

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092363** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2020.12.29**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.04.03**

(51) Int. Cl. **C07K 14/015** (2006.01)  
**C12N 15/35** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/864** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

(54) **УКЛОНЯЮЩИЕСЯ ОТ АНТИТЕЛ ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ**

(31) **62/652,111; 62/776,814; 62/819,388**

(32) **2018.04.03; 2018.12.07; 2019.03.15**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/025617**

(87) **WO 2019/195449 2019.10.10**

(71) Заявитель:

**СТРАЙДБАЙО, ИНК. (US)**

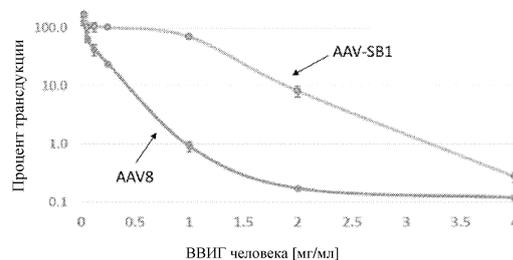
(72) Изобретатель:

**Маккой Дэниел, Бэрри Гаррет И. (US)**

(74) Представитель:

**Носырева Е.Л. (RU)**

(57) В настоящем изобретении предложены рекомбинантные капсидные белки AAV, содержащие модификацию в аминокислотной последовательности, и вирусные векторы, содержащие рекомбинантные капсидные белки AAV. В изобретении также предложены способы введения вирусных векторов и вирусных капсидов по изобретению в клетку или субъекту in vivo.



**A1**

**202092363**

**202092363**

**A1**

P87745479EA

## УКЛОНЯЮЩИЕСЯ ОТ АНТИТЕЛ ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/819,388, поданной 15 марта 2019 г., предварительной заявке на патент США № 62/776,814, поданной 7 декабря 2018 г., предварительной заявке на патент США № 62/652,111, поданной 3 апреля 2018 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки для всех целей.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к модифицированным капсидным белкам из аденоассоциированного вируса (AAV), а также к содержащим их вирусным капсидам и вирусным векторам. В частности, изобретение относится к модифицированным капсидным белкам AAV и содержащим их капсидам, которые могут быть встроены в вирусные векторы для придания фенотипа уклонения от нейтрализующих антител без снижения эффективности трансдукции.

### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Рассматриваемая в настоящий момент заявка содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный в данный документ в полном объеме путем ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 3 апреля 2019 года, называется STRD\_006\_03WO\_SeqList\_ST25.txt и имеет размер ~ 2 МВ.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Полученные от хозяина ранее существовавшие антитела, генерируемые при естественном контакте с AAV или рекомбинантными векторами AAV, препятствуют первому, а также повторному введению векторов AAV в качестве вакцин и/или для генной терапии. Серологические исследования демонстрируют высокую

распространенность антител в человеческой популяции во всем мире: около 67% людей имеют антитела против AAV1, 72% против AAV2 и около 40% против AAV5–AAV9.

[0005] Кроме того, при генной терапии в некоторых клинических сценариях, включающих сайленсинг гена или дегенерацию ткани, может потребоваться многократное введение вектора AAV для поддержания долгосрочной экспрессии трансгена. Чтобы обойти эти проблемы, необходимы рекомбинантные векторы AAV, которые ускользают от распознавания антителами (AAV<sub>e</sub>). Такие векторы помогут: а) расширить соответствующую критериям когорту пациентов, подходящих для генной терапии на основе AAV, и б) обеспечить возможность многократного повторного введения векторов для генной терапии на основе AAV.

[0006] В настоящем изобретении предложены способы и композиции, содержащие капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий одну или более аминокислотных замен, при этом замены внедряют в вектор AAV, содержащий упомянутые модифицированные капсидные белки, способность уклоняться от антител хозяина.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В настоящем изобретении предложены капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), содержащие одну или более аминокислотных модификаций, причем одна или более аминокислотных модификаций модифицируют один или более антигенных участков на капсидном белке AAV. В некоторых вариантах осуществления, в которых капсидные белки AAV встроены в векторы AAV, модификация одного или более антигенных участков приводит к уклонению от нейтрализующих антител.

[0008] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен рекомбинантный капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок содержит в антигенном участке капсидного белка AAV, при этом замена имеет последовательность любой из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 или 411–421. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV имеет серотип AAV, выбранный из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV или бычьего AAV. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV является химерным.

[0009] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен рекомбинантный капсидный белок AAV, где капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с любой одной из SEQ ID NO: 18–80, 300–612 или 783–785.

[0010] В настоящем изобретении также предложены нуклеотидная последовательность или содержащий ее экспрессионный вектор, которые кодируют один или более капсидных белков AAV по изобретению. В настоящем изобретении также предложена клетка, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей или экспрессионных векторов по изобретению.

[0011] В настоящем изобретении также предложен капсид AAV, содержащий капсидный белок AAV по этому изобретению. Дополнительно в настоящем изобретении предложен вирусный вектор, содержащий капсид AAV по этому изобретению, а также композиция, содержащая капсидный белок AAV, капсид AAV и/или вирусный вектор по этому изобретению, в фармацевтически приемлемом носителе.

[0012] В настоящем изобретении дополнительно предложен способ введения нуклеиновой кислоты в клетку в присутствии антител против капсида AAV, включающий приведение клетки в контакт с вирусным вектором по этому изобретению. Клетка может находиться в организме субъекта, и при этом в некоторых вариантах осуществления субъект может представлять собой субъекта-человека.

[0013] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения пациента, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества вирусного вектора AAV по изобретению.

[0014] Эти и другие аспекты рассматриваются более подробно в подробном описании, представленном ниже.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0015] Фиг. 1А и Фиг. 1В. Пузырьковые диаграммы, демонстрирующие анализ разнообразия библиотек, направленной эволюции и обогащения новыми областями

узнавания антигенов. Библиотеки родительских (фиг. 1A) и эволюционировавших (фиг. 1B) белков AAV подвергали высокопроизводительному секвенированию с использованием платформы Illumina MiSeq. После анализа с помощью специального сценария Perl были нанесены на график обогащенные аминокислотные последовательности. Каждый пузырек представляет собой отдельную аминокислотную последовательность капсида, при этом радиус пузырька пропорционален количеству считываний для этого варианта в соответствующей библиотеке. На оси y представлено абсолютное количество считываний, приведенное к логарифму с основанием 2. Данные распределены по оси x для облегчения визуализации. Процентное снижение количества уникальных клонов (93,4%) демонстрирует, что многочисленные «неподходящие» последовательности после первого цикла эволюции были удалены.

[0016] Фиг. 2A, Фиг. 2B, Фиг. 2C и Фиг. 2D. Фиг. 2A представляет собой пузырьковую диаграмму, показывающую родительскую (входную) библиотеку для первого раунда эволюции. Фиг. 2B представляет собой пузырьковую диаграмму, показывающую выходную библиотеку для первого раунда эволюции, которая использовалась в качестве входной библиотеки для второго раунда эволюции. Фиг. 2C представляет собой пузырьковую диаграмму, показывающую выходную библиотеку для второго раунда эволюции, которая использовалась в качестве входной библиотеки для третьего раунда эволюции. Фиг. 2D представляет собой пузырьковую диаграмму, показывающую выходную библиотеку для третьего раунда эволюции, которая представляет собой общее сокращение уникальных клонов на 97,3% по сравнению с родительской библиотекой, показанной на фиг. 2A. Примечательно, что на фиг. 2A и 2B показаны те же данные, что и на фиг. 1A и 1B, соответственно, но данные были нормализованы до процента от общего числа считываний, что позволяет проводить продольное сравнение на последующих этапах эволюции.

[0017] Фиг. 3. Экспрессия люциферазы в гепатоцитах человека (HepG2, Huh7) после инфицирования рекомбинантными AAV (AAV-SB1, AAV-SB2, AAV-SB3, AAV-SB4, AAV-SB5) в дозе 10000 мкг/клетку.

[0018] Фиг. 4. Нейтрализация рекомбинантных AAV (AAV-SB1, AAV-SB2, AAV-SB3, AAV-SB4, AAV-SB5) человеческим внутривенным иммуноглобулином (ВВИГ) по сравнению с нейтрализацией родительского AAV8. Данные представлены в виде трансдукции после обработки ВВИГ в процентах от трансдукции без обработки ВВИГ.

[0019] Фиг. 5. Кривая, показывающая процент трансдукции (т. е. степень нейтрализации) родительских AAV8 и AAV-SB1 после обработки различными дозами IVIG (0–4 мг/мл).

[0020] Фиг. 6А. Процент донорских образцов (всего 100 образцов), которые нейтрализовали и не нейтрализовали указанные капсиды. Фиг. 6В. Распределение выборок серопозитивных доноров по возрастным группам.

[0021] Фиг. 7. Репрезентативные иммуногистохимические (ИГХ) изображения печени нормальных мышей после инфицирования родительским AAV8 или AAV-SB1 в дозе  $3 \times 10^{12}$  вг/мл.

[0022] Фиг. 8. Репрезентативные изображения флуоресцентной микроскопии клеток U87 через 48 часов после трансдукции родительскими векторами AAV8, AAV-SB1 или AAV-SB6, упаковывающими GFP при MOI 40 000. Типичное изображение, полученное с помощью световой микроскопии, также показано для справки.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0023] Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно подразумевается средним специалистом в той области, к которой относится данное изобретение. Терминология, используемая в разделе «Подробное описание сущности изобретения» настоящего документа, применяется только для описания конкретных вариантов и не подразумевает ограничения.

[0024] Все публикации, патентные заявки, патенты, номера доступа в базе данных GenBank или других базах данных, а также другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены в него в полном объеме посредством ссылки.

[0025] Обозначение всех положений аминокислот в капсидных белках AAV в описании и прилагаемой формуле изобретения соответствует нумерации субъединиц капсида VP1. Специалистам в данной области будет понятно, что описанные в настоящем документе модификации, если они вставлены в ген капсида AAV, могут привести к модификациям субъединиц VP1, VP2 и/или VP3 капсида. Альтернативно, субъединицы капсида могут быть независимо экспрессированы для достижения модификации только

в одной или двух субъединицах капсида (VP1, VP2, VP3, VP1 + VP2, VP1 + VP3 или VP2 + VP3).

#### Определения

[0026] В описании и в прилагаемой формуле изобретения используются приведенные ниже термины.

[0027] Если из контекста явно не следует иное, формы единственного числа включают формы множественного числа.

[0028] Кроме того, термин «приблизительно», используемый в настоящем документе в отношении измеряемой величины, например в отношении показателя длины полинуклеотидной или полипептидной последовательности, дозы, времени, температуры и т. п., охватывает вариации указанного показателя  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,5\%$  или даже  $\pm 0,1\%$ .

[0029] Также в контексте настоящего документа термин «и/или» относится ко всем и каждой возможной комбинации одного или более связанных перечисляемых элементов, а также к отсутствию комбинаций при интерпретации в виде альтернативы («или») и охватывает их.

[0030] Если контекст не указывает на иное, специально предполагается, что различные признаки, описанные в данном документе, могут использоваться в любой комбинации.

[0031] Кроме того, в настоящем изобретении также предполагается, что в некоторых вариантах осуществления любой признак или комбинация признаков, представленных в данном документе, могут быть исключены или опущены. Информация для дополнительной иллюстрации: если, например, в описании указано, что конкретная аминокислота может быть выбрана из A, G, I, L и/или V, это выражение также означает, что аминокислота может быть выбрана из любого подмножества этих аминокислот, например, из A, G, I или L; A, G, I или V; A или G; только L; и т. п., как если бы каждая такая подкомбинация прямо указана в данном документе. Более того, такая формулировка также означает отрицание возможности наличия одной или более указанных аминокислот. Например, в конкретных вариантах осуществления аминокислота не является A, G или I; не является G или V; и т. д., как если бы каждое такое возможное отрицание наличия было бы прямо изложено в настоящем документе.

[0032] В контексте настоящего документа термины «уменьшать», «уменьшает», «уменьшение» и подобные термины означают уменьшение по меньшей мере приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 35%, приблизительно на 50%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 97% или более.

[0033] В контексте настоящего документа, термины «повысить», «повышает», «повышение» и аналогичные термины указывают на увеличение по меньшей мере приблизительно на 10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 50%, приблизительно на 75%, приблизительно на 100%, приблизительно на 150%, приблизительно на 200%, приблизительно на 300%, приблизительно на 400%, приблизительно на 500% или более.

[0034] В контексте настоящего документа термин «парвовирус» охватывает семейство Parvoviridae, включая автономно реплицирующиеся парвовирусы и зависимые вирусы. Автономные парвовирусы включают представителей родов *Protoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Vocaparvovirus*, и подсемейства *Densovirus*. Иллюстративные автономные парвовирусы включают, без ограничений, мелкий вирус мышей, парвовирус крупного рогатого скота, парвовирус собак, парвовирус курицы, вирус панлейкопении кошек, парвовирус кошек, парвовирус гусей, парвовирус H1, парвовирус мускусных уток, вирус B19 и любой другой автономный парвовирус, известный в настоящее время или тот, который будет открыт позже. Другие автономные парвовирусы известны специалистам в данной области. См. например, BERNARD N. FIELDS et al, VIROLOGY, том 2, глава 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers; Cotmore et al. Archives of Virology DOI 10.1007/S00705-013-1914-1).

[0035] В контексте настоящего документа термин «аденоассоциированный вирус» (AAV), включает, без ограничений, AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAV типа rh32.33, AAV типа rh8, AAV типа rh10, AAV типа rh74, AAV типа hu.68, птичий AAV, бычий AAV, собачий AAV, лошадиный AAV, овечий AAV, змеиный AAV, AAV бородатой ящерицы, AAV2i8, AAV2g9, AAV-LK03, AAV7m8, AAV Anc80, AAV PHP.B и другие

AAV, известные в настоящее время или те, которые будут открыты позже. См. например, BERNARD N. FIELDS et al, VIROLOGY, том 2, глава 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers). Идентифицирован ряд серотипов и клад (систематических категорий) AAV (см., например, Gao et al, (2004) J. Virology 78:6381-6388; Moris et al, (2004) Virology 33-:375-383; и таблица 2).

[0036] В контексте настоящего документа термин «химерный AAV» относится к AAV, содержащему капсидный белок с областями, доменами, отдельными аминокислотами, полученными из двух или более различных серотипов AAV. В некоторых вариантах осуществления химерный AAV содержит капсидный белок, состоящий из первой области, полученной из первого серотипа AAV, и второй области, полученной из второго серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления химерный AAV содержит капсидный белок, состоящий из первой области, полученной из первого серотипа AAV, второй области, полученной из второго серотипа AAV, и третьей области, полученной из третьего серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления химерный AAV может содержать области, домены, отдельные аминокислоты, полученные из двух или более AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и/или AAV12. Например, химерный AAV может включать в себя области, домены и/или отдельные аминокислоты из первого и второго серотипов AAV, как показано ниже (таблица 1), где AAVX+Y означает химерный AAV, включающий в себя последовательности, полученные из AAVX и AAVY.

ТАБЛИЦА 1. Химерные AAV

		Второй серотип ААV											
Первый серотип ААV		AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9	AAV10	AAV11	AAV12
	AAV1	X	AAV1 + 2	AAV1 + 3	AAV1 + 4	AAV1 + 5	AAV1 + 6	AAV1 + 7	AAV1 + 8	AAV1 + 9	AAV1 + 10	AAV1 + 11	AAV1 + 12
	AAV2	AAV2 + 1	X	AAV2 + 3	AAV2 + 4	AAV2 + 5	AAV2 + 6	AAV2 + 7	AAV2 + 8	AAV2 + 9	AAV2 + 10	AAV2 + 11	AAV2 + 12
	AAV3	AAV3 + 1	AAV3 + 2	X	AAV3 + 4	AAV3 + 5	AAV3 + 6	AAV3 + 7	AAV3 + 8	AAV3 + 9	AAV3 + 10	AAV3 + 11	AAV3 + 12
	AAV4	AAV4 + 1	AAV4 + 2	AAV4 + 3	X	AAV4 + 5	AAV4 + 6	AAV4 + 7	AAV4 + 8	AAV4 + 9	AAV4 + 10	AAV4 + 11	AAV4 + 12
	AAV5	AAV5 + 1	AAV5 + 2	AAV5 + 3	AAV5 + 4	X	AAV5 + 6	AAV5 + 7	AAV5 + 8	AAV5 + 9	AAV5 + 10	AAV5 + 11	AAV5 + 12
	AAV6	AAV6 + 1	AAV6 + 2	AAV6 + 3	AAV6 + 4	AAV6 + 5	X	AAV6 + 7	AAV6 + 8	AAV6 + 9	AAV6 + 10	AAV6 + 11	AAV6 + 12
	AAV7	AAV7 + 1	AAV7 + 2	AAV7 + 3	AAV7 + 4	AAV7 + 5	AAV7 + 6	X	AAV7 + 8	AAV7 + 9	AAV7 + 10	AAV7 + 11	AAV7 + 12
	AAV8	AAV8 + 1	AAV8 + 2	AAV8 + 3	AAV8 + 4	AAV8 + 5	AAV8 + 6	AAV8 + 7	X	AAV8 + 9	AAV8 + 10	AAV8 + 11	AAV8 + 12
	AAV9	AAV9 + 1	AAV9 + 2	AAV9 + 3	AAV9 + 4	AAV9 + 5	AAV9 + 6	AAV9 + 7	AAV9 + 8	X	AAV9 + 10	AAV9 + 11	AAV9 + 12
	AAV10	AAV10 + 1	AAV10 + 2	AAV10 + 3	AAV10 + 4	AAV10 + 5	AAV10 + 6	AAV10 + 7	AAV10 + 8	AAV10 + 9	X	AAV10 + 11	AAV10 + 12
	AAV11	AAV11 + 1	AAV11 + 2	AAV11 + 3	AAV11 + 4	AAV11 + 5	AAV11 + 6	AAV11 + 7	AAV11 + 8	AAV11 + 9	AAV11 + 10	X	AAV11 + 12
	AAV12	AAV12 + 1	AAV12 + 2	AAV12 + 3	AAV12 + 4	AAV12 + 5	AAV12 + 6	AAV12 + 7	AAV12 + 8	AAV12 + 9	AAV12 + 10	AAV12 + 11	X

[0037] Посредством включения в один капсидный белок отдельных аминокислот или областей из множества серотипов AAV, можно получить капсидные белки, обладающие множеством желаемых свойств, полученных отдельно из множества серотипов AAV.

[0038] Геномные последовательности различных серотипов AAV и автономных парвовирусов, а также последовательности нативных концевых повторов (TR), белков Rep и субъединиц капсида известны в данной области. Информацию о таких последовательностях можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. См., например, номера доступа в базе данных GenBank NC\_002077, NC\_001401, NC\_001729, NC\_001863, NC\_001829, NC\_001862, NC\_000883, NC\_001701, NC\_001510, NC\_006152, NC\_006261, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC\_001358, NC\_001540, AF513851, AF513852, AY530579; описания которых включены в настоящий документ путем ссылки для предоставления информации о последовательностях нуклеиновых кислот и аминокислот парвовируса и AAV. См., например, также публикации Srivistava et al., (1983) *J. Virology* 45:555; Chiorini et al., (1998) *J. Virology* 71:6823; Chiorini et al., (1999) *J. Virology* 73: 1309; Bantel-Schaal et al., (1999) *J. Virology* 73:939; Xiao et al., (1999) *J. Virology* 73:3994; Muramatsu et al., (1996) *Virology* 221:208; Shade et al., (1986) *J. Virol.* 58:921; Gao et al., (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:11854; Moris et al., (2004) *Virology* 33:375–383; международные патентные публикации WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; и патент США № 6,156,303; описания которых включены в настоящий документ путем ссылки для предоставления информации о последовательностях нуклеиновых кислот и аминокислот парвовируса и AAV. См. также таблицу 2. Структуры капсида автономных парвовирусов и AAV более подробно описаны в публикации BERNARD N. FIELDS et al., *VIROLOGY*, том 2, главы 69 и 70 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers). См. также описание кристаллической структуры AAV2 (Xie et al., (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 10405-10), AAV9 (DiMattia et al., (2012) *J. Virol.* 86:6947-6958), AAV8 (Nam et al., (2007) *J. Virol.* 81: 12260-12271), AAV6 (Ng et al., (2010) *J. Virol.* 84:12945-12957), AAV5 (Govindasamy et al. (2013) *J. Virol.* 87, 11187-11199), AAV4 (Govindasamy et al. (2006) *J. Virol.* 80:11556-11570), AAV3B (Lerch et al., (2010) *Virology* 403:26-36), BPV (Kailasan et al., (2015) *J. Virol.* 89:2603-2614) и CPV (Xie et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 6:497-520 и Tsao et al., (1991) *Science* 251:1456-64).

ТАБЛИЦА 2

	Номер доступа в базе данных GenBank		Номер доступа в базе данных GenBank		Номер доступа в базе данных GenBank
Полные геномы		Клада C		Rh57	AY530569
Аденоассоциированный вирус 1	NC_002077, AF063497	Hu9	AY530629	Rh50	AY530563
Аденоассоциированный вирус 2	NC_001401	Hu10	AY530576	Rh49	AY530562
Аденоассоциированный вирус 3	NC_001729	Hu11	AY530577	Hu39	AY530601
Аденоассоциированный вирус 3B	NC_001863	Hu53	AY530615	Rh58	AY530570
Аденоассоциированный вирус 4	NC_001829	Hu55	AY530617	Rh61	AY530572
Аденоассоциированный вирус 5	Y18065, AF085716	Hu54	AY530616	Rh52	AY530565
Аденоассоциированный вирус 6	NC_001862	Hu7	AY530628	Rh53	AY530566
Птичий AAV, ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828	Hu18	AY530583	Rh51	AY530564
Птичий AAV, штамм DA-1	NC_006263, AY629583	Hu15	AY530580	Rh64	AY530574
Бычий AAV	NC_005889, AY388617, AAR26465	Hu16	AY530581	Rh43	AY530560
AAV11	AAT46339, AY631966	Hu25	AY530591	AAV8	AF513852

AAV12	ABI16639, DQ813647	Hu60	AY530622	Rh8	AY242997
Клада А		Ch5	AY243021	Rh1	AY530556
AAV1	NC 002077, AF063497	Hu3	AY530595	Клада F	
AAV6	NC_001862	Hu1	AY530575	Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu.48	AY530611	Hu4	AY530602	Hu31	AY530596
Hu 43	AY530606	Hu2	AY530585	Hu32	AY530597
Hu 44	AY530607	Hu61	AY530623	HSC1	MI332400.1
Hu 46	AY530609	Клада D		HSC2	MI332401.1
Клада B		Rh62	AY530573	HSC3	MI332402.1
Hu. 19	AY530584	Rh48	AY530561	HSC4	MI332403.1
Hu. 20	AY530586	Rh54	AY530567	HSC5	MI332405.1
Hu 23	AY530589	Rh55	AY530568	HSC6	MI332404.1
Hu22	AY530588	Cy2	AY243020	HSC7	MI332407.1
Hu24	AY530590	AAV7	AF513851	HSC8	MI332408.1
Hu21	AY530587	Rh35	AY243000	HSC9	MI332409.1
Hu27	AY530592	Rh37	AY242998	HSC11	MI332406.1
Hu28	AY530593	Rh36	AY242999	HSC12	MI332410.1
Hu 29	AY530594	Cy6	AY243016	HSC13	MI332411.1
Hu63	AY530624	Cy4	AY243018	HSC14	MI332412.1
Hu64	AY530625	Cy3	AY243019	HSC15	MI332413.1
Hu13	AY530578	Cy5	AY243017	HSC16	MI332414.1
Hu56	AY530618	Rh13	AY243013	HSC17	MI332415.1
Hu57	AY530619	Клада E		Hu68	
Hu49	AY530612	Rh38	AY530558	Клональный изолят	

Hu58	AY530620	Hu66	AY530626	AAV5	Y18065, AF085716
Hu34	AY530598	Hu42	AY530605	AAV 3	NC_001729
Hu35	AY530599	Hu67	AY530627	AAV3B	NC 001863
AAV2	NC_001401	Hu40	AY530603	AAV4	NC_001829
Hu45	AY530608	Hu41	AY530604	Rh34	AY243001
Hu47	AY530610	Hu37	AY530600	Rh33	AY243002
Hu51	AY530613	Rh40	AY530559	Rh32	AY243003
Hu52	AY530614	Rh2	AY243007	Другие	
Hu T41	AY695378	Bb1	AY243023	Rh74	
Hu S17	AY695376	Bb2	AY243022	AAV бородатой ящерицы	
Hu T88	AY695375	Rh10	AY243015	Змеиный AAV	NC_006148.1
Hu T71	AY695374	Hu17	AY530582		
Hu T70	AY695373	Hu6	AY530621		
Hu T40	AY695372	Rh25	AY530557		
Hu T32	AY695371	Pi2	AY530554		
Hu T17	AY695370	Pi1	AY530553		
Hu LG15	AY695377	Pi3	AY530555		

[0039] В контексте настоящего документа термин «тропизм» относится к предпочтительному входу вируса в конкретные типы клеток или тканей необязательно с последующей экспрессией (например, транскрипцией и, необязательно, трансляцией) последовательности (-ей), переносимой (-ых) вирусным геномом в клетку, например в случае рекомбинантного вируса, экспрессией гетерологичной (-ых) нуклеиновой (-ых) кислоты (кислот), представляющей (-их) интерес.

[0040] Специалистам в данной области будет понятно, что инициация транскрипции последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты из вирусного генома может не происходить в отсутствие транс-действующих факторов, например, в случае индуцируемого промотора или иным образом регулируемой последовательности нуклеиновой кислоты. В случае генома гAAV, экспрессия гена из вирусного генома может происходить из стабильно интегрированного провируса, из неинтегрированной эписомы, а также из любой другой формы, которую нуклеиновая кислота вируса может принимать внутри клетки.

[0041] В контексте настоящего документа термины «системный тропизм» и «системная трансдукция» (и эквивалентные термины) означают, что вирусный капсид или вирусный вектор по изобретению проявляет тропизм или трансдуцирует, соответственно, ткани во всем организме (например, головной мозг, легкие, скелетные мышцы, сердце, печень, почки и/или поджелудочная железа). В вариантах осуществления наблюдается системная трансдукция мышечных тканей (например, скелетной мышцы, диафрагмы и сердечной мышцы). В других вариантах осуществления достигается системная трансдукция тканей скелетных мышц. Например, в конкретных вариантах осуществления происходит трансдукция по существу всех скелетных мышц всего тела (хотя эффективность трансдукции может варьироваться в зависимости от типа мышцы). В конкретных вариантах осуществления достигается системная трансдукция мышц конечностей, сердечной мышцы и мышцы диафрагмы. Необязательно, вирусный капсид или вирусный вектор вводят системным путем (например, таким системным путем, как внутривенный, внутрисуставной или внутрилимфатический).

[0042] Альтернативно, в других вариантах осуществления капсид или вирусный вектор доставляют локально (например, в подушечку стопы, внутримышечно, внутрикожно, подкожно, местно).

[0043] Если не указано иное, термины «эффективная трансдукция», или «эффективный тропизм», или аналогичные термины, могут быть определены со ссылкой на подходящий контроль (например, по меньшей мере приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или более от трансдукции или тропизма, соответственно, контроля). В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор

эффективно трансдуцирует или обладает эффективным тропизмом в отношении скелетной мышцы, сердечной мышцы, мышцы диафрагмы, поджелудочной железы (включая островковые клетки), селезенки, желудочно-кишечного тракта (например, эпителия и/или гладких мышц), клеток центральной нервной системы, легких, клеток суставов и/или почек. Подходящие контроли будут зависеть от множества факторов, включая желаемый профиль тропизма. Например, AAV8 и AAV9 очень эффективны при трансдукции скелетной мышцы, сердечной мышцы и мышцы диафрагмы, но имеют недостаток, заключающийся в том, что они также с высокой эффективностью трансдуцируют печень. Таким образом, можно идентифицировать вирусные векторы, которые демонстрируют эффективную трансдукцию AAV8 или AAV9 скелетных мышц, сердечной мышцы и/или мышцы диафрагмы, но с гораздо более низкой эффективностью трансдукции печени. Кроме того, поскольку представляющий интерес профиль тропизма может отражать тропизм к множеству тканей-мишеней, следует понимать, что подходящий вектор может представлять некоторые компромиссы. Для иллюстрации: вирусный вектор по изобретению может быть менее эффективным в трансдукции скелетной мышцы, сердечной мышцы и/или мышцы диафрагмы, чем AAV8 или AAV9, однако благодаря низкому уровню трансдукции печени, он может быть очень желательным.

[0044] Точно так же термины, описывающие, что вирус «не осуществляет эффективную трансдукцию» или «не обладает эффективным тропизмом» в отношении ткани-мишени или аналогичные термины могут быть определены со ссылкой на подходящий контроль. В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор не осуществляет эффективную трансдукцию (т. е. не обладает эффективным тропизмом в отношении) печени, почек, гонад и/или половых клеток. В конкретных вариантах осуществления, нежелательная трансдукция ткани(тканей) (например, печени) составляет приблизительно 20% или менее, приблизительно 10% или менее, приблизительно 5% или менее, приблизительно 1% или менее, приблизительно 0,1% или менее от уровня трансдукции желательной ткани-мишени (тканей-мишеней) (например, скелетных мышц, сердечной мышцы, мышцы диафрагмы и/или клеток центральной нервной системы).

[0045] В контексте настоящего документа термин «полипептид» охватывает как пептиды, так и белки, если не указано иначе.

[0046] «Полинуклеотид» представляет собой последовательность нуклеотидных оснований, и может представлять собой последовательности РНК, ДНК или гибридные последовательности ДНК-РНК (включая как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе нуклеотиды), но в типичных вариантах осуществления представляют собой одноцепочечные или двухцепочечные последовательности ДНК.

[0047] В контексте настоящего документа термин «выделенный» полинуклеотид (например, «выделенная ДНК» или «выделенная РНК») означает полинуклеотид, по меньшей мере частично отделенный от по меньшей мере некоторых из других компонентов природного организма или вируса, например структурных компонентов клетки или вируса, или других полипептидов или нуклеиновых кислот, обычно обнаруживаемых в связи с полинуклеотидом. В иллюстративных вариантах осуществления «выделенный» нуклеотид обогащен по меньшей мере приблизительно в 10 раз, приблизительно в 100 раз, приблизительно в 1000 раз, приблизительно в 10 000 раз или более по сравнению с исходным материалом.

[0048] Подобным образом, «выделенный» полипептид обозначает полипептид, по меньшей мере частично отделенный от по меньшей мере некоторых из других компонентов природного организма или вируса, например структурных компонентов клетки или вируса, или других полипептидов или нуклеиновых кислот, обычно обнаруживаемых в связи с полипептидом. В иллюстративных вариантах осуществления «выделенный» полипептид обогащен по меньшей мере приблизительно в 10 раз, приблизительно в 100 раз, приблизительно в 1000 раз, приблизительно в 10 000 раз или более по сравнению с исходным материалом.

[0049] В контексте настоящего документа термины «выделить» или «очистить» вирусный вектор (или их грамматические эквиваленты) означают, что вирусный вектор по меньшей мере частично отделен от по меньшей мере некоторых других компонентов исходного материала. В иллюстративных вариантах осуществления «выделенный» или «очищенный» вирусный вектор обогащен по меньшей мере приблизительно в 10 раз, приблизительно в 100 раз, приблизительно в 1000 раз, приблизительно в 10 000 раз или более по сравнению с исходным материалом.

[0050] «Терапевтический полипептид» представляет собой полипептид, который может облегчать, уменьшать, предотвращать, задерживать развитие и/или стабилизировать

симптомы, возникающие в результате отсутствия или дефекта белка в клетке или у субъекта, или полипептид, иным образом обеспечивающий преимущество для субъекта, например, противораковые эффекты или улучшение приживаемости трансплантата.

[0051] Под термином «лечить», «подвергать лечению» или «лечение» (или грамматически эквивалентными терминами) понимают, что тяжесть состояния субъекта уменьшают или по меньшей мере частично улучшают или стабилизируют, и/или что достигают некоторого облегчения, смягчения, уменьшения или стабилизации по меньшей мере одного клинического симптома, и/или что присутствует задержка прогрессирования заболевания или расстройства.

[0052] Термины «предотвращать», «предотвращает» или «предотвращение» (и их грамматические эквиваленты) относятся к задержке начала заболевания, расстройства и/или появления клинического (-их) симптома (-ов) у субъекта и/или к снижению тяжести начала заболевания, расстройства и/или клинического (-их) симптома (-ов) по сравнению с тем, что было бы в отсутствие способов по изобретению. Предотвращение может быть полным, например, при полном отсутствии заболевания, расстройства и/или клинического (-их) симптома (-ов). Предотвращение также может быть частичным, таким, что возникновение заболевания, расстройства и/или клинического (-их) симптома (-ов) у субъекта и/или тяжесть начала является меньше, чем могли бы быть в отсутствие настоящего изобретения.

[0053] В контексте настоящего документа термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере клинического симптома заболевания является достаточным для обеспечения такого лечения заболевания или его симптома. «Терапевтически эффективное количество» может изменяться в зависимости, например, от заболевания и/или симптомов заболевания, тяжести заболевания и/или симптомов заболевания или расстройства, возраста, массы тела и/или состояния здоровья пациента, подлежащего лечению, и решения лечащего врача. Подходящее количество в любом конкретном случае может быть установлено специалистами в данной области или может быть определено обычным экспериментированием.

[0054] В контексте настоящего документа термины «вирусный вектор», «вектор» или «вектор для доставки гена» относятся к вирусной частице (например, AAV), которая функционирует в качестве носителя для доставки нуклеиновой кислоты, и которая содержит геном вектора (например, вирусную ДНК [вДНК]), упакованную внутри вириона. Альтернативно, в некоторых контекстах термин «вектор» может использоваться для обозначения генома вектора/только вДНК.

[0055] «Рекомбинантный геном вектора AAV (гAAV)» или «геном гAAV» представляет собой геном AAV (т. е. вДНК), который содержит одну или более последовательностей гетерологичных нуклеиновых кислот. Для получения вируса векторам гAAV обычно необходим (-ы) концевой (-ые) повтор (-ы) (TR) в цис-положении. Все другие вирусные последовательности являются необязательными и могут быть предоставлены в транс-положении (Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97). Обычно геном вектора гAAV будет сохранять только одну или более последовательностей TR, чтобы максимально увеличить размер трансгена, который может быть эффективно упакован вектором. Последовательности, кодирующие структурный и неструктурный белок, могут быть предоставлены в транс-форме (например, из вектора, такого как плаزمид, или путем стабильной интеграции последовательностей в упаковывающую клетку). В вариантах осуществления геном вектора гAAV содержит по меньшей мере одну последовательность TR (например, последовательность TR AAV), необязательно две TR (например, две TR AAV), которые, как правило, могут находиться на 5'- и 3'-концах векторного генома и фланкировать гетерологичную нуклеиновую кислоту, но не обязательно должны быть смежными с ней. TR могут быть одинаковыми или могут отличаться друг от друга.

[0056] Термин «концевой повтор» или «TR» включает любой вирусный концевой повтор или синтетическую последовательность, которые формируют структуру шпильки и функционируют в качестве инвертированного концевого повтора (т. е. опосредуют желательные функции, такие как репликация, упаковка, интеграция вируса и/или восстановление провируса и т. п.). TR может представлять собой TR AAV или TR, не относящийся к AAV. Например, не относящуюся к AAV последовательность TR, такую как последовательность из других парвовирусов (например, собачьего парвовируса (CPV), мышинового парвовируса (MVM), человеческого парвовируса B-19) или последовательность из любого другого подходящего вируса (например, шпильку

SV40, которая служит точкой начала репликации SV40), можно использовать в качестве TR, который можно дополнительно модифицировать посредством усечения, замены, делеции, вставки и/или добавления. Кроме того, TR может быть частично или полностью синтетическим, таким как «двойная-D последовательность», как описано в патенте США № 5,478,745 от Samulski et al.

[0057] «Концевой повтор AAV» или «TR AAV» могут происходить из любого AAV, включая, но без ограничений, серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или любой другой AAV, известный в настоящее время или тот, который будет открыт позже (см., например, таблицу 2). Концевой повтор AAV необязательно должен представлять собой последовательность нативного концевого повтора (например, последовательность нативного TR AAV можно изменять посредством вставки, делеции, усечения и/или мутаций с изменением смысла), при условии, что концевой повтор опосредует желательные функции, например, репликацию, упаковку, интеграцию вируса и/или восстановление провируса и т. п.

[0058] Вирусные векторы по изобретению могут быть дополнительно «нацеленными» вирусными векторами (например, имеющими направленный тропизм) и/или «гибридными» парвовирусами (т. е. теми, в которых вирусные TR и вирусный капсид происходят из разных парвовирусов), как описано в международной патентной публикации WO 00/28004 и в Chao et al, (2000) *Molecular Therapy* 2:619.

[0059] Вирусные векторы по изобретению могут дополнительно представлять собой дуплексные парвовирусные частицы, как описано в международной патентной публикации WO 01/92551 (описание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления двухцепочечные (дуплексные) геномы могут быть упакованы в вирусные капсиды по изобретению. Кроме того, вирусный капсид или геномные элементы могут содержать другие модификации, включая вставки, делеции и/или замены.

[0060] В контексте настоящего документа термин «аминокислота» охватывает любую встречающуюся в природе аминокислоту, ее модифицированные формы и синтетические аминокислоты.

[0061] Встречающиеся в природе левовращающие (L-) аминокислоты показаны в таблице 3.

ТАБЛИЦА 3. Аминокислотные остатки и сокращения.

Аминокислотный остаток	Сокращение	
	Трехбуквенный код	Однобуквенный
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота (аспартат)	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота (глутамат)	Glu	E
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

[0062] Альтернативно, аминокислота может иметь модифицированный аминокислотный остаток (неограничивающие примеры показаны в таблице 4) и/или может быть аминокислотой, которая была модифицирована посредством посттрансляционной модификации (например, ацетилированием, амидированием, формилированием, гидроксिलированием, метилированием, фосфорилированием или сульфатированием).

ТАБЛИЦА 4. Модифицированные аминокислотные остатки

Модифицированный аминокислотный остаток	Сокращение
Производные аминокислотных остатков	
2-Аминооадипиновая кислота	Aad

3-Аминооадипиновая кислота	bAad
бета-Аланин, бета-аминопропионовая кислота	bAla
2-Аминомасляная кислота	Abu
4-Аминомасляная кислота, пиперидиновая кислота	4Abu
6-Аминокапроновая кислота	Acp
2-Аминогептановая кислота	Ahe
2-Аминоизомасляная кислота	Aib
3-Аминоизомасляная кислота	bAib
2-Аминопимелиновая кислота	Apm
т-Бутилаланин	t-BuA
Цитруллин	Cit
Циклогексилаланин	Cha
2,4-Диаминомасляная кислота	Dbu
Десмозин	Des
2,21-Диаминопимелиновая кислота	Dpm
2,3-Диаминопропионовая кислота	Dpr
N-Этилглицин	EtGly
N-Этиласпарагин	EtAsn
Гомоаргинин	hArg
Гомоцистеин	hCys
Гомосерин	hSer
Гидроксилизин	Hyl
Алло-гидроксилизин	aHyl
3-Гидроксипролин	3Hyp
4-Гидроксипролин	4Hyp
Изодезмозин	Ide

Алло-изолейцин	alle
Сульфоксид метионина	MSO
N-метилглицин, саркозин	MeGly
N-Метилизолейцин	Melle
6-N-Метиллизин	MeLys
N-Метилвалин	MeVal
2-Нафтилаланин	2-Nal
Норвалин	Nva
Норлейцин	Nle
Орнитин	Orn
4-Хлорфенилаланин	Phe(4-C1)
2-Фторфенилаланин	Phe(2-F)
3-Фторфенилаланин	Phe(3-F)
4-Фторфенилаланин	Phe(4-F)
Фенилглицин	Phg
Бета-2-тиенилаланин	Thi

[0063] Кроме того, не встречающаяся в природе аминокислота может быть «неприродной» аминокислотой (как описано в публикации Wang et al., *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:225-49 (2006)). Эти не встречающиеся в природе аминокислоты можно успешно использовать для химического связывания представляющих интерес молекул с капсидным белком AAV.

Модифицированные капсидные белки AAV и содержащие их вирусные капсиды и вирусные векторы.

[0064] В настоящем изобретении предложены капсидные белки AAV (VP1, VP2 и/или VP3), содержащие модификацию (например, замену) в аминокислотной последовательности, а также вирусные капсиды и вирусные векторы, содержащие модифицированный капсидный белок AAV. Авторы изобретения обнаружили, что

описанные в настоящем документе модификации могут придавать одно или более желательных свойств вирусным векторам, содержащим модифицированный капсидный белок AAV, включая, помимо прочего, способность уклоняться от нейтрализующих антител. Таким образом, в настоящем изобретении представлены некоторые ограничения, связанные с обычными векторами AAV.

[0065] Соответственно, в одном аспекте в настоящем изобретении предложен капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий одну или более аминокислотных замен, причем одна или более замен изменяют один или более антигенных участков капсидного белка AAV. Модификация одного или более антигенных участков приводит к ингибированию связывания антителом одного или более антигенных участков и/или к ингибированию нейтрализации инфекционности вирусной частицы, содержащей указанный капсидный белок AAV. Одно или более аминокислотных замен могут находиться в одной или более областях узнавания антигена, идентифицированных посредством картирования пептидных эпитопов и/или исследованиями с помощью криоэлектронной микроскопии комплексов AAV-антитело, содержащих капсидные белки AAV. В некоторых вариантах осуществления один или более антигенных участков являются общими антигенными мотивами или САМ, как описано в публикации WO 2017/058892, включенной в настоящий документ путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления антигенные участки находятся в варибельной области (VR) капсидного белка AAV, например VR-I, VR-II, VR-III, VR-IV, VR-V, VR-VI, VR-VII, VR-VIII, VR-IX. В некоторых вариантах осуществления один или более антигенных участков находятся в петле III капсидного белка AAV.

[0066] В некоторых вариантах осуществления модифицированный антигенный сайт может предотвращать связывание или распознавание или нейтрализацию капсидов AAV антителами, где антитело представляет собой IgG (включая IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), IgM, IgE или IgA.

[0067] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh32.22, бычьего AAV или птичьего AAV содержит аминокислотную замену в одной или более областях, указанных в таблице 5 ниже. В некоторых вариантах осуществления аминокислотную замену выбрано из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 и 411–421. В некоторых

вариантах осуществления аминокислотная замена имеет по меньшей мере 95%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологии последовательности с SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 или 411–421.

ТАБЛИЦА 5. Иллюстративные антигенные или другие области различных капсидов AAV, которые могут быть частично или полностью замещены/заменены. Показана соответствующая нумерация остатков VP1.

Последовательность AAV1 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Последовательность AAV2 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Последовательность AAV3 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Последовательность AAV4 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Последовательность AAV5 (номера аминокислот)	SEQ ID NO
SASTGAS (262-268)	613	SQSGAS (262-267)	623	SQSGAS (262-267)	633	RLGESLQ S (253-260)	643	EIKSGSVD GS (249-258)	653
VFMVPQY GYL (370-379)	614	VFMVPQY GYL (369-378)	624	VFMVPQY GYL (369-378)	634	VFMVPQY GYC (360-369)	644	VFTLPQY GYA (360-369)	654
NQSGSA QNK (451-459)	615	TPSGTIT QS (450-458)	625	TTSGTIN QS (451-459)	635	GTTLNAG TA (445-453)	645	STNNTGG VQ (440-448)	655
SV (472-473)	616	RD (471-472)	626	SL (472-473)	636	SN (466-467)	646	AN (458-459)	656
KTDNNS SN (493-500)	617	SADNNS E (492-499)	627	ANDNNS N (493-500)	637	ANQNYKI PATGS (487-498)	647	SGVNRAS (479-485)	657
KDDEDK F (528-534)	618	KDDEEKF (527-533)	628	KDDEEKF (528-534)	638	GPADSKF (527-533)	648	LQGSNTY (515-521)	658
SAGASN (547-552)	619	GSEKTN (546-551)	629	GTTASN (547-552)	639	QNGNTA (545-560)	649	ANPGTTA T (534-541)	659
STDPATG DVH (588-597)	620	NRQAATA DVN (587-596)	630	NTAPTGT VN (588-597)	640	SNLPTVD RLT (583-595)	650	TTAPATG TYN (577-586)	660
AN (709-710)	621	VN (708-709)	631	VN (709-710)	641	NS (707-708)	651	QF (697-698)	661
DNNGLY T (716-722)	622	DTNGVYS (715-721)	632	DTNGVYS (716-722)	642	DAAGKYT (714-720)	652	DSTGEYR (704-710)	662

AAV6 (номера аминнокислот)	SEQ ID NO	AAV7 (номера аминнокислот)	SEQ ID NO	AAV8 (номера аминнокислот)	SEQ ID NO	AAV9 (номера аминнокислот)	SEQ ID NO	AAVt8 (номера аминнокислот)	SEQ ID NO
SASTGAS (262-268)	663	SETAGST (263- 269)	673	NGTSGG AT (263-270)	683	NSTSGG SS (262-269)	693	NGTSGGS T (262-269)	703
VFMIPQY GYL (370-379)	664	VFMIPQY GYL (371-380)	674	VFMIPQY GYL (372-381)	684	VFMIPQY GYL (371-380)	694	VFMIPQY GYL (371-380)	704
NQSGSA QNK (451-459)	665	NPGGTA GNR (453-461)	675	TTGGTA NTQ (453-461)	685	INGSGQ NQQ (451-459)	695	QTGTGG TQ (451-459)	705
SV (472-473)	666	AN (474-475)	676	AN (474-475)	686	AV (472-473)	696	AN (472-473)	706
KTDNNN SN (493-500)	667	LDQNNNS N (495-502)	677	TGQNNN SN (495-502)	687	VTQNNN SE (493-500)	697	TNQNNNS N (493-500)	707
KDDKDK F (528-534)	668	KDDEDRF (530-536)	678	KDDEER F (530-536)	688	KEGEDR F (528-534)	698	KDDDDRF (528-534)	708
SAGASN (547- 552)	669	GATNKT (549- 554)	679	NAARDN (549- 554)	689	GTGRDN (547-552)	699	GAGNDG (547- 552)	709
STDPATG DVH (588-897)	670	NTAAQTQ VVN (589- 598)	680	NTAPQIG TVNS (590- 600)	690	QAQAQT GWVQ (588-597)	700	NTQAQTG LVH (588-597)	710
AN (709-710)	671	TG (710-711)	681	TS (711-712)	691	NN (709-710)	701	TN (709-710)	711
DNNGLY T (716-722)	672	DSQGVY S (717-723)	682	NTEGVY S (718-724)	692	NTEGVY S (716-722)	702	NTEGVYS (716-722)	712

AAVrh10 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAV10 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAV11 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAV12 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAVrh32.33 (номера аминокислот)	SEQ ID NO
NGTSGGS T (263-270)	713	NGTSGG ST (263-270)	723	RLGTTSS S (253-260)	733	RIGTTAN S (262-269)	743	RLGTTSSNS (253-260)	753
VFMVPOY GYL (372-381)	714	VFMVPOY GYL (372-381)	724	VFMVPO YGYC (360- 369)	734	VFMVPO YGYC (369- 378)	744	VFMVPOY G YC (360-369)	754
STGGTAG TQ (453-461)	715	STGGTQ GTQ (453-461)	725	GETLNQ GNA (444-452)	735	GNSLNQ GTA (453- 461)	745	GETLNQGN A (444-452)	755
SA (474-475)	716	SA (474-475)	726	AF (465-466)	736	AY (474- 475)	746	AF (465-466)	756
LSQNNNS N (495-502)	717	LSQNNNS N (495-502)	727	ASQNYKI PASGG (486- 497)	737	ANQNYKI PASGG (495-506)	747	ASQNYKI PA SGG (486-497)	757
KDDEERF (530-536)	718	KDDEERF (530-536)	728	GPSDGD F (526-532)	738	GAGDSD F (535-541)	748	GPSDGD F (526- 532)	758
GAGKDN (549- 554)	719	GAGRDN (549- 554)	729	VTGNIT (544- 549)	739	PSGNIT (553-558)	749	VTGNIT (544- 549)	759
NAAPIVG AVN (590-599)	720	NTGPIVG NVN (590-599)	730	TTAPIG NVT (585- 594)	740	TTAPIA NLD (594-503)	750	TTAPIG NV T (585-594)	760
TN (711-712)	721	TN (711-712)	731	SS (706-707)	741	NS (715-716)	751	SS (706-707)	761
NTDGTYS (718-724)	722	INTEGTYS (718- 724)	732	DTTGKYT (713-719)	742	DNAGNY H (722-728)	752	DTTGKYT (713-719)	762

Бычий AAV (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Птичий AAV (номера аминокислот)	SEQ ID NO
RLGSSN AS (255-262)	763	RIQGPSG G (265-272)	773
VFMVPQ YGYC (362-371)	764	IYTIPOYG YC (375-384)	774
GGTLNQ GNS (447-455)	765	VSQAGS SGR (454-462)	775
SG (468-469)	766	AA (475-476)	776
ASQNYKI PQGRN (489- 500)	767	ASNITKN NVFSV (496-507)	777
ANDATDF (529-535)	768	FSGEPDR (533-539)	778
ITGNIT (547- 552)	769	VYDQTTA T (552-559)	779
TTVPTVD DVD (588-597)	770	VTPGTRA AVN (595-604)	780
DS (709-710)	771	AD (716-717)	781
DNAGAY K(716-722)	772	SDTGSYS (723-729)	782

[0068] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена заменяет любые шесть, семь или восемь аминокислот в капсидном белке AAV любого из следующих серотипов: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh32.22, бычий AAV или птичий AAV. Например, аминокислотная замена может обеспечить замену следующих аминокислот (нумерация VP1) в любом из перечисленных выше серотипов AAV: 280-286, 279-293, 294-300, 301-307, 308-314, 315-321, 322-328, 329-335, 336-342, 343-349, 350-356, 357-363, 364-370, 371-377, 378-384, 385-391, 392-398, 399-405, 406-412, 143-149, 420-426, 427-433, 434-440, 441-447, 448-454, 455-461, 462-468, 469-475, 476-482, 483-489, 490-496, 497-503, 504-510, 511-517, 518-524, 525-531, 532-538, 539-545, 546-552, 553-559, 560-566, 567-573, 574-580, 581-587, 588-594, 595-601, 602-608, 609-615, 616-622, 623-629, 630-636, 637-643, 644-650, 651-657, 658-664, 665-671, 672-678, 679-685, 686-692, 693-699. В вариантах осуществления изобретения аминокислотная замена может обеспечить замену следующих аминокислот (нумерация VP1) в любом из перечисленных выше серотипов AAV: 294-301, 302-309, 310-317, 318-325, 326-333, 334-331, 342-349, 350-357, 358-365, 366-373, 374-381, 382-389, 390-397, 398-405, 406-413, 414-421, 422-429, 430-437, 438-445, 446-453, 454-461, 462-469, 470-477, 478-485, 486-493, 494-501, 502-509, 210-517, 518-525,

526–533, 534–541, 542–549, 550–557, 558–565, 566–573, 574–581, 582–589, 590–597, 598–605, 506–613, 614–621, 622–629, 630–637, 638–645, 646–653, 654–661, 662–669, 670–677, 678–685, 686–693, 694–701. В вариантах осуществления изобретения аминокислотная замена может обеспечить замену следующих аминокислот (нумерация VP1) в любом из перечисленных выше серотипов AAV: 400–405, 406–411, 412–417, 418–423, 424–429, 430–435, 436–441, 442–447, 448–453, 454–459, 460–465, 466–471, 472–477, 478–483, 484–489, 490–495, 484–489, 490–495, 496–501, 502–507, 508–513, 514–519, 520–525, 526–531, 532–537, 538–543, 544–549, 550–555, 556–561, 562–567, 568–573, 574–579, 580–585, 586–591, 592–597, 598–603, 604–609, 610–615, 616–621, 622–627, 628–633, 634–639, 640–645, 646–651, 652–657, 658–663, 664–669, 670–675, 676–681, 682–687, 688–693, 694–699, 700–705.

[0069] В некоторых вариантах осуществления замена вводит делецию в последовательность капсида AAV. Например, последовательность из 6, 7, 8 или 9 аминокислот замещает 7, 8, 9 или 10 аминокислот соответственно, в капсидной последовательности нативной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления замена вводит вставку в последовательность капсида AAV. Например, последовательность из 6, 7, 8 или 9 аминокислот замещает 5, 6, 7 или 8 аминокислот соответственно нативной аминокислотной капсидной последовательности.

[0070] Капсидные белки этого изобретения модифицированы для продукции капсида AAV, который присутствует в частице вируса AAV или векторе вируса AAV, имеющего фенотип уклонения от нейтрализующих антител. Частица или вектор вируса AAV по настоящему изобретению могут в дополнение к фенотипу уклонения от нейтрализующих антител также иметь фенотип повышенной или поддерживаемой эффективности трансдукции.

[0071] В некоторых вариантах осуществления одна или более замен одного или более антигенных участков могут вводить один или более антигенных участков из капсидного белка первого серотипа AAV в капсидный белок второго серотипа AAV, который отличается от указанного первого серотипа AAV.

[0072] Капсидный белок AAV по этому изобретению может представлять собой капсидный белок серотипа AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10,

AAVrh.32.33, AAVrh74, бычьего AAV, птичьего AAV или любого другого AAV, известного в настоящее время или того, который будет открыт позже. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV является химерным.

[0073] В настоящем документе представлены несколько примеров модифицированного капсидного белка AAV по этому изобретению. В следующих примерах капсидный белок может содержать конкретные описанные замены, а в некоторых вариантах осуществления может содержать меньше или больше замен, чем описано. В контексте настоящего документа, «замена» может относиться к замене одной аминокислоты или замене более чем одной аминокислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления капсидный белок по данному изобретению может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т. п. замен одной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок по данному изобретению может содержать одну или более замен множества смежных аминокислот, например одну или более замен 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 смежных аминокислот.

[0074] Кроме того, в вариантах осуществления, описанных в данном документе, в которых аминокислотный остаток заменен любым аминокислотным остатком, отличным от аминокислотного остатка, присутствующего в аминокислотной последовательности дикого типа или нативной аминокислотной последовательности, указанной любой другой аминокислотный остаток может быть любым природным или не природным аминокислотным остатком, известным в данной области (см., например, таблицу 3 и 4). В некоторых вариантах осуществления замена может быть консервативной заменой, а в некоторых вариантах осуществления замена может быть неконсервативной заменой.

[0075] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит одну или более аминокислотных замен, причем аминокислотные замены выбраны из последовательностей, перечисленных в таблице 6.1.

ТАБЛИЦА 6.1. АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ

Замещение	SEQ ID NO.
последовательности SNGRGV	9
NLAENFKY	10

VLSGDHSA	11
MSAASGSG	12
GTNLGKEQ	13
SSHSGTNQ	14
VATRDGQL	15
ALNADTGT	16
VMEPTR	17
VVGNGGVV	297
NFREMPIG	298
RRSEDMGTI	299
YPLQNNNS	411
YPLENFKY	412
YPLGDHSA	413
YPLASGSG	414
YPLLGKEQ	415
YPLSGTNQ	416
YPLRDGQL	417
YPLADTGT	418
YPLNGGVV	419
YPLEMPIG	420

YPLEDMGTI	421
-----------	-----

[0076] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит первую аминокислотную замену и вторую аминокислотную замену, при этом каждая из первой аминокислотной замены и второй аминокислотной замены модифицируют различные антигенные сайты на капсидном белке AAV. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая аминокислотная замена выбраны из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 и 411–421.

[0077] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV включает первое аминокислотную замену, вторую аминокислотную замену и третью аминокислотную замену, при этом каждое из первой аминокислотной замены, второй аминокислотной замены и третьей аминокислотной замены модифицируют разные антигенный сайт на капсидном белке AAV. В некоторых вариантах осуществления каждую из первой аминокислотной замены, второй аминокислотной замены и третьей аминокислотной

замены выбраны из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 и 411–421. В некоторых вариантах осуществления первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит одну из SEQ ID NO. 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 297, 298, 299 или 411–421; и третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17. В некоторых вариантах осуществления первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит одну из SEQ ID NO. 10; и третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17. В некоторых вариантах осуществления первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит одну из SEQ ID NO. 14; и третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17.

[0078] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит последовательность по любой из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит последовательность по любой из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV имеет по меньшей мере 95%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологии последовательности с любой из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785.

[0079] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV имеет по меньшей мере 95%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологии последовательности с SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV модифицируют путем замены области, охватывающей аминокислоты 454–460 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV модифицируют путем замены области, охватывающей аминокислоты 493–500 SEQ ID NO: 49, на одну из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 297, 298, 299 или 411–421. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV модифицируют путем замены области, охватывающей аминокислоты 585–590 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV модифицируют путем замены области, охватывающей аминокислоты 454–460 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 9, области, охватывающей аминокислоты 493–500 SEQ ID NO: 49, на одну из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 297, 298, 299 или 411–421, и области, охватывающей аминокислоты 585–590 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 17.

[0080] Любой из капсидов AAV, описанных в настоящем документе, может дополнительно содержать модификацию (например, замену или делецию) в петле HI. Петля HI представляет собой выступающий домен на поверхности капсида AAV, находящийся между  $\beta$ -цепями  $\beta$ H и  $\beta$ I, который простирается от каждой субъединицы вирусного белка (VP), перекрывая соседний пятикратный VP. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь аминокислотных замен в петле HI. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит одну или более из следующих замен в петле HI: P661R, T662S, Q666G, S667D, где нумерация соответствует капсиду AAV8 дикого типа (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит одну или более из следующих замен в петле HI: P659R, T660S, A661T, K664G, где нумерация соответствует капсиду AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 7).

[0081] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит одну, две, три или четыре аминокислотные замены, причем каждая замена модифицирует отличный антигенный участок капсидного белка AAV, и при этом по меньшей мере одна из аминокислотных замен модифицирует петлю HI капсидного белка.

[0082] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит первую, вторую, третью и четвертую аминокислотную замену. В вариантах осуществления каждое из первой аминокислотной замены, второй аминокислотной замены и третьей аминокислотной замены выбраны из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 и 411–421, а четвертая аминокислотная замена модифицирует петлю HI капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит одну из SEQ ID NO. 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 297, 298, 299 или 411-421; третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17, а четвертая аминокислотная замена модифицирует петлю HI капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит одну или более из следующих замен в петле HI: P661R, T662S, Q666G, S667D, где нумерация соответствует капсиду AAV8 дикого типа (SEQ ID NO: 6); или P659R, T660S, A661T, K664G, где нумерация соответствует капсиду AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 7).

[0083] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV может содержать первую замену, вторую замену и, необязательно, третью замену, представленные в таблице 6.2.

ТАБЛИЦА 6.2. КОМБИНАЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН

Первая замена (SEQ ID NO)	Вторая замена (SEQ ID NO)	Третья замена (SEQ ID NO)
9	10	17
9	11	17
9	12	17
9	13	17
9	14	17
9	15	17
9	16	17
9	297	17
9	298	17
9	299	17
9	411	17
9	412	17
9	413	17
9	414	17
9	415	17
9	416	17
9	417	17
9	418	17
9	419	17
9	420	17
9	421	17
9	10	
9	11	
9	12	
9	13	
9	14	
9	15	
9	16	
9	297	
9	298	
9	299	
9	411	
9	412	
9	413	
9	414	
9	415	
9	416	
9	417	
9	418	

9	419	
9	420	
9	421	
9	17	
10	17	
11	17	
12	17	
13	17	
14	17	
15	17	
16	17	
297	17	
298	17	
299	17	
411	17	
412	17	
413	17	
414	17	
415	17	
416	17	
417	17	
418	17	
419	17	
420	17	
421	17	

[0084] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный капсидный белок имеет последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 6 (AAV8) или SEQ ID NO: 7 (AAV9) и содержит первую замену, вторую замену и, необязательно, третью замену, как показано на таблице 6.2.

[0085] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный капсидный белок имеет последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 6 (AAV8) и содержит одну или более из следующих аминокислотных замен: G455S, G456N, G456S, T457G, T457N, A458R, A458G, N459G, N459R, T460V, T460G, N459R, Q461V, T494N, T494V, T494M, T494G, T494S, T494A, T494R, T494Y, T495L, T495S, T495T, T495S, T495V, T495F, T495R, T495P, G496A, G496S, G496N, G496H, G496T, G496N, G496R, G496L, Q497E, Q497G, Q497A, Q497L, Q497S, Q497R, Q497A, Q497N, Q497E, Q497E, N498D, N498S,

N498G, N498M, N499F, N499H, N499G, N499K, N499T, N499P, N499M, N500K, N500S, N500E, N500N, N500Q, N500G, N500V, N500I, N500T, S501Y, S501A, S501G, S501Q, S501L, S501T, S501V, S501G, S501I, L586V, Q587M, Q588E, Q589P, N590T, T591R. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный капсидный белок имеет последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 6 (AAV8) и содержит следующие аминокислотные замены: T494Y, T495P и/или G496L.

[0086] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный капсидный белок имеет последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательностям SEQ ID NO: 380, 384, 783, 784 или 785.

[0087] В настоящем изобретении также предложены нуклеотидная последовательность или содержащий ее экспрессионный вектор, которые кодируют один или более капсидных белков AAV по изобретению. Нуклеотидная последовательность может представлять собой последовательность ДНК или последовательность РНК. В настоящем изобретении также предложена клетка, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей или экспрессионных векторов по изобретению.

[0088] Также предложен капсид AAV, содержащий капсидный белок AAV по этому изобретению. Дополнительно в настоящем изобретении предложен вирусный вектор, содержащий капсид AAV по этому изобретению, а также композиция, содержащая капсидный белок AAV, капсид AAV и/или вирусный вектор по этому изобретению, в фармацевтически приемлемом носителе.

[0089] В некоторых вариантах осуществления модификация одного или более антигенных участков приводит к ингибированию связывания антитела с одним или более антигенными участками. В некоторых вариантах осуществления модификация одного или более антигенных участков приводит к ингибированию нейтрализации инфекционности вирусной частицы, содержащей капсидный белок AAV.

[0090] Как описано в настоящем документе, в данной области известны последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот капсидных белков ряда AAV.

Таким образом, аминокислоты, «соответствующие» положениям аминокислот нативного капсидного белка AAV, могут быть легко определены для любого другого AAV (например, с использованием выравнивания последовательностей).

[0091] В изобретении предполагается, что модифицированные капсидные белки могут быть получены путем модификации капсидного белка любого AAV, известного в настоящее время или того, который будет открыт позже.

[0092] Кроме того, капсидный белок AAV, подлежащий модификации, может представлять собой встречающийся в природе капсидный белок AAV (например, капсидный белок AAV2, AAV3a или 3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11 или любой AAV, представленный в таблице 2), но не ограничивается этим. Специалисты в данной области поймут, что на данном уровне техники известны различные манипуляции с капсидными белками AAV, и изобретение не ограничивается модификациями встречающихся в природе капсидных белков AAV. Например, капсидный белок, подлежащий модификации, может уже иметь изменения по сравнению со встречающимся в природе AAV (например, получен из встречающегося в природе капсидного белка AAV, например AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или любого другого AAV, известного в настоящее время или того, который будет обнаружен позже). В некоторых вариантах осуществления капсидный белок может представлять собой химерный капсидный белок. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок может представлять собой сконструированный AAV, такой как AAV2i8, AAV2g9, AAV-LK03, AAV7m8, AAV Anc80, AAV PHP.B. Такие капсидные белки AAV также входят в объем настоящего изобретения.

[0093] Таким образом, в конкретных вариантах осуществления капсидный белок AAV, подлежащий модификации, может быть получен из встречающегося в природе AAV, но дополнительно содержит одну или более чужеродных последовательностей (например, экзогенных по отношению к нативному вирусу), которые вставлены в капсидный белок и/или заменены в нем, и/или были изменены путем делеции одной или более аминокислот.

[0094] Соответственно, при ссылке в данном документе на конкретный капсидный белок AAV (например, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9,

AAV10 или AAV11 или любой капсидный белок AAV, представленный в таблице 2, и т. п.), предполагается охват нативного капсидного белка, а также капсидных белков, которые имеют изменения, отличные от модификаций по изобретению. Такие изменения включают замены, вставки и/или делеции. В конкретных вариантах осуществления, капсидный белок содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, менее 20, менее 30, менее 40, менее 50, менее 60 или менее 70 вставленных в него аминокислот (кроме вставок по настоящему изобретению) по сравнению с последовательностью нативного капсидного белка AAV. В вариантах осуществления капсидный белок содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, менее 20, менее 30, менее 40, менее 50, менее 60, или менее 70 аминокислотных замен (кроме аминокислотных замен по настоящему изобретению) по сравнению с последовательностью нативного капсидного белка AAV; в вариантах осуществления изобретения капсидный белок содержит делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, менее 20, менее 30, менее 40, менее 50, менее 60, или менее 70 аминокислот (кроме аминокислотной делеции по изобретению) по сравнению с последовательностью нативного капсидного белка AAV.

[0095] Способы определения сходства или идентичности последовательностей двух или более аминокислотных последовательностей известны в данной области. Сходство и/или идентичность последовательностей определяют с использованием стандартных методов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, алгоритм идентификации локальной последовательности Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2, 482 (1981), алгоритм выравнивания идентичности последовательностей Needleman & Wunsch, *J Mol. Biol.* 48,443 (1970), поиск по методу сходства согласно Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85,2444 (1988), компьютеризированные реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, штат Висконсин, США), программа Best Fit sequence, описанная Devereux et al., *Nucl. Acid Res.* 12, 387-395 (1984), или путем проверки.

[0096] Другим применимым алгоритмом является алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., *J Mol. Biol.* 215, 403–410, (1990) и Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873–5787 (1993). Особенно подходящей для использования программой BLAST является программа WU-BLAST-2, полученная из описания Altschul et al., *Methods in*

Enzymology, 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>. В программе WU-BLAST-2 используется несколько параметров поиска, которые опционно имеют настройки по умолчанию. Параметры являются динамическими значениями и определяются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, в которой осуществляется поиск исследуемой последовательности; однако значения могут быть скорректированы для повышения чувствительности.

[0097] Кроме того, дополнительно используемым алгоритмом является gapped BLAST, как описано в Altschul et al, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

[0098] В изобретении также предложен вирусный капсид, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из модифицированного капсидного белка AAV по изобретению. В конкретных вариантах осуществления вирусный капсид представляет собой капсид парвовируса, который, кроме того, может быть капсидом автономного парвовируса или капсидом зависимого вируса. Необязательно, вирусный капсид представляет собой капсид AAV. В конкретных вариантах осуществления капсид AAV представляет собой AAV1, AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, бычий капсид AAV, птичий капсид AAV или любой другой AAV, известный в настоящее время или тот, который будет открыт позже. Неограничивающий список серотипов AAV показан в таблице 2 и капсид AAV по настоящему изобретению может относиться к любому серотипу AAV, указанному в таблице 2, или может быть получен из любого из вышеперечисленного путем одной или более вставок, замен и/или делеций. Модифицированные вирусные капсиды можно использовать в качестве «капсидных носителей», как описано, например, в патенте США № 5,863,541. Молекулы, которые можно упаковывать посредством капсидов вируса и переносить в клетку, включают в себя гетерологичные ДНК, РНК, полипептиды, малые органические молекулы, металлы или их комбинации.

[0099] Гетерологичные молекулы определяются как молекулы, которые не встречаются в природе при инфекции AAV, например, молекулы, не кодируемые геномом AAV дикого типа. Кроме того, используемые в терапевтических целях молекулы могут быть связанными с внешней частью капсида химерного вируса для переноса молекул в клетки-мишени хозяина. Такие связанные молекулы могут включать в себя ДНК, РНК,

малые органические молекулы, металлы, углеводы, липиды и/или полипептиды. В одном варианте осуществления изобретения используемая в терапевтических целях молекула является ковалентно связанной (т. е. конъюгированной или химически связанной) с капсидными белками. Способы ковалентного присоединения молекул известны специалистам в данной области.

[0100] Модифицированные вирусные капсиды по изобретению также находят применение в стимуляции образования антител против новых структур капсидов. В качестве дополнительной альтернативы, экзогенную аминокислотную последовательность можно вставлять в модифицированный вирусный капсид для представления антигена клетке, например, для введения субъекту для получения иммунного ответа на экзогенную аминокислотную последовательность.

[0101] В других вариантах осуществления вирусные капсиды можно вводить для блокирования определенных участков клеток перед и/или одновременно с введением вирусного вектора, доставляющего нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющие интерес полипептид или функциональную РНК (например, с разницей между введением в пределах нескольких минут или часов). Например, капсиды по изобретению можно доставлять для блокирования клеточных рецепторов на клетках печени, а вектор для доставки можно вводить после или одновременно, что может снизить трансдукцию клеток печени и усилить трансдукцию других мишеней (например, скелетных мышц, сердечной мышцы и/или мышц диафрагмы).

[0102] В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления модифицированные вирусные капсиды можно вводить субъекту перед введением и/или одновременно с введением модифицированного вирусного вектора по настоящему изобретению. Кроме того, в изобретении предложены композиции и фармацевтические препараты, содержащие модифицированные вирусные капсиды по изобретению; необязательно, композиция также содержит модифицированный вирусный вектор по изобретению.

[0103] В изобретении также предложены нуклеиновые кислоты (необязательно, выделенные нуклеиновые кислоты), кодирующие модифицированные вирусные капсиды и капсидные белки по изобретению. Дополнительно предложены векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, и клетки (*in vivo* или в культуре), содержащие

нуклеиновые кислоты и/или векторы по изобретению. В качестве одного примера в настоящем изобретении предложен вирусный вектор, содержащий: (a) модифицированный капсид AAV по этому изобретению; и (b) нуклеиновую кислоту, содержащую по меньшей мере одну последовательность концевого повтора, причем нуклеиновая кислота заключена в капсид AAV.

[0104] Другие подходящие векторы включают, без ограничения, вирусные векторы (например, аденовирусный вектор, вектор AAV, вектор на основе вируса герпеса, коревой оспы, поксвируса, бакуловируса и т. п.), плазмиды, фаг, искусственную хромосому бактерий (BAC), искусственную хромосому дрожжей (YAC) и т. п. Такие нуклеиновые кислоты, векторы и клетки могут быть использованы, например, как реагенты (например, как конструкции-помощники для упаковки или как упаковывающие клетки) для получения модифицированных вирусных капсидов или вирусных векторов, как описано в настоящем документе.

[0105] Вирусные капсиды по изобретению могут быть получены с использованием любого способа, известного в данной области, например, путем экспрессии из бакуловируса (Brown et al., (1994) *Virology* 198:477–488).

[0106] Модификации капсидного белка AAV по настоящему изобретению являются «селективными» модификациями. Этот подход отличается от предыдущей работы с заменами целых субъединиц или обменом больших доменов между серотипами AAV (см., например, международную патентную публикацию WO 00/28004 и Hauck et al., (2003) *J. Virology* 77:2768-2774). В конкретных вариантах осуществления, «селективная» модификация приводит к вставке, и/или замене, и/или делеции приблизительно 20, 18, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 смежных аминокислот или менее.

[0107] Модифицированные капсидные белки и капсиды по изобретению могут дополнительно содержать любую другую модификацию, известную в настоящее время или ту, которая будет открыта позже.

[0108] Например, капсидные белки AAV и вирусные капсиды по изобретению могут быть химерными в том смысле, что они могут содержать всю субъединицу или часть субъединицы капсида другого вируса, необязательно другого парвовируса или AAV, например, как описано в международной патентной публикации WO 00/28004.

[0109] В некоторых вариантах осуществления этого изобретения вирусный капсид может быть нацеленным вирусным капсидом, содержащим нацеливающую последовательность (например, замещенную или вставленную в вирусный капсид), которая направляет вирусный капсид для взаимодействия с молекулами клеточной поверхности, присутствующими на желаемой целевой ткани (тканях) (см., например, международную патентную публикацию WO 00/28004 и публикации Hauck et al., (2003) *J. Virology* 77:2768-2774); Shi et al., *Human Gene Therapy* 17:353- 361 (2006) [в которых описана вставка мотива RGD, связывающегося с интегриновым рецептором, в положения 520 и/или 584 субъединицы капсида AAV]; и патент США № 7,314,912 [в котором описана вставка пептида PI, содержащего мотив RGD, в следующие положения аминокислот 447, 534, 573 и 587 субъединицы капсида AAV2]). В данной области известны другие положения в пределах субъединицы капсида AAV, которые допускают вставки (например, положения 449 и 588, описанные в Grifman et al., *Molecular Therapy* 3:964–975 (2001)).

[0110] Например, вирусный капсид по этому изобретению может иметь относительно неэффективный тропизм к определенным представляющим интерес тканям-мишеням (например, печени, скелетным мышцам, сердцу, мышце диафрагмы, почкам, головному мозгу, желудку, кишечнику, коже, эндотелиальным клеткам и/или легким). Нацеливающая последовательность может быть успешно встроена в эти векторы с низкой трансдукцией, чтобы тем самым придать вирусному капсиду желаемый тропизм и, необязательно, селективный тропизм в отношении конкретной (-ых) ткани (-ей). Капсидные белки AAV, капсиды и векторы, содержащие нацеливающие последовательности описаны, например, в международной патентной публикации WO 00/28004. В качестве другого примера, одна или более не встречающихся в природе аминокислот, описанных Wang et al., *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:225-49 (2006)), могут быть встроены в субъединицу капсида AAV по этому изобретению в независимом участке в качестве средства перенаправления вектора с низкой трансдукцией к желаемой ткани-мишени. Эти не встречающиеся в природе аминокислоты можно успешно использовать для химического связывания представляющих интерес молекул с капсидным белком AAV, включая, без ограничения: гликаны (нацеливание маннозы на дендритные клетки); RGD, бомбезин или нейропептид для нацеленной доставки к конкретным типам раковых клеток; РНК-аптамеры или пептиды, выбранные из фагового дисплея, нацеленные на специфические

рецепторы клеточной поверхности, такие как рецепторы факторов роста, интегрины и т. п.

[0111] Способы химической модификации аминокислот известны в данной области (см., например, Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 1<sup>st</sup> edition, Academic Press, 1996).

[0112] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может представлять собой последовательность вирусного капсида (например, последовательность капсида автономного парвовируса, последовательность капсида AAV или последовательность любого другого вирусного капсида), которая направляет инфекцию к конкретному (-ым) типу (-ам) клеток.

[0113] В качестве другого неограничивающего примера домен, связывающий гепарин или гепарансульфат (например, гепарин-связывающий домен респираторно-синцитиального вируса) может быть вставлен или заменен в субъединице капсида, которая обычно не связывается с рецепторами HS (например, AAV4, AAV5) для придания полученному мутанту свойств связывания с гепарином и/или гепарансульфатом.

[0114] B19 инфицирует первичные эритроидные клетки-предшественники, используя в качестве рецептора глобозид (Brown et al, (1993) *Science* 262: 114). Структура B19 определена с разрешением 8 Å (Agbandje-McKenna et al, (1994) *Virology* 203: 106). Область капсида B19, которая связывается с глобозидом, была картирована между аминокислотами 399–406 (Chapman et al, (1993) *Virology* 194:419), в области с петлей между β-цилиндрическими структурами E и F (Chipman et al, (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:7502). Соответственно, домен связывания глобозидного рецептора капсида B19 может быть заменен на капсидный белок AAV по этому изобретению для нацеливания вирусного капсида или вирусного вектора, содержащего этот белок, на эритроидные клетки.

[0115] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нацеливающая последовательность может представлять собой любую аминокислотную последовательность, кодирующую пептид, который изменяет тропизм вирусного капсида или вирусного вектора, содержащего модифицированный капсидный белок AAV. В конкретных вариантах осуществления нацеливающий пептид или белок может

быть природным или, альтернативно, полностью или частично синтетическим. Иллюстративные нацеливающие последовательности включают в себя лиганды и другие пептиды, которые связываются с рецепторами клеточной поверхности и гликопротеинами, такие как пептидные последовательности ROD, брадикинин, гормоны, пептидные факторы роста (например, эпидермальный фактор роста, фактор роста нервов, фактор роста фибробластов, фактор роста тромбоцитов, инсулиноподобные факторы роста I и II и т. д.), цитокины, гормон, стимулирующий меланоциты (например,  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$ ), нейропептиды и эндорфины и т. п., и их фрагменты, которые сохраняют способность нацеливать клетки на родственные им рецепторы. Другие иллюстративные пептиды и белки включают в себя вещество P, фактор роста кератиноцитов, нейропептид Y, пептид, высвобождающий гастрин, интерлейкин 2, лизоцим куриного яичного белка, эритропоэтин, гонадолибкрин, кортикостатин,  $\beta$ -эндорфин, лейэнкефалин, риморфин, альфа-неоэнкефалин, ангиотензин, пневмадин, вазоактивный кишечный пептид, нейротензин, мотилин и их фрагменты, как описано выше. В качестве еще одной альтернативы связывающий домен токсина (например, столбнячного токсина или токсинов змеи, таких как альфа-бунгаротоксин и т. п.) может быть заменен на капсидный белок в качестве нацеливающей последовательности. В еще одном репрезентативном варианте осуществления капсидный белок AAV может быть модифицирован посредством замены «неклассического» сигнального пептида импорта/экспорта (например, фактора роста фибробластов-1 и -2, интерлейкина 1, белка Tat ВИЧ-1, белка вируса герпеса VP22 и т. п.), как описано в Cleves (Current Biology 7:R318 (1997)) в капсидном белке AAV. Также охватываются пептидные мотивы, которые направляют поглощение специфическими клетками, например, пептидный мотив FVFLP (SEQ ID NO: 83) запускает захват клетками печени.

[0116] Методы фагового дисплея, а также другие методы, известные в данной области, могут использоваться для идентификации пептидов, которые распознают любой интересующий тип клеток.

[0117] Нацеливающая последовательность может кодировать любой пептид, нацеленный на участок связывания на клеточной поверхности, включая рецепторы (например, белок, углевод, гликопротеин или протеогликан). Примеры участков связывания на клеточной поверхности включают, без ограничений, гепарансульфат, хондроитинсульфат и другие гликозаминогликаны, фрагменты сиаловой кислоты,

обнаруженные в муцинах, гликопротеинах и ганглиозидах, гликопротеины МНС 1, углеводные компоненты, обнаруженные на гликопротеинах мембран, включая маннозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, фукозу, галактозу и т. п.

[0118] В конкретных вариантах осуществления домен, связывающий гепарансульфат (HS) или гепарин заменяют в капсиде вируса (например, в капсиде AAV, который в противном случае не связывается с HS или гепарином). В данной области известно, что связывание HS/гепарина опосредуется «основным пэтчем», который богат аргининами и/или лизинами. В иллюстративных вариантах осуществления может использоваться последовательность, следующая за мотивом BXXB (SEQ ID NO: 84), где «B» представляет собой основной остаток, а X представляет доступный для использования нейтральный и/или гидрофобный. В качестве неограничивающего примера BXXB может представлять собой RGNR (SEQ ID NO: 85). В качестве другого неограничивающего примера аминокислотные положения с 262 по 265 в нативном капсидном белке AAV2 или в соответствующем (-их) положении (-ях) в капсидном белке другого серотипа AAV заменены на BXXB.

[0119] В таблице 7 показаны другие неограничивающие примеры подходящих нацеливающих последовательностей.

Таблица 7: Нацеливающие последовательности AAV

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
NSVRDL(G/S)	86	Muller et al., Nature Biotechnology 21: 1040-1046 (2003)
PRSVTVP	87	Muller et al., Nature Biotechnology 21: 1040-1046 (2003)
NSVSSX(S/A)	88	Muller et al., Nature Biotechnology 21: 1040-1046 (2003)
NGRAHA	89	Grifman et al., Molecular Therapy 3:964-975 (2001)
QPEHSST	90	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
VNTANST	91	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
HGPMQS	92	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
PHKPPLA	93	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
IKNNEMW	94	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
RNLDTPM	95	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
VDSHRQS	96	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
YDSKTKT	97	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)

SQLPHQK	98	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
STMQQNT	99	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
TERYMTQ	100	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
QPEHSST	101	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
DASLSTS	102	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
DLPNKT	103	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
DLTAARL	104	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
EPHQFNY	105	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
EPQSNHT	106	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
MSSWPSQ	107	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
NPKHNAT	108	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
PDGMRTT	109	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
PNNNKT	110	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
QSTTHDS	111	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
TGSKQKQ	112	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
SLKHQAL	113	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
SPIDGEQ	114	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
WIFPWIQL	115	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CDCRGDCFC	116	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CNGRC	117	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CPRECES	118	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CTTHWGFTLC	119	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CGRRAGGSC	120	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CKGGRAKDC	121	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CVPELGHEC	122	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CRRETAWAK	123	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
VSWFSHRYSPFAV S	124	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
GYRDGYAGPILYN	125	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
XXXY*XXX	126	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
Y*E/MNW	127	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
RPLPPLP	128	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
APPLPPR	129	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
DVFYPYPYASGS	130	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
MYWYPY	131	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
DITWDQLWDLMK	132	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CWDD(G/L)WLC	133	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
EWCEYLGGYLRCYA	134	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
YXCXXGPXTWXCXP	135	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
IEGPTLRQWLAARA	136	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
LWXX(Y/W/F/H)	137	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
XFXXYLW	138	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
RWGLCD	139	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
MSRPACPPNDKYE	140	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CLRSGRGC	141	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CHWMFSPWC	142	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)

WXXF	143	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CSSRLDAC	144	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CLPVASC	145	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CGFECVRQCPERC	146	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CVALCREACGEGC	147	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
SWCEPGWCR	148	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
YSGWGW	149	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
GLSGGRS	150	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
LMLPRAD	151	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CSCFRDVCC	152	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CRDVVSVIC	153	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
CNGRC	154	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
MARSGL	155	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MARAKE	156	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MSRTMS	157	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
KCCYSL	158	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MYWGDSHWLQYW YE	159	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MQLPLAT	160	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-

		Verlag, Berlin (2008)
EWLS	161	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SNEW	162	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
TNYL	163	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WIFPWIQL	164	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WDLAWMFRLPVG	165	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CTVALPGGYVRVC	166	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVPELGHEC	167	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CGRRAGGSC	168	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

Последовательность	SEQ ID	Ссылка
--------------------	--------	--------

	NO	
CVAYCIEHHCWTC	169	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVFAHNYDYLC	170	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVFTSNYAFC	171	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
VHSPNKK	172	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CDCRGDCFC	173	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CRGDGWC	174	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
XRGCDX	175	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
PXX(S/T)	176	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CTTHWGFTLC	177	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы

		145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SGKGPRQITAL	178	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
A(A/Q)(N/A)(L/Y)(T/V)/M/R)(R/K)	179	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
VYMSPF	180	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MQLPLAT	181	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
ATWLPPR	182	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

Последовательность	SEQ NO	ID	Ссылка
HTMYHHYQHHL	183		Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SEVGCRAGPLQWL CEKYFG	184		Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CGLLPVGRPDRNV	185		Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы

WRWLC		145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CKGQCDRFKGLPW EC	186	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SGRSA	187	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WGFP	188	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
LWXXAr	189	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
XFXXYLW	190	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
AEPMPHSLNFSQYL WYT	191	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WAY(W/F)SP	192	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
IELLQAR	193	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
DITWDQLWDLMK	194	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы

		145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
AYTKCSRQWRTCM TTH	195	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
PQNSKIPGPTFLDP H	196	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
SMEPALPDWWWK MFK	197	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
ANTPCGPYTHDCP VKR	198	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
TACHQHVRMVRP	199	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
VPWMEPAYQRFL	200	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
DPRATPGS	201	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
FRPNRAQDYNTN	202	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы

		145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CTKNSYLMC	203	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
C(R/Q)L/RT(G/N)XX G(A/V)GC	204	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CPIEDRPMC	205	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
HEWSYLAPYPWF	206	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MCPKHPLGC	207	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
RMWPSSTVNLSAG RR	208	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SAKTAVSQRVWLP SHRGGEP	209	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
KSREHVNNSACPS KRITAAL	210	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

Последовательность	SEQ ID	Ссылка
--------------------	--------	--------

	NO	
EGFR	211	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
AGLGVR	212	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
GTRQGHTMRLGVS DG	213	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
IAGLATPGWSHWLA L	214	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SMSIARL	215	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
HTFEPGV	216	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
NTSLKRISNKR1RR K	217	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
LRIKRKRRKRRKKTR K	218	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, страницы 145–163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

[0120] В качестве еще одного дополнительного варианта осуществления нацеливающая последовательность может представлять собой пептид, который можно использовать

для химического связывания (например, может содержать остатки аргинина и/или лизина, которые могут быть химически связаны через их группы R) с другой молекулой, нацеленной на проникновение в клетку.

[0121] В качестве другого варианта осуществления капсидный белок AAV или вирусный капсид по изобретению может содержать мутацию, описанную в WO 2006/066066. Например, капсидный белок может содержать селективную аминокислотную замену в положениях аминокислот 263, 705, 708 и/или 716 нативного капсидного белка AAV2 или соответствующее (-ие) изменение (-я) в капсидном белке из другого серотипа AAV.

[0122] Дополнительно или альтернативно в иллюстративных вариантах осуществления капсидный белок, вирусный капсид или вектор содержит селективную аминокислотную вставку, непосредственно следующую за положением аминокислоты 264 капсидного белка AAV2, или соответствующее изменение в капсидном белке из другого AAV. Под фразой «непосредственно следующая за положением аминокислоты X» подразумевается, что вставка следует непосредственно за указанным положением аминокислоты (например, фраза «следующая за положением аминокислоты 264» указывает на точечную вставку в положение 265 или более крупную вставку, например от положения 265 до 268 и т. д.).

[0123] Кроме того, в иллюстративных вариантах осуществления капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению может содержать аминокислотные модификации, такие как те, что описаны в публикации PCT № WO 2010/093784 (например, 2i8) и/или в публикации PCT № WO 2014/144229 (например, двойной гликан).

[0124] В некоторых вариантах осуществления этого изобретения капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению может иметь эквивалентную или повышенную эффективность трансдукции по сравнению с эффективностью трансдукции серотипа AAV, из которого произошел капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению. В некоторых вариантах осуществления этого изобретения капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению может иметь сниженную эффективность трансдукции по сравнению с эффективностью трансдукции серотипа AAV, из которого произошел капсидный белок, вирусный

капсид или вектор по этому изобретению. В некоторых вариантах осуществления этого изобретения капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению может иметь эквивалентный или повышенный тропизм по сравнению с тропизмом серотипа AAV, из которого произошел капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению. В некоторых вариантах осуществления этого изобретения капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению может иметь измененный или отличный тропизм по сравнению с тропизмом серотипа AAV, из которого произошел капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению. В некоторых вариантах осуществления этого изобретения капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению могут иметь или могут быть сконструированы, чтобы иметь тропизм к ткани головного мозга. В некоторых вариантах осуществления этого изобретения капсидный белок, вирусный капсид или вектор по этому изобретению могут иметь или могут быть сконструированы, чтобы иметь тропизм к ткани печени.

[0125] Вышеупомянутые варианты осуществления могут использоваться для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку или субъекту, как описано в настоящем документе. Например, модифицированный вектор может использоваться для лечения лизосомальных болезней накопления, таких как мукополисахаридоз (например, синдром Слая [ $\beta$ -глюкуронидаза], синдром Гурлера [ $\alpha$ -L-идуронидаза], синдром Шейе [ $\alpha$ -L-идуронидаза], синдром Гурлера — Шейе [ $\alpha$ -L-идуронидаза], синдром Гунтера [идуронатсульфатаза], синдром Санфилиппо А [гепарансульфамидаза], В [N-ацетилглюкозаминидаза], С [ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид ацетилтрансфераза], D [N-ацетилглюкозамин 6-сульфатаза], синдром Моркио А [галактоза-6-сульфатсульфатаза], В [ $\beta$ -галактозидаза], синдром Марото — Лами [N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза], etc.), болезнь Фабри ( $\alpha$ -галактозидаза), болезнь Гоше (глюкоцереброзидаза) или болезней накопления гликогена (например, болезнь Помпе; лизосомальная кислая альфа-глюкозидаза), как описано в настоящем документе.

[0126] Специалисты в данной области поймут, что для некоторых капсидных белков AAV соответствующей модификацией будет вставка и/или замена, в зависимости от того, присутствуют ли соответствующие аминокислотные положения частично или полностью в вирусе или, альтернативно варианте, полностью отсутствуют. Как

обсуждается в другом месте в данном документе, соответствующие аминокислотные положения будут очевидны специалистам в данной области с использованием хорошо известных методик.

[0127] Изобретений также охватывает вирусные векторы, содержащие модифицированные капсидные белки и капсиды по изобретению. В конкретных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой парвовирусный вектор (например, содержащий парвовирусный капсид и/или геном вектора), например, вектор AAV (например, содержащий капсид AAV и/или геном вектора). В иллюстративных вариантах осуществления, вирусный вектор содержит модифицированный капсид AAV, содержащий модифицированную субъединицу капсида по изобретению и геном вектора.

[0128] Например, в иллюстративных вариантах осуществления вирусный вектор содержит: (a) модифицированный вирусный капсид (например, модифицированный капсид AAV), содержащий модифицированный капсидный белок по изобретению; и (b) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность концевого повтора (например, TR AAV), причем нуклеиновая кислота, содержащая последовательность концевого повтора, заключена в модифицированный вирусный капсид. Нуклеиновая кислота может необязательно содержать два концевых повтора (например, два TR AAV).

[0129] В иллюстративных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вирусный вектор, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид или функциональную РНК, представляющие интерес. Рекомбинантные вирусные векторы описаны более подробно ниже.

[0130] В конкретных вариантах осуществления вирусные векторы по изобретению (i) имеют сниженную трансдукцию печени по сравнению с уровнем трансдукции вирусным вектором без модифицированного капсидного белка; (ii) показывают повышенную системную трансдукцию вирусным вектором у субъектов-животных по сравнению с уровнем, наблюдаемым для вирусного вектора без модифицированного капсидного белка; (iii) демонстрируют улучшенное перемещение через эндотелиальные клетки по сравнению с уровнем перемещения вирусным вектором без модифицированного капсидного белка, и/или (iv) показывают селективное повышение трансдукции мышечной ткани (например, скелетных мышц, сердечной мышцы и/или

мышц диафрагмы), (v) показывают селективное повышение трансдукции ткани печени и/или (vi) снижение трансдукции тканей головного мозга (например, нейронов) по сравнению с уровнем трансдукции вирусным вектором без модифицированного капсидного белка. В конкретных вариантах осуществления вирусный вектор имеет системную трансдукцию в отношении печени.

[0131] Специалистам в данной области будет понятно, что модифицированные капсидные белки, вирусные капсиды и вирусные векторы по изобретению исключают те капсидные белки, капсиды и вирусные векторы, которые имеют указанные аминокислоты в определенных положениях в их природном состоянии (т. е. не являются мутантами).

#### Способы получения вирусных векторов

[0132] В настоящем изобретении дополнительно предложены способы получения вирусных векторов по изобретению. Таким образом, в одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения вектора AAV, который уклоняется от нейтрализующих антител, причем способ включает: а) идентификацию контактных аминокислотных остатков, которые образуют трехмерную область узнавания антигена на капсидном белке AAV; б) создание библиотеки капсидных белков AAV, содержащей аминокислотные замены контактных аминокислотных остатков, идентифицированных в п. (а); в) получение частиц AAV, содержащих капсидные белки из библиотеки капсидных белков AAV по п. (б); г) контактирование частиц AAV из п. (в) с клетками в условиях, при которых может происходить инфицирование и репликация; д) выбор частиц AAV, которые могут завершить по меньшей мере один инфекционный цикл и реплицироваться до титров, аналогичных контрольным частицам AAV: 1) контактирование частиц AAV, выбранных в п. (д), с нейтрализующими антителами и клетками в условиях, при которых может происходить инфицирование и репликация; и е) выбор частиц AAV, которые не нейтрализуются нейтрализующими антителами по п. (д). Неограничивающие примеры способов идентификации контактных аминокислотных остатков включают картирование пептидных эпитопов и/или криоэлектронную микроскопию.

[0133] Анализ и идентификация контактирующих с антителом остатков в трехмерном участке узнавания антигена обеспечивает последующую модификацию посредством

случайного, рационального и/или вырожденного мутагенеза для создания уклоняющихся от антител капсидов AAV, которые могут быть идентифицированы посредством дальнейшего отбора и/или скрининга.

[0134] Таким образом, в одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения вектора AAV, который уклоняется от нейтрализующих антител, причем способ включает: а) идентификацию контактных аминокислотных остатков, которые образуют трехмерную область узнавания антигена на капсидном белке AAV; b) создание капсидных белков AAV, содержащих аминокислотные замены контактных аминокислотных остатков, идентифицированных в п. (а) посредством случайного, рационального и/или вырожденного мутагенеза; с) получение частиц AAV, содержащих капсидные белки из капсидных белков AAV по п. (b); d) контактирование частиц AAV из п. (с) с клетками в условиях, при которых может происходить инфицирование и репликация; е) выбор частиц AAV, которые могут завершить по меньшей мере один инфекционный цикл и реплицироваться до титров, аналогичных контрольным частицам AAV; f) контактирование частиц AAV, выбранных в п. (е), с нейтрализующими антителами и клетками в условиях, при которых может происходить инфицирование и репликация; и g) выбор частиц AAV, которые не нейтрализуются нейтрализующими антителами по п. (f).

[0135] Неограничивающие примеры способов идентификации контактных аминокислотных остатков включают картирование пептидных эпитопов и/или криоэлектронную микроскопию. Способы создания капсидных белков AAV, содержащих аминокислотные замены контактных аминокислотных остатков посредством случайного, рационального и/или вырожденного мутагенеза известны в данной области.

[0136] Этот комплексный подход представляет собой платформенную технологию, которая может применяться для модификации любого капсида AAV. Применение этой платформенной технологии позволяет получать антигенные варианты AAV, полученные из исходной матрицы капсида AAV, без потери эффективности трансдукции. В качестве одного из достоинств и преимуществ применение этой технологии расширит когорту пациентов, подходящих для генной терапии векторами AAV.

[0137] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения вирусного вектора, причем способ включает обеспечение клетки: (a) матрицей-нуклеиновой кислотой, содержащей по меньшей мере одну последовательность TR (например, последовательность TR AAV), и (b) последовательностями AAV, достаточными для репликации и заключения матрицы-нуклеиновой кислоты в капсиды AAV (например, последовательностями гер AAV и последовательностями сар AAV, кодирующими капсиды AAV по изобретению). Необязательно матрица-нуклеиновая кислота дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты. В конкретных вариантах осуществления, матрица-нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR AAV, расположенные в направлении 5' и 3' относительно последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты (при наличии), хотя они не обязательно должны быть непосредственно смежными с ней.

[0138] Матрицу-нуклеиновую кислоту и последовательности гер и сар AAV предоставляют в таких условиях, что такой вирусный вектор, содержащий матрицу-нуклеиновую кислоту, упакованную внутри капсида AAV, продуцируется в клетке. Способ может дополнительно включать в себя стадию сбора вирусного вектора из клетки. Вирусный вектор можно собирать из среды и/или посредством лизиса клеток.

[0139] Клетка может представлять собой клетку, перmissive для репликации вируса AAV. Можно использовать любую клетку, известную в данной области. В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В качестве другого варианта клетка может представлять собой транс-комплементирующую линию клеток, обеспечивающую функции, удаленные из дефектного по репликации вируса-помощника, например, клетки 293 или другие транс-комплементирующие E1a клетки.

[0140] Последовательности для репликации AAV и последовательности капсидов AAV можно получать любым способом, известным в данной области. В соответствии с текущими протоколами обычно экспрессируют гены гер/сар AAV на одной плазмиде. Последовательности для репликации и упаковки AAV не обязательно предоставлять вместе, хотя это может быть удобным. Последовательности гер и/или сар AAV можно предоставлять посредством любого вирусного или невирусного вектора. Например, последовательности гер/сар можно предоставлять посредством гибридного

аденовирусного вектора или вектора на основе вируса герпеса (например, вставлять в области E1a или E3 подвергнутого делеции аденовирусного вектора). Векторы EBV можно также использовать для экспрессии генов *car* и *her* AAV. Одним из преимуществ этого способа является то, что векторы EBV являются эписомальными, все еще поддерживая высокое количество копий на протяжении последовательных делений клетки (т. е. являются стабильно интегрированными в клетку в форме внехромосомных элементов, обозначенных как «ядерные эписомы на основе EBV», см. Margolski, (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immun.* 158:67).

[0141] В качестве дополнительной альтернативы, последовательности *her/car* могут быть стабильно встроены в клетку.

[0142] Как правило, последовательности *her/car* AAV не будут фланкированы TR для предотвращения спасения и/или упаковки этих последовательностей.

[0143] Матрицу-нуклеиновую кислоту можно предоставлять в клетку с использованием любого способа, известного в данной области. Например, матрицу можно предоставлять посредством невирусного (например, плазмидного) или вирусного вектора. В конкретных вариантах осуществления, матрицу-нуклеиновую кислоту предоставляют посредством вектора на основе вируса герпеса или аденовирусного вектора (например, вставленную в области E1a или E3 подвергнутого делеции аденовируса). В качестве другой иллюстрации, в Palombo et al., (1998) *J. Virology* 72:5025, описан бакуловирусный вектор, несущий репортерный ген, фланкированный TR AAV. Векторы EBV также можно использовать для доставки матрицы, как описано выше по отношению к генам *her/car*.

[0144] В другом репрезентативном варианте осуществления матрицу-нуклеиновую кислоту предоставляют посредством репликации вируса *gAAV*. В других вариантах осуществления, провирус AAV, содержащий матрицу-нуклеиновую кислоту, является стабильно интегрированным в хромосому клетки.

[0145] Для увеличения титров вируса в клетку можно предоставить функции вируса-помощника (например, аденовируса или вируса герпеса), стимулирующие продуктивную инфекцию AAV. Последовательности вируса-помощника, необходимые для репликации AAV, известны в данной области. Обычно эти последовательности предоставляют посредством аденовируса-помощника или вектора на основе вируса

герпеса. Альтернативно, последовательности аденовируса или вируса герпеса можно предоставлять посредством другого невирусного или вирусного вектора, например, в форме неинфекционной аденовирусной миниплазмиды, несущей все из генов-помощников, необходимых для стимулирования эффективной продукции AAV, как описано в Ferrari et al., (1997) Nature Med. 3: 1295, и патентах США № 6,040,183 и 6,093,570.

[0146] Кроме того, функции вируса-помощника можно предоставлять посредством упаковывающей клетки с последовательностями-помощниками, интегрированными в хромосому или поддерживаемыми в форме стабильного внехромосомного элемента. По существу, последовательности вируса-помощника не могут быть упакованы в вирионы AAV, например, не являются фланкированными TR.

[0147] Специалистам в данной области будет понятно, что может являться преимущественным предоставлять

[0148] последовательности для репликации AAV и последовательности капсида AAV, и последовательности вируса-помощника (например, аденовирусные последовательности) на одной конструкции-помощнике. Эта конструкция-помощник может представлять собой невирусную или вирусную конструкцию. В качестве неограничивающей иллюстрации эта конструкция-помощник может представлять собой гибридный аденовирус или гибридный вирус герпеса, содержащий гены гер/сар AAV.

[0149] В одном конкретном варианте осуществления последовательности гер/сарAAV и последовательности аденовируса-помощника предоставляют посредством одного аденовирусного вектора-помощника. Этот вектор может дополнительно содержать матрицу-нуклеиновую кислоту. Последовательности гер/сар AAV и/или матрицу гAAV можно вставлять в удаленную область (например, области E1a или E3) аденовируса.

[0150] В дополнительном варианте осуществления последовательности гер/сар AAV и последовательности аденовируса-помощника предоставляют посредством одного аденовирусного вектора-помощника. В соответствии с этим вариантом осуществления матрица гAAV может быть предоставлена в форме плазмидной матрицы.

[0151] В другом иллюстративном варианте осуществления последовательности гер/сар AAV и последовательности аденовируса-помощника предоставляют посредством одного аденовирусного вектора-помощника, и матрицу гAAV интегрируют в клетку в виде провируса. Альтернативно, матрицу гAAV предоставляют посредством вектора EBV, который поддерживают внутри клетки в виде внехромосомного элемента (например, в виде ядерной эписомы на основе EBV).

[0152] В дополнительном иллюстративном варианте осуществления последовательности гер/сар AAV и последовательности аденовируса-помощника предоставляют посредством одного аденовируса-помощника. Матрица гAAV может быть предоставлена в виде отдельного реплицирующегося вирусного вектора. Например, матрицу гAAV можно предоставлять посредством частицы гAAV или второй рекомбинантной аденовирусной частицы.

[0153] В соответствии с вышеописанными способами, гибридный аденовирусный вектор, как правило, содержит 5'- и 3'-цис-последовательности аденовируса, достаточные для репликации и упаковки аденовируса (т.е., концевые повторы аденовируса и последовательность PAC). Последовательности гер/сар AAV и, если присутствует, матрицу гAAV вставляют в остов аденовируса и фланкируют 5'- и 3'-цис-последовательностями так, что эти последовательности можно упаковывать в капсиды аденовирусов. Как описано выше, последовательности аденовируса-помощника и последовательности гер/сар AAV по существу не фланкированы TR, так что эти последовательности не упаковываются в вирионы AAV.

[0154] Zhang et al., ((2001) Gene Ther. 18:704-12) описан химерный помощник, содержащий и аденовирус и гены гер и сар AAV.

[0155] Вирус герпеса можно также использовать в качестве вируса-помощника в способах упаковки AAV. Гибридные вирусы герпеса, кодирующие белок (белки) гер AAV могут преимущественным образом способствовать более поддающимся масштабированию схемами продукции вектора AAV. Описан гибридный вектор на основе вируса простого герпеса типа I (HSV-1), экспрессирующий гены гер и сар AAV-2 (Conway et al., (1999) Gene Therapy 6:986 и WO 00/17377).

[0156] В качестве дополнительной альтернативы, вирусные векторы по изобретению можно получать в клетках насекомых с использованием бакуловирусных векторов для

доставки генов гер/сар и матрицы гAAV, как описано, например, в Urabe et al., (2002) Human Gene Therapy 13: 1935–43.

[0157] Запасы вектора AAV для хранения, не содержащие загрязнений вирусом-помощником, можно получать любым способом, известным в данной области. Например, AAV и вирус-помощник можно легко разделять на основании размера. AAV можно также отделять от вируса-помощника на основании аффинности для гепаринового субстрата (Zolotukhin et al. (1999) Gene Therapy 6:973). Можно использовать подвергнутые делеции дефектные по репликации вирусы-помощники, так чтобы любой загрязняющий вирус-помощник не был компетентным по репликации. В качестве дополнительной альтернативы можно использовать аденовирус-помощник, лишенный экспрессии поздних генов, поскольку для того, чтобы опосредовать упаковку вируса AAV, необходима только экспрессия ранних генов аденовируса. В данной области известны мутантные аденовирусы, дефектные по экспрессии поздних генов (например, мутантные аденовирусы ts100K и ts149).

#### Рекомбинантные вирусные векторы

[0158] Вирусные векторы по настоящему изобретению можно применять для доставки нуклеиновых кислоты в клетки *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. В частности, вирусный вектор можно преимущественным образом применять для доставки или переноса нуклеиновых кислот в клетки животного, в том числе млекопитающего. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота («карго-нуклеиновая кислота») может быть заключена в капсидный белок по изобретению.

[0159] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен вектор AAV, содержащий рекомбинантный капсидный белок, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с любой одной из SEQ ID NO: 18-80, 300–410, 422–612 или 783–785. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит рекомбинантный капсидный белок, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 380 или 384. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор AAV содержит рекомбинантный капсидный белок, имеющий по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с любой одной из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785 и дополнительно содержащий карго- нуклеиновую кислоту, заключенную в капсидный белок. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор AAV содержит рекомбинантный капсидный белок, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 380 или 384, и дополнительно содержащий карго-нуклеиновую кислоту, заключенную в капсидный белок.

[0160] Последовательность карго-нуклеиновой кислоты, доставляемой в вирусные векторы по настоящему изобретению, может быть любой (-ыми) последовательностью (-ями) гетерологичной нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, включают нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, включая терапевтические (например, для медицинского или ветеринарного применения) или иммуногенные (например, для вакцин) полипептиды или РНК.

[0161] Терапевтические полипептиды включают, без ограничений, белок трансмембранный регулятор муковисцидоза (CFTR), дистрофин (включая мини- и микродистрофины, см., например, Vincent et al, (1993) Nature Genetics 5: 130; публикацию патента США № 2003/017131; международная публикация WO/2008/088895, Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 1 3714-13719 (2000); и Gregorevic et al., Mol. Ther. 16:657-64 (2008)), пропептид миостатина, фоллистатин, растворимый рецептор активина 11 типа, IGF-1, аполипопротеины, такие как apoA (apoA1, apoA2, apoA4, apoA-V), apoB (apoB100, ApoB48), apoC (apoC1, apoCII, apoCIII, apoCIV), apoD, apoE, apoH, apoL, apo(a), противовоспалительные полипептиды, такие как доминантный мутант Iкаппа В, саркоспан, утрофин (Tinsley et al, (1996) Nature 384:349), мини-утрофин, факторы свертывания крови (например, фактор VIII, фактор IX, фактор X и т. д.), эритропоэтин, ангиостатин, эндостатин, каталазу, тирозингидроксилазу, супероксиддисмутазу, лептин, рецептор LDL, липопротеинлипазу, програнулин, орнитинтранскарбамилазу,  $\beta$ -глобин,  $\alpha$ -глобин, спектрин, альфа-1-антитрипсин, аденозиндезаминазу,

гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу,  $\beta$ -глюкоцереброзидазу, амилоид бета, тау, баттенин, сфингомиелиназу, лизосомальную гексозаминидазу А, дегидрогеназу кетокислот с разветвленной цепью, белок RP65, цитокины (например, альфа-интерферон, бета-интерферон, гамма-интерферон, интерлейкин-2, интерлейкин-4, альфа синуклеин, паркин, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, лимфотоксин и т. п.), пептидные факторы роста, нейротрофические факторы и гормоны (например, соматотропин, инсулин, инсулиноподобные факторы роста 1 и 2, тромбоцитарный фактор роста, эпидермальный фактор роста, фактор роста фибробластов, фактор роста нервов, нейротрофический фактор-3 и -4, нейротрофический фактор головного мозга, костные морфогенетические белки [включая RANKL и VEGF], глиальный фактор роста, трансформирующий фактор роста- $\alpha$  и - $\beta$ , и т. п.), хантингин, лизосомальную кислую альфа-глюкозидазу, идуронат-2-сульфатазу, N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу, альфа-галактозидазу А, рецепторы (например, растворимый рецептор фактора роста некроза опухолей), S100A1, убиквитинпротеинлигазу E3, парвальбумин, аденилатциклазу типа 6, молекулу, модулирующую обработку кальция (например, SERCA<sub>2A</sub>, ингибитор 1 PP1 и их фрагменты [например, WO 2006/029319 и WO 2007/100465]), молекулу, вызывающую нокдаун киназы сопряженного с G-белком рецептора типа 2, такую как усеченный конститутивно активный bARKct, противовоспалительные факторы, такие как IRAP, антимиостатиновые белки, аспартоацилазу, моноклональные антитела (включая одноцепочечные моноклональные антитела; примером mAb является mAb Герцептин<sup>®</sup>), нейропептиды и их фрагменты (например, галанин, нейропептид Y (см. патент США 7,071,172)), ингибиторы ангиогенеза, такие как вазогибин и другие ингибиторы VEGF (например, вазогибин 2 [см., WO JP2006/073052]). Другие иллюстративные последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты кодируют продукты гена суицида (например, тимидинкиназу, цитозиндезаминазу, дифтерийный токсин и фактор некроза опухоли), белки, которые усиливают или ингибируют транскрипцию факторов хозяина (например, убитый нуклеазой Cas9, связанный с усилителем транскрипции или элементом ингибитора, белки «цинковые пальцы», связанные с усилителем транскрипции или элементом ингибитора, эффекторы, подобные активатору транскрипции (TAL), связанные с усилителем транскрипции или элементом ингибитора), белки, придающие устойчивость к лекарственному средству, используемому в терапии злокачественных новообразований, генные продукты-супрессоры опухолей (например, p53, Rb, Wt-1), TRAIL, FAS-лиганд и любой другой

полипептид, который оказывает терапевтическое действие на субъекта, нуждающегося в этом. Векторы AAV также можно использовать для доставки моноклональных антител и фрагментов антител, например, антитела или фрагмента антитела, направленного против миостатина (см., например, Fang et al., *Nature Biotechnology* 23:584-590 (2005)). Последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, включают те, что кодируют репортерные полипептиды (например, фермент). Репортерные полипептиды известны в данной области и включают в себя, без ограничений, зеленый флуоресцентный белок,  $\beta$ -галактозидаза, щелочная фосфатаза, люцифераза и ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы.

[0162] Необязательно, гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует секретируемый белок (например, полипептид, который является секретируемым полипептидом в его нативном состоянии или который был сконструирован для секретирования, например, посредством функциональной ассоциации с секреторной сигнальной последовательностью, как известно в данной области).

[0163] Альтернативно, в конкретных вариантах осуществления этого изобретения гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим (например, как описано в патенте США № 5,877,022), РНК, вызывающую опосредуемый сплайсосомой/gam-сплайсинг (см. Puttaraju et al, (1999) *Nature Biotech.* 17:246; патент США № 6,013,487; патент США № 6,083,702), интерферирующие РНК (РНКи), включая малые интерферирующие РНК (миРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК) или микроРНК, опосредующие выключение гена (см. Sharp et al, (2000) *Science* 287:2431) и другие нетранслируемые РНК, такие как «направляющие» РНК (Gorman et al., (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 :4929; патент США № 5,869,248 от Yuan et al.) и т. п. Иллюстративные нетранслируемые РНК включают в себя РНКи против продукта гена множественной устойчивости к лекарственным средствам (MDR) (например, для лечения и/или профилактики опухолей и/или для введения в сердце для предотвращения повреждения посредством химиотерапии), РНКи против миостатина (например, при мышечной дистрофии Дюшенна), РНКи против VEGF (например, для лечения и/или профилактики опухолей), РНКи против фосфоламбана (например, для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, см., например, Andino et al., *J. Gene Med.* 10: 132-142 (2008) и Li et al., *Acta Pharmacol Sin.* 26:51-55 (2005)); ингибирующие фосфоламбан или доминантно-

негативные молекулы, такие как фосфоламбан S16E (например, для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, см., например, Hoshijima et al. Nat. Med. 8:864-871 (2002)), РНКи к аденозинкиназе (например, для лечения эпилепсии) и РНКи, направленная против патогенных организмов и вирусов (например, вируса гепатита В и/или С, вируса иммунодефицита человека, CMV, вируса простого герпеса, вируса папилломы человека и т. п.).

[0164] Кроме того, может быть доставлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая направляет альтернативный сплайсинг. Для иллюстрации: антисмысловая последовательность (или другая ингибирующая последовательность), комплементарная 5'- и/ли 3'-участку сплайсинга экзона 51 дистрофина, может быть доставлена вместе с промотором малой ядерной (мя) РНК U1 или U7, чтобы индуцировать пропуск этого экзона. Например, последовательность ДНК, содержащая промотор U1 или U7 мяРНК, расположенный в направлении 5' от антисмысловой (-ых)/ингибирующей (-их) последовательности (последовательностей), может быть упакована и доставлена в модифицированный капсид по изобретению.

[0165] В некоторых вариантах осуществления может быть доставлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая направляет редактирование гена. Например, нуклеиновая кислота может кодировать направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой одиночную направляющую РНК (онРНК), содержащую последовательность сгРНК и последовательность tracrРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может кодировать нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу цинкового пальца, самонаводящуюся эндонуклеазу, TALEN (эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции), NgAgo (эндонуклеазу аргонавт), SGN (структурно-направляемую эндонуклеазу), RGN (направляемую РНК нуклеазу) или их модифицированные или усеченные варианты. В некоторых вариантах осуществления направляемая РНК нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, нуклеазу Cas12(a), нуклеазу (Cpf1), нуклеазу Cas12b, нуклеазу Cas12c, TnpB-подобную нуклеазу, нуклеазу Cas13a (C2c2), нуклеазу Cas13b или их модифицированные или усеченные варианты. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 выделена или получена из *S. pyogenes* или *S. aureus*.

[0166] В некоторых вариантах осуществления может быть доставлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая направляет нокдаун гена. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать миРНК, кшРНК, микроРНК или антисмысловую нуклеиновую кислоту.

[0167] Вирусный вектор может также содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, разделяющую гомологию и вступающую в рекомбинацию с локусом на хромосоме хозяина. Этот подход можно использовать для коррекции генетического дефекта в клетке-хозяине.

[0168] В настоящем изобретении также предложены вирусные векторы, экспрессирующие иммуногенный полипептид, например, для вакцинации. Нуклеиновая кислота может кодировать любой представляющий интерес иммуноген, известный в данной области, включая, без ограничений, иммуногены из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса гриппа, белки gag ВИЧ или SIV, антигены опухолей, антигены злокачественных новообразований, бактериальные антигены, вирусные антигены и т. п.

[0169] Применение парвовирусов в качестве вакцинных векторов известно в данной области (см., например, Miyamura et al, (1994) Proc. Nat. Acad. Sci USA 91:8507; патент США № 5,916,563 от Young et al, патент США № 5,905,040 от Mazzara et al, патент США № 5,882,652, патент США № 5,863,541 от Samulski et al). Антиген может быть представлен в парвовирусном капсиде.

[0170] Альтернативно, антиген можно экспрессировать с гетерологичной нуклеиновой кислоты, введенной в рекомбинантный геном вектора. Любой представляющий интерес иммуноген, описанный в настоящем документе и/или известный в данной области, может быть обеспечен с помощью вирусного вектора по настоящему изобретению.

[0171] Иммуногенный полипептид может представлять собой любой полипептид, подходящий для стимуляции иммунного ответа и/или защиты субъекта от инфекции и/или заболевания, включая, без ограничений, микробные, бактериальные, протозойные, паразитарные, грибковые и/или вирусные инфекции и заболевания. Например, иммуногенный полипептид может представлять собой иммуноген ортомиксовируса (например, иммуноген вируса гриппа, такой как поверхностный белок гемагглютинин (НА) вируса гриппа или нуклеопротеин вируса гриппа, или

иммуноген вируса гриппа лошадей) или иммуноген лентивируса (например, иммуноген вируса инфекционной анемии лошадей, иммуноген вируса иммунодефицита обезьян (SIV), или иммуноген вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такой как белок GP 160 оболочки ВИЧ или SIV, белки матрикса/капсида ВИЧ или SIV и продукты генов gag, pol и env ВИЧ или SIV). Иммуногенный полипептид может также представлять собой иммуноген аренавируса (например, иммуноген вируса лихорадки Ласса, такой как белок нуклеокапсида вируса лихорадки Ласса и гликопротеин оболочки вируса лихорадки Ласса), иммуноген поксвируса (например, вируса осповакцины, такой как продукты гена L1 или L8 осповакцины), иммуноген флавивируса (например, иммуноген вируса желтой лихорадки или иммуноген вируса японского энцефалита), иммуноген филовirusа (например, иммуноген вируса Эбола или иммуноген вируса марбургской болезни, такой как продукты генов NP и GP), иммуноген буньявируса (например, иммуногены вирусов RVFV, CCHF и SFS) или иммуноген коронавируса (например, иммуноген инфекционного коронавируса человека, такой как ген гликопротеина оболочки коронавируса человека, или иммуноген вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней, или иммуноген вируса инфекционного бронхита птиц). Кроме того, иммуногенный полипептид может представлять собой иммуноген вируса полиомиелита, иммуноген вируса герпеса (например, иммуногены CMV, EBV, HSV), иммуноген вируса свинки, иммуноген вируса кори, иммуноген вируса краснухи, дифтерийный токсин или другой дифтерийный иммуноген, антиген возбудителя коклюша, иммуноген вируса гепатита (например, гепатита А, гепатита В, гепатита С и т. п.), и/или любой другой вакцинный иммуноген, известный в данной области в настоящее время или тот, который будет открыт как иммуноген позже.

[0172] Альтернативно, иммуногенный полипептид может представлять собой любой антиген клетки опухоли или злокачественного новообразования. Необязательно, антиген опухоли или злокачественного новообразования экспрессирован на поверхности клетки злокачественного новообразования.

[0173] Иллюстративные антигены клеток злокачественных новообразований и опухолей описаны в S.A. Rosenberg (Immunity 10:281 (1991)). Другие иллюстративные антигены злокачественного новообразования и опухоли включают, без ограничений: продукт гена BRCA1, продукт гена BRCA2, gp100, тирозиназу, GAGE- 1/2, BAGE, RAGE, LAGE, NY-ESO-1, CDK-4,  $\beta$ -катенин, MUM-1, каспазу-8, KIAA0205, HPVE,

SART-1, FRAME, p15, антигены опухоли меланомы (Kawakami et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3515; Kawakami et al., (1994) J. Exp. Med., 180:347; Kawakami et al., (1994) Cancer Res. 54:3124), MART-1, gp100, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, CEA, TRP-1, TRP-2, P-15, tyrosinase (Brichard et al., (1993) J Exp. Med. 178:489); продукт гена HER-2/neu (патент США № 4,968,603), CA 125, LK26, FB5 (эндосиалин), TAG 72, AFP, CA 19-9, NSE, DU-PAN-2, CA50, SPan-1, CA72-4, HCG, STN (сиалил-Tn-антиген), белки c-erbB-2, PSA, L-CanAg, рецептор эстрогенов, глобулин молочного жира; белок-супрессор опухолей p53 (Levine, (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:623); муциновые антигены (международная патентная публикация № WO 90/05142); теломеразы; белки ядерного матрикса; простатическую кислую фосфатазу; антигены вируса папилломы; и/или известные в настоящее время или те, которые будут обнаружены позже, антигены, связанные со следующими злокачественными новообразованиями: меланома, аденокарцинома, тимома, лимфома (например, неходжкинская лимфома и лимфома Ходжкина) саркома, рак легкого, рак печени, рак толстой кишки, лейкозы, рак матки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки, рак поджелудочной железы, злокачественная опухоль головного мозга и любые другие злокачественные новообразования или онкологические заболевания, известные в настоящее время или те, которые будут обнаружены позже (см. например, Rosenberg, (1996) Ann. Rev. Med. 47:481-91).

[0174] В качестве дополнительной альтернативы, гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать любой полипептид, который желательно продуцировать в клетке *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Например, вирусные векторы можно вводить в культивируемые клетки и выделять из них экспрессированный генный продукт.

[0175] Специалистам в данной области будет понятно, что представляющая (ие) интерес гетерологичная (-ые) нуклеиновая (-ые) кислота (кислоты) может (могут) являться функционально связанной (-ыми) с подходящими контрольными последовательностями. Например, гетерологичная нуклеиновая кислота может быть функционально связанной с контрольными элементами экспрессии, такими как контрольные сигналы транскрипции/трансляции, точки начала репликации, сигналы полиаденилирования, участки внутренней посадки рибосомы (IRES), промоторы и/или энхансеры и т. п.

[0176] Кроме того, регулируемая экспрессия интересующей (-их) гетерологичной (ых) нуклеиновой (-ых) кислоты (кислот) может быть достигнута на посттранскрипционном уровне, например, путем регулирования селективного сплайсинга различных интронов посредством наличия или отсутствия олигонуклеотида, малой молекулы и/или другого соединения, которое избирательно блокирует активность сплайсинга в определенных участках (например, как описано в WO 2006/119137).

[0177] Специалистам в данной области будет понятно, что можно использовать множество промоторных/энхансерных элементов в зависимости от желательного уровня и тканеспецифичности экспрессии. Промотор/энхансер может быть конститутивным или индуцируемым, в зависимости от желательной модели экспрессии. Промотор/энхансер может являться нативным или чужеродным и может представлять собой природную или синтетическую последовательность. Под определением «чужеродный» подразумевают, что область инициации транскрипции не обнаружена у хозяина дикого типа, которому вводят область инициации транскрипции.

[0178] В конкретных вариантах осуществления промоторные/энхансерные элементы могут являться нативными для клетки-мишени или субъекта, подлежащего лечению. В иллюстративных вариантах осуществления, промоторные/энхансерные элементы могут являться нативными для последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты. Промоторный/энхансерный элемент обычно выбирают таким образом, чтобы он мог функционировать в представляющей (-их) интерес клетке-мишени (клетках-мишенях). Кроме того, в конкретных вариантах осуществления промоторный/энхансерный элемент представляет собой промоторный/энхансерный элемент млекопитающих. Промоторный/энхансерный элемент может быть конститутивным или индуцируемым.

[0179] Индуцируемые элементы контроля экспрессии обычно обеспечивают преимущество в тех видах применения, в которых желательно обеспечивать регуляцию экспрессии последовательности (-ей) гетерологичной нуклеиновой кислоты. Индуцируемые промоторные/энхансерные элементы для доставки генов могут представлять собой тканеспецифические или предпочтительные для ткани промоторные/энхансерные элементы, и включают в себя специфические или предпочтительные для мышц (включая конкретно или предпочтительно сердечную, скелетные и/или гладкие мышцы), специфические или предпочтительные для нервной ткани (включая специфические или предпочтительные для головного мозга),

специфические или предпочтительные для глаза (включая специфические для сетчатки и специфические для роговицы), специфические или предпочтительные для печени, специфические или предпочтительные для костного мозга, специфические или предпочтительные для поджелудочной железы, специфические или предпочтительные для селезенки и специфические или предпочтительные для легкого промоторные/энхансерные элементы. Другие индуцируемые промоторные/энхансерные элементы включают в себя индуцируемые гормонами или индуцируемые металлами элементы. Иллюстративные индуцируемые промоторные/энхансерные элементы включают в себя, без ограничений, элемент Tet вкл./выкл., индуцируемый RU486 промотор, индуцируемый экдизоном промотор, индуцируемый рапамицином промотор и промотор металлотионеина.

[0180] В вариантах осуществления, в которых последовательность (-и) гетерологичной нуклеиновой кислоты транскрибируют, а затем транслируют в клетках-мишенях, специфические сигналы инициации, как правило, применяют для эффективной трансляции вставленных последовательностей, кодирующих белок. Эти экзогенные последовательности контроля трансляции, которые могут включать в себя иницирующий кодон ATG и смежные последовательности, могут происходить из множества источников, как природных, так и синтетических.

[0181] Вирусные векторы по настоящему изобретению обеспечивают способы доставки гетерологичных нуклеиновых кислот в широкий диапазон клеток, включая делящиеся и неделящиеся клетки. Вирусные векторы можно применять для доставки представляющей интерес нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, например, для получения полипептида *in vitro* или для генотерапии *ex vivo*. Вирусные векторы можно дополнительно использовать в способе доставки нуклеиновой кислоты нуждающемуся в этом субъекту, например, для экспрессии иммуногенного или терапевтического полипептида или функциональной РНК. Таким образом, у субъекта можно продуцировать полипептид или функциональную РНК *in vivo*. Субъект сможет нуждаться в полипептиде, поскольку у субъекта имеется дефицит полипептида. Кроме того, способ можно применять на практике, потому что продукция полипептида или функциональной РНК у субъекта может оказывать некоторый положительный эффект.

[0182] Вирусные векторы также можно использовать для получения представляющего интерес полипептида или функциональной РНК в культивируемых клетках или у

субъекта (например, с использованием субъекта в качестве биореактора для получения полипептида или для наблюдения воздействия функциональной РНК на субъекта, например, в связи со способами скрининга).

[0183] Как правило, вирусные векторы по настоящему изобретению можно применять для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или функциональную РНК для лечения и/или профилактики любого состояния заболевания, при котором доставка терапевтического полипептида или функциональной РНК приносит пользу. Иллюстративные состояния заболевания включают, без ограничений: муковисцидоз (белок-трансмембранный регулятор кистозного фиброза) и другие заболевания легких, гемофилию А (фактор VIII), гемофилию В (фактор IX), талассемию ( $\beta$ -глобин), анемию (эритропоэтин) и другие болезни крови. Болезнь Альцгеймера (GDF; неприлизин), рассеянный склероз ( $\beta$ -интерферон), болезнь Паркинсона (выделенный из линии глиальных клеток нейротрофический фактор [GDNF]), болезнь Гентингтона (РНКи для удаления повторов), болезнь Канавана, боковой амиотрофический склероз, эпилепсию (галанин, нейротрофические факторы) и другие неврологические нарушения, злокачественное новообразование (эндостатин, ангиостатин, TRAIL, FAS-лиганд, цитокины, включая интерфероны; РНКи, включая РНКи против VEGF или продукт гена множественной устойчивости, miR-26a [например, для гепатоцеллюлярной карциномы]), сахарный диабет (инсулин), мышечные дистрофии, включая мышечную дистрофию Дюшенна и Беккера (дистрофин, минидистрофин, инсулиноподобный фактор роста I, саркогликан [например,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ]), РНКи против миостатического пропептида миостатина, фоллистатин, растворимый рецептор активина типа II, противовоспалительные полипептиды, такие как доминантный мутант I каппа В, саркоспан, утрофин, мини-утрофин, антисмысловая или РНКи против границ сплайсинга в гене дистрофина для индукции пропуска экзонов [см., например, WO/2003/095647], антисмысловая РНК против мяРНК U7 для индукции пропуска экзонов [см., например, WO/2006/021724] и антитела или фрагменты антител против миостатина или пропептида миостатина), болезнь Гоше (глюкоцереброзидаза), болезнь Гурлера ( $\alpha$ -L-идуронидаза), дефицит аденозиндезаминазы (аденозиндезаминаза), болезни накопления гликогена (например, болезнь Фабри [ $\alpha$ -галактозидаза] и болезнь Помпе [лизосомальная кислая альфа-глюкозидаза]) и другие нарушения метаболизма, врожденную эмфизему (альфа-1-антитрипсин), синдром Леша — Найхана (гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-

трансфераза), болезнь Ниманна — Пика (сфингомиелиназа), болезнь Тея — Сакса (лизосомальная гексозаминидаза А), болезнь мочи с запахом кленового сиропа (дегидрогеназа кетокислот с разветвленной цепью), дегенеративные заболевания сетчатки (и другие заболевания глаза и сетчатки, например, PDGF в случае дегенерации желтого пятна и/или вазогибин или другие ингибиторы VEGF или другие ингибиторы ангиогенеза для лечения/профилактики заболеваний сетчатки, например, при сахарном диабете I типа), заболевания солидных органов, таких как головной мозг (включая болезнь Паркинсона [GDNF], астроцитомы [эндостатин, ангиостатин и/или РНКи против VEGF], глиобластомы [эндостатин, ангиостатин и/или РНКи против VEGF]), печень, почка, сердце, включая застойную сердечную недостаточность или заболевание периферических артерий (PAD) (например, посредством доставки ингибитора протеинфосфатазы 1 (I-1) и его фрагментов (например ПС), *serca2a*, белки с цинковыми пальцами, регулирующими ген фосфоламбана, *Barkct*, 32-адренергический рецептор, киназа 2-адренергического рецептора (BARK), фосфоинозитид-3-киназа (киназа PI3), S100A1, парвальбумин, аденилатциклаза типа б, молекула, вызывающая нокдаун киназы сопряженного с G-белком рецептора типа 2, такая как усеченный конститутивно активный *bARKct*; калсакрин, РНКи против фосфоламбана; ингибирующие фосфоламбан или доминантно-негативные молекулы, такие как фосфоламбан S16E и т. п.), артрит (инсулиноподобные факторы роста), болезни суставов (инсулиноподобные факторы роста 1 и/или 2), гиперплазию интимы (например, посредством доставки *enos*, *inos*), улучшение выживаемости сердечных трансплантатов (супероксиддисмутаза), СПИД (растворимый CD4), истощение мышечной ткани (инсулиноподобный фактор роста I), почечную недостаточность (эритропоэтин), анемию (эритропоэтин), артрит (противовоспалительные факторы, такие как IRAP и TNF $\alpha$  растворимый рецептор), гепатит ( $\alpha$ -интерферон), дефицит рецептора LDL (рецептор LDL), гипераммониемию (орнитинтранскарбамилаза), болезнь Краббе (галактоцереброзидаза), болезнь Баттена, спинномозговые атаксии, включая SCA1, SCA2 и SCA3, фенилкетонурию (фенилаланингидроксилаза), аутоиммунные заболевания и т. п. Изобретение можно дополнительно использовать после трансплантации органов для увеличения успешности трансплантации и/или для уменьшения отрицательных побочных эффектов трансплантации органов или средств вспомогательной терапии (например, посредством введения иммунодепрессантов или ингибирующих нуклеиновых кислот для блокирования продукции цитокинов). В качестве другого примера, костные морфогенетические белки (включая BNP 2, 7 и т. д.,

RANKL и/или VEGF) можно вводить с костным аллотрансплантатом, например, после перелома или хирургического удаления у пациента со злокачественным новообразованием.

[0184] В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы по настоящему изобретению можно применять для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или функциональную РНК для лечения и/или профилактики заболевания или нарушения функции печени. Заболевание или нарушение функции печени может представлять собой, например, первичный билиарный цирроз, неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), аутоиммунный гепатит, гепатит В, гепатит С, алкогольную болезнь печени, фиброз, желтуху, первичный склерозирующий холангит (PSC), синдром Бадда — Киари, гемохроматоз, болезнь Вильсона, алкогольный фиброз, неалкогольный фиброз, стеатоз печени, синдром Жильбера, атрезию желчных путей, дефицит альфа-1-антитрипсина, синдром Алажиля, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз, гемофилию В, наследственный ангионевротический отек (HAE), гомозиготную семейную гиперхолестеринемию (HoFH), гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию (HeFH), болезнь фон Гирке (GSD I), гемофилию А, метилмалоновую ацидемию, пропионовую ацидемию, гомоцистинурию, фенилкетонурию (PKU), тирозинемию типа 1, дефицит аргиназы 1, дефицит аргининосукцинатлиазы, дефицит карбамоилфосфатсинтетазы 1, цитруллинемия типа 1, дефицит цитрина, синдром Криглера — Найяра 1 типа, цистиноз, болезнь Фабри, болезнь накопления гликогена 1b, дефицит LPL, дефицит N-ацетилглутаматсинтетазы, дефицит орнитинтранскарбамилазы, дефицит орнитинтранслоказы, первичная гипероксалурия типа 1 или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) вследствие дефицита аденозиндезаминазы (ADA).

[0185] Изобретение также может быть использовано для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS). Например, вирусный вектор по изобретению может быть использован для доставки нуклеиновой (-ых) кислоты (кислот), связанной (-ых) со стволовыми клетками, в плюрипотентную клетку, такую как взрослые фибробласты, клетки кожи, клетки печени, почечные клетки, жировые клетки, сердечные клетки, нервные клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки и т. п.

[0186] Факторы, кодирующие нуклеиновые кислоты, связанные со стволовыми клетками, известны в данной области. Неограничивающие примеры таких факторов, связанных со стволовыми клетками и плюрипотентностью, включают: Oct-3/4, семейство SOX (например, SOX 1, SOX2, SOX3 и/или SOX 15), семейство Klf (например, Klf1, Klf4 и/или Klf5), семейство Myc (например, C-myc, L-myc и/или N-myc), NANOG и/или LIN28.

[0187] Изобретение также может использоваться на практике для лечения и/или профилактики метаболических нарушений, таких как сахарный диабет (например, инсулин), гемофилия (например, фактор IX или фактор VIII), лизосомальных болезней накопления, таких как мукополисахаридоз (например, синдром Слая [ $\beta$ -глюкуронидаза], синдром Гурлера [альфа-L-идуронидаза], синдром Шейе [альфа-L-идуронидаза], синдром Гурлера — Шейе [альфа-L-идуронидаза], синдром Гунтера [идуронатсульфатаза], синдром Санфилиппо А [гепарансульфамидаза], В [N-ацетилглюкозаминидаза], С [ацетил-КоА:альфа-глюкозаминид ацетилтрансфераза], D [N-ацетилглюкозамин 6-сульфатаза], синдром Моркио А [галактоза-сульфатсульфатаза], В [п-галактозидаза], синдром Марото — Лами [N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза], etc.), болезнь Фабри (альфа-галактозидаза), болезнь Гоше (глюкоцереброзидаза) или болезней накопления гликогена (например, болезнь Помпе; лизосомальная кислая альфа-глюкозидаза).

[0188] Перенос генов имеет значительное потенциальное применение для понимания и обеспечения терапии состояний заболевания. Существует ряд наследственных заболеваний, для которых известны и клонированы дефектные гены. Как правило, вышеуказанные состояния заболевания попадают в два класса: состояния дефицита, как правило, ферментов, наследуемые обычно рецессивным образом, и состояния неуравновешенности, которые могут затрагивать регуляторные или структурные белки, и которые обычно наследуются доминантным образом. В случае заболеваний с состоянием дефицита, перенос гена можно использовать для доставки нормального гена в поврежденные ткани для заместительной терапии, а также как для получения моделей заболевания на животных с использованием антисмысловых мутаций. В случае заболеваний с состоянием неуравновешенности, перенос гена можно использовать для получения состояния заболевания в модельной системе, которую затем используют для попыток противодействия состоянию заболевания. Таким

образом, вирусные векторы по настоящему изобретению позволяют лечение и/или профилактику генетических заболеваний.

[0189] Вирусные векторы по настоящему изобретению также можно использовать для предоставления в клетку функциональной РНК *in vitro* или *in vivo*. Функциональная РНК может представлять собой, например, некодирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления экспрессия функциональной РНК в клетке может уменьшать экспрессию клеткой конкретного белка-мишени. Соответственно, функциональную РНК можно вводить для уменьшения экспрессии конкретного белка у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления экспрессия функциональной РНК в клетке может увеличивать экспрессию клеткой конкретного белка-мишени. Соответственно, функциональную РНК можно вводить для увеличения экспрессии конкретного белка у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления экспрессия функциональной РНК может регулировать сплайсинг конкретной целевой РНК в клетке. Соответственно, функциональную РНК можно вводить для регулирования сплайсинга конкретной РНК у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления экспрессия функциональной РНК в клетке может регулировать функцию конкретного белка-мишени в клетке. Соответственно, функциональную РНК можно вводить для регулирования функции конкретного белка у нуждающегося в этом субъекта. Функциональную РНК также можно вводить в клетки *in vitro* для регулирования экспрессии генов и/или физиологии клеток, например, для оптимизации систем культур клеток или тканей или в методах скрининга.

[0190] Кроме того, вирусные векторы в соответствии с настоящим изобретением находят применение в способах диагностики и скрининга, в которых представляющая интерес нуклеиновая кислота временно или стабильно экспрессируется в системе культуры клеток, или альтернативно, в модели на трансгенных животных.

[0191] Вирусные векторы по настоящему изобретению также можно использовать для различных нетерапевтических целей, включая, без ограничений, использование в протоколах оценки нацеливания, клиренса, транскрипции, трансляции гена и т. п., как это будет очевидно специалисту в данной области. Вирусные векторы также можно использовать с целью оценки безопасности (распространение, токсичность, иммуногенность и т. п.). Такие данные, например, рассматриваются Управлением по

санитарному контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США как часть процесса утверждения регулирующими органами до оценки клинической эффективности.

[0192] В качестве следующего аспекта, вирусные векторы по настоящему изобретению можно использовать для получения иммунного ответа у субъекта. В соответствии с этим вариантом осуществления вирусный вектор, содержащий последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенный полипептид, можно вводить субъекту, и при этом субъекта развивается активный иммунный ответ в отношении иммуногенного полипептида. Иммуногенные полипептиды являются такими, как описано выше в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вызывается защитный иммунный ответ.

[0193] Альтернативно, вирусный вектор можно вводить в клетку *ex vivo*, и при этом измененную клетку вводят субъекту. Вирусный вектор содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту вводят в клетку, и эту клетку вводят субъекту, при этом гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая иммуноген, может быть экспрессирована и может индуцировать у субъекта иммунный ответ против иммуногена. В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой антигенпредставляющую клетку (например, дендритную клетку).

[0194] «Активный иммунный ответ» или «активный иммунитет» характеризуется «участием тканей и клеток хозяина после встречи с иммуногеном. Он включает дифференцировку и пролиферацию иммунокомпетентных клеток в лимфоретикулярных тканях, что приводит к синтезу антитела или к развитию опосредованной клетками реакционной способности, или к тому и другому». Herbert B. Herscowitz, *Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation*, in *IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES* 1 17 (Joseph A. Bellanti ed., 1985). Альтернативно установлено, что активный иммунный ответ развивается у хозяина после воздействия иммуногенов при инфекции или при вакцинации. Активный иммунитет может отличаться от пассивного иммунитета, который приобретается посредством переноса предварительно сформированных веществ (антител, факторов переноса, трансплантата тимуса, интерлейкина-2) от активно иммунизированного хозяина к неиммунному хозяину.

[0195] В контексте настоящего документа «защитный» иммунный ответ или «защитный» иммунитет обозначает то, что иммунный ответ обеспечивает некоторое преимущество для субъекта, в том что он предотвращает или уменьшает частоту возникновения заболевания. Альтернативно, защитный иммунный ответ или защитный иммунитет можно использовать для лечения и/или профилактики заболевания, в частности, злокачественного новообразования или опухолей (например, посредством предотвращения образования злокачественного новообразования или опухоли, посредством вызова регрессии злокачественного новообразования или опухоли и/или посредством предотвращения метастазирования и/или посредством предотвращения роста метастатических узлов). Защитные эффекты могут являться полными или частичными, при условии, что преимущество лечения превышает любые его недостатки.

[0196] В конкретных вариантах осуществления вирусный вектор или клетку, содержащую гетерологичную нуклеиновую кислоту, можно вводить в иммунологически эффективном количестве, как описано ниже.

[0197] Вирусные векторы по настоящему изобретению можно вводить также для иммунотерапии злокачественного новообразования посредством введения вирусного вектора, экспрессирующего один или более антигенов клетки злокачественного новообразования (или иммунологически сходную молекулу) или любой другой иммуноген, вызывающий иммунный ответ против клетки злокачественного новообразования. Для иллюстрации: иммунный ответ у субъекта можно вызывать против антигена клетки злокачественного новообразования посредством введения вирусного вектора, содержащего гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген клетки злокачественного новообразования, например, для лечения субъекта со злокачественным новообразованием и/или для предотвращения развития злокачественного новообразования у субъекта. Вирусный вектор можно вводить субъекту *in vivo* или с использованием способов *ex vivo*, как описано в настоящем документе.

[0198] Альтернативно, антиген злокачественного новообразования может экспрессироваться как часть вирусного капсида или быть иным образом ассоциирован с вирусным капсидом (например, как описано выше).

[0199] В качестве другой альтернативы для лечения и/или профилактики злокачественного новообразования можно вводить любую другую терапевтическую нуклеиновую кислоту (например, РНКи) или полипептид (например, цитокин), известные в данной области.

[0200] В контексте настоящего документа, термин «злокачественное новообразование» охватывает злокачественные новообразования, формирующие опухоли. Подобным образом, термин «злокачественная ткань» охватывает опухоли. «Антиген клетки злокачественного новообразования» охватывает антигены опухолей.

[0201] Термин «злокачественное новообразование» обладает значением, понятным в данной области, например, неконтролируемый рост ткани, обладающий потенциалом для распространения к отдаленным участкам организма (т. е. метастазирования). Иллюстративные злокачественные новообразования включают в себя, без ограничений, меланому, аденокарциному, тимому, лимфому (например, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина), саркому, рак легкого, рак печени, рак толстой кишки, лейкоз, рак матки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки, рак поджелудочной железы, злокачественную опухоль головного мозга и любое другое злокачественное новообразование или онкологическое заболевание, известное в настоящее время или то, которое будет открыто позже. В иллюстративных вариантах осуществления в изобретении предложен способ лечения и/или профилактики злокачественных новообразований, формирующих опухоль.

[0202] Термин «опухоль» также понимают в данной области, например, как патологическую массу недифференцированных клеток внутри многоклеточного организма. Опухоли могут быть злокачественными или доброкачественными. В иллюстративных вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, используют для профилактики и лечения злокачественных опухолей.

[0203] Под терминами «проведение лечения злокачественного новообразования» или «лечение злокачественного новообразования» подразумевают уменьшение тяжести злокачественного новообразования или по меньшей мере частичное устранение, и/или замедление прогрессирования заболевания, и/или то, что заболевание берут под контроль и/или стабилизируют. В конкретных вариантах осуществления эти термины

указывают на предотвращение или уменьшение или по меньшей мере частичное устранение метастазирования злокачественного новообразования и/или на предотвращение или уменьшение или по меньшей мере частичное устранение роста метастатических узлов.

[0204] Под терминами «предотвращение злокачественного новообразования» или «осуществление предотвращения злокачественного новообразования» подразумевают, что способы по меньшей мере частично устраняют или уменьшают и/или задерживают заболеваемость и/или тяжесть начала злокачественного новообразования. Альтернативно указано, что начало злокачественного новообразования у субъекта можно уменьшать в смысле возможности или вероятность возникновения, и/или можно задерживать.

[0205] В конкретных вариантах осуществления у субъекта со злокачественным новообразованием можно извлекать клетки и приводить их в контакт с вирусным вектором, экспрессирующим антиген злокачественной клетки, в соответствии с настоящим изобретением. Затем модифицированную клетку вводят субъекту, посредством чего стимулируют иммунный ответ против антигена клетки злокачественного новообразования. Этот способ обеспечивает особые преимущества при использовании для субъектов с иммунной недостаточностью, которые неспособны развивать достаточный иммунный ответ *in vivo* (т. е. неспособны усиленно образовывать антитела в достаточных количествах).

[0206] В данной области известно, что иммунные ответы можно усиливать посредством иммуномодулирующих цитокинов (например, альфа-интерферона, бета-интерферона, гамма-интерферона, омега-интерферона, тау-интерферона, интерлейкина-1-альфа, интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-2, интерлейкина-3, интерлейкина-4, интерлейкина 5, интерлейкина-6, интерлейкина-7, интерлейкина-8, интерлейкина-9, интерлейкина-10, интерлейкина-11, интерлейкина-12, интерлейкина-13, интерлейкина-14, интерлейкина-18, фактора роста В-клеток, лиганда CD40, фактора некроза опухолей-альфа, фактора некроза опухолей- $\beta$ , моноцитарного хемоаттрактантного белка-1, гранулоцитарномacroфагального колониестимулирующего фактора и лимфотоксина). Соответственно, иммуномодулирующие цитокины (например, индуцирующие STL цитокины) можно вводить субъекту в сочетании с вирусным вектором. Цитокины можно вводить любым способом, известным в данной области. Экзогенные цитокины

можно вводить субъекту, или, альтернативно, можно доставлять субъекту нуклеиновую кислоту, кодирующую цитокин, с использованием подходящего вектора, и продуцировать цитокин *in vivo*.

Субъекты, фармацевтические составы и способы введения

[0207] Вирусные векторы и капсиды по настоящему изобретению находят применение как в ветеринарии, так и в медицине. Пригодные субъекты включают как птиц, так и млекопитающих. В контексте настоящего документа термин «птицы», включает, без ограничений, кур, уток, гусей, перепелов, индеек, фазанов, попугаев, длиннохвостых попугайчиков и т. п. В контексте настоящего документа термин «млекопитающее» включает, без ограничений, человека, низших приматов, крупный рогатый скот, овец, коз, лошадей, кошек, собак, зайцеобразных и т. п. Субъекты-люди включают новорожденных, детей, подростков, взрослых и пожилых субъектов. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта-человека может быть менее 6 месяцев, менее 2 лет, менее 5 лет, менее 10 лет, быть в диапазоне 10–18 лет, 19–29 лет, 30–35 лет, 36–40 лет или быть старше 40 лет.

[0208] В иллюстративных вариантах осуществления, субъект «нуждается» в применении способов, описанных в настоящем документе.

[0209] В конкретных вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая вирусный вектор, и/или капсид, и/или капсидный белок, и/или вирусную частицу по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе и, необязательно, другие медицинские препараты, фармацевтические агенты, стабилизаторы, буферы, носители, адъюванты и т. п. Как правило, носитель для инъекции является жидким. Для других способов введения, носитель может являться либо твердым, либо жидким. Для введения посредством ингаляции, носитель может являться пригодным для вдыхания и, необязательно, может находиться в форме твердых или жидких частиц.

[0210] Под «фармацевтически приемлемым» понимают материал, который не является токсичным или иным образом нежелательным, т. е. материал можно вводить субъекту, не вызывая каких-либо нежелательных биологических эффектов.

[0211] Один аспект настоящего изобретения относится к способу переноса нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*. Вирусный вектор можно вводить в клетки с соответствующим показателем множественности инфицирования в соответствии со стандартными способами трансдукции, подходящими для конкретных клеток-мишеней. Титры вирусного вектора, подлежащего введению, можно менять в зависимости от типа и количества клеток-мишеней и конкретного вирусного вектора, и их может определять специалист в данной области без излишнего экспериментирования. В иллюстративных вариантах осуществления в клетку водят по меньшей мере приблизительно  $10^3$  инфекционных единиц, необязательно по меньшей мере приблизительно  $10^5$  инфекционных единиц.

[0212] Клетка (клетки), в которую (-ые) можно вводить вирусный вектор, может (могут) принадлежать к любому типу, включая, без ограничений, нервные клетки (включая клетки периферической и центральной нервных систем, в частности, клетки головного мозга, такие как нейроны и олигодендроциты), клетки легких, клетки глаза (включая клетки сетчатки, клетки пигментного эпителия сетчатки и роговицы), эпителиальные клетки (например, эпителиальные клетки кишечника и дыхательных путей), клетки мышц (например, клетки скелетных мышц, клетки сердечной мышцы, клетки гладких мышц и/или клетки мышцы диафрагмы), дендритные клетки, клетки поджелудочной железы (включая клетки островков), клетки печени, миокардиальные клетки, клетки костей (например, стволовые клетки костного мозга), гематопозитические стволовые клетки, клетки селезенки, кератиноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки, клетки предстательной железы, зародышевые клетки и т. п. В иллюстративных вариантах осуществления клетка может представлять собой любую клетку-предшественник. В качестве дополнительной возможности клетка может представлять собой стволовую клетку (например, нервную стволовую клетку, стволовую клетку печени). В качестве дополнительной альтернативы клетка может представлять собой клетку злокачественного новообразования или клетку опухоли. Более того, клетка может происходить из любых видов, как указано выше.

[0213] Вирусный вектор можно вводить в клетки *in vitro* с целью введения модифицированной клетки субъекту. В конкретных вариантах осуществления, клетки извлекают у субъекта, вводят в них вирусный вектор, и затем клетки обратно вводят субъекту. В данной области известны способы извлечения клеток из организма

субъекта для обработки *ex vivo* с последующим введением обратно субъекту (см., например, патент США № 5,399,346). Альтернативно, рекомбинантный вирусный вектор можно ввести в клетки, полученные от субъекта-донора, в культивируемые клетки или в клетки из любого другого подходящего источника, и вводят упомянутые клетки нуждающемуся в этом субъекту (т. е. субъекту-«реципиенту»).

[0214] Клетки, пригодные для доставки нуклеиновой кислоты *ex vivo*, являются такими, как описано выше. Дозы клеток для введения субъекту будут меняться в зависимости от возраста, состояния и вида, к которому принадлежит субъект, типа клеток, нуклеиновой кислоты, экспрессируемой клеткой, способа введения и т. п. Как правило, вводят по меньшей мере от приблизительно  $10^2$  до приблизительно  $10^8$  клеток или по меньшей мере от приблизительно  $10^3$  до приблизительно  $10^6$  клеток на дозу в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретных вариантах осуществления клетки, трансдуцированные вирусным вектором, вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве в комбинации с фармацевтическим носителем.

[0215] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор вводят в клетку, и клетку могут вводить субъекту для вызова иммуногенного ответа против доставляемого полипептида (например, экспрессированного в форме трансгена или в капсиде). Обычно вводят некоторое количество клеток, экспрессирующих иммуногенно эффективное количество полипептида, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. «Имуногенно эффективное количество» представляет собой количество экспрессированного полипептида, достаточное для того, чтобы вызвать активный иммунный ответ против полипептида у субъекта, которому вводят фармацевтический состав. В конкретных вариантах осуществления доза является достаточной для получения защитного иммунного ответа (как определено выше). Степень обеспечиваемой защиты не должна быть полной или защита не должна быть постоянной, при условии, что преимущества от введения иммуногенного полипептида превышают любые его недостатки.

[0216] Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ введения нуклеиновой кислоты в клетку, причем способ включает приведение клетки в контакт с вирусным вектором, вирусной частицей и/или композицией по этому изобретению.

[0217] Дополнительный аспект изобретения представляет собой способ введения вирусного вектора, вирусной частицы и/или вирусного капсида по этому изобретению субъекту. Таким образом, в настоящем изобретении также предложен способ доставки нуклеиновой кислоты субъекту, включающий введение субъекту вирусной частицы, вирусного вектора и/или композиции по этому изобретению. Введение вирусных векторов, вирусных частиц и/или капсидов по настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту-человеку или животному можно осуществлять любыми способами, известными в данной области. Необязательно, вирусный вектор, вирусную частицу и/или капсид доставляют в терапевтически эффективной дозе в фармацевтически приемлемом носителе. В предпочтительных вариантах осуществления доставляют терапевтически эффективное количество вирусного вектора, вирусной частицы и/или капсида.

[0218] Вирусные векторы и/или капсиды по изобретению можно, кроме того, вводить пациенту для вызова иммуногенного ответа (например, в качестве вакцины). Как правило, иммуногенные композиции по настоящему изобретению содержат иммуногенно эффективное количество вирусного вектора и/или капсида в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Необязательно доза является достаточной для получения защитного иммунного ответа (как определено выше). Степень обеспечиваемой защиты не должна быть полной или защита не должна быть постоянной, при условии, что преимущества от введения иммуногенного полипептида превышают любые его недостатки. Субъекты и иммуногены являются такими, как описано выше.

[0219] Дозы вирусного вектора и/или капсида, подлежащие введению субъекту, зависят от способа введения, заболевания или состояния, подлежащего лечению и/или профилактике, состояния отдельного субъекта, конкретного вирусного вектора или капсида и нуклеиновой кислоты, подлежащей доставке, и т. п., и их можно определять общепринятым способом. Примерными дозами для достижения терапевтического эффекта являются титры по меньшей мере около  $10^5$ , около  $10^6$ , около  $10^7$ , около  $10^8$ , около  $10^9$ , около  $10^{10}$ , около  $10^{11}$ , около  $10^{12}$ , около  $10^{13}$ , около  $10^{14}$ , около  $10^{15}$  трансдуцирующих единиц, необязательно около  $10^8$ – $10^{13}$  трансдуцирующих единиц.

[0220] В конкретных вариантах осуществления для достижения желательного уровня экспрессии гена можно применять более одного введения (например, два, три, четыре

или более введений) в течение периода из различных интервалов, например, ежесуточно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно и т. д.

[0221] Иллюстративные способы введения включают в себя пероральное, ректальное, трансмукозальное, интраназальное введение, ингаляцию (например, посредством аэрозоля), буккальное (например, подъязычное), вагинальное, интратекальное, внутриглазное, чрескожное введение, введение *in utero* (или *in ovo*), парентеральное (например, внутривенное, подкожное, внутрикожное, внутримышечное введение [включая введение в скелетные мышцы, в мышцу диафрагмы и/или сердечную мышцу], внутрикожное, внутривисцеральное, внутривисцеральное и внутрисуставное), местное (например, на поверхности как кожи, так и слизистых оболочек, включая поверхности дыхательных путей, и чрескожное введение), внутривисцеральное введение и т. п., а также в виде непосредственной инъекции в ткань или орган (например, в печень, скелетную мышцу, сердечную мышцу, мышцу диафрагмы или головной мозг). Можно также проводить введение в опухоль (например, в опухоль или в лимфатический узел, или вблизи них). Наиболее подходящий способ в любом данном случае зависит от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению, и от природы конкретного используемого вектора.

[0222] Введение в скелетную мышцу в соответствии с настоящим изобретением включает, без ограничений, введение в скелетную мышцу в конечностях (например, в плечо, предплечье, бедро и/или голень), в спину, шею, голову (например, язык), грудную клетку, живот, таз/промежность и/или пальцы. Пригодные скелетные мышцы включают, без ограничений, следующие: мышца, отводящая мизинец (в руке), мышца, отводящая мизинец (в стопе), мышца, отводящая большой палец стопы, мышца, отводящая пятую плюсневую кость, короткая мышца, отводящая большой палец кисти, длинная мышца, отводящая большой палец кисти, короткая приводящая мышца, мышца, приводящая большой палец стопы, длинная приводящая мышца, большая приводящая мышца, мышца, приводящая большой палец кисти, локтевая мышца, передняя лестничная мышца, суставная мышца колена, двуглавая мышца плеча, двуглавая мышца бедра, плечевая мышца, плечелучевая мышца, щечная мышца, клювовидно-плечевая мышца, мышца, сморщивающая бровь, дельтовидная мышца, мышца, опускающая угол рта, мышца, опускающая нижнюю губу, двубрюшная мышца, тыльные межкостные мышцы (в руке), тыльные межкостные мышцы (в стопе),

короткий лучевой разгибатель запястья, длинный лучевой разгибатель запястья, локтевой разгибатель запястья, разгибатель мизинца, разгибатель пальцев, короткий разгибатель пальцев, длинный разгибатель пальцев, короткий разгибатель большого пальца стопы, длинный разгибатель большого пальца стопы, разгибатель указательного пальца, короткий разгибатель большого пальца кисти, длинный разгибатель большого пальца кисти, лучевой сгибатель запястья, локтевой сгибатель запястья, короткий сгибатель мизинца (в руке), короткий сгибатель мизинца (в стопе), короткий сгибатель пальцев, длинный сгибатель пальцев, глубокий сгибатель пальцев, поверхностный сгибатель пальцев, короткий сгибатель большого пальца стопы, длинный сгибатель большого пальца стопы, короткий сгибатель большого пальца кисти, длинный сгибатель большого пальца, лобная мышца, икроножная мышца, подбородочно-подъязычная мышца, большая ягодичная мышца, средняя ягодичная мышца, малая ягодичная мышца, тонкая мышца, подвздошно-реберная мышца шеи, подвздошно-реберная мышца поясницы, подвздошно-реберная мышца груди, подвздошная мышца, нижняя близнецовая мышца, нижняя косая мышца, нижняя прямая мышца, подостная мышца, межкостистые мышцы, межпоперечные мышцы, латеральная крыловидная мышца, латеральная прямая мышца, широчайшая мышца спины, мышца, поднимающая угол рта, мышца, поднимающая верхнюю губу, мышца, поднимающая верхнюю губу и крылья носа, мышца, поднимающая верхнее веко, мышца, поднимающая лопатку, длинные мышцы-вращатели, длиннейшая мышца головы, длиннейшая мышца шеи, длиннейшая мышца груди, длинная мышца головы, длинная мышца шеи, червеобразные мышцы (в руке), червеобразные мышцы (в стопе), жевательная мышца, медиальная крыловидная мышца, медиальная прямая мышца, средняя лестничная мышца, многораздельные мышцы, челюстно-подъязычная мышца, нижняя косая мышца головы, верхняя косая мышца головы, наружная запирающая мышца, внутренняя запирающая мышца, затылочная мышца, лопаточно-подъязычная мышца, мышца, противопоставляющая мизинец, мышца, противопоставляющая большой палец кисти, круговая мышца глаза, круговая мышца рта, ладонные межкостные мышцы, короткая ладонная мышца, длинная ладонная мышца, гребенчатая мышца, большая грудная мышца, малая грудная мышца, короткая малоберцовая мышца, длинная малоберцовая мышца, третья малоберцовая мышца, грушевидная мышца, подошвенные межкостные мышцы, подошвенная мышца, подкожная мышца шеи, подколенная мышца, задняя лестничная мышца, квадратный пронатор, круглый пронатор, большая поясничная мышца, квадратная мышца бедра, квадратная мышца подошвы, передняя

прямая мышца головы, латеральная прямая мышца головы, большая задняя прямая мышца головы, малая задняя прямая мышца головы, прямая мышца бедра, большая ромбовидная мышца, малая ромбовидная мышца, мышца смеха, портняжная мышца, наименьшая лестничная мышца, полуперепончатая мышца, полуостистая мышца головы, полуостистая мышца шеи, полуостистая мышца груди, полусухожильная мышца, передняя зубчатая мышца, короткие мышцы-вращатели, камбаловидная мышца, остистая мышца головы, остистая мышца шеи, остистая мышца груди, ременная мышца головы, ременная мышца шеи, грудино-ключично-сосцевидная мышца, грудино-подъязычная мышца, грудино-щитовидная мышца, шилоподъязычная мышца, подключичная мышца, подлопаточная мышца, верхняя близнецовая мышца, верхняя косая мышца, верхняя прямая мышца, мышца-супинатор, надостная мышца, височная мышца, напрягатель широкой фасции, большая круглая мышца, малая круглая мышца, мышцы груди, щитоподъязычная мышца, передняя большеберцовая мышца, задняя большеберцовая мышца, трапецевидная мышца, трехглавая мышца плеча, промежуточная широкая мышца бедра, латеральная широкая мышца бедра, медиальная широкая мышца бедра, большая скуловая мышца и малая скуловая мышца, а также любая другая подходящая скелетная мышца, известная в данной области.

[0223] Вирусный вектор и/или капсид можно доставлять в скелетную мышцу с помощью внутривенного введения, внутриартериального введения, внутрибрюшинного введения, перфузии конечностей (необязательно, с помощью изолированной перфузии конечностей, например, ноги и/или руки; см., например, Arguda et al., (2005) Blood 105: 3458-3464) и/или с помощью прямой внутримышечной инъекции. В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор и/или капсид вводят в конечность (руку и/или ногу) субъекта (например, субъекта с мышечной дистрофией, такой как DMD) с помощью перфузии конечностей, необязательно, с помощью изолированной перфузии конечностей (например, посредством внутривенного или внутрисуставного введения). В вариантах осуществления по изобретению вирусные векторы и/или капсиды по изобретению можно преимущественно вводить без использования «гидродинамических» методов. Доставка в ткань (например, в мышцу) векторов предшествующего уровня техники часто усиливалась гидродинамическими методами (например, внутривенным/внутриартериальным введением в большом объеме), которые увеличивают давление в сосудистой сети и содействуют способности вектора преодолеть барьер эндотелиальных клеток. В конкретных вариантах осуществления

вирусные векторы и/или капсиды по изобретению можно вводить при отсутствии применения гидродинамических методов, таких как инфузии большого объема и/или повышенное внутрисосудистое давление (например, выше нормального систолического давления, например, меньше или равное 5%, 10%, 15%, 20%, 25% повышению внутрисосудистого давления по сравнению с нормальным систолическим давлением). Такие способы могут уменьшить или позволяют избежать побочных эффектов, связанных с гидродинамическими методами, таких как отек, повреждение нервов и/или синдром сдавления. Введение в сердечную мышцу включает, без ограничений, введение в левое предсердие, правое предсердие, левый желудочек, правый желудочек и/или перегородку. Вирусный вектор и/или капсид можно доставлять в сердечную мышцу с помощью внутривенного введения, внутриартериального введения, такого как внутриаортальное введение, с помощью прямой инъекции в сердце (например, в левое предсердие, правое предсердие, левый желудочек, правый желудочек) и/или посредством перфузии коронарной артерии.

[0224] Введение в мышцу диафрагмы можно проводить посредством любого приемлемого способа, включая внутривенное введение, внутриартериальное введение и/или внутрибрюшинное введение.

[0225] Доставку в ткань-мишень можно также осуществлять посредством доставки депо, содержащего вирусный вектор и/или капсид. В иллюстративных вариантах осуществления депо содержащее вирусный вектор и/или капсид имплантируют в ткань скелетной мышцы, сердечной мышцы, мышцы диафрагмы или ткань можно приводить в контакт с пленкой или другой матрицей, содержащей вирусный вектор и/или капсид. Такие пригодные для имплантации матрицы или субстраты описаны в патенте США № 7,201,898.

[0226] в конкретных вариантах осуществления вирусный вектор и/или вирусный капсид по настоящему изобретению вводят в скелетную мышцу, мышцу диафрагмы и/или сердечную мышцу (например, для лечения и/или профилактики мышечной дистрофии, заболевания сердца [например, PAD или застойной сердечной недостаточности]).

[0227] В иллюстративных вариантах осуществления изобретение используют для лечения и/или профилактики нарушений скелетных мышц, сердечной мышцы и/или мышцы диафрагмы.

[0228] В репрезентативном варианте осуществления предложен способ лечения и/или профилактики мышечной дистрофии у нуждающегося в этом субъекта, причем указанный способ включает: введение лечебно или профилактически эффективного количества вирусного вектора по изобретению субъекту-млекопитающему, при этом вирусный вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую дистрофин, мини-дистрофин, микро-дистрофин, пропептид миостатина, фоллистатин, растворимый рецептор активина типа II, IGF-1, противовоспалительные полипептиды, такие как доминантный мутант I каппа B, саркоспан, утрофин, микродистрофин, ламинин-а2, альфа-саркогликан, бета-саркогликан, гамма-саркогликан, дельта-саркогликан, IGF-1 антитело или фрагмент антитела против миостатина или пропептида миостатина и/или РНК против миостатина. В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор можно вводить в скелетную мышцу, мышцу диафрагмы и/или сердечную мышцу, как описано в другом месте в настоящем документе.

[0229] Альтернативно изобретение можно осуществлять на практике для доставки нуклеиновой кислоты в скелетные мышцы, сердечную мышцу и/или мышцу диафрагмы, что используют в качестве платформы для продукции полипептида (например, фермента) или функциональной РНК (например, РНКи, микроРНК, антисмысловой РНК), которые в норме циркулируют в крови, или для системной доставки в другие ткани для лечения и/или профилактики нарушения (например, нарушения метаболизма, такого как сахарный диабет [например, инсулин], гемофилия [например, фактор IX или фактор VIII], мукополисахаридоз [например, синдром Слая, синдром Гурлера, синдром Шейе, синдром Гурлера — Шейе, синдром Гунтера, синдром Санфилиппо А, В, С, D, синдром Моркио, синдром Марото — Лами и т. п.] или лизосомальная болезнь накопления, такая как, например, болезнь Гоше [глюкоцереброзидаза] или болезнь Фабри [ $\alpha$ -галактозидаза А], или болезнь накопления гликогена, такая как болезнь Помпе [лизосомальная кислая альфа-глюкозидаза]). Другие пригодные белки для лечения и/или профилактики метаболических нарушений описаны в настоящем документе. Использование мышц в качестве платформы для

экспрессии интересующей нуклеиновой кислоты описано в патентной публикации США US 2002/0192189.

[0230] Таким образом, в одном аспекте изобретение дополнительно охватывает способ лечения и/или профилактики метаболического нарушения у нуждающегося в этом субъекта, причем указанный способ включает: введение лечебно или профилактически эффективного количества вирусного вектора по изобретению в скелетную мышцу субъекта, при этом вирусный вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, при этом метаболическое нарушение возникает в результате дефицита и/или дефекта в полипептиде. Иллюстративные метаболические нарушения и гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, описаны в настоящем документе. Необязательно, полипептид является секретлируемым (например, полипептид, который является секретлируемым полипептидом в его нативном состоянии или который был сконструирован для секретирования, например, посредством функциональной ассоциации с секреторной сигнальной последовательностью, как известно в данной области). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией изобретения, согласно этому варианту осуществления введение в скелетную мышцу может привести к секреции полипептида в системный кровоток и доставке к ткани-мишени (тканям-мишеням). Способы доставки вирусных векторов в скелетную мышцу описаны в настоящем документе более подробно.

[0231] Изобретение также может осуществляться на практике для получения неcodирующей РНК, такой как антисмысловая РНК, РНКи или другая функциональная РНК (например, рибозим) для системной доставки.

[0232] В изобретении также предложен способ лечения и/или профилактики врожденной сердечной недостаточности или PAD у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение лечебно или профилактически эффективного количества вирусного вектора по изобретению субъекту-млекопитающему, при этом вирусный вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую, например, Ca<sup>2+</sup>-АТФазу саркоплазматического эндоретикулама (SERCA2a), ангиогенный фактор, ингибитор 1 фосфатазы (I-1) и его фрагменты (например, I1C), РНКи против фосфоламбана; ингибирующие фосфоламбан или доминантно-негативные молекулы, такие как фосфоламбан S16E, белок с цинковыми пальцами, регулирующий ген фосфоламбана, бета-2-адренергический рецептор, киназу бета-2-

адренергического рецептора (BARK), киназу PI3, калсакран, ингибитор киназы  $\beta$ -адренергического рецептора (PARKct), ингибитор 1 белка фосфатазы 1 и его фрагменты (например, П С), S100A1, парвальбумин, аденилатциклазу типа 6, молекулу, вызывающую нокдаун киназы сопряженного с G-белком рецептора типа 2, такую как усеченный конститутивно активный bARKct, Pim-1, PGC-I a, SOD-1, SOD-2, EC-SOD, калликреин, HIF, тимозин-p4, mir-1, mir-133, mir-206, mir-208 и/или mir-26a.

[0233] Инъекционные препараты могут быть приготовлены как обычные лекарственные формы, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий, в виде твердых форм, пригодных для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Альтернативно, можно вводить вирусный вектор и/или вирусные капсиды по изобретению местным, а не системным способом, например, в составе депо или в составе с замедленным высвобождением. Кроме того, вирусный вектор и/или вирусный капсид можно доставлять прикрепленным к хирургически имплантируемой матрице (например, как описано в патентной публикации США № US-2004-0013645-A1).

[0234] Вирусные векторы и/или вирусные капсиды, раскрытые в настоящем документе, можно вводить в легкие субъекта любыми пригодными способами, необязательно, посредством введения аэрозольной суспензии пригодных для вдыхания частиц, содержащих вирусные векторы и/или вирусные капсиды, которые субъект вдыхает. Пригодные для вдыхания частицы могут быть жидкими или твердыми. Аэрозоли из жидких частиц, содержащих вирусные векторы и/или вирусные капсиды, можно получать любыми пригодными способами, например, с использованием управляемого давлением аэрозольного распылителя или ультразвукового распылителя, как известно специалистам в данной области. См., например, патент США № 4,501,729. Аэрозоли из твердых частиц, содержащих вирусные векторы и/или капсиды, можно получать подобным образом с использованием любого генератора лекарственных препаратов в виде аэрозолей твердых частиц, способами, известными в области фармацевтики.

[0235] Вирусные векторы и вирусные капсиды можно вводить в ткани ЦНС (например, головной мозг, глаз), и они могут преимущественно приводить к более широкому распределению вирусного вектора или капсида, чем это наблюдалось бы в отсутствие настоящего изобретения.

[0236] В конкретных вариантах осуществления векторы для доставки, описанные в настоящем документе, можно вводить для лечения заболеваний ЦНС, включая генетические нарушения, нейродегенеративные расстройства, психические расстройства и опухоли. Иллюстративные заболевания ЦНС включают, но не ограничиваются ими, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, болезнь Канавана, болезнь Ли, болезнь Рефсума, синдром Туретта, первичный боковой склероз, боковой амиотрофический склероз, прогрессирующую мышечную атрофию, болезнь Пика, мышечную дистрофию, рассеянный склероз, миастению, болезнь Бинсвангера, травму спинного мозга или головы, болезнь Тея Сакса, болезнь Леша-Найхана, эпилепсию, церебральные инфаркты, психические расстройства, включая расстройства настроения (например, депрессию, биполярное аффективное расстройство, стойкое аффективное расстройство, вторичное расстройство настроения), шизофрению, лекарственную зависимость (например, алкоголизм и зависимость от других веществ), неврозы (например, тревогу, навязчивое расстройство, соматоформное расстройство, диссоциативное расстройство, горе, послеродовую депрессию), психоз (например, галлюцинации и бред), слабоумие, паранойю, синдром дефицита внимания, психосексуальные расстройства, нарушения сна, болевые расстройства, расстройства питания или веса (например, ожирение, кахексию, нервную анорексию и булемию), а также рак и опухоли (например, опухоли гипофиза) ЦНС.

[0237] Нарушения со стороны ЦНС включают офтальмологические расстройства с вовлечением сетчатки, заднего тракта и зрительного нерва (например, пигментный ретинит, диабетическая ретинопатия и другие дегенеративные заболевания сетчатки, увеит, возрастная дегенерация желтого пятна, глаукома).

[0238] Большинство, если не все, офтальмологические заболевания и расстройства связаны с одним или более из трех типов показаний: (1) ангиогенез, (2) воспаление и (3) дегенерация. Векторы для доставки по настоящему изобретению можно использовать для доставки антиангиогенных факторов; противовоспалительных факторов; факторов, замедляющих дегенерацию клеток, способствующих сохранению клеток или способствующих росту клеток, и комбинации вышеперечисленного.

[0239] Например, диабетическая ретинопатия характеризуется ангиогенезом. Диабетическую ретинопатию можно лечить путем доставки одного или более антиангиогенных факторов либо интраокулярно (например, в стекловидное тело), либо

периокулярно (например, в субтенонову область). Один или более нейротрофических факторов также можно доставлять совместно либо интраокулярно (например, интравитреально), либо периокулярно.

[0240] Увеит включает воспаление. Один или более противовоспалительных факторов можно вводить с помощью интраокулярного (например, в стекловидное тело или переднюю камеру) введения вектора для доставки по настоящему изобретению.

[0241] Для сравнения, пигментный ретинит характеризуется дегенерацией сетчатки. В иллюстративных вариантах осуществления пигментный ретинит можно лечить посредством интраокулярного (например, в стекловидное тело) введения вектора для доставки, кодирующего один или более нейротрофических факторов.

[0242] Возрастная дегенерация желтого пятна включает как ангиогенез, так и дегенерацию сетчатки. Это заболевание можно лечить путем введения векторов для доставки по изобретению, кодирующих один или более нейротрофических факторов интраокулярно (например, в стекловидное тело) и/или один или более антиангиогенных факторов интраокулярно или периокулярно (например, в субтенонову область).

[0243] Глаукома характеризуется повышенным внутриглазным давлением и потерей ганглиональных клеток сетчатки. Лечение глаукомы включает введение одного или более нейрозащитных агентов, которые защищают клетки от эксайтотоксического повреждения, с использованием векторов для доставки по изобретению. Такие агенты включают антагонисты N-метил-D-аспартата (NMDA), цитокины и нейротрофические факторы, доставляемые интраокулярно, необязательно в стекловидное тело.

[0244] В других вариантах осуществления настоящее изобретение можно использовать для лечения судорожных приступов, например, для уменьшения начала, частоты или тяжести судорожных приступов. Эффективность терапевтического лечения судорожных приступов можно оценить с помощью поведенческих (например, дрожание, тики глаз или рта) и/или электрографических методов (большинство судорожных приступов имеют характерные электрографические отклонения от нормы). Таким образом, изобретение можно также использовать для лечения эпилепсии, которая характеризуется множественными судорожными приступами с течением времени.



внутриглазную доставку (например, доставку в стекловидное тело, субретинальную доставку, доставку в переднюю камеру) и периокулярную доставку (например, в субтенонову область), а также внутримышечную доставку с ретроградной доставкой к двигательным нейронам. В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор и/или капсид вводят в жидком составе посредством прямой инъекции (например, стереотаксической инъекции) в желательную область или компартмент ЦНС. В других вариантах осуществления вирусный вектор и/или капсид можно предоставлять посредством местного введения в желательную область или посредством интраназального введения аэрозольного состава. Введение в глаз можно осуществлять посредством местного введения жидких капель. В качестве дополнительной альтернативы вирусный вектор и/или капсид можно вводить в форме твердого состава с замедленным высвобождением (см., например, патент США № 7201898).

[0250] В еще дополнительных вариантах осуществления вирусный вектор можно использовать для ретроградного транспорта для лечения и/или профилактики заболеваний и нарушений, затрагивающих двигательные нейроны (например, боковой амиотрофический склероз (ALS); спинальная мышечная атрофия (SMA) и т. д.). Например, вирусный вектор может быть доставлен в мышечную ткань, из которой он может мигрировать в нейроны.

#### ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0251] Следующие пронумерованные варианты осуществления включены в объем изобретения.

[0252] 1. Рекомбинантный капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок содержит замену в антигенном участке капсидного белка AAV, при этом замена имеет последовательность, соответствующую любой одной из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 или 411–421.

[0253] 2. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что замена содержит а последовательность, соответствующую любой одной из SEQ ID NO: 9, 10, 14 или 17.

[0254] 3. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 1 или 2, отличающийся тем, что капсидный белок AAV включает первую аминокислотную

замену и вторую аминокислотную замену, причем каждая из первой аминокислотной замены и второй аминокислотной замен модифицирует разные антигенные сайты на капсидном белке AAV, причем каждое из первой аминокислотной замены и второй аминокислотной замены содержит любую из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 или 411–421.

[0255] 4. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 1 или 2, отличающийся тем, что апсидный белок AAV включает первую аминокислотную замену, вторую аминокислотную замену и третью аминокислотную замену, при этом каждая из первой аминокислотной замены, второй аминокислотной замены и третьей аминокислотной замены модифицирует разные антигенные сайты капсидного белка AAV, где каждая из первой аминокислотной замены, второй аминокислотной замены и третьей аминокислотной замены содержат любую из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 или 411–421.

[0256] 5. Капсид рекомбинантного AAV по варианту осуществления 4, отличающийся тем, что первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит любую из SEQ ID NO. 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 297, 298, 299 или 411–421; и третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17.

[0257] 6. Капсид рекомбинантного AAV по варианту осуществления 5, отличающийся тем, что первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 10; и третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17.

[0258] 7. Капсид рекомбинантного AAV по варианту осуществления 5, отличающийся тем, что первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 14; и третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17.

[0259] 8. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 1–7, отличающийся тем, что капсидный белок AAV дополнительно содержит замену, которая модифицирует петлю III капсида.

[0260] 9. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 8, отличающийся тем, что капсид содержит одну или более из следующих замен в петле HI:

[0261] P661R, T662S, Q666G, S667D, где нумерация соответствует капсиду AAV8 дикого типа (SEQ ID NO: 6); или

[0262] P659R, T660S, A661T, K664G, где нумерация соответствует капсиду AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 7).

[0263] 10. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 1–9, отличающийся тем, что капсидный белок AAV имеет серотип AAV, выбранный из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, бычьего AAV и птичьего AAV.

[0264] 11. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 1–9, отличающийся тем, что капсидный белок AAV является химерным.

[0265] 12. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 11, отличающийся тем, что капсидный белок содержит последовательности, полученные от двух или более серотипов AAV.

[0266] 13. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что капсидный белок содержит последовательности, происходящие от трех или более серотипов AAV.

[0267] 14. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 1–10, отличающийся тем, что капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785.

[0268] 15. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 14, отличающийся тем, что капсидный белок содержит аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785.

[0269] 16. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 15, отличающийся тем, что капсидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 380 или SEQ ID NO: 384.

[0270] 17. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 1–16, отличающийся тем, что модификация одного или более антигенных участков приводит к ингибированию связывания антитела с одним или более антигенными участками.

[0271] 18. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 1–17, отличающийся тем, что модификация одного или более антигенных участков приводит к ингибированию нейтрализации инфекционности вирусной частицы, содержащей капсидный белок AAV.

[0272] 19. Рекомбинантный капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

[0273] 20. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 19, отличающийся тем, что капсидный белок модифицируют путем замены области, охватывающей аминокислоты 454–460 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 9.

[0274] 21. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 19 или 20, отличающийся тем, что капсидный белок AAV модифицирован путем замены области, охватывающей аминокислоты 493–500 SEQ ID NO: 49, на любую SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 297, 298, 299 или 411–421.

[0275] 22. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 19–21, отличающийся тем, что капсидный белок AAV модифицирован путем замены области, охватывающей аминокислоты 585–590 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 17.

[0276] 23. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 19–22, отличающийся тем, что капсидный белок AAV модифицирован путем замены области, охватывающей аминокислоты 454–460 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 9, области, охватывающей аминокислоты 493–500 SEQ ID NO: 49, на любую SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 297, 298, 299 или 411–421, и области, охватывающей аминокислоты 585–590 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 17.

[0277] 24. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 19–23, отличающийся тем, что модификация приводит к ингибированию связывания антителом с капсидным белком AAV.

[0278] 25. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 19–24, отличающийся тем, что модификация приводит к ингибированию нейтрализации инфекционности вирусной частицы, содержащей капсидный белок AAV.

[0279] 26. Рекомбинантный капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785.

[0280] 27. Рекомбинантный капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 380 или SEQ ID NO: 384.

[0281] 28. Нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 1–27.

[0282] 29. Нуклеотидная последовательность по варианту осуществления 28, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность ДНК.

[0283] 30. Нуклеотидная последовательность по варианту осуществления 28, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность РНК.

[0284] 31. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность по любому из вариантов осуществления 28–30.

[0285] 32. Клетка, содержащая нуклеотидную последовательность по любому из вариантов осуществления 28–30 или экспрессионный вектор по варианту осуществления 31.

[0286] 33. Вирусный вектор AAV, содержащий рекомбинантный капсидный белок по любому из вариантов осуществления 1–27.

[0287] 34. Вирусный вектор AAV по варианту осуществления 33, дополнительно содержащий карго-нуклеиновую кислоту, заключенную в капсидный белок.

[0288] 35. Вирусный вектор AAV по варианту осуществления 34, отличающийся тем, что карго-нуклеиновая кислота кодирует терапевтический белок или РНК.

[0289] 36. Вирусный вектор AAV по любому из вариантов осуществления 34–35, отличающийся тем, что карго-нуклеиновая кислота кодирует молекулу редактирования генов.

[0290] 37. Вирусный вектор AAV по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что молекула редактирования генов представляет собой нуклеазу.

[0291] 38. Вирусный вектор AAV по варианту осуществления 37, отличающийся тем, что молекула редактирования генов представляет собой нуклеазу Cas9.

[0292] 39. Вирусный вектор AAV по варианту осуществления 37, отличающийся тем, что молекула редактирования генов представляет собой нуклеазу Cpf1.

[0293] 40. Вирусный вектор AAV по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что молекула редактирования генов представляет собой одиночную направляющую РНК.

[0294] 41. Фармацевтическая композиция, содержащая вирусный вектор AAV по любому из вариантов осуществления 33–40.

[0295] 42. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 41, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0296] 43. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по варианту осуществления 32 или экспрессионный вектор по варианту осуществления 31.

[0297] 44. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 43, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0298] 45. Способ лечения пациента, нуждающегося в этом, включающий введение

пациенту терапевтически эффективного количества вирусного вектора AAV по любому из вариантов осуществления 33–40 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 41–44.

[0299] 46. Способ по варианту осуществления 45, отличающийся тем, что у пациента имеется заболевание или нарушение функции печени.

[0300] 47. Способ по варианту осуществления 46, отличающийся тем, что заболевание или нарушение функции печени представляет собой первичный билиарный цирроз, неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), аутоиммунный гепатит, гепатит В, гепатит С, алкогольную болезнь печени, фиброз, желтуху, первичный склерозирующий холангит (PSC), синдром Бадда — Киари, гемохроматоз, болезнь Вильсона, алкогольный фиброз, неалкогольный фиброз, стеатоз печени, синдром Жильбера, атрезию желчных путей, дефицит альфа-1-антитрипсина, синдром Алажиля, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз, гемофилию В, наследственный ангионевротический отек (HAE), гомозиготную семейную гиперхолестеринемию (HoFH), гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию (HeFH), болезнь фон Гирке (GSD I), гемофилию А, метилмалоновую ацидемию, пропионовую ацидемию, гомоцистинурию, фенилкетонурию (PKU), тирозинемию типа 1, дефицит аргиназы 1, дефицит аргининосукцинатлиазы, дефицит карбамоилфосфатсинтетазы 1, цитруллинемию типа 1, дефицит цитрина, синдром Криглера — Найяра 1 типа, цистиноз, болезнь Фабри, болезнь накопления гликогена 1b, дефицит LPL, дефицит N-ацетилглутаматсинтетазы, дефицит орнитинтранскарбамилазы, дефицит орнитинтранслоказы, первичную гипероксалурию типа 1 или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) вследствие дефицита аденозиндезаминазы (ADA).

[0301] 48. Способ по варианту осуществления 46, отличающийся тем, что заболевание или нарушение функции печени представляет собой рак печени или метастазы в печени.

[0302] 49. Способ по любому из вариантов реализации 45–48, отличающийся тем, что пациент является млекопитающим.

[0303] 50. Способ по варианту осуществления 49, отличающийся тем, что пациент является человеком.

[0304] 51. Способ введения молекулы нуклеиновой кислоты в клетку, включающий приведение клетки в контакт с вирусным вектором AAV по любому из вариантов осуществления 33–40.

[0305] 52. Вирусный вектор AAV по любому из вариантов осуществления 33–40 для применения в качестве лекарственного средства.

[0306] 53. Вирусный вектор AAV по любому из вариантов осуществления 33–40 для применения в способе лечения.

## ПРИМЕРЫ

[0307] Следующие ниже примеры, которые включены в настоящий документ только для иллюстрации, не предназначены для ограничения.

ПРИМЕР 1. Комбинаторная инженерия и отбор векторов AAV, уклоняющихся от антител

[0308] Способ создания мутантов AAV, уклоняющихся от антител, заключается в следующем. Первый шаг включает идентификацию конформационных трехмерных антигенных эпитопов на поверхности капсида AAV, например, с помощью криоэлектронной микроскопии. Затем выбранные остатки в пределах антигенных мотивов подвергают мутагенезу с использованием вырожденных праймеров, причем каждый кодон замещают нуклеотидами NNK, и фрагменты генов объединяют вместе с помощью сборки Гибсона и/или многоступенчатой ПЦР. Гены, кодирующие капсид, содержащие вырожденную библиотеку мутировавших антигенных мотивов, клонируют в геном AAV дикого типа для замены исходной последовательности ДНК, кодирующей Cap, с получением библиотеки плазмид. Плазмидные библиотеки затем трансфицируют в линии клеток-продуцентов 293 аденовирусной вспомогательной плазмидой для создания библиотек AAV (то есть, библиотек AAV, содержащих описанные выше мутантные капсиды AAV), которые затем могут быть подвергнуты селекции. Успешное создание библиотек AAV подтверждают посредством секвенирования ДНК.

[0309] Для отбора новых штаммов AAV, которые могут ускользать от нейтрализующих антител (NAbs), библиотеки AAV подвергают многократным циклам инфицирования у низших приматов. На каждом этапе у субъектов-животных выделяют интересующие ткани. Клеточные лизаты, собранные из интересующих тканей, секвенируют для

идентификации изолятов AAV, уклоняющихся от нейтрализации антителами. После множества циклов инфицирования нечеловекообразных приматов, объединяют изолированные последовательности из каждой мутагенизированной области во всех перестановках и комбинациях. Каждый раунд заражения, выделения ткани и секвенирования называется в данном документе циклом эволюции.

[0310] В качестве неограничивающего конкретного примера, общий антигенный мотив на капсидном белке AAV был подвергнут мутагенезу в соответствии с описанным выше. Вырожденные библиотеки рекомбинантных AAV, содержащих мутировавшие капсиды, затем подвергали первому раунду инфицирования на приматах, не являющихся людьми (фиг. 1A, фиг. 2A). Печень собирали на 7-й день после инфицирования и проводили секвенирование для идентификации отдельных рекомбинантных изолятов AAV (Фиг. 1B, Фиг. 2B).

[0311] Затем AAV, выделенные во время данного первого цикла эволюции, (Фиг. 2B), повторно вводили второму примату, не являющемуся человеком. Печень собирали на 7-й день после инфицирования и проводили секвенирование для идентификации отдельных рекомбинантных изолятов AAV (фиг. 2C).

[0312] Затем AAV, выделенные во время второго цикла эволюции, (фиг. 2C), повторно вводили третьему примату, не являющемуся человеком. Печень собирали на 7-й день после инфицирования и проводили секвенирование для идентификации отдельных рекомбинантных изолятов AAV (Фиг. 2D).

[0313] После каждого цикла эволюции в образцах печени были идентифицированы различные рекомбинантные изоляты AAV. Описание различных изолятов приведено в Таблице 8 и Таблице 6.1 выше.

ТАБЛИЦА 8. Рекомбинантный AAV, выделенный из печени

Последовательность, заменяющая антигенную последовательность	Полная Капсид Последовательность
SNGRGV (SEQ ID NO: 9)	SEQ ID NO: 18
NLAENFKY (SEQ ID NO: 10)	SEQ ID NO: 19
VLSGDHSA (SEQ ID NO: 11)	SEQ ID NO: 20

MSAASGSG (SEQ ID NO: 12)	SEQ ID NO: 21
GTNLGKEQ (SEQ ID NO: 13)	SEQ ID NO: 22
SSHSGTNQ (SEQ ID NO: 14)	SEQ ID NO: 23
VATRDGQL (SEQ ID NO: 15)	SEQ ID NO: 24
ALNADTGT (SEQ ID NO: 16)	SEQ ID NO: 25
VMEPTR (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 26
VVGNGGVV (SEQ ID NO: 297)	SEQ ID NO: 300
NFREMPIG (SEQ ID NO: 298)	SEQ ID NO: 301
RRSEDMGTI (SEQ ID NO: 299)	SEQ ID NO: 302

ПРИМЕР 2. Рекомбинантные векторы AAV трансдуцируют клетки в культуре

[0314] Для подтверждения того, что различные векторы AAV, выделенные из печени в примере 1, являются в целом инфекционными и способными трансдуцировать клетки в культуре, были приготовлены различные векторы AAV, упаковывающие трансген GFP (AAV8, AAV-SB1 (SEQ ID NO: 380), AAV-SB6 (SEQ ID NO: 437)). Векторы AAV приводили в контакт с клетками U87 (линия первичных клеток глиобластомы), поддерживаемыми в стандартных условиях культивирования. Клетки были инфицированы с показателем множественности инфицирования (MOI) равным 40 000 вг/клетка. 48 часов спустя клетки были визуализированы с помощью флуоресцентного микроскопа.

[0315] Как показано на ФИГ. 8, все протестированные векторы AAV обладали способностью успешной трансдукции клеток U87 в культуре, что привело к экспрессии упакованного в них трансгена (GFP) в клетках. Эти данные подтверждают, что рекомбинантные векторы AAV являются инфекционными и могут использоваться для доставки трансгена в интересующую клетку.

ПРИМЕР 3. Характеристика *in vitro* рекомбинантных AAV, нацеленных на печень

[0316] Пять рекомбинантных капсидных белков, содержащих одну или несколько замен, идентифицированных в Примере 1 выше, были отобраны для характеристики *in vitro* после эволюции *in vivo*: SB1 (SEQ ID NO: 380), SB2 (SEQ ID NO: 384), SB3 (SEQ

ID NO: 783), SB4 (SEQ ID NO: 784), SB5 (SEQ ID NO: 785). Были приготовлены рекомбинантные векторы AAV, которые включали рекомбинантные белки капсида и упаковывали трансген люциферазы. Эти векторы AAV (AAV-SB1, AAV-SB2, AAV-SB3, AAV-SB4 и AAV-SB5) были получены из родительского штамма AAV8.

[0317] Пять рекомбинантных векторов AAV контактировали с клетками HepG2 и клетками Huh7 в культуре с показателем множественности заражения (MOI) 10 000 вг/клетка. Далее клетки лизировали и лизат приводили в контакт с бьюиолюминисцентным субстратом и измеряли значение OCE. Как показано на фиг. 3, все пять AAV показали улучшенный тропизм в отношении гепатоцитов человека *in vitro* по сравнению с исходным штаммом AAV8, при этом AAV-SB1 демонстрировало увеличение экспрессии люциферазы до 2 log.

[0318] Для подтверждения улучшенного ускользания нейтрализующих антител по сравнению с родительским AAV8, пять конструкций AAV-люциферазы инкубировали с добавлением и без добавления 0,25 мг/мл человеческого внутривенного иммуноглобулина (IVIg) перед трансдукцией клеток глиобластомы человека U87. На фиг. 4 показан процент трансдукции по сравнению с инкубацией без IVIg, измеренный по экспрессии люциферазы. AAV-SB1, AAV-SB2 и AAV-SB5 показали наибольшее улучшение эффективности трансдукции в присутствии IVIg по сравнению с родительским AAV8. Дальнейшие анализы диапазона доз IVIg показали, что для нейтрализации AAV-SB1 необходимы более высокие концентрации IVIg по сравнению с родительским AAV8 (фиг. 5).

[0319] Вместе эти данные подтверждают значительное улучшение тропизма клеток печени *in vitro* и улучшение ускользания антител у рекомбинантного AAV по сравнению с исходным серотипом AAV8.

#### ПРИМЕР 4. Скрининг человеческой сыворотки на нейтрализующие антитела к AAV

[0320] Родительский AAV8, AAV-SB1, AAV-SB2 и три других нацеленных на печень капсида (AAV5, HSC15 и LK03), были протестированы в анализе нейтрализации при сравнении с 100 образцов донорской сыворотки. Эффективность трансдукции каждого AAV на клетках U87 в присутствии сыворотки, разведенной 1:5, сравнивали с эффективностью трансдукции без сыворотки, измеренной по уровням экспрессии люциферазы. Образец сыворотки, который снижает экспрессию люциферазы вектора

AAV до менее чем 50% уровней люциферазы без сыворотки, считался нейтрализующим.

[0321] Фиг. 6А показывает процент образцов, которые показали нейтрализацию (сильно нейтрализующие, эффективность трансдукции <20%; умеренно нейтрализующие, эффективность трансдукции 20-50%) по отношению к указанному AAV. AAV-SB1 был нейтрализован наименьшим количеством образцов (15%), тогда как родительский капсид AAV8 был нейтрализован 25% образцов. Из других капсидов LK03 был нейтрализован наибольшим количеством образцов (40%), а AAV5 — наименьшим (20%). Примечательно, что, за одним исключением, все образцы, которые были серопозитивными по AAV-SB01, были серопозитивными по всем другим капсидам. Единственное исключение имело процентную эффективность преобразования 49,58% (чуть ниже 50% границы).

[0322] Распределение по возрастным группам доноров, серопозитивных в отношении указанного капсида, показано ниже на фиг. 6В. Аналогичная картина распределения среди возрастных групп наблюдается следующим образом: возрастная группа 30–35 лет имела наибольшее количество серопозитивных доноров, а возрастная группа 36–40 лет имела их наименьшее количество.

#### ПРИМЕР 5. Биораспределение рекомбинантных AAV у нормальных мышей

[0323] Это исследование было проведено для оценки влияния эволюции тропизма капсида на печень у приматов, не являющихся людьми (NHP) на тропизм в печени у мышей, что важно для выполнения подтверждающих концепцию исследований на доступных моделях мышей. Небольшое исследование было проведено на нормальных мышцах линии В1/6. Дизайн исследования представлен в Таблице 9 ниже. Мышам внутривенно вводили одну из двух доз, и через 30 дней после инъекции ткани собирали для иммуногистохимического (ИНС) анализа для оценки экспрессии GFP и для количественной оценки векторного генома (вг) посредством кПЦР.

Таблица 9: Дизайн исследования биораспределения мышей

Номер группы	AAV	Уровень дозы	Количество животных	
			Мужчина	Женский
1	AAV-SB1-GFP	$3 \times 10^{12}$	2	2
2	AAV8	$3 \times 10^{12}$	2	2

[0324] Было подтверждено, что тропизм AAV-SB1-GFP в печени мыши подобен тропизму родительского вектора AAV8. Окрашивание ИНС (фиг. 7) продемонстрировало аналогичные уровни экспрессии GFP между AAV8 и AAV-SB1 и ожидаемые различия между полами. В таблице 10 ниже показано количество копий вирусного генома на пикограмм общей ДНК для каждой ткани. Каждый столбец представляет отдельную мышь.

Таблица 10. Распределение векторного генома (на пг ДНК) у нормальных мышей

ткани	Группа 1 (AAV-SB1-GFP, $3 \times 10^{12}$ вг/мл)			
Поджелудочная железа	$1,03 \times 10^{-03}$	$3,35 \times 10^{-04}$	$1,86 \times 10^{-03}$	$2,19 \times 10^{-03}$
Селезенка	0,017	0,142	0,015	0,017
Мозг (кора)	$3,70 \times 10^{-04}$	$2,00 \times 10^{-04}$	$6,15 \times 10^{-04}$	$8,40 \times 10^{-04}$
Сердце	$6,49 \times 10^{-03}$	$3,23 \times 10^{-03}$	0,013	0,014
Левая почка	$8,47 \times 10^{-03}$	$2,25 \times 10^{-03}$	0,027	0,021
Мышца*	0,013	0,013	0,018	0,021
Печень объединенные данные	1,730	0,477	0,627	0,573
	Группа 2 (AAV8-GFP, $3 \times 10^{12}$ вг/мл)			
Поджелудочная железа	$3,65 \times 10^{-04}$	$5,85 \times 10^{-04}$	$1,03 \times 10^{-03}$	$1,52 \times 10^{-03}$
Селезенка	$5,87 \times 10^{-03}$	$5,78 \times 10^{-03}$	$5,94 \times 10^{-03}$	$8,55 \times 10^{-03}$
Мозг (кора)	$3,05 \times 10^{-04}$	$5,75 \times 10^{-04}$	$5,50 \times 10^{-04}$	$4,20 \times 10^{-04}$

Сердце	$4,93 \times 10^{-03}$	$4,41 \times 10^{-03}$	$7,64 \times 10^{-03}$	$7,36 \times 10^{-03}$
Левая почка	$3,68 \times 10^{-03}$	$4,63 \times 10^{-03}$	0,014	$8,55 \times 10^{-03}$
Мышца*	$8,34 \times 10^{-03}$	$3,23 \times 10^{-03}$	$7,98 \times 10^{-03}$	$8,71 \times 10^{-03}$
Печень объединенные данные	0,993	0,887	0,454	0,342

\*икроножная мышца

BLOD — ниже предела обнаружения

[0325] Вышеизложенное является иллюстрацией настоящего изобретения и не должно рассматриваться как его ограничение. Изобретение определяется следующей формулой изобретения, в которую должны быть включены эквиваленты пунктов формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV - англ.: adeno-associated virus), причем капсидный белок содержит замену в антигенном участке капсидного белка AAV, при этом замена имеет последовательность, соответствующую любой из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 или 411–421.
2. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 1, отличающийся тем, что замена содержит последовательность, соответствующую любой одной из SEQ ID NO: 9, 10, 14 или 17.
3. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что капсидный белок AAV содержит первую аминокислотную замену и вторую аминокислотную замену, причем каждая из первой аминокислотной замены и второй аминокислотной замены модифицирует разные антигенные области на капсидном белке AAV, при этом каждая из первой аминокислотной замены и второй аминокислотной замены содержит любую из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 или 411–421.
4. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что капсидный белок AAV содержит первую аминокислотную замену, вторую аминокислотную замену и третью аминокислотную замену, при этом каждая из первой аминокислотной замены, второй аминокислотной замены и третьей аминокислотной замены модифицирует разные антигенные сайты капсидного белка AAV, где каждая из первой аминокислотной замены, второй аминокислотной замены и третьей аминокислотной замены содержит любую из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 297, 298, 299 или 411–421.
5. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 4, отличающийся тем, что первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит любую из SEQ ID NO. 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 297, 298, 299 или 411–421; и третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17.
6. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 5, отличающийся тем, что первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 10; и третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17.

7. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 5, отличающийся тем, что первая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 9; вторая аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 14; и третья аминокислотная замена содержит SEQ ID NO. 17.

8. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 1–7, отличающийся тем, что капсидный белок AAV дополнительно содержит замену, которая модифицирует петлю III капсида.

9. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 8, отличающийся тем, что капсид AAV содержит одну или более следующих замен в петле III:

R661R, T662S, Q666G, S667D, где нумерация соответствует капсиду AAV8 дикого типа (SEQ ID NO: 6); или

R659R, T660S, A661T, K664G, где нумерация соответствует капсиду AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 7).

10. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 1–9, отличающийся тем, что капсидный белок AAV имеет серотип AAV, выбранный из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, бычьего AAV и птичьего AAV.

11. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 1–9, отличающийся тем, что капсидный белок AAV является химерным.

12. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 11, отличающийся тем, что капсидный белок AAV содержит последовательности, полученные из двух или более серотипов AAV.

13. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 12, отличающийся тем, что капсидный белок AAV содержит последовательности, полученные из трех или более серотипов AAV.

14. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 1–10, отличающийся тем, что капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785.

15. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 14, отличающийся тем, что капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785.
16. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 15, отличающийся тем, что капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 380 или SEQ ID NO: 384.
17. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 1–16, отличающийся тем, что модификация одного или более антигенных участков приводит к ингибированию связывания антитела с одним или более антигенными участками.
18. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 1–17, отличающийся тем, что модификация одного или более антигенных участков приводит к ингибированию нейтрализации инфекционности вирусной частицы, содержащей капсидный белок AAV.
19. Рекомбинантный капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.
20. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 19, отличающийся тем, что капсидный белок AAV модифицирован путем замены области, охватывающей аминокислоты 454–460 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 9.
21. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 19 или 20, отличающийся тем, что капсидный белок AAV модифицирован путем замены области, охватывающей аминокислоты 493–500 SEQ ID NO: 49, на любую SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 297, 298, 299 или 411–421.
22. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 19–21, отличающийся тем, что капсидный белок AAV модифицирован путем замены области, охватывающей аминокислоты 585–590 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 17.
23. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 19–22, отличающийся тем, что капсидный белок AAV модифицирован путем замены области, охватывающей аминокислоты 454–460 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 9, области, охватывающей аминокислоты 493–500 SEQ ID NO: 49, на любую SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,

297 298, 299 или 411–421, и области, охватывающей аминокислоты 585–590 SEQ ID NO: 49, на SEQ ID NO: 17.

24. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 19–23, отличающийся тем, что модификация приводит к ингибированию связывания антитела с капсидным белком AAV.

25. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 19–24, отличающийся тем, что модификация приводит к ингибированию нейтрализации инфекционности вирусной частицы, содержащей капсидный белок AAV.

26. Рекомбинантный капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность, соответствующую любой одной из SEQ ID NO: 18–80, 300–410, 422–612 или 783–785.

27. Рекомбинантный капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 380 или SEQ ID NO: 384.

28. Нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 1–27.

29. Нуклеотидная последовательность по п. 28, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность ДНК.

30. Нуклеотидная последовательность по п. 28, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность РНК.

31. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность по любому из пп. 28–30.

32. Клетка, содержащая нуклеотидную последовательность по любому из пп. 28–30 или экспрессионный вектор по п. 31.

33. Вирусный вектор AAV, содержащий рекомбинантный капсидный белок по любому из пп. 1–27.

34. Вирусный вектор AAV по п. 33, дополнительно содержащий карго-нуклеиновую кислоту, заключенную в капсидный белок.

35. Вирусный вектор AAV по п. 34, отличающийся тем, что карго-нуклеиновая кислота кодирует терапевтический белок или РНК.
36. Вирусный вектор AAV по любому из пп. 34–35, отличающийся тем, что карго-нуклеиновая кислота кодирует молекулу редактирования генов.
37. Вирусный вектор AAV по п. 36, отличающийся тем, что молекула редактирования генов представляет собой нуклеазу.
38. Вирусный вектор AAV по п. 37, отличающийся тем, что молекула редактирования генов представляет собой нуклеазу Cas9.
39. Вирусный вектор AAV по п. 37, отличающийся тем, что молекула редактирования генов представляет собой нуклеазу Cpf1.
40. Вирусный вектор AAV по п. 36, отличающийся тем, что молекула редактирования генов представляет собой одиночную направляющую РНК.
41. Фармацевтическая композиция, содержащая вирусный вектор AAV по любому из пп. 33–40.
42. Фармацевтическая композиция по п. 41, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.
43. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по п. 32 или экспрессионный вектор по п. 31.
44. Фармацевтическая композиция по п. 43, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.
45. Способ лечения пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества вирусного вектора AAV по любому из пп. 33–40 или фармацевтической композиции по любому из пп. 41–44.
46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что у субъекта имеется заболевание или нарушение функции печени.
47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что заболевание или нарушение функции печени представляет собой первичный билиарный цирроз, неалкогольную жировую

болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), аутоиммунный гепатит, гепатит В, гепатит С, алкогольную болезнь печени, фиброз, желтуху, первичный склерозирующий холангит (PSC), синдром Бадда — Киари, гемохроматоз, болезнь Вильсона, алкогольный фиброз, неалкогольный фиброз, стеатоз печени, синдром Жильбера, атрезию желчных путей, дефицит альфа-1-антитрипсина, синдром Алажиля, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаза, гемофилию В, наследственный ангионевротический отек (HAE), гомозиготную семейную гиперхолестеринемию (HoFH), гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию (HeFH), болезнь фон Гирке (GSD I), гемофилию А, метилмалоновую ацидемию, пропионовую ацидемию, гомоцистинурию, фенилкетонурию (PKU), тирозинемию типа 1, дефицит аргиназы 1, дефицит аргининосукцинатлиазы, дефицит карбамоилфосфатсинтетазы 1, цитруллинемию типа 1, дефицит цитрина, синдром Криглера — Найяра 1 типа, цистиноз, болезнь Фабри, болезнь накопления гликогена 1b, дефицит LPL, дефицит N-ацетилглутаматсинтетазы, дефицит орнитинтранскарбамилазы, дефицит орнитинтранслоказы, первичную гипероксалурию типа 1 или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) вследствие дефицита аденозиндезаминазы (ADA).

48. Способ по п. 46, отличающийся тем, что заболевание или нарушение функций печени представляет собой рак печени или метастазы в печени.

49. Способ по любому из пп. 45–48, отличающийся тем, что пациент представляет собой млекопитающее.

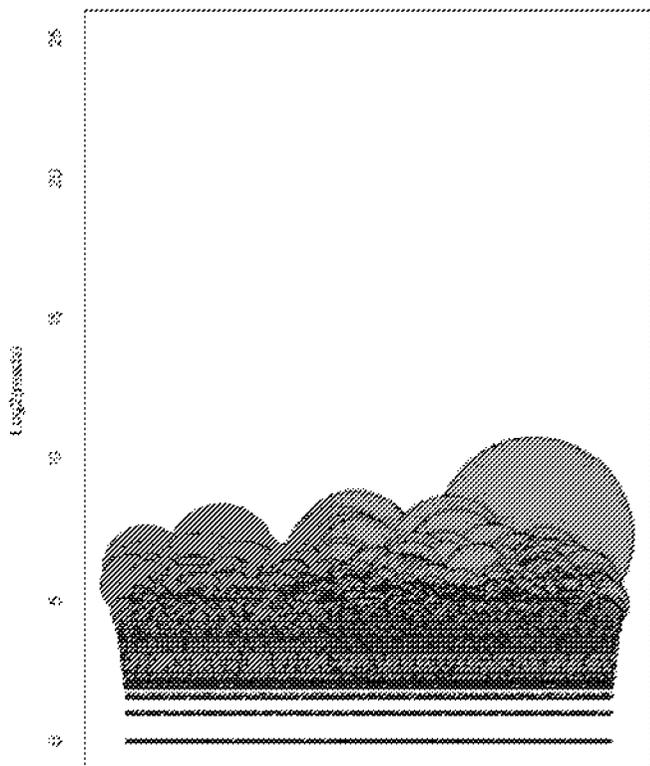
50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что пациент представляет собой человека.

51. Способ введения молекулы нуклеиновой кислоты в клетку, включающий приведение клетки в контакт с вирусным вектором AAV по любому из пп. 33–40.

52. Вирусный вектор AAV по любому из пп. 33–40 для применения в качестве лекарственного средства.

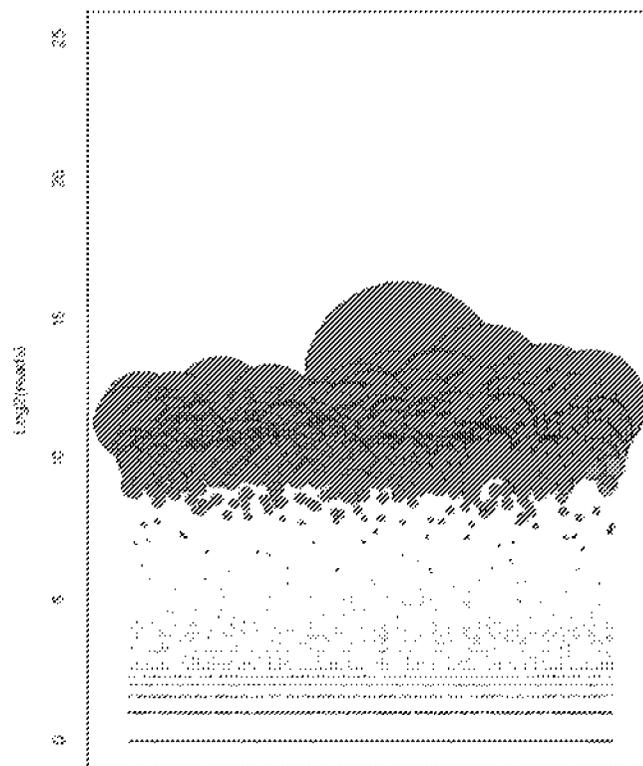
53. Вирусный вектор AAV по любому из пп. 33–40 для применения в способе лечения.

Перед эволюцией



Фиг. 1А

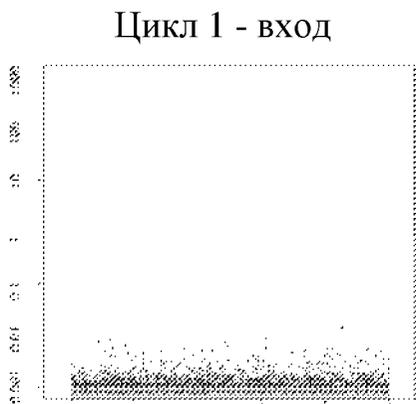
После I цикла эволюции



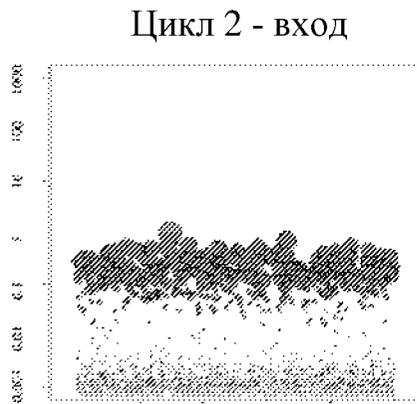
93,4%  
уменьшения  
уникальных  
КЛОНОВ

Фиг. 1В

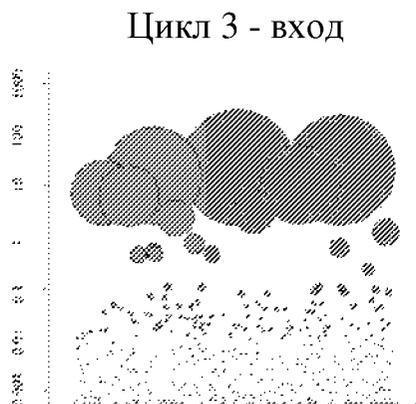
Фиг. 2А



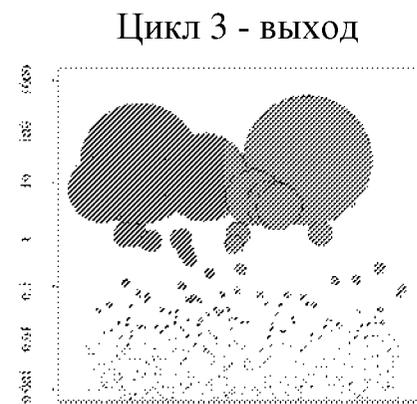
Фиг. 2В

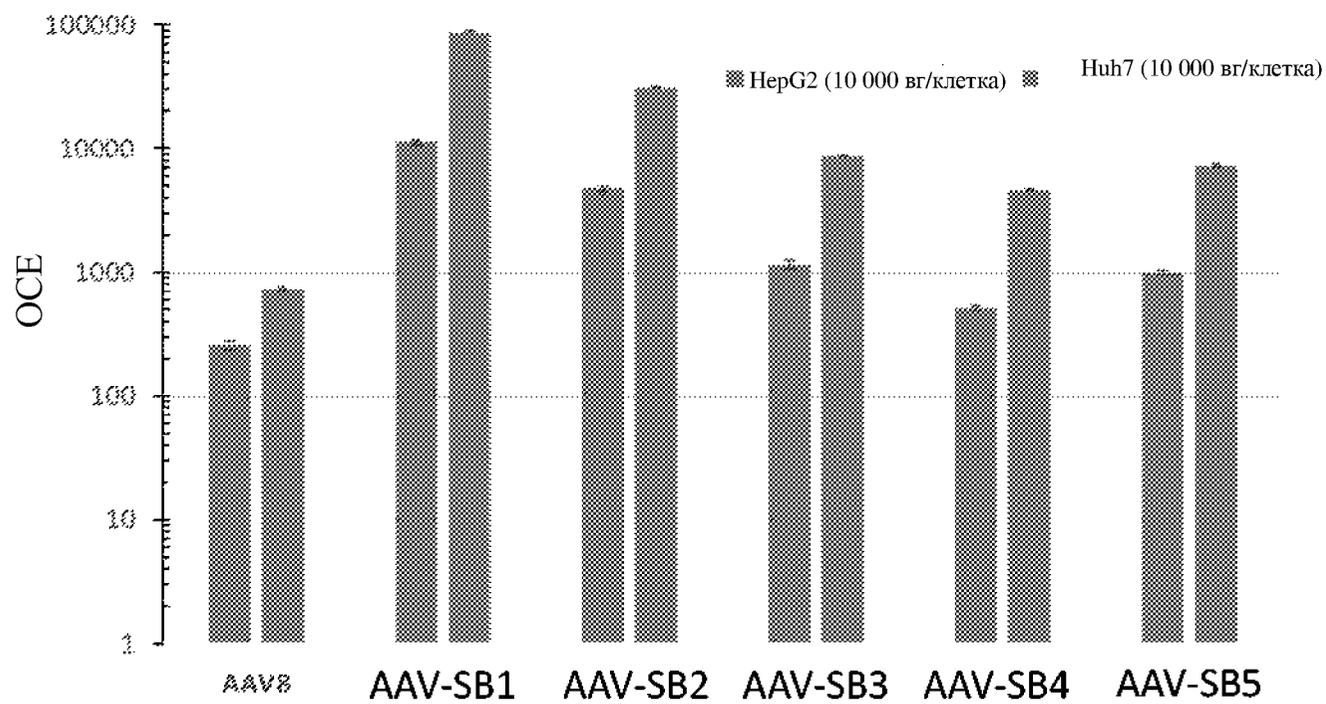


Фиг. 2С

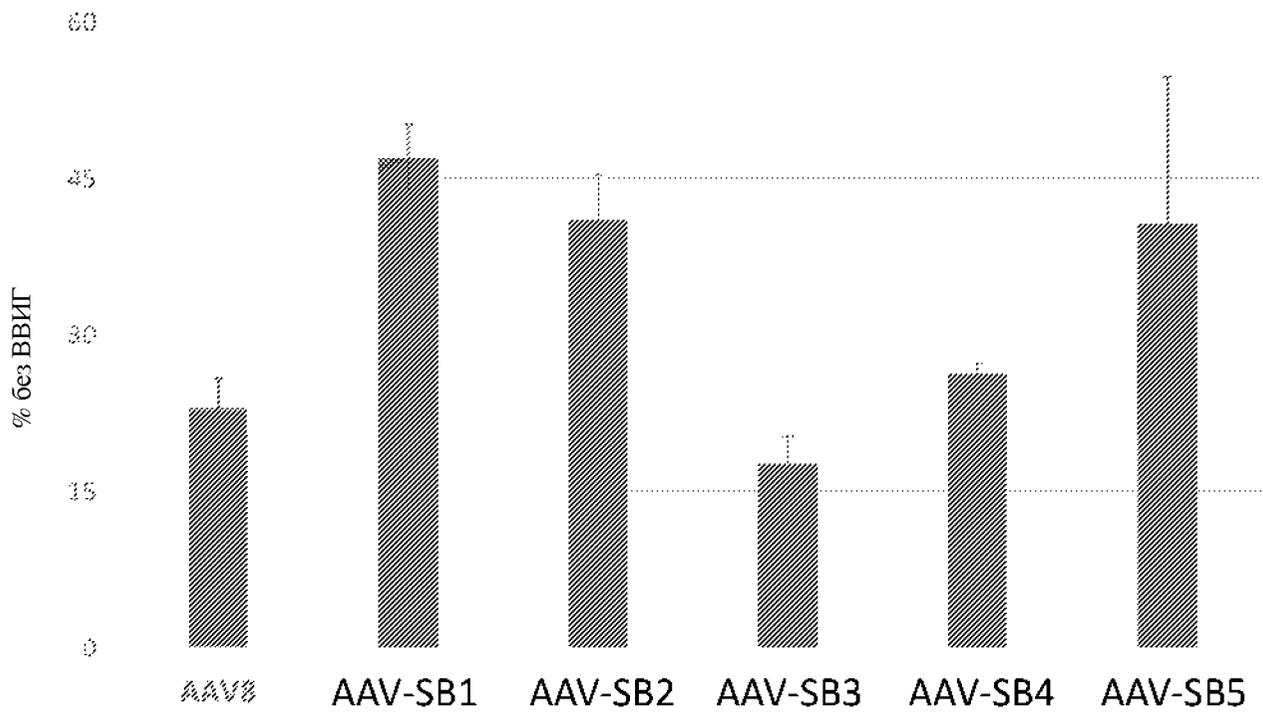


Фиг. 2D

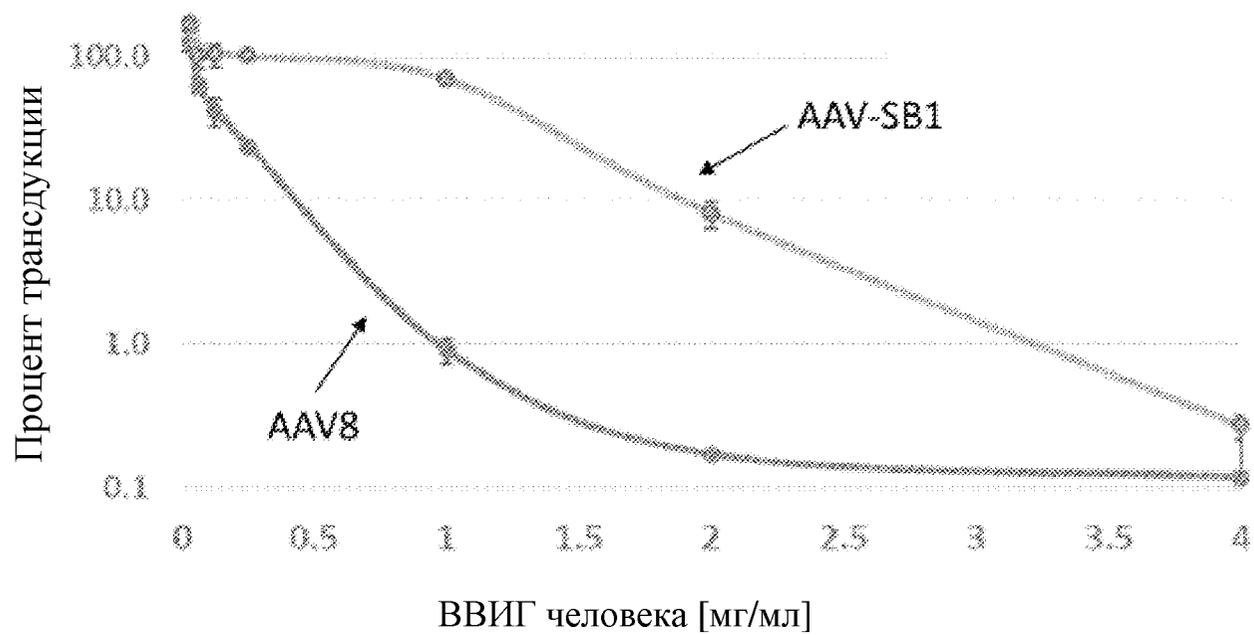




Фиг. 3

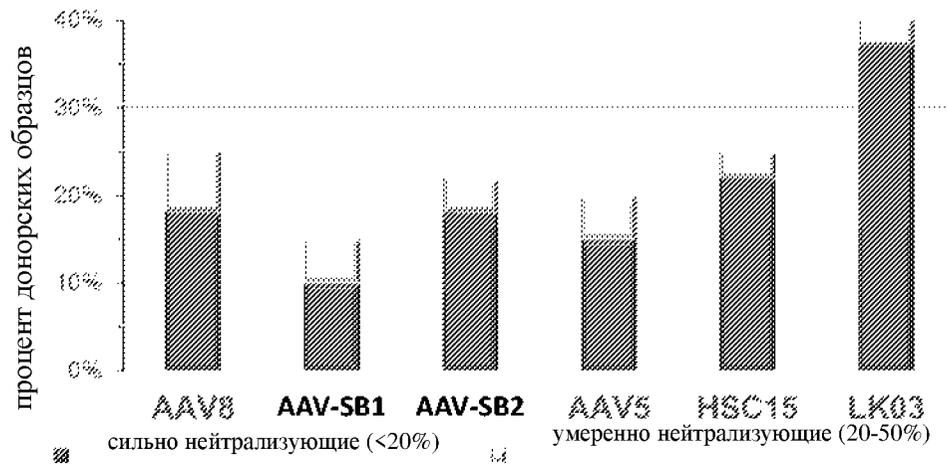


Фиг. 4

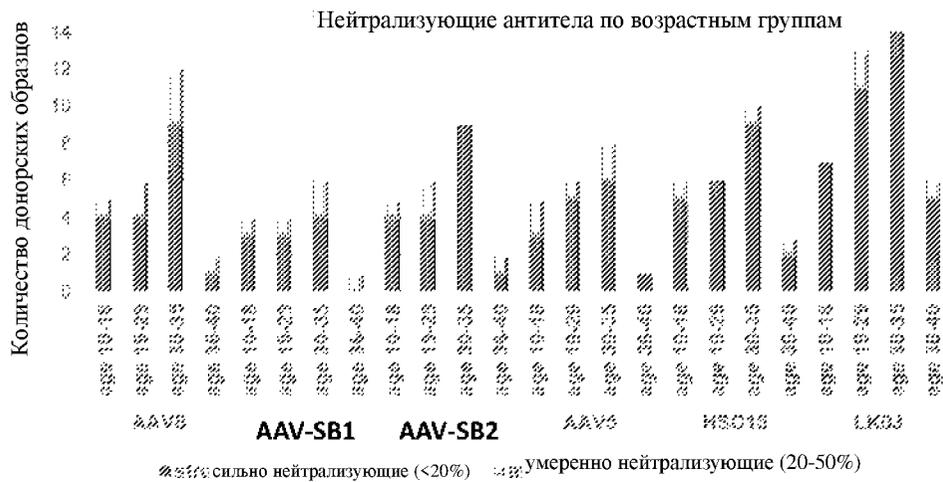


Фиг. 5

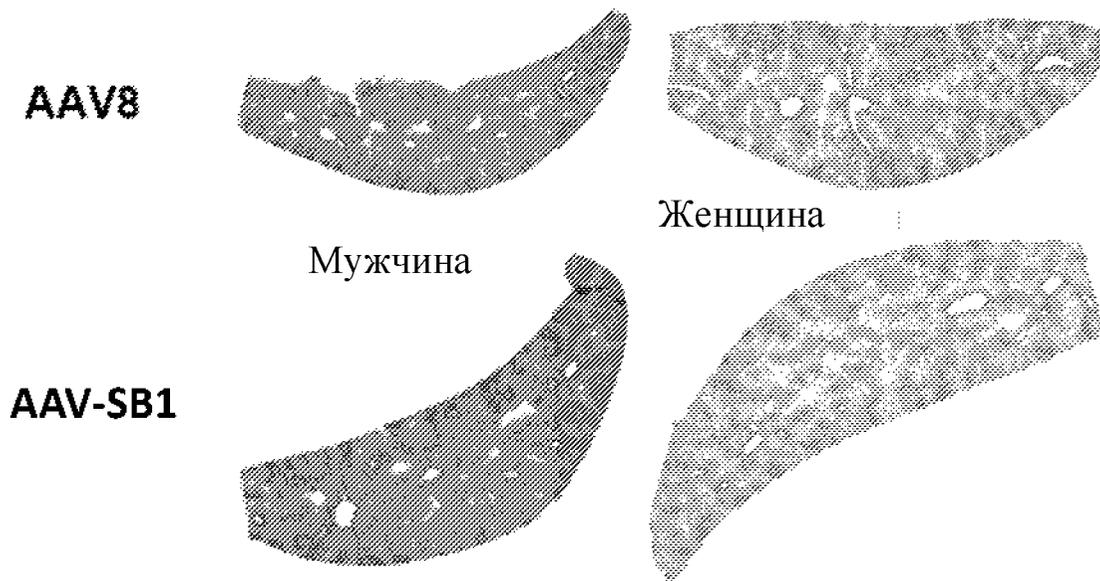
Образование нейтрализующих Ат к AAV в панели донорской сыворотки



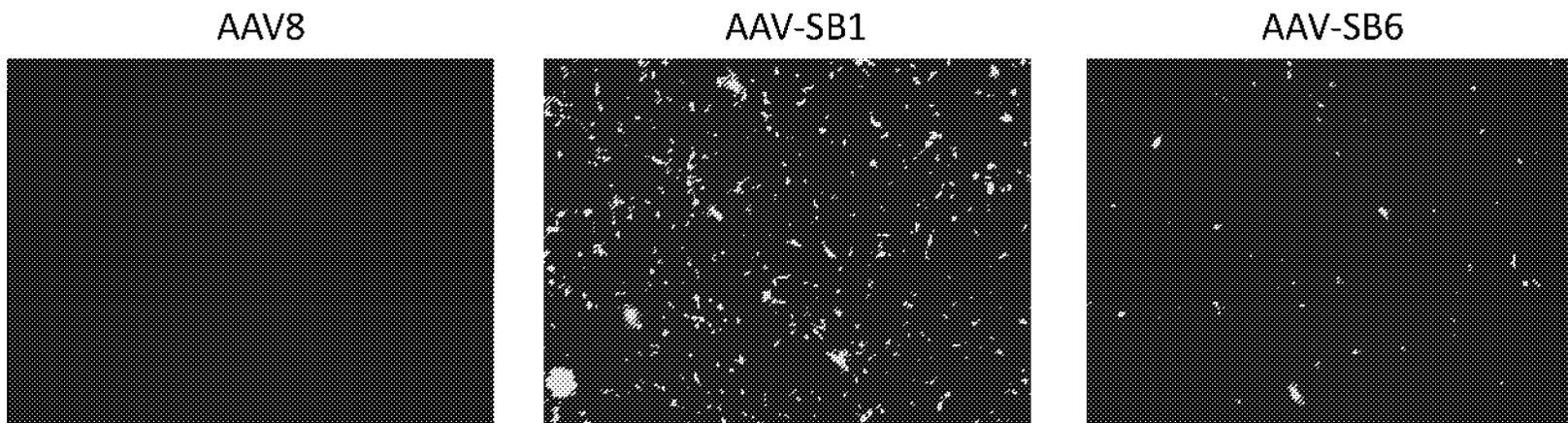
Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 7



Фиг. 8