

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091712 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.16

(51) Int. Cl. A61K 35/76 (2015.01)
C12N 15/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.01.17

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЙ КАПСИДНЫЙ БЕЛОК rAAV ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

(31) 18152133.7

(32) 2018.01.17

(33) EP

(86) PCT/EP2019/051128

(87) WO 2019/141765 2019.07.25

(71) Заявитель:
МЕЙРАДжиТиЭкс УК П
ЛИМИТЕД (GB); УНИВЕРСИТЕТ
ГЕЙДЕЛЬБЕРГ (DE)

(72) Изобретатель:
Финн Джонатан Дуглас (US), Гримм
Дирк, Бёрнер Катлен (DE), Снук
Сусанне Анна, Брукстра Нилс, Ван
Дер Санден Сабине Мария Гертруде
(NL)

(74) Представитель:
Вашина Г.М. (RU)

(57) Изобретение относится к вирионам рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) для генной терапии, при этом вирионы rAAV содержат новый капсидный белок. В частности, изобретение относится к применению таких вирионов в генной терапии для лечения артрита, такого как, например, ревматоидный артрит, или его симптомов, предпочтительно путем внутрисуставного введения.

A1

202091712

202091712

A1

Модифицированный капсидный белок RAAV для генной терапии

Область техники

Данное изобретение относится к области генной терапии на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), в частности к применению rAAV с мутантным капсидом в лечении или профилактике артрита.

Уровень техники изобретения

Векторы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) продемонстрировали превосходные профили безопасности и эффективности для доставки генов людям *in vivo*. Поэтому векторы rAAV широко использовались для генной терапии *in vivo* и были показаны, как безопасные и эффективные в доклинических моделях, а также в клинических испытаниях. Векторы rAAV были успешными в ряде клинических испытаний генной терапии для ряда заболеваний, включая гемофилию В, гемофилию А, муковисцидоз, альфа-1-анти-трипсиновый дефицит, спинальную мышечную атрофию (SMA), болезнь Паркинсона, мышечную дистрофию Дюшенна и Врожденный амавроз Лебера (Selot *et al.*, Current Pharmaceutical Biotechnology, 2013, 14, 1072-1082). Алипоген типарвовек (Glybera®, uniQure) получил европейское разрешение на медицинское применение в качестве генной терапии для лечения дефицита липопротеинлипазы (LPLD). Впоследствии было одобрено лекарственное средство для генной терапии препарата талимоген лагерпарепвек на основе вируса герпеса для лечения рака кожи (T-Vec, Imlygic®, Amgen) и для генной терапии *ex vivo* на основе ретровирусных стволовых клеток стримвелис для лечения ADA-SCID (GSK).

Генная терапия на основе вектора rAAV также применяется при ревматоидном артрите (РА), который является хроническим воспалительным заболеванием, поражающим ~ 1 % населения. Патология РА распространяется по всему синовиальному суставу. Локализованный характер сустава делает генную терапию *in vivo* очень привлекательной. Применялись методы лечения, обеспечивающие противовоспалительные белки, направленные на смещение баланса при РА в сторону противовоспалительного состояния.

Множество усилий было сосредоточено на разработке капсидных белков AAV с желаемыми свойствами. Такие свойства могут включать более высокую эффективность трансдукции, тропизм тканей/органов, устранение нацеливания на нежелательные ткани/органы или избегание ранее существующих нейтрализующих антител.

Однако в данной области техники все еще существует потребность в дальнейшем улучшении векторов генной терапии rAAV. В частности, существует необходимость в улучшении использования векторов генной терапии rAAV при артрите и, более точно, в повышении эффективности доставки генетического материала в ткань-мишень, такую как синовиальное соединение или специфические типы клеток в синовиальном соединении предпочтительно в фибробластоподобные синовиоциты (FLS).

Сущность изобретения

В первом аспекте, в данном изобретении предложен вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий модифицированный капсидный белок для применения при лечении или профилактике артрита, или при лечении или профилактике симптомов, связанных с артритом, причем модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой располагаются на поверхности капсидного белка. Предпочтительно, аминокислотная последовательность Z:

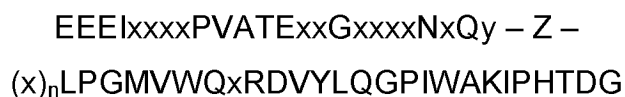
- a. содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I:



где x представляет собой один аминокислотный остаток, и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и

- b. присутствует на участке, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков с С-конца капсидного белка AAV дикого типа.

Предпочтительно аминокислотные остатки формулы I располагаются на поверхности капсидного белка. В предпочтительном варианте осуществления последовательность Z содержится в модифицированном капсидном белке на участке, представленном формулой II:



где Z, x и y имеют значения, определенные выше; и где n равен 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15.

В предпочтительном варианте осуществления данное изобретение относится к вирусу rAAV, содержащему модифицированный капсидный белок для применения при лечении или профилактике артрита или при лечении или профилактике симптомов, связанных с артритом, причем капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: i) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 1, и при этом аминокислоты в положениях 588 – 602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, ii) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 2, и при этом аминокислоты в положениях 585 – 599 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, iii) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 3, и при этом аминокислоты в положениях 587 – 601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, iv) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 4, и при этом аминокислоты в положениях 586 – 600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, v) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70 % идентичности

последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 5, и при этом аминокислоты в положениях 588 – 602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, vi) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 6, и при этом аминокислоты в положениях 588 – 602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и vii) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 7, и при этом аминокислоты в положениях 587 – 601 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, при этом модифицированный капсидный белок обеспечивает по меньшей мере двукратное увеличение экспрессии, предпочтительно в клетках FLS человека, по сравнению с немодифицированным капсидным белком с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 – 19, при тестировании в тех же условиях, при этом предпочтительно немодифицированный капсидный белок имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или имеет тот же серотип, что и модифицированный капсидный белок.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный капсидный белок обеспечивает по меньшей мере двукратное увеличение экспрессии в клетках FLS человека, по сравнению с немодифицированным капсидным белком с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 – 19, при тестировании в тех же условиях, при этом предпочтительно немодифицированный капсидный белок имеет аминокислотную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 19 или имеет тот же серотип, что и модифицированный капсидный белок.

Альтернативно или в сочетании с любым из предыдущих вариантов осуществления, в предпочтительном варианте осуществления данного изобретения капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 7.

Альтернативно или в сочетании с любым из предшествующих вариантов осуществления в предпочтительном варианте осуществления данного

изобретения вирион гAAV содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV. Предпочтительно вирион дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес генный продукт. Еще более предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес генный продукт, расположена между двумя последовательностями ITR AAV.

В предпочтительном варианте осуществления представляющий интерес генный продукт лечит, предотвращает или подавляет симптомы, связанные с артритом, при этом предпочтительно представляющий интерес генный продукт выбирают из группы, состоящей из интерлейкинов, иммуномодуляторов, антител, кшРНК, микроРНК, гидовой РНК, днкРНК, факторов роста, протеазы, нуклеотидазы/нуклеозидазы, пептидов, ингибиторов протеаз, ингибиторов ферментов и их комбинации, и при этом более предпочтительно представляющий интерес генный продукт представляет собой по меньшей мере один из CD39, CD73 и IFN- β .

Альтернативно или в сочетании с любым из предшествующих вариантов осуществления в предпочтительном варианте осуществления данного изобретения вирион гAAV содержит по меньшей мере один из: (i) полинуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую по меньшей мере одну гидовую РНК; при этом указанная или каждая гидовая РНК является по существу комплементарной последовательности-мишени (полинуклеотидам) в геноме; и (ii) полинуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую нуклеазу; при этом нуклеаза образует рибонуклеазный комплекс с гидовой РНК, и при этом рибонуклеазный комплекс вызывает сайт-специфические двухцепочечные разрывы (DSDB) ДНК в геноме.

В другом аспекте, в данном изобретении предложена композиция гAAV для применения в лечении или профилактике артрита или для лечения или профилактики симптомов, связанных с артритом, при этом композиция гAAV содержит вирион гAAV по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления композиция гAAV дополнительно содержит пустой капсид в соотношении пустой капсид к вириону гAAV, равном по меньшей мере 1:1, по меньшей мере 5:1 или по меньшей мере 10:1.

В другом аспекте, в данном изобретении предложена композиция гAAV и иммунодепрессант для применения в лечении или профилактике артрита или для лечения или профилактики симптомов, связанных с артритом, при этом композиция гAAV представляет собой композицию гAAV согласно изобретению, и, предпочтительно, при этом лечение или профилактика включает введение композиции гAAV и введение иммунодепрессанта индивиду.

Альтернативно или в сочетании с любым из предшествующих вариантов осуществления, в предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, артрит выбирают из группы, состоящий из ревматоидного артрита (РА), ювенильного ревматоидного артрита, остеоартрита (ОА), подагры, псевдоподагры, спондилоартрита (SpA), псориатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, септического артрита, артрита, ювенильного идиопатического артрита, тупой травмы, эндопротезирования сустава и болезни Стилла.

Альтернативно или в сочетании с любым из предшествующих вариантов осуществления, в предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, вирион или композицию гAAV вводят системно и/или местно. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одно из композиции гAAV и иммунодепрессанта вводят локально. Предпочтительно местное введение представляет собой внутрисуставное введение.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложен способ лечения, профилактики или подавления симптомов, связанных с артритом, включающий стадию внутрисуставного введения лекарственного средства, содержащего эффективное количество вириона гAAV или композиции гAAV согласно изобретению.

Подробное описание изобретения

Авторы изобретения обнаружили, что вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащий модифицированный капсидный белок, неожиданно эффективен в отношении трансдукции клеток и, в частности, эффективен в трансдукции клеток синовиального соединения. Поскольку фибробластоподобные синовиоциты (FLS) обычно являются первичной клеткой-мишенью в суставе при лечении заболеваний, связанных с

артритом, таких как, например, ревматоидный артрит, целью данного изобретения является обеспечение капсидных белков, которые улучшаются в одном или более из следующих свойств: i) более высокие уровни экспрессии в синовиальной ткани, в частности в FLS; ii) улучшенный тропизм синовиальной ткани, в частности улучшенный тропизм для FLS; и/или iii) улучшенное устранение нацеливания на нежелательные ткани/органы при введении гAAV по сравнению с капсидными белками, известными в данной области техники. В частности, эти свойства вириона гAAV, содержащего модифицированный капсидный белок по изобретению, улучшаются по сравнению с немодифицированными капсидными белками, предпочтительно капсидным белком дикого типа того же серотипа, что и модифицированный капсидный белок и/или капсидными белками AAV5. Ранее было установлено, что капсид AAV5 вызывает наивысшие уровни экспрессии FLS по сравнению с другими серотипами AAV (Adriaansen et al. (2005) *Ann Rheum Dis* 64:1677-1684; Apparailly et al. (2005) *Hum. Gene Ther.* 16:426-434). Поскольку именно капсид придает свойства тропизма ткани/клетки, модифицированные капсиды, описанные в данном изобретении, обладают свойством повышенного потенциала трансдукции FLS предпочтительно по сравнению с немодифицированным AAV5. В частности, предпочтительно, чтобы капсидные белки по данному изобретению обеспечивали более высокие уровни экспрессии в синовиальной ткани, в частности в FLS, предпочтительно при внутрисуставном введении, по сравнению с немодифицированными капсидными белками (то есть тем же самым капсидным белком без модификации, которая должен быть проверен, предпочтительно того же серотипа, что и модифицированные капсидные белки), предпочтительно немодифицированными капсидными белками дикого типа (предпочтительно того же серотипа, что и модифицированные капсидные белки), более предпочтительно немодифицированными капсидными белками AAV5 или wtAAV5.

Следовательно, в первом аспекте в данном изобретении предложен вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок. Вирион гAAV, как определенный в данном документе, особенно полезен для применения в генной терапии.

Используемый в данном документе термин «генная терапия» представляет собой вставку последовательностей нуклеиновых кислот (таких

как, например, трансген (также называемый нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес генный продукт), как определено в данном документе ниже) в клетки и/или ткани индивидуума для лечения или предотвращения заболевания или расстройства или лечения или предотвращения симптомом заболевания или расстройства.

AAV может инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки, и заражение происходит при взаимодействии капсидных белков с рецептором клеточной мембраны с последующим эндоцитозом вириона AAV. AAV принадлежит к роду *Dependovirus*, который, в свою очередь, относится к подсемейству *Parvovirinae*, также называемому парвовирусами, которые способны заражать позвоночных. *Parvovirinae* принадлежат к семейству мелких ДНК-вирусов животных, то есть к семейству *Parvoviridae*. Как следует из названия их рода, члены *Dependovirus* уникальны тем, что они обычно требуют ко-инфекции с вирусом-помощником, таким как аденовирус или вирус герпеса, для продуктивной инфекции в культуре клеток. Род *Dependovirus* включает AAV, который обычно заражает людей, и родственные вирусы, которые заражают других теплокровных животных (например, адено-ассоциированные вирусы крупного рогатого скота, собак, лошадей и овец). Дополнительная информация о парвовирусах и других членах *Parvoviridae* описана в Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Chapter 69 in *Fields Virology* (3d Ed. 1996). Для удобства данное изобретение дополнительно проиллюстрировано и описано в данном документе со ссылкой на AAV. Однако следует понимать, что изобретение не ограничивается AAV, но может в равной степени применяться к другим парвовирусам.

Геномная организация всех известных серотипов AAV очень похожа. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК длиной менее 5000 нуклеотидов (нт). Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности для неструктурных белков репликации (Rep) и структурных (VP) белков. Белки VP (VP1, -2 и -3) образуют капсид или оболочку белка с помощью активирующего сборку белка (AAP) (для некоторых серотипов), который кодируется в альтернативной открытой рамке считывания, перекрывающейся с таковой у VP2/VP3. Концевые нуклеотиды являются самокомплементарными и организованы так, что может быть сформирован энергетически стабильный

внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильку. Размер концевых нуклеотидов зависит от серотипа. Например, в случае AAV2 концевые 145 нт 125 нт являются самокомплементарными, а оставшиеся 20 нт остаются одноцепочечными. Эти шпильчатые структуры функционируют как источник репликации вирусной ДНК, служа праймерами для комплекса клеточной ДНК-полимеразы. После инфицирования AAV дикого типа (wtAAV) в клетках млекопитающих белки Rep (то есть, Rep78 и Rep52) экспрессируются из мРНК, транскрибируемой промотором p5 и промотором p19, соответственно. Оба белка Rep выполняют определенные функции при репликации вирусного генома. Событие сплайсинга в ORF Rep приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (то есть, Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Однако было показано, что белков Rep78 и Rep52, кодируемых не сплайсированными мРНК, в клетках млекопитающих достаточно для продуцирования вектора AAV. Продуцирование wtAAV или gAAV в клетках млекопитающих, кроме того, зависит от сочетания альтернативного использования двух сайтов-акцепторов сплайсинга и субоптимального использования иницирующего кодона ACG для VP2, что обеспечивает надлежащую экспрессию всех трех капсидных белков приблизительно в соотношении 1:1:10 (VP1: VP2: VP3).

«Вирион gAAV» (также обозначаемый в данном документе как «вектор gAAV» или «трансгенный вектор gAAV»), используемый в данном документе, означает капсид AAV, содержащий ненативную последовательность нуклеиновой кислоты. Такая последовательность в gAAV обычно фланкирована последовательностями ITR, предпочтительно из wtAAV, и предпочтительно кодирует представляющий интерес генный продукт, такой как, например, трансген или гомологичные плечи. Иными словами, вирион gAAV означает геном gAAV, содержащий (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес генный продукт, и (ii) по меньшей мере одну последовательность ITR AAV, инкапсидированную капсидными белками. Геном gAAV может иметь один или предпочтительно все гены wtAAV, но все же может содержать функциональные нуклеотидные последовательности ITR. Предпочтительно вирион gAAV не содержит каких-либо нуклеотидных последовательностей, кодирующих вирусные белки, такие как гены AAV *rep* (репликация) или *cap* (капсид). Таким образом, вирион gAAV отличается от вириона wtAAV, поскольку весь или часть вирусного генома заменена

нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес генный продукт, который является ненативной нуклеиновой кислотой по отношению к нуклеотидной последовательности AAV, как дополнительно определено в данном документе.

В предпочтительном варианте осуществления вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок по изобретению, предназначен для применения при лечении или профилактике артрита или для лечения или профилактики симптомов, связанных с артритом. Медицинское применение (например, генная терапия для лечения или профилактики (симптомов, связанных с) артритом), описанная в данном документе, представлена в виде вириона гAAV по изобретению для применения в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения определенного(ых) заболевания(ий) и/или расстройства(расстройств), определенных в данном документе, но в равной степени можно сформулировать как (i) способ профилактики или лечения заболевания(ий) и/или расстройства(расстройств), определенных в данном документе, или их симптомов, включающий введение достаточного или эффективного количества вириона гAAV по изобретению нуждающемуся в этом субъекту в виде (ii) вириона гAAV по изобретению для применения в изготовлении лекарственного средства для предотвращения или лечения заболевания(ий) и/или расстройства (расстройств), определенных в данном документе, или в качестве (iii) использования вириона гAAV в соответствии с изобретением для профилактики или лечение заболевания(ий) и/или расстройства(расстройств), определенных в данном документе. Такие медицинские применения все предусмотрены данным изобретением. Предпочтительно модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой расположены на поверхности капсидного белка.

Используемые в данном документе термины «лечить», «лечение» или «процесс лечения» относятся к применению или введению вириона гAAV по изобретению субъекту, страдающему артритом, при этом целью является излечение, частичная или полная реверсия, ослабление, улучшение, ингибирование, задержка, подавление, замедление или остановка прогрессирования или тяжести артрита или симптомов, связанных с артритом. Термин «лечение» включает уменьшение или ослабление по меньшей мере

одного неблагоприятного эффекта или симптома артрита. Лечение обычно является «эффективным», если один или более симптомов или клинических маркеров уменьшаются. Альтернативно, лечение является «эффективным», если прогрессирование заболевания артритом уменьшается или останавливается. То есть «лечение» включает не только улучшение симптомов или маркеров, но также прекращение или по меньшей мере замедление прогресса или ухудшение симптомов, которые можно ожидать в отсутствие лечения. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, без ограничения, ослабление одного или более симптома(ов), уменьшение степени заболевания, стабилизированное (то есть не ухудшающееся) состояние заболевания, задержка или замедление развития заболевания, улучшение или временное смягчение болезненного состояния и ремиссия (частичная или полная), определяемая или не обнаруживаемая. Термин «лечение» артрита также включает облегчение симптомов или побочных эффектов артрита (включая паллиативное лечение). Используемый в данном документе термин «предотвращать», «предотвращение» или «превентивный» (также называемый профилактическим) относится к применению или введению вируса гAAV по изобретению субъекту, который имеет предрасположенность к артриту, с целью отсрочить или предотвратить возникновение, ослабить, улучшить, облегчить, ингибировать прогрессирование, уменьшить степень тяжести и/или уменьшить частоту появления одного или более симптомов или признаков будущего артрита. Таким образом, вирус гAAV по изобретению можно вводить субъекту, у которого нет признаков артрита, и/или субъекту, у которого проявляются только ранние признаки артрита, предпочтительно с целью уменьшения риска развития патологии, связанной с артритом.

Используемый в данном документе термин «излечение» или «излечить» означает полное ослабление одного или более, предпочтительно всех симптомов или признаков артрита. Используемый в данном документе термин «задержка» или «задерживать» означает задержку начала и/или ингибирование прогрессирования и/или уменьшение тяжести одного или более симптомов или признаков заболевания артритом.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированный капсидный белок по изобретению обеспечивает по меньшей мере двукратное увеличение экспрессии по сравнению с немодифицированным капсидным

белком при тестировании в тех же условиях. Предпочтительно немодифицированный капсидный белок представляет собой капсидный белок того же серотипа, что и модифицированный капсидный белок, но без модификации, которая должна быть протестирована. Более предпочтительно немодифицированный капсидный белок представляет собой капсидный белок дикого типа (wt) того же серотипа, что и модифицированный капсидный белок, при этом капсидный белок wt предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 – 19. Альтернативно, предпочтительно, чтобы немодифицированный капсидный белок имел аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 – 19. Наиболее предпочтительно немодифицированный капсидный белок имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19. Предпочтительные немодифицированные капсидные белки могут зависеть от ткани, на которую будет нацеливаться вирион rAAV. Например, rAAV с капсидными белками AAV5 является предпочтительным вирионом для клеток FLS (Apparailly et al. (2005) Human Gene Therapy 16(4):426-434; Adriaansen et al. (2005) Ann. Rheum. Dis. 64(12):1677-1684) и поэтому - независимо от исходного серотипа мутантных вирионов rAAV - контрольный вирион rAAV предпочтительно содержит капсидные белки AAV5, более предпочтительно капсидный белок AAV5 дикого типа (wtAAV5), более предпочтительно, капсидный белок AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, еще более предпочтительно, контрольный вирион rAAV представляет собой вирион rAAV5. Контрольный вирион rAAV представляет собой вирион rAAV, содержащий немодифицированные капсидные белки, определенные в данном документе, вместо модифицированных капсидных белков. В предпочтительном варианте осуществления вирион rAAV (содержащий модифицированные капсидные белки) обеспечивает более высокую экспрессию при трансдукции *in vitro* в фибробластоподобных синовиоцитах от пациентов с ревматоидным артритом (RA-FLS) и/или HEK 293, предпочтительно клетки HEK293T, по сравнению с вирионом rAAV с немодифицированными капсидными белками, как определено в данном документе, вместо модифицированных капсидных белков с использованием способа, описанного в примерах. Другими словами, кроме капсидных белков, вирион rAAV и контрольный вирион rAAV

предпочтительно идентичны. Предпочтительно эффективность трансдукции определяют в анализе трансдукции *in vitro*: путем измерения уровней экспрессии репортерного гена, кодируемого трансгеном, такого как GFP, YFP и/или люцифераза. В предпочтительном варианте осуществления тест для определения экспрессии представляет собой анализ трансдукции *in vitro*, как описано в примере 2/3. Вкратце, RA-FLS (выделенный, как описано в van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427) высевает на 2500 клеток/лунку или клетки HEK293T (эмбриональные клетки почек человека) высевает при 40000 клеток/лунку в 96-луночный планшет (DMEM-GlutaMAX-I (Gibco, ref. 31966-021), 10 % FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка «Gold», Gibco кат. A15-151), 100 мкг/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, кат. P0781; 37 °C/5 % CO₂). Через 24 часа супернатант удаляли и заменяли средой (DMEM-glutaMAX-I (Gibco, кат. 31966-021), 0,001 % pluronic F68 (Sigma, кат. p5559)), содержащей мутантные вирионы gAAV или контрольные вирионы gAAV - все они экспрессируют желтый флуоресцентный белок (yFP) и/или люциферазу под контролем промотора цитомегаловируса (CMV), при множественности инфекции (MOI) 10000, 20000 и 100000. Могут быть использованы неочищенные лизаты (то есть, неочищенные супернатанты клеток, трансфицированных всеми плазмидами, необходимыми для продуцирования gAAV и содержащие репортер-экспрессирующие вирионы) или очищенный AAV (предпочтительно на основе очистки йодиксанолом или очистки градиентом плотности хлорида цезия (CsCl)). Через четыре часа после трансдукции добавляли среду (DMEM-GlutaMAX-I, 10 % FBS 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина), содержащую доксорубин (Sigma, кат. D1515; конечная концентрация 0,4 мкМ), FBS (конечная концентрация 1 %). Через 48 часов (HEK293T) или 4-6 суток (RA-FLS) клетки анализировали на процент клеток, экспрессирующих YFP или люциферазу, с помощью флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии. Предпочтительно, анализ трансдукции *in vitro* проводили многократно с FLS, выделенным от разных пациентов, таких как, например, FLS, выделенный из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более пациентов.

«Серотип» традиционно определяется на основе отсутствия перекрестной реактивности между антителами к одному вирусу по сравнению с другим вирусом. Такие различия в перекрестной реактивности обычно обусловлены

различиями в последовательностях капсидных белков/антигенных детерминант (например, из-за различий последовательностей серотипов VP1, VP2 и/или VP3 AAV). Согласно традиционному определению, серотип означает, что представляющий интерес вирус был протестирован на нейтрализующую активность с помощью сыворотки, специфичной для всех существующих и охарактеризованных серотипов, и не было обнаружено антител, которые нейтрализуют представляющий интерес вирус. По мере дальнейшего обнаружения встречающихся в природе вирусных изолятов и образования капсидных мутантов могут существовать или не существовать серологические различия с любым из существующих в настоящее время серотипов. Таким образом, в тех случаях, когда новый AAV не имеет серологического различия, этот новый AAV будет подгруппой или вариантом соответствующего серотипа. Во многих случаях серологическое тестирование на нейтрализующую активность еще предстоит выполнить на мутантных вирусах с модификациями капсидной последовательности, чтобы определить, имеют ли они другой серотип в соответствии с традиционным определением серотипа. Соответственно, для удобства и во избежание повторения термин «серотип» в широком смысле относится как к серологически различным вирусам (например, AAV), так и к вирусам (например, AAV), которые не являются серологически различными, которые могут находиться в подгруппе или варианте данного серотипа.

«Трансдукция» относится к переносу трансгена в клетку-хозяина-реципиента с помощью вирусного вектора. Трансдукция клетки-мишени вирионом gAAV по изобретению приводит к переносу трансгена, содержащегося в этом вирионе gAAV, в трансдуцированную клетку. «Клетка-хозяин» или «клетка-мишень» относится к клетке, в которую происходит доставка ДНК, такой как синовиоциты или синовиальные клетки индивидуума или такие как выделенные клетки FLS от пациентов или клетки HEK293T в случае анализа трансдукции *in vitro*. Векторы AAV способны преобразовывать как делящиеся, так и неделящиеся клетки. В клетке, содержащей представляющий интерес генный продукт, такой как, например, GFP, представляющий интерес генный продукт был введен / перенесен / преобразован посредством gAAV «трансдукции» клетки. Клетка, в которую был введен трансген, называется «трансдуцированной» клеткой.

Клетка-хозяин-реципиент, в которой трансген трансдуцируется, предпочтительно представляет собой клетку, на которую влияет заболевание, которое подлежит лечению, такую как, например, синовиальные клетки, более конкретно, FLS, макрофаги, моноциты, нейтрофилы, остеобласты, остеокласты, хондроциты, Т-лимфоциты, дендритные клетки, плазматические клетки, тучные клетки, В-лимфоциты при артрите. Термин «синовиальный», «синовиальная ткань» или «синовиальные клетки», используемый в данном документе, относится к клеточной выстилке, покрывающей нехрящевые поверхности синовиальных суставов, как дополнительно описано в Tak (2000, Examination of the synovium and synovial fluid. In: Firestein GS, Panyani GS, Wollheim FA editors. Rheumatoid Arthritis. New York: Oxford Univ. Press, Inc. 55-68) и включена в данный документ путем ссылки. Синовиум состоит из слоя внутренней оболочки (или слоя синовиальной выстилки) и синовиальной оболочки (субсиновия), которая сливается с суставной капсулой. Слой интимной оболочки содержит интимные макрофаги (или макрофагоподобные синовиоциты или синовиоциты типа А) и FLS (или синовиоциты типа В). Следовательно, «синовиум» может быть заменен или синонимичен «синовиальной ткани». Синовиальная клетка может включать любую клетку, присутствующую в синовиальной оболочке, включая FLS и макрофагоподобные синовиоциты. Клетка синовиоцита может также представлять собой нейтрофил, Т, В-клетки и/или клетки соединительной ткани, которые все могут присутствовать в синовиальной оболочке.

«Фибробластоподобные синовиоциты» (FLS) представляют собой клетки мезенхимного происхождения, которые обладают многими характеристиками, общими с фибробластами, такими как экспрессия специфических белков, таких как, например, несколько типов коллагенов. Однако FLS также секретируют белки, которые обычно отсутствуют в других линиях фибробластов, такие как, например, лубрицин. Кроме того, FLS экспрессируют молекулы, которые важны для опосредования клеточной адгезии, такие как кадгерин-11, VCAM-1, несколько интегринов и их рецепторы. Специфичным для FLS является экспрессия CD55, и поэтому этот белок обычно используется для идентификации FLS в синовиальной оболочке с помощью иммуногистохимии. FLS представляют собой специализированный тип клеток, расположенных внутри суставов в синовиальной оболочке, клетки которых играют решающую

роль в патогенезе хронических воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит (РА). Термин «ревматоидный синовиальный» или «ревматоидные синовиальные клетки» или «ревматоидная синовиальная ткань» относится к воспаленному синовиальному суставу суставов человека, страдающего РА. Ревматоидный синовиум характеризуется гиперплазией слизистой оболочки интимы и накоплением FLS, Т-клеток, плазматических клеток, макрофагов, В-клеток, естественных клеток-киллеров и дендритных клеток в синовиальном сублинии. Эти накопленные клетки включены в определение ревматоидных синовиальных клеток. Во время прогрессирования РА синовиальная ткань становится местом, где происходят постоянные воспалительные процессы, которые могут в конечном итоге привести к повреждению хряща, разрушению и деформации суставов. Сообщалось, что FLS, которые присутствуют в синовии во время РА, демонстрируют измененный фенотип по сравнению с FLS, присутствующим в нормальных тканях. Например, FLS в ревматоидном синовии теряют «контактное ингибирование», то есть они теряют свойство останавливать свой рост, когда большее количество клеток вступает в контакт друг с другом. Кроме того, они теряют способность расти на адгезивных поверхностях. В результате число FLS в больном синовиуме увеличивается. Воспаление дополнительно усиливается за счет продукции нескольких провоспалительных сигнальных молекул, в частности интерлейкинов IL-6 и IL-8, простагландинов и матриксных металлопротеиназ (MMP).

Альтернативно или в сочетании с другим вариантом осуществления в дополнительном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок по изобретению, обеспечивает по меньшей мере двукратное увеличение экспрессии трансгена в FLS человека по сравнению с вирионом gAAV, содержащим немодифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, предпочтительно с немодифицированным капсидным белком с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-19, при тестировании в тех же условиях, при этом предпочтительно немодифицированный капсидный белок имеет тот же серотип, что и модифицированный капсидный белок, или имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19.

Более предпочтительно, вирион гAAV по изобретению приводит к повышенным уровням экспрессии трансгена при трансдукции *in vitro*, как описано выше, по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 15-, 20-, 25-, 30-, 35-, 40-, 50-кратному увеличению уровней экспрессии в клетках FLS человека по сравнению с контрольным вирионом гAAV.

Также предпочтительно, или в дополнение к вышесказанному, вирион гAAV обеспечивает повышенную экспрессию трансгена при введении *in vivo* в модели синовиального воздушного мешка (APS) мыши, (адаптировано из Edwards et al (1981) J Pathol 134: 147-156 как описано в примере 4) по сравнению с контрольным вирионом гAAV, предпочтительно по сравнению с вирионом гAAV, содержащим капсидные белки wtAAV5, при условии, что гAAV в остальном идентичен (кроме его капсидного белка (белков)). Предпочтительно, экспрессия трансгена имеет по меньшей мере, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 15-, 20-, 25-, 30-, 35- кратное увеличение с использованием гAAV, содержащего мутантные капсидные белки, из способа по изобретению. Иллюстративный способ предложен в Примерах.

Также предпочтительно или в дополнение к вышесказанному, вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, обеспечивает сходные или более низкие титры нейтрализующего антитела (nAb) по сравнению с тем же вирионом гAAV, содержащим немодифицированный, предпочтительно дикого типа капсидный белок AAV, того же самого серотипа. Известно, что капсиды WtAAV5 имеют привлекательный профиль nAb, и поэтому предпочтительными являются сходные или более низкие титры nAb для гAAV, содержащего модифицированный капсидный белок в соответствии с данным изобретением, по сравнению с wtAAV5.

Альтернативно, анализ трансдукции *in vitro* может быть выполнен аналогично тому, как описано выше, но в типе клеток / клеточной линии, отличной от FLS, в зависимости от типа клеток, на который следует воздействовать, например, в клетках, выбранных из группы, состоящей из первичных гепатоцитов, клеточных линий печени, например HuH, HepG2, HepA1-6, клеток сердца, клеток скелетных мышц, клеток легких, таких как клеточная линия A549, клеток ЦНС, клеток глаза, клеток желудочно-кишечного тракта, клеток костного мозга и клеток крови, таких как клеточная линия THP-1. Это также может потребовать другого серотипа AAV в качестве

предпочтительного контроля в зависимости от тропизма капсидных белков дикого типа. Обычно контрольный вектор предпочтительно содержит капсидные белки дикого типа, которые естественным образом нацелены на выбранную ткань. Как будет понятно специалисту, это также может зависеть от способа введения: местного или системного. Например, AAV2, который был наиболее широко исследованным AAV, демонстрирует тропизм к клеткам скелетных мышц, нейронам, клеткам гладких мышц сосудов и гепатоцитам; AAV6 демонстрирует тропизм к эпителиальным клеткам дыхательных путей; AAV7 демонстрирует тропизм к клеткам скелетных мышц; AAV8 демонстрирует тропизм к гепатоцитам; AAV1 и AAV5 демонстрируют тропизм к эндотелиальным клеткам сосудов. При системном введении AAV 1-3 и 5-9 имеют тропизм к печени, с высокими уровнями белка, наблюдаемыми с AAV9, 8, 7, 6, 1 и в меньшей степени 5 и 2; сердце трансдуцируется AAV4, 6, 7, 8 и 9; торакальная экспрессия наблюдается для AAV4 и 6 (Zincarelli et al (2008) *Molecular Therapy* 16(6): 1073-1080).

Не желая ограничиваться какой-либо теорией, мы полагаем, что повышенная экспрессия, достигаемая вирионами gAAV, содержащим модифицированный капсидный белок по изобретению, по сравнению с вирионами, контролирующими gAAV, вызвана улучшенной трансдукцией gAAV в клетку, возможно, измененным тропизмом, приводящим к (i) увеличению числа клеток в популяции клеток и/или (ii) повышенному уровню экспрессии на клетку, например, из-за лучшего поглощения вириона и/или внутриклеточного процессинга.

Другим преимуществом вириона gAAV с модифицированным капсидным белком в соответствии с изобретением предпочтительно могут быть другие улучшения, такие как возможное избегание ранее существующих нейтрализующих антител.

В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения модифицированный капсидный белок содержит аминокислотную последовательность Z, предпочтительно аминокислотная последовательность Z содержится в С-концевой части белка. Предпочтительно последовательность Z имеет длину 12-18 аминокислотных остатков (в данном документе также называемая «область петли» и «вставка»). В предпочтительном варианте осуществления последовательность Z расположена в С-концевой части

капсидного белка, предпочтительно на участке, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160, наиболее предпочтительно около 150 аминокислот с С-конца капсидного белка дикого типа, как, например, показано в SEQ ID NO: 13-19. Остатки аминокислотной последовательности Z предпочтительно располагаются на поверхности капсидного белка так, что, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 остатков располагаются на поверхности капсидного белка (так называемая «петля»). В предпочтительном варианте осуществления последовательность Z имеет длину 14-18 аминокислотных остатков, более предпочтительно 15, 16, 17 или 18 аминокислотных остатков, наиболее предпочтительно 15, 17 или 18 аминокислотных остатков в длину. Последовательность Z может заменять некоторые аминокислотные остатки по сравнению с немодифицированными, такими как последовательность капсидного белка дикого типа. Предпочтительно вставка заменяет 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков, более предпочтительно 6 или 7 аминокислотных остатков той же последовательности, но без вставки, предпочтительно немодифицированной, более предпочтительно из последовательности дикого типа. Помимо последовательности Z/вставки, таким образом, в каркасе капсидный белок может содержать дополнительные модификации, такие как аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены), или каркасный капсидный белок может представлять собой аминокислотную последовательность дикого типа. Каркас AAV, в который входит вставка, может иметь любой серотип, такой как, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAVrh10 или AAVDJ. Предпочтительно, каркас AAV, в котором содержится последовательность Z, выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV7, AAV9, AAVrh10, AAVDJ, более предпочтительно из немодифицированных капсидных белков, имеющих аминокислотную последовательность, как показано в любом из SEQ ID NO: 13 – 19. Вставка по изобретению предпочтительно содержится в С-концевой части капсидного белка, предпочтительно на участке, соответствующему 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160, наиболее предпочтительно приблизительно 150 аминокислотных остатков с С-конца капсидного белка дикого типа, как,

например, показано в SEQ ID NO: 13 – 19, где расположение вставки представлено формулой II:



где x представляет собой один аминокислотный остаток, где y представляет 0, 1 или 2 аминокислотных остатка (ов) (которые, таким образом, могут отсутствовать), и где n представляет собой 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, предпочтительно 8, 9 или 10, или где местоположение вставки представлено последовательностью, имеющей по меньшей мере 90, 93, 95, 96, 97, 98 или 99 % идентичности последовательности с формулой II. Предпочтительно последние три аминокислотных остатка, предшествующие N-концу последовательности Z по изобретению, представляют собой NLQ, NHQ или NFQ. Предпочтительно, y представляет 0 или 2 аминокислотных остатка. В некоторых случаях y обозначает 2 аминокислотных остатка, поэтому между мотивом NxQ и вставкой по данному изобретению могут присутствовать два дополнительных аминокислотных остатка, предпочтительно два остатка серина. Это предпочтительно тот случай, когда мотив NxQ представляет собой NFQ, например, если капсид AAV представляет собой последовательность капсида AAV1, как представлено в SEQ ID NO: 1. Специалист сможет определить эти мотивы и эту область, в которой расположена вставка, также, если она содержит некоторые вариации, такие как аминокислотные замены или делеции, которые также включены в объем данного изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления на основе выравниваний, показанных на фиг. 4 и 5, вставка (последовательность Z) содержит или состоит из последовательности формулы: $x_1\text{-G-Q-}x_2\text{-G-}x_3\text{-}x_4\text{-}x_5\text{-R-}x_6\text{-}x_7\text{-}x_8\text{-}x_9\text{-}x_{10}\text{-}x_{11}\text{-}x_{12}\text{-}x_{13}\text{-}x_{14}\text{-}x_{15}$, где x_1 представляет собой Q или отсутствует, x_2 представляет собой S или R, x_3 представляет собой N или C, x_4 представляет собой D, Y или E, x_5 представляет собой C, V, S или A, x_6 представляет собой G, S или V, x_7 отсутствует или представляет собой A, V или R, x_8 представляет собой D, N или E, x_9 представляет собой C или A, x_{10} представляет собой F или Q, x_{11} отсутствует или представляет собой C или A, x_{12} отсутствует или представляет собой A, x_{13} отсутствует или представляет собой Q, x_{14} отсутствует или

представляет собой A и X_{15} отсутствует или представляет собой A. Альтернативно, вставка (последовательность Z) содержит или состоит из последовательности формулы: $y_1-G-Q-y_2-G-y_3-y_4-y_5-R-y_6-y_7-y_8-y_9-y_{10}-A-y_{11}-y_{12}-y_{13}$, где y_1 представляет собой Q или отсутствует, y_2 представляет собой S или R, y_3 представляет собой N или C, y_4 представляет собой D, Y или E, y_5 представляет собой C, V, S или A, y_6 представляет собой G, S или V, y_7 отсутствует или представляет собой D, y_8 отсутствует или представляет собой C, y_9 представляет собой A, V, R или F, y_{10} представляет собой N, D, E или C, y_{11} отсутствует или представляет собой Q, y_{12} отсутствует или представляет собой A, y_{13} отсутствует или представляет собой A. В еще одной альтернативе, в наиболее предпочтительном варианте осуществления, на основе выравниваний, показанных на фиг. 6 и 7, вставка (последовательность Z) содержит или состоит из последовательности общей формулы I:



где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет 0, 1 или 2 аминокислотных остатка (которые, таким образом, могут отсутствовать). Предпочтительно, (i) если на N-конце y представляет 0 аминокислот, тогда другой y в формуле I представляет 0 аминокислотных остатков или (ii) если на N-конце y представляет 1 аминокислотный остаток, тогда другой y в формуле I представляет собой 2 аминокислотных остатка. Более предпочтительно вставка (последовательность Z) содержит или состоит из последовательности более конкретной формулы:



где z_0 отсутствует или представляет собой Q, z_1 представляет собой R или S, z_2 представляет собой C или N, z_3 представляет собой D, E или Y, z_4 представляет собой C, A, S или V, z_5 представляет собой G, V или S, z_6 представляет собой d или отсутствует, z_7 представляет собой C или отсутствует, z_8 представляет собой F, R, V или A, z_9 представляет собой C, D, N или E. Более предпочтительно, если z_0 отсутствует, тогда также z_6 или z_7 оба отсутствуют.

Более предпочтительно, последовательность Z/вставки содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 %, наиболее предпочтительно 100 % идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 – 12. Предпочтительно, чтобы последовательность Z/вставки содержала или состояла из аминокислотной последовательности, представленной любой из вышеуказанных последовательностей, и имеющей по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 %, наиболее предпочтительно 100 % идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 – 12.

В клетках млекопитающих экспрессия трех капсидных белков AAV (VP1, VP2 и VP3) в правильной стехиометрии зависит от комбинации альтернативного использования двух сайтов-акцепторов сплайсинга и субоптимального использования иницирующего кодона ACG для VP2, который не воспроизводится точно клетками насекомых. Правильная стехиометрия важна для инфекционности частиц AAV. Для продуцирования трех капсидных белков AAV в клетках насекомых с правильной стехиометрией в данной области техники обычно используют конструкцию, которая транскрибируется в один поликистронный мессенджер, который способен экспрессировать все три белка VP без необходимости сплайсинга. Для достижения этого белок VP1 может находиться под контролем неоптимального кодона инициации трансляции вместо ATG. Примерами такого субоптимального кодона инициации трансляции являются ACG, TTG, CTG и GTG (Urabe et al. (2002) Human Gene Therapy 13: 1935-1943; US 20030148506; US 20040197895; WO 2007/046703). Альтернативно, при продуцировании гAAV в клетках насекомых можно использовать кассету нуклеиновой кислоты для экспрессии белков VP1, VP2 и VP3, где эти белки кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORF), как описано в европейском патенте № 2061891 B1, где раскрыта кассета экспрессии VP, которая содержит интрон, содержащий промотор перед кодоном инициации ACG VP2. Модифицированный капсидный белок по изобретению определяется в отношении последовательности белка капсидного белка VP1. Однако,

поскольку последовательность Z/вставки расположена в С-концевой части белка VP1, в изобретение включено, что также белки VP2 и VP3 несут последовательность Z/вставки и, таким образом, модифицируются (независимо от способа получения гAAV, такого как, например, в клетках насекомых или в клетках млекопитающих).

Альтернативно или в сочетании с другим вариантом осуществления в дополнительном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения модифицированный капсидный белок по изобретению содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: i) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 1 и где аминокислоты в положениях 588 – 602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, ii) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 2 и где аминокислоты в положениях 585 – 599 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, iii) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, более предпочтительно, имеющей 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 3 и где аминокислоты в положениях 587 – 601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, iv) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 4 и где аминокислоты в положениях 586 – 600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере

80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, v) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 5 и где аминокислоты в положениях 588 - 602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, vi) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 6 и где аминокислоты в положениях 588 - 602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 и vii) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 7 и где аминокислоты в положениях 587 – 601 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %, более предпочтительно, имеющей 100 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно каркасный капсидный белок AAV, который содержит вставку, имеет аминокислотную последовательность капсида AAV дикого типа, такую как, например, AAV5, AAV1, AAV2, AAV7, AAV9, AAVrh10 или AAVDJ, или аминокислотную последовательность, содержащую консервативные аминокислотные замены. Более предпочтительно каркасный капсидный белок AAV, который содержит вставку, имеет аминокислотную последовательность капсида wtAAV5 или аминокислотную последовательность, содержащую консервативные аминокислотные замены.

«Идентичность последовательности» в данном документе определяется как отношение между двумя или более аминокислотными (полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более нуклеиновыми (полинуклеотидными) последовательностями, определенное путем сравнения

последовательностей. В предпочтительном варианте осуществления идентичность последовательности рассчитывается на основе полной длины двух данных SEQ ID NO или их частей. Их части предпочтительно означают по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 % или 100 % обоих SEQ ID NO. В данной области техники «идентичность» также означает степень родства последовательностей между аминокислотными или нуклеиновыми кислотными последовательностями, в зависимости от обстоятельств, что определяется соответствием между строками таких последовательностей. Если в данном документе не указано иное, идентичность или сходство с данной SEQ ID NO означает идентичность или сходство на основе полной длины указанной последовательности (то есть, по всей ее длине или в целом).

«Сходство» между двумя аминокислотными последовательностями определяют путем сравнения аминокислотной последовательности и ее консервативных аминокислотных заместителей одного полипептида с последовательностью второго полипептида. «Идентичность» и «сходство» могут быть легко рассчитаны известными способами, включая, без ограничений, описанные в (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)).

Разработаны предпочтительные методы определения идентичности с целью выявления максимального сходства между исследуемыми последовательностями. Эти методы определения идентичности и подобию запрограммированы в общественно доступных компьютерных программах. Предпочтительные способы компьютерной программы для определения идентичности и сходства между двумя последовательностями включают, например, пакет программ GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Программа BLAST X публично доступна в Национальном центре биотехнологической информации и в других источниках

(BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Для определения идентичности также может быть применен общеизвестный алгоритм Смита-Уотермана.

Предпочтительные параметры для сравнения полипептидных последовательностей включают следующий алгоритм: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Comparison matrix: BLOSSUM62 из Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992); штраф за гэп: 12 и штраф за удлинение гэпа: 4. Такая программа общедоступна как программа «Огар» от Genetics Computer Group, расположенной в Мэдисон, штат Висконсин. Вышеупомянутые параметры являются параметрами по умолчанию для сравнения аминокислот (наряду с отсутствием штрафа за концевые гэпы).

Предпочтительные параметры для сравнения нуклеиновых кислот включают следующий алгоритм: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); матрица сравнения: совпадения = + 10, несовпадение = 0; штраф за гэп: 50; штраф за удлинение гэпа: 3. Доступна как программа Gap от Genetics Computer Group, расположенной в Мэдисоне, штат Висконсин. (www.biology.wustl.edu/gcg/gap). Выше приведены параметры по умолчанию для сравнения нуклеиновых кислот.

Необязательно, при определении степени сходства аминокислот специалист в данной области техники может также принимать во внимание так называемые «консервативные» замены аминокислот, что будет понятно специалисту. Консервативные аминокислотные замены относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи представляет собой глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксильные боковые цепи, представляет собой серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амидосодержащие боковые цепи, представляет собой аспарагин и глутамин; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, представляет собой фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, представляет собой лизин, аргинин и гистидин, а группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, представляет собой цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин,

аланин-валин и аспарагин-глутамин. Заместительными вариантами аминокислотной последовательности, раскрытой в данном документе, являются те, в которых по меньшей мере один остаток в раскрытых последовательностях удален, а другой остаток вставлен на его место. Предпочтительно, аминокислотная замена является консервативной. Предпочтительные консервативные замены для каждой встречающейся в природе аминокислоты являются следующими: Ala на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln или His; Asp на Glu; Cys на Ser или Ala; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Pro; His на Asn или Gln; Ile на Leu или Val; Leu на Ile или Val; Lys на Arg; Gln или Glu; Met на Leu или Ile; Phe на Met, Leu или Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp или Phe и Val на Ile или Leu.

Альтернативно или в сочетании с другим вариантом осуществления в дополнительном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-7, более предпочтительно из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 6 и 7, еще более предпочтительно, из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4 и 6, еще более предпочтительно, из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 6 наиболее предпочтительно SEQ ID NO: 4.

Функциональные последовательности ITR необходимы для репликации, освобождения и упаковки вирионов rAAV. Последовательности ITR могут представлять собой последовательности дикого типа или могут иметь идентичность последовательности, равную по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 100 % с последовательностями дикого типа или могут быть изменены, например, путем вставки, мутации, делеции или замещение нуклеотидов, пока они остаются функциональными. В этом контексте, функциональность относится к способности непосредственно упаковывать геном в оболочку капсида и затем обеспечивать возможность экспрессии в клетке-хозяине или клетке-мишени. Как правило, ITR генома AAV дикого типа сохраняются в векторе rAAV. ITR могут быть клонированы из вирусного генома AAV или вырезаны из вектора, содержащего ITR AAV. Нуклеотидные последовательности ITR могут быть либо лигированы на любом конце с трансгеном, как определено в данном документе, с использованием стандартных методов молекулярной биологии, либо последовательность AAV

дикого типа между ITR может быть заменена желаемой нуклеотидной последовательностью. Вектор гAAV предпочтительно содержит по меньшей мере нуклеотидные последовательности областей ITR одного из серотипов AAV или нуклеотидные последовательности, по существу, идентичные ему, и по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический белок (под контролем подходящего регуляторного элемента), вставленную между двумя ITR. Большинство используемых в настоящее время векторов гAAV используют последовательности ITR из серотипа AAV 2. Наиболее предпочтительные ITR, присутствующие в векторе гAAV, относятся к серотипу AAV2. Другими предпочтительными ITR относятся к серотипу AAV1, AAV3, AAV5 или AAV6 (Grimm et al. (2006) J Virol 80(1):426-439). Геном гAAV может содержать одноцепочечную или двухцепочечную (самокомплементарную) ДНК. Молекула одноцепочечной нуклеиновой кислоты является либо смысловой, либо антисмысловой цепью, поскольку обе полярности одинаково способны упаковываться в капсиды AAV. Одноцепочечные векторы гAAV могут использовать последовательности ITR AAV серотипа 2 (AAV2) дикого типа, а двухцепочечные (самокомплементарные) векторы гAAV могут использовать модифицированную версию ITR. Альтернативно, в варианте осуществления двухцепочечный вектор содержит один ITR, который является ITR из AAV4. Вектор гAAV может дополнительно содержать маркерный или репортерный ген, такой как, например, ген, кодирующий ген устойчивости к антибиотику, флуоресцентный белок (например, *gfp*) или ген, кодирующий химически, ферментативно или иным образом выявляемый и/или селектируемый продукт (например, *lacZ*, щелочную фосфатазу (AP), SEAP, Luc, Neo, Bla и т.д.), известные в данной области техники.

Вектор гAAV, включая любую возможную комбинацию капсида AAV серотипа и ITR генома AAV, получают с использованием способов, известных в данной области техники, например, с использованием системы продуцирования гAAV млекопитающих или системы продуцирования гAAV клеток насекомых. Способы, известные в данной области техники, описаны, например, в Pan et al. (J. of Virology (1999) 73: 3410-3417), Clark et al. (Human Gene Therapy (1999) 10: 1031-1039), Wang et al. (Methods Mol. Biol. (2011) 807: 361-404), Grimm (Methods (2002) 28(2): 146-157), а система клеток насекомых основаны на Urabe et al

(Human Gene Therapy (2002) 13:1935-1943), Kohlbrenner et al (Molecular Therapy (2005) 12(6):1217-1225), международной патентной публикации WO 2007/046703, международной патентной публикации WO 2007/148971, международной патентной публикации WO 2009/014445, международной патентной публикации WO 2009/104964, международной патентной публикации WO 2009/154452, международной патентной публикации WO 2011/112089, международной патентной публикации WO 2013/036118, патенте США №. 6723551 В, которые включены в данный документ посредством ссылки. Если кратко, способы обычно могут включать (а) введение конструкции генома гAAV в клетку-хозяина, (b) введение конструкции-помощника AAV в клетку-хозяина, при этом конструкция-помощник содержит вирусные функции, отсутствующие в геноме гAAV дикой типа и (с) введение конструкции вируса-помощника в клетку-хозяина. Должны присутствовать все функции для репликации и упаковки вектора гAAV, чтобы обеспечить репликацию и упаковку генома гAAV в векторы гAAV. Введение в клетку-хозяина может осуществляться с использованием стандартных методик молекулярной биологии и может осуществляться одновременно или последовательно. Наконец, клетки-хозяева культивируют для получения векторов гAAV, которые затем очищают с использованием стандартных методов, таких как градиенты CsCl (Xiao et al. 1996, J. Virol. 70: 8098-8108) или очистка йодиксанолом. Затем очищенный вектор гAAV обычно является готовым для применения в способах. Высокие титры более 10^{12} частиц на мл и может быть достигнута высокая чистота (без обнаруживаемых вирусов-помощников и вирусов дикого типа) (см., например, Clark et al. *выше* и Flotte et al. 1995, Gene Ther. 2: 29-37). Общий размер трансгена, вставленного в вектор гAAV между областями ITR, обычно меньше 5 килобаз (кб).

В контексте данного изобретения оболочка капсидного белка может иметь другой серотип, нежели геном гAAV, содержащий (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес генный продукт, и (ii) по меньшей мере одну последовательность ITR AAV. Таким образом, геном гAAV по данному изобретению может быть инкапсидирован оболочкой капсидного белка по данному изобретению, т.е. икосаэдрическим капсидом, который содержит капсидные белки (VP1, VP2 и/или VP3) согласно данному изобретению, например, мутантные капсидные белки AAV согласно изобретению, тогда как последовательности ITR, содержащиеся в этом векторе

гAAV, могут представлять собой любой из серотипов AAV, описанных выше, включая, например, AAV2 или AAV5. В одном варианте осуществления геном гAAV или ITR, присутствующие в вирионе гAAV, получены из серотипа AAV 2, серотипа 5 AAV или серотипа AAV 8. Полный геном AAV5 и других серотипов AAV был секвенирован (Chiorini et al. 1999, J. of Virology Vol. 73, No.2, p1309-1319), а нуклеотидная последовательность AAV5 доступна в GenBank (номер доступа AF085716). Таким образом, нуклеотидные последовательности ITR AAV2 и AAV5 легко доступны для специалиста. Полный геном AAV2 доступен в NCBI (эталонная последовательность NCBI NC_001401.2). Они могут быть клонированы или получены путем химического синтеза, известного в данной области техники, с использованием, например, синтезатора олигонуклеотидов, поставляемого, например, компанией Applied Biosystems Inc. (Фостерс, штат Калифорния, США) или с использованием стандартных методов молекулярной биологии.

Альтернативно или в сочетании с другим вариантом осуществления в дополнительном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения вектор гAAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес генный продукт.

Термины «трансген» или «представляющий интерес генный продукт» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к ненативной нуклеиновой кислоте по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты AAV. Они используются для обозначения полинуклеотида, который может быть введен в клетку или организм. Представляющие интерес генные продукты включают любой полинуклеотид, такой как ген, который кодирует полипептид или белок, полинуклеотид, который транскрибируется в ингибирующий полинуклеотид, или полинуклеотид, который не транскрибируется (например, отсутствует элемент управления экспрессией, такой как промотор, который управляет транскрипцией). Представляющий интерес генный продукт по изобретению может содержать по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, каждая из которых различна или кодирует разные терапевтические молекулы. По меньшей мере две разные нуклеотидные последовательности могут быть связаны элементом IRES (внутренний сайт посадки рибосомы), обеспечивая бицистронный транскрипт под контролем одного промотора. Подходящие элементы IRES описаны,

например, в Hsieh et al. (1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:910-917). Кроме того, по меньшей мере две разные нуклеотидные последовательности, кодирующие разные (терапевтические) полипептиды или белки, могут быть связаны вирусной последовательностью 2A для обеспечения эффективной экспрессии обоих трансгенов из одного промотора. Примеры последовательностей 2A включают последовательности вируса ящура, вируса конского ринита А, вируса Тесы Асигны и тешовируса-1 свиней (Kim et al., *PLoS One* (2011) 6(4): e18556). Представляющий интерес генный продукт предпочтительно встраивают в геном gAAV или между последовательностями ITR. Представляющий интерес генный продукт может также представлять собой экспрессионную конструкцию, содержащую регуляторный элемент экспрессии, такой как промоторная или регуляторная последовательность транскрипции, функционально связанная с кодирующей последовательностью и 3'-концевой последовательностью. Представляющий интерес генный продукт может представлять собой функциональный мутантный аллель, который заменяет или дополняет дефектный аллель. Генная терапия также включает вставку трансгенов, которые являются ингибиторными по природе, то есть которые ингибируют, уменьшают или снижают экспрессию, активность или функцию эндогенного или экзогенного гена или белка, такого как нежелательный или абберантный (например, патогенный) ген или белок. Такие трансгены могут быть экзогенными. Под экзогенной молекулой или последовательностью понимают молекулу или последовательность, обычно не встречающуюся в клетке, ткани и/или индивидууме, подлежащим лечению. Как приобретенные, так и врожденные заболевания поддаются генной терапии.

«Ген» или «кодирующая последовательность» относится к области ДНК или РНК, которая «кодирует» конкретный белок. Кодированная последовательность транскрибируется (ДНК) и транслируется (РНК) в полипептид при помещении под контроль соответствующей регуляторной области, такой как промотор. Ген может содержать несколько функционально связанных фрагментов, таких как промотор, 5'-лидерная последовательность, интрон, кодирующая последовательность и 3'-нетранслируемая последовательность, содержащая сайт полиаденилирования или сигнальную последовательность. Химерный или рекомбинантный ген представляет собой ген, обычно не встречающийся в природе, такой как ген, в котором, например,

промотор не связан в природе с частью или всей областью транскрибируемой ДНК. «Экспрессия гена» относится к процессу, в котором ген транскрибируется в РНК и/или транслируется в активный белок.

Используемый в данном документе термин «промотор» или «регуляторная последовательность транскрипции» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который контролирует транскрипцию одной или более кодирующих последовательностей и расположен выше сайта инициации транскрипции в кодирующей последовательности относительно направления транскрипции и структурно идентифицируется наличием сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, включая, без ограничения, сайты связывания транскрипционных факторов, сайты связывания репрессорного и активаторного белков, и любые другие последовательности нуклеотидов, известные специалисту в данной области техники для прямого или косвенного действия, регулирующего количество транскрипции от промотора. «Конститутивный» промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве тканей в большинстве физиологических условий и состояний развития. «Индуцируемый» промотор представляет собой промотор, который регулируется физиологически или при развитии, например, путем применения химического индуктора. Предпочтительным индуцибельным промотором является NF-κB-чувствительный промотор, который индуцибелен при воспалении. «Тканеспецифичный» промотор предпочтительно активен в определенных типах тканей или клеток. Выбор подходящей промоторной последовательности обычно зависит от клетки-хозяина, выбранной для экспрессии сегмента ДНК. Предпочтительными промоторными последовательностями в пределах gAAV и/или трансгена по изобретению являются промоторы, которые обеспечивают экспрессию в клетках ревматоидного синовиума, таких как *in vitro* макрофаги и/или в FLS и/или других синовиальных клетках, таких как, без ограничения, Т-клетки. Предпочтительными промоторами являются, например, промоторы генов, о которых известно, что они экспрессируются в синовиальных клетках, такие как промотор CMV, промотор гена IL-6 или промотор SV40 или индуцируемый NF-κB промотор, как ранее идентифицированный в данном документе, и другие, которые легко определяется квалифицированным специалистом. В качестве

альтернативы, трансген функционально связан с промотором, который обеспечивает эффективную системную экспрессию. Подходящими промоторными последовательностями являются промотор CMV, CBA (куриный бета-актин) или специфичные для печени промоторы, такие как альфа-1-антитрипсин человека (hAAT) или TBG (тироксин-связывающий глобулин). Предпочтительно, промотор внутри gAAV и/или трансгена не является стероид-индуцируемым промотором. Более предпочтительно, промотор внутри gAAV и/или трансгена не является дексаметазон-индуцируемым промотором.

Используемый в данном документе термин «функционально связанный» относится к связи полинуклеотидных (или полипептидных) элементов в функциональных отношениях. Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она находится в функциональном отношении с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, последовательность, регулирующая транскрипцию, является функционально соединенной с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. «Функционально связанный» означает, что соединяемые последовательности ДНК обычно являются смежными и, при необходимости, соединяются с двумя кодирующими белок областями, смежными и расположенными в рамке считывания.

«Представляющий интерес генный продукт» может быть «терапевтическим полипептидом» или «терапевтическим белком», которые следует понимать в данном документе как полипептид или белок, который может оказывать благоприятное воздействие на индивидуума, предпочтительно указанный индивидуум представляет собой человека, более предпочтительно, указанный человек страдает от болезни. Такой терапевтический полипептид может быть выбран, без ограничения, из группы, состоящей из фермента, кофактора, цитокина, антитела, фактора роста, гормона и противовоспалительного белка.

В качестве альтернативы или в сочетании с другим вариантом осуществления в дополнительном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес генный продукт, расположена между двумя последовательностями ITR AAV. В качестве альтернативы сказано, что нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес

генный продукт, фланкирована двумя последовательностями ITR AAV, то есть одной ITR на любом конце нуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес генный продукт.

В качестве альтернативы или в сочетании с другим вариантом осуществления в дополнительном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения представляющий интерес генный продукт лечит, предотвращает или подавляет симптомы, связанные с артритом, при этом предпочтительно представляющий интерес генный продукт выбирают из группы, состоящей из интерлейкинов, иммуномодуляторов, антител, кшРНК, микроРНК, факторов роста, протеазы, нуклеотидазы/нуклеозидазы, пептидов, ингибиторов протеаз, ингибиторов, ферментов и их комбинации, и при этом более предпочтительно представляющий интерес генный продукт представляет собой по меньшей мере один из CD39, CD73 и IFN- β . Примеры таких представляют собой: ингибитор интерлейкина 1 (IL-1) (например анакинра, канакинумаб, рилонацепт), ингибитор фактора некроза опухоли альфа (TNF α) (например этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, цертилизумаб, пегол, голимумаб), антагонист рецептора IL-1, растворимый рецептор IL-1, ингибитор IL-17 (например секукинумаб, бродалумаб, икэкизумаб), ингибитор IL-12 / IL-23 (устекинумаб, рисанкизумаб, гуселькумаб, тилдракизумаб), ингибитор костимуляции Т-клеток (например, абатацепт), В-клеточные истощающие и ингибирующие агенты (например, ритуксимаб, белимумаб, ианалумаб, табалумаб), ингибитор IL-15 (например, AMG-714), ингибитор IL-22 (например, фезакунимаб), ингибитор GM-CSF (лензилумаб, намилумаб) инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), фактор роста фибробластов (FGF) (например, rhFGF-18/сприфермин), ингибитор лиганда рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL) (например деносумаб), ингибитор комплемента 5а (например, C5aR-151), член семейства морфогенетических белков костей (BMP), трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β), семейство факторов дифференциации роста (GDF), ингибитор интерлейкина-18 (например тадекиниг альфа/ связывающий белок IL-18), ингибиторы IL-2 (например базиликсимаб, даклизумаб), растворимый рецептор TNF α (sTNF α) p55 или рецептор sTNF α p75, рецепторы sTNF α , слитые с IgG, ингибиторы рецептора TNF α p55, ингибиторы рецептора sTNF α p75, доминантно-негативная I κ B-киназа (dn-IKK- β), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-10 (IL-10) (F8IL10/декавил),

интерлейкин-13 (IL-13), интерферон бета (IFN- β), тканевой ингибитор семейства MMP (TIMP), ингибитор активатора плазминогена (PAI), ингибиторы сериновой протеазы (серпины), сигнальные молекулы / факторы транскрипции (*например*, SMAD, Sox9, I κ B), компоненты внеклеточного матрикса (*например*, коллаген, олигомерный матрикс белка хряща (COMP), протеогликаны, эластин), вазоактивный кишечный пептид (VIP), кластер дифференцировки 39 (CD39) и кластер дифференцировки 73 (CD73), супероксиддисмутаза (SOD) и их комбинации.

Специалистам в данной области техники известны системы редактирования функционального генома для использования во всех вариантах осуществления изобретения, и они включают: эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN, Gaj et al. (2013) Trends Biotechnol. 31(7):397-405), нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN, Gaj et al. (2013) *выше*), мегануклеазы, такие как I-SceI (Arnould et al. (2007) J Mol Biol 371(1):49-65; Takeuchi et al. (2011) PNAS USA 108(32):13077-13082), PHK-управляемые эндонуклеазные системы, такие как CRISPR/Cas (Mali et al. (2013) Nat methods 10(10):957-963; Mali et al. (2013) Nat Biotechnol 31(9):833-838; Cong et al. (2013) Science 339(6121):819-823) и CRISPR/Cpf1 (Zetsche et al. (2015) Cell 163(3):759-771), триплексообразующие молекулы, синтетические полиамиды и сконструированные белки «цинковые пальцы» (Uil et al. (2003) Nucleic Acids Res 31 (21): 6064-6078). Системы редактирования функционального генома используют нуклеазы, которые создают сайт-специфические двухцепочечные разрывы в желаемых местах в геноме. Индуцированные двухцепочечные разрывы восстанавливаются посредством негомологичного присоединения конца или гомологичной рекомбинации. В результате получаются целевые мутации. Выгодно заменять дефектный ген (вызывающий заболевание или расстройство) нормальным аллелем в его естественном местоположении любым из этих способов, поскольку не требуется, чтобы полные кодирующие последовательности и регуляторные последовательности включались в вирион гAAV, когда только небольшая часть гена должна быть изменена. Также считается, что экспрессия частично замещенного гена более соответствует нормальной клеточной биологии, чем полные гены, которые несут вирионы. Предпочтительной системой редактирования генов является CRISPR (включая CRISPR/Cpf1 и CRISPR-Cas),

потому что она быстрее и дешевле, чем другие методы. Основным преимуществом также является то, что CRISPR может быть легко перенастроен для нацеливания на различные последовательности ДНК с использованием одиночных гидовых РНК CRISPR. Таким образом, альтернативно или в сочетании с другим вариантом осуществления в другом предпочтительном варианте осуществления данного изобретения геном гAAV содержит по меньшей мере один из: (i) полинуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую по меньшей мере одну гидовую РНК (гРНК); при этом гидовая РНК является по существу комплементарной – предпочтительно комплементарной – последовательности-мишени (полинуклеотидам) в геноме; и (ii) полинуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую нуклеазу; при этом нуклеаза образует рибонуклеазный комплекс с гидовой РНК, и при этом рибонуклеазный комплекс вызывает сайт-специфические двухцепочечные разрывы ДНК в геноме.

Во втором аспекте в данном изобретении предложены композиции гAAV для применения при лечении, профилактике или подавлении симптомов, связанных с артритом, при этом композиция гAAV содержит вирион гAAV по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или эксципиент, предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель. Такой фармацевтически приемлемый носитель, разбавители, солюбилизатор, наполнитель, консервант и / или эксципиент, например, можно найти в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Любой подходящий фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, солюбилизатор, наполнитель, консервант и / или эксципиент может быть использован в данных композициях (см. *например*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997). Предпочтительные фармацевтические формы должны быть в комбинации со стерильным физиологическим раствором, раствором декстрозы или забуференным раствором или другими фармацевтически приемлемыми стерильными жидкостями. В качестве альтернативы может быть использован твердый носитель, такой как, например, шарики микроносителя.

Фармацевтические композиции обычно являются стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Фармацевтические

композиции могут быть составлены в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для приспособления к высокой концентрации лекарственного средства. Носителем может быть растворитель или дисперсная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Продленное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина. Парвовирусный вирион можно вводить в виде болюса или в виде препарата с контролируемым высвобождением, например, в композиции, которая содержит полимер с замедленным высвобождением или другие носители, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Например, могут быть использованы биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиэфиры, полимолочная кислота и полимолочные, полигликолевые сополимеры (PLG). Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «эксципиент» предпочтительно включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для предусмотренного для немедленного приема приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какой-либо обычный носитель или агент несовместим с активным соединением,

предполагается его применение в фармацевтических композициях по изобретению.

Может быть выгодным изготовление парентеральных композиций в единичной дозированной форме для удобства введения и единообразия дозировки. Используемая здесь единичная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм по изобретению может быть продиктована уникальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, который должен быть достигнут, а также ограничениями, присущими уровню техники приготовления такого активного соединения для лечения состояния у индивидов.

В фармацевтические композиции по изобретению также могут быть включены дополнительные активные соединения. Руководство по совместному применению дополнительных лекарственных средств можно найти, например, в Компендиуме фармацевтических и специальных препаратов (CPS) Канадской ассоциации фармацевтов.

В одном варианте осуществления композиция гAAV дополнительно содержит пустые частицы (то есть частицы только с капсидом, таким образом, не содержащие геном гAAV). Следовательно, альтернативно или в сочетании с другим вариантом осуществления в дополнительном варианте осуществления данного изобретения композиция гAAV по изобретению дополнительно содержит пустой капсид при соотношении пустого капсида к вириону гAAV, равному по меньшей мере 1:1, более предпочтительно при по меньшей мере 5:1, еще более предпочтительно по меньшей мере 10:1. Композиция гAAV может содержать вирион гAAV, как определено выше, и пустой капсид, такой как, например, определенный в WO 2016/055437, который включен в данный документ посредством ссылки, и как описано в Aalbers et al. (2017) Hum. Gene Ther. 28(2):168-178. Пустой капсид может быть того же серотипа или другого серотипа по сравнению с композицией трансгенного вектора гAAV по изобретению. Предпочтительно пустой капсид имеет тот же серотип, что и вирион гAAV. В такой композиции гAAV пустой капсид и капсид вириона гAAV

могут содержать модифицированный капсидный белок по изобретению, предпочтительно тот же тип модифицированных капсидных белков. Однако также включена композиция гAAV, в которой пустые капсиды имеют другой серотип или представляют собой по-разному модифицированные капсидные белки по сравнению с модифицированными капсидными белками вириона гAAV. Также охватывается композиция гAAV, в которой пустые капсиды имеют смесь серотипов, такую как, без ограничения, смесь капсидов AAV2 и AAV5. Авторы изобретения сообщают об усилении эффекта экспрессии трансгена в суставах после внутрисуставного введения вирионов гAAV, смешанных со значительным количеством пустых капсидов. Предпочтительно вирион гAAV и пустой капсид присутствуют внутри композиции при соотношении пустого капсида к вириону гAAV, равном по меньшей мере 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 50:1, 100:1 или 1000:1, предпочтительно, равном по меньшей мере 5:1 (то есть, количество пустых капсидов, которое по меньшей мере в 5 раз превышает количество трансгенных векторов гAAV). Предпочтительно указанная композиция содержит вирион гAAV и пустой капсид в соотношении пустой капсид к гAAV-трансгенному вектору не более 10000:1, 5000:1, 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1 или 5:1, предпочтительно не более 1000:1. Предпочтительно указанная композиция содержит вирион гAAV и пустые капсиды в соотношении пустой капсид-вирион гAAV, равном от 1:1 до 100:1, от 2:1 до 100:1, от 5:1 до 100:1, от 1:1 до 20:1, от 2:1 до 20:1 или предпочтительно от 5:1 до 20:1.

Выше в данном документе предложен вариант осуществления, в котором вирион гAAV и пустые капсиды присутствуют в одной композиции. В данном изобретение также включен альтернативный вариант осуществления, в котором вирион гAAV и пустые капсиды присутствуют (по меньшей мере, в двух или более) отдельных разделенных композициях. В этом альтернативном варианте осуществления вирион гAAV и пустые капсиды могут вводиться отдельно по времени (например, последовательно) и/или локализации, где под локализацией следует понимать место введения. Кроме того, вирион гAAV и пустые капсиды могут вводиться одновременно, например, по существу в одно и то же время, необязательно в отдельном месте.

В третьем аспекте в данном изобретении предложены композиции гAAV и иммунодепрессант для применения при лечении или профилактике артрита или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с артритом, при этом композиция гAAV является такой, как определено выше, и при этом лечение или профилактика включает введение композиции гAAV и введение иммунодепрессанта индивидууму. В WO 2016/055437, включенной в данное описание в качестве ссылки, раскрыто усиливающееся влияние иммунодепрессанта на экспрессию трансгена AAV, когда субъекты получали лечение как иммунодепрессантами, так и вирионами гAAV. Кроме того, в WO 2016/055437 раскрывается удивительный синергетический эффект иммунодепрессанта вместе с пустыми векторами в отношении экспрессию трансгена гAAV. В одном варианте осуществления иммунодепрессант применяют отдельно от композиции гAAV, что означает отдельное значение по месту и/или времени. В таком варианте осуществления иммунодепрессант и композиция гAAV могут присутствовать в отдельных и разных композициях. Иммунодепрессант, вирион гAAV и, необязательно, пустые векторы могут даже присутствовать в каждой отдельной композиции. В другом варианте осуществления иммунодепрессант и композиция гAAV могут присутствовать в одной композиции. В следующем варианте осуществления вирион гAAV и иммунодепрессант присутствуют в одной композиции, и предпочтительно эту композицию используют для лечения вместе с отдельной композицией, содержащей пустой капсид. В еще одном варианте осуществления иммунодепрессант и пустой капсид присутствуют в одной композиции, и предпочтительно эту композицию используют для лечения вместе с отдельной композицией, содержащей вирион гAAV. Следовательно, в данном изобретении также предложена композиция, содержащая пустой капсид и иммунодепрессант, как определено в данном документе, для композиции, содержащей вирион гAAV и иммунодепрессант, как определено в данном документе, и для композиции, содержащей композицию гAAV и иммунодепрессант, как определено в данном документе.

Предпочтительно иммунодепрессант для применения в данном изобретении представляет собой ингибитор врожденных иммунных клеток, предпочтительно ингибитор макрофагов. Врожденная иммунная клетка определяется в данном документе как клетка нейтрофила, макрофага,

моноцита, эозинофила, базофила или дендритная клетка, которая потенциально может участвовать в воспалительной реакции на чужеродное вещество. Ингибитор врожденных иммунных клеток в данном описании определяется как агент, который приводит к снижению активности врожденных иммунных клеток и/или количества врожденных иммунных клеток. Ингибитор макрофагов определяется в данном документе как агент, который приводит к снижению активности макрофагов и/или количества макрофагов. «Макрофаг» в данном документе понимается как врожденная иммунная клетка, которая поглощает и переваривает клеточный дебрис, чужеродные вещества, микробы и раковые клетки в процессе, называемом фагоцитозом. Предпочтительно ингибитор врожденных иммунных клеток или макрофагов по изобретению приводит к уменьшению по меньшей мере на 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 % или предпочтительно 100 % количества или активности врожденных иммунных клеток или макрофагов по сравнению с исходным количеством или активностью врожденных иммунных клеток или макрофагов до лечения. Активность и/или количество врожденных иммунных клеток или макрофагов можно обнаружить с помощью любого подходящего анализа, известного специалисту в данной области техники, такого как, без ограничения, МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)2,5-дифенил тетразолия бромид) колориметрический анализ для определения цитотоксической активности макрофагов *in vitro* как описано в Ferrari et al. (Journal of Immunological Methods, 131 (1990) 165-172), путем измерения уровня цитокинов (например, CCL2, TNF), путем гистологических и гистохимических методов обнаружения, например, с помощью мечения CD68 или путем детекции магнитно-резонансной томографии *in vivo* (MRI) суперпарамагнитного оксида железа (SPIO) поглощения макрофагами, предпочтительно после внутривенного введения SPIO, согласно обзору Yi-Xiang J. Wang (Quant. Imaging Med Surg (2011)1:35-40). Обнаружение может быть *in vitro* или *in vivo*. Предпочтительно, определение *in vivo* осуществляют на модели животного, предпочтительно на модели крысы или мыши.

Предпочтительно иммунодепрессант представляет собой глюкокортикоид и / или бисфосфонат, предпочтительно липосомальный бисфосфонат. Конкретными неограничивающими примерами глюкокортикоидов являются кортизол, кортизон, преднизон, преднизолон, метилпреднизолон,

дексаметазон, бетаметазон, триамцинолон, беклометазон, ацетат флудрокортизона, ацетат дезоксикортикостерона и альдостерон. Предпочтительно иммунодепрессант представляет собой триамцинолон. Конкретными неограничивающими примерами бисфосфонатов являются этидронат, клодронат, тилудронат, памидронат, неридронат, оладронат, алендронат, ибандронат, ризедронат и золедронат. Предпочтительно бисфосфонат представляет собой инкапсулированный в липосомы бисфосфонат или липосомальный бисфосфонат, предпочтительно липосомальный клодронат. Предпочтительно глюкокортикоид не является дексаметазоном. Следует понимать, что ингибитор воспаления или макрофагов по изобретению не ограничивается глюкокортикоидами и / или бисфосфонатом. Например, ингибитор воспаления или макрофагов по изобретению также может представлять собой воспалительное или разрушающее макрофаги антитело, такое как антитело против F4/80. Предпочтительно, такое антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. Другими релевантными иммунодепрессантами для применения в данном изобретении являются цитостатические препараты (например, алкилирующие агенты и/или антиметаболиты, такие как метотрексат), препараты, которые модифицируют пуринергический сигнальный путь (например, метотрексат, аналоги аденозина, антагонисты или агонисты аденозиновых рецепторов), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВС, например, ибупрофен, диклофенак, мелоксикам, напроксен, ацетилсалициловая кислота), биологические препараты, такие как блокаторы TNF (например, инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, цертолизумаб, голимумаб), блокаторы IL-6 (например, тоцилизумаб), блокаторы IL-2 (например, базиликсимаб, даклизумаб), блокаторы IL-1 β (например, анакинра, рилонацепт, канакинумаб) IL-17 (секукинумаб, бродалумаб, икекинумаб), анти-IL-12/IL-23 (устекинумаб), PDE4-ингибитор (апремилласт) муромонаб, абатацепт и/или ритуксимаб, и / или другие соединения, такие как гидроксихлорохин, хлорохин, лефлуномид, сульфасалазин, азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, тетрахлорозолотокислый натрий, ингибиторы mTOR (например, рапамицин/сиролимус, зверолимус) и пеницилламин.

Предпочтительно, композиция gAAV и/или композиция, содержащая пустые капсиды, и/или композиция, содержащая иммунодепрессант,

дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавители, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или эксципиент, как определено в другом месте данного документа.

Предпочтительно генная терапия в соответствии с данным изобретением дополнительно включает введение иммунодепрессанта, как определено в данном документе, либо присутствующего в композиции гAAV, либо включенного в отдельную, отличную композицию, то есть отдельную и отличную от композиции гAAV. При введении композиция гAAV и/или пустые капсиды и/или иммунодепрессант по изобретению доставляются индивиду, клетке, ткани или органу указанного индивида, предпочтительно индивиду, страдающему от состояния или заболевания, как определено в данном документе. Предпочтительно композицию гAAV и иммунодепрессант вводят одновременно. Под одновременным введением в данном документе следует понимать введение более или менее в одно и то же время, предпочтительно не более чем через 15 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 12 часов или 24 часа, предпочтительно разделенное не более чем 15 минутами. В другом варианте осуществления композицию гAAV и иммунодепрессант вводят последовательно, причем предпочтительно иммунодепрессант вводят перед композицией гAAV. Предпочтительно иммунодепрессант вводят по меньшей мере за 1 час, 3 часа, 12 часов, 24 часа, 2 суток, 4 суток или 1 неделю до введения композиции гAAV. В случае, когда вирионы гAAV и пустые капсиды присутствуют в отдельных композициях, иммунодепрессант можно вводить одновременно или в течение, по меньшей мере, 15 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 1 суток, 2 суток или 1 недели до пустой капсиды, и пустые капсиды, в свою очередь, вводят одновременно или в течение, по меньшей мере, 15 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 1 суток, 2 суток или 3 суток до приема вириона гAAV.

В вариантах осуществления, определенных в данном документе, иммунодепрессант можно вводить повторно, то есть до и/или одновременно с композицией гAAV. Как указано выше, предпочтительно, чтобы композиция гAAV содержала значительное количество пустых капсидов. Кроме того, изобретение охватывает введение как трансгенных векторов гAAV, так и пустых капсидов в отдельных, раздельных композициях, которые можно вводить одновременно или последовательно в способе или применении изобретения.

Если они включены в отдельные композиции, то трансгенные векторы gAAV и пустые капсиды предпочтительно вводить одновременно. В следующем варианте осуществления пустые капсиды вводят не более чем за 3 суток, 2 суток, 1 суток, 24 часа, 12 часов, 3 часа, 2 часа, 1 час, 30 минут, 15 минут или 5 минут, предпочтительно, не более чем за 24 часа до введения трансгенного вектора gAAV. Кроме того, если они включены в отдельные композиции, трансгенные векторы gAAV и пустые капсиды предпочтительно вводят в одно и то же место.

Доза иммунодепрессанта зависит от типа иммунодепрессанта. Эффективные дозировки известны специалисту в данной области техники. Предпочтительная терапевтически эффективная дозировка триамцинолона указана выше. Предпочтительной терапевтически эффективной дозой липосомального клодроната предпочтительно является терапевтически эффективная доза, известная специалисту в данной области техники, например, предпочтительно 80-320 мг/доза внутрисуставно, более предпочтительно 160 мг/доза внутрисуставно (Barrera et al. 2000, Arthritis & Rheumatism Vol 43(9), p1951-1959).

Как правило, заболевание суставов называется артропатией, а при воспалении одного или более суставов расстройство называется артритом. Большинство заболеваний суставов связано с артритом, однако повреждение суставов, вызванное внешней физической травмой, обычно не называется артритом. Используемый в данном документе термин «артритное заболевание», также называемый «артрит», определяется в данном документе как форма расстройства сустава, которая включает воспаление одного или более суставов. В настоящее время, по оценкам, существует более ста различных форм артрита. Под артритом в данном описании понимают «боль в суставах» или «заболевание суставов». В предпочтительном варианте осуществления артритное заболевание выбирают из группы, состоящей из болезни Стилла у взрослых, анкилозирующего спондилоартрита, артрита, боли в спине, болезни Бехчета, тупой травмы, бурсита, болезни отложения пирофосфата кальция (CPPD), синдрома запястного канала, хондромалиции надколенника, синдрома хронической усталости, рефлекторной симпатической дистрофии, связанных с криопирином периодических синдромов (CAPS), дегенеративного заболевания диска, дисплазии тазобедренного сустава,

болезни Элерса-Данлоса, семейной средиземноморской лихорадки, фибромиалгии, инфекционной эритемы, гигантоклеточного артрита, подагры, гемохроматоза, инфекционного артрита, воспалительного артрита, воспалительного заболевания кишечника, эндопротезирования, ювенильного артрита, ювенильного дерматомиозита (JD), ювенильного идиопатического артрита (JIA), ювенильного ревматоидного артрита, ювенильной склеродермии, болезни Кавасаки, волчанки, волчанки у детей и подростков, болезни Лайма, смешанной болезни соединительной ткани, миозита (вкл. полимиозит, дерматомиозит), остеоартрита (OA), остеопороза, болезнь Педжета, палиндромного ревматизма, надколенно-бедренный болевой синдром, детского ревматического заболевания, педиатрической системной красной волчанки (SLE), ревматической полимиалгии, псевдоподагры, псориатического артрита, феномена Рейно, реактивного артрита, рефлекторной симпатической дистрофии, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, ревматизма, ревматоидного артрита, склеродермии, септического артрита, болезни Шегрена, стеноза позвоночного канала, спондилоартрита, болезни Стилла, системного ювенильного идиопатического артрита, системной красной волчанки, системной красной волчанки у детей и подростков, системного склероза, височного артериита, тендинита, васкулита и гранулематоза Вегенера. В следующем предпочтительном варианте осуществления артритное заболевание выбирают из группы, состоящей из ревматоидного артрита (RA), ювенильного ревматоидного артрита, остеоартроза (OA), подагры, псевдоподагры, спондилоартрита (SpA), псориатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, септического артрита, артрита, ювенильного идиопатического артрита, тупой травмы, эндопротезирования и болезни Стилла. В более предпочтительном варианте осуществления артритное заболевание представляет собой заболевание суставов, которое включает воспаление одного или более суставов. Предпочтительно, артритное заболевание выбирают из группы, состоящей из ревматоидного артрита (RA), ювенильного ревматоидного артрита, остеоартрита (OA), подагры, псевдоподагры, спондилоартрита (SpA), псориатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, септического артрита, артрита, ювенильного идиопатического артрита и болезни Стилла.

Альтернативно или в сочетании с другим вариантом осуществления, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, вирион гAAV или композицию гAAV вводят системно и/или местно. Композицию гAAV и/или пустые капсиды и/или иммунодепрессант по изобретению можно вводить прямо или косвенно с использованием подходящих средств, известных в данной области техники. Способы и применения изобретения включают доставку и введение композиции гAAV и/или пустого вектора и/или иммунодепрессанта системно, регионально или местно или любым путем, например, путем инъекции, инфузии, перорально (например, путем проглатывания или вдыхания) или местно (например, трансдермального). Иллюстративные пути введения и доставки включают внутривенное (в/в), внутрисуставное, внутрибрюшинное (в/б), внутриартериальное, внутримышечное, парентеральное, подкожное, внутриплевральное, местное, кожное, внутрикожное, трансдермальное, парентеральное, например, трансмукозальное, внутричерепное, интраспинальное, оральное (алиментарное), мукозальное, респираторное, интраназальное, посредством интубации, внутрилегочное, посредством внутрилегочной инстилляцией, буккальное, подъязычное, внутрисосудистое, интратекальное, внутриполостное, ионтофоретическое, внутриглазное, офтальмическое, глазное, внутрижелезистое, внутриорганное, внутрилимфатическое. Ожидается усовершенствование средств обеспечения индивидуума или клетки, ткани, органа указанного индивида композицией гAAV и/или пустыми капсидами и/или иммунодепрессантом по изобретению, с учетом прогресса, который уже достигнут к настоящему времени. Для достижения упомянутого эффекта изобретения такие будущие усовершенствования, конечно, могут быть включены. При введении композиции гAAV и/или пустых капсидов, и/или иммунодепрессанта по изобретению предпочтительно, чтобы такая комбинация и/или композиция растворялась в растворе, который совместим со способом доставки. Для внутривенного, подкожного, внутримышечного, интратекального, внутрисуставного и/или внутрижелудочкового введения предпочтительно, чтобы раствор представлял собой физиологический солевой раствор. В случае, когда иммунодепрессант присутствует в композиции гAAV по изобретению, иммунодепрессант вводят в том же месте, что и композиция гAAV, то есть предпочтительно местно, как

указано выше. В варианте осуществления, где иммунодепрессант содержится в отдельной композиции, отличной от композиции гAAV, иммунодепрессант можно вводить системно, предпочтительно внутримышечно или внутривенно. Композицию гAAV также можно вводить местно, предпочтительно в участок тела, содержащий значительное количество макрофагов, как определено в данном документе, и иммунодепрессант вводят системно, предпочтительно внутримышечно или внутривенно. В данное изобретение также включен вариант осуществления, в котором иммунодепрессант и композиция гAAV, даже если они присутствуют в разных композициях, вводят в одном и том же месте, предпочтительно местно, более предпочтительно внутрисуставно. Как дополнительно указано в данном документе, введение таких отдельных композиций может осуществляться либо одновременно, либо последовательно. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения по меньшей мере одно из композиции гAAV и иммунодепрессанта вводят локально. Более предпочтительно местное введение представляет собой внутрисуставное введение. «Внутрисуставная инъекция» (также известная как «суставная инъекция» или «внутрисуставная инъекция») в данном документе определяется как инъекция или инфузия в сустав. Внутрисуставная инъекция обычно используется для введения противовоспалительного средства в сустав, пораженный воспалением.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложена композиция гAAV, содержащая вирион гAAV по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или эксципиент, предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель, как определено в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления композиция дополнительно содержит пустые капсиды, как определено в данном документе, и/или иммунодепрессант, как определено в данном документе.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложен способ лечения, профилактики или подавления симптомов, связанных с артритом, включающий стадию внутрисуставного введения лекарственного средства, содержащего эффективное количество вириона гAAV как определено в любом из пп. 1-8 формулы изобретения или композиции гAAV, как определено выше.

«Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество нуклеиновой кислоты, конструкции нуклеиновой кислоты, вириона гAAV или фармацевтической композиции может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса субъекта, которого лечат, и способности нуклеиновой кислоты, конструкции нуклеиновой кислоты, вириона гAAV или фармацевтической композиции вызвать желаемый ответ у субъекта. Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Терапевтически эффективное количество также обычно является таким, в котором любые токсические или вредные эффекты нуклеиновой кислоты, конструкции нуклеиновой кислоты, вириона гAAV или фармацевтической композиции перевешиваются терапевтически полезными эффектами. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата, такого как профилактика или ингибирование различных состояний. Профилактическая доза может использоваться у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, и в некоторых случаях профилактически эффективное количество может быть больше или меньше терапевтически эффективного количества. Вводимая дозировка может зависеть в значительной степени от состояния и размера субъекта, которого лечат, а также от терапевтической композиции, частоты лечения и пути введения. Режимы продолжения терапии, включая дозу, состав и частоту, могут основываться на первоначальном ответе и клинической оценке.

Термины «субъект» или «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к животному, включая человеческий вид, которое поддается лечению композициями и/или гAAV по данному изобретению. Соответственно, термин «субъект» или «пациент» включает, без ограничения, человека, примата, не являющегося человеком, такого как шимпанзе и другие виды обезьян и человекоподобных обезьян, или любого млекопитающего, такого как собака, кошка, лошадь, овца, свинья, корова и т.д. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения субъект,

которого лечат rAAV согласно данному изобретению, представляет собой млекопитающее, более предпочтительно человека, собаку, кошку или лошадь, наиболее предпочтительно человека.

В данном документе и в его формуле изобретения глагол «содержать» и его производные используются в их неограничительном смысле для обозначения того, что элементы, следующие за словом, включены, но элементы, конкретно не упомянутые, не исключены. Кроме того, отсылка к «элементу», указанному в единственном числе, не исключает возможности присутствия более одного элемента, если из контекста четко не следует наличие одного и только одного элемента. Таким образом, существительное в единственном числе обычно означает «по меньшей мере один».

Слово «приблизительно» или «около» при использовании в сочетании с числовым значением (приблизительно 10, около 10) предпочтительно означает, что значением может быть заданное значение, равное 10 или более или менее 10 % от значения.

Все ссылки на патенты и литературу, цитируемые в данном описании, полностью включены в данное описание посредством ссылки.

Следующие примеры являются исключительно иллюстративными и никоим образом не подразумевают ограничения объема данного изобретения.

Описание фигур

Данное изобретение будет обсуждаться более подробно ниже со ссылкой на приложенные графические материалы:

Фиг. 1: Скрининг капсидных серотипов на клетках HEK293T и FLS. Неочищенный лизат, содержащий 7 мутантных капсидных серотипов (плюс AAV5), экспрессирующих желтый флуоресцентный белок (YFP), использовали для трансдукции клеток HEK293T или 3 различных клеточных линий FLS (каждая от разного пациента с РА). Через 72 часа (HEK293T) или 6 суток (FLS) клетки анализировали на процент клеток, экспрессирующих YFP, с помощью проточной цитометрии. На панели А показан % клеток HEK 293T, экспрессирующих YFP; на панели В показан % клеток, экспрессирующих YFP в 3 разных клеточных линиях FLS; на панели С показана средняя интенсивность флуоресценции (MFI) в клетках HEK293T; на панели D показана MFI в 3 различных клеточных линиях FLS (все клетки); на панели Е показана MFI в 3

различных клеточных линиях FLS (только положительная популяция). Условные обозначения образца представлены в Таблице 2.

Фигура 2: Капсидные мутанты демонстрируют повышенную экспрессию люциферазы по сравнению с wt-AAV5 в клетках FLS. Очищенный AAV (4 мутантных серотипа или AAV5), экспрессирующих слитый белок YFP-Luc, использовали для трансдукции трех разных клеточных линий FLS от разных пациентов с PA:BB5498 (FLS 1), BB5540 (FLS 2) и BB7144 (FLS 3) с использованием двух MOI (20000 или 100000 частиц gAAV на клетку). Через 4 суток клетки лизировали и измеряли экспрессию люциферазы. Данные представлены в виде абсолютных уровней экспрессии люциферазы (RLU; белые столбцы) или кратного увеличения по сравнению с AAV5 (черные столбцы). На панели A представлен FLS 1 при MOI 20000; на панели B представлен FLS 1 при MOI 100000; на панели C представлен FLS 2 при MOI 20000; на панели D представлен FLS 2 при MOI 100000; на панели E представлен FLS 3 при MOI 20000; и на панели F представлен FLS 3 при MOI 100000. Незакрашенные столбцы представляют люциферазу (RLU), а закрашенные столбцы представляют «кратное увеличение» по сравнению с AAV5. В другом эксперименте три дополнительные линии клеток FLS от пациентов с PA были трансдуцированы AAV (7 мутантных серотипов или AAV5), экспрессирующими люциферазу: BB4308 (FLS 4), BX 1592 (FLS 5), BB4426 (FLS 6) с использованием 2 MOI (10000 или 100000 частиц RAAV на клетку). На панели G представлен FLS 4 при MOI 10000; на панели H представлен FLS 4 при MOI 100000; на панели I представлен FLS 5 при MOI 10000; на панели J представлен FLS 5 при MOI 100000; на панели K представлен FLS 6 при MOI 10000; и на панели L представлен FLS 3 при MOI 100000.

Эффективность трансдукции 7 мутантных серотипов или AAV5 (MOI 100000) также оценивали в клетках HEK293T (Панель M). Незакрашенные столбцы представляют экспрессию люциферазы (RLU), а закрашенные столбцы представляют «кратное увеличение» по сравнению с AAV5.

Фиг 3A: Капсидные мутанты демонстрируют повышенную экспрессию генов *in vivo*. Два капсидных мутанта (AAV9-A2 и AAV7-A6) сравнивали с wtAAV5 с использованием модели синовиума с воздушным мешком. Экспрессирующий люциферазу вектор вводили на 0 сутки после образования воздушного мешка, а экспрессию люциферазы измеряли с помощью

визуализации живых животных (IVIS) на 3 сутки после трансдукции. Показанные данные представляют собой люминесценцию (фотон/секунда/квадратный сантиметр/стерадиан) в воздушном мешке как среднее + SEM.

Фиг. 3B: во втором эксперименте 5 отобранных капсидных мутантов (AAV1-P4, AAV7-A6, AAV9-A2, AAVrh10-A2, AAVrh10-A6) и wtAAV5 были инъецированы в коленные суставы мышей. Вектор, экспрессирующий люциферазу, вводили на 0 сутки, и экспрессию измеряли с помощью визуализации в реальном времени (IVIS) в указанные моменты времени после введения. Показанные данные представляют собой люминесценцию (фотон/секунда/квадратный сантиметр/стерадиан) (левая панель) как среднее+SEM. **P<0,05, ***P<0,01, ****P<0,00001 против wtAAV5 на 14 сутки. Фиг. 3C: кратность увеличения по сравнению с wtAAV5.

Фиг. 4: выравнивание формата CLUSTAL с помощью MAFFTFFT-NS-I (v7.215). Ниже выравнивания находится ключ, обозначающий консервативный остаток (*) и неконсервативную мутацию ().

Фиг. 5: выравнивание CLUSTAL нескольких последовательностей при помощи MUSCLE (3.8). Ниже выравнивания находится ключ, обозначающий консервативный остаток (*); консервативную мутацию (:); полуконсервативную мутацию (.) и неконсервативную мутацию ().

Фиг. 6: выравнивание формата CLUSTAL вставок P4, A2, A6, P2 и QR-P2 (SEQ ID NO: 8 - 12) с помощью MAFFT FFT-NS-I (v7.215). Ниже выравнивания находится ключ, обозначающий консервативный остаток (*) и неконсервативную мутацию ().

Фиг. 7: выравнивание CLUSTAL нескольких последовательностей вставок P4, A2, A6, P2 и QR-P2 (SEQ ID NO: 8-12) с помощью MUSCLE (3.8). Ниже выравнивания находится ключ, обозначающий консервативный остаток (*) и неконсервативную мутацию ().

Перечень последовательностей

В таблице 1 приведено объяснение ссылок на последовательности в корреляции с номерами SEQ ID.

Таблица 1: Объяснение ссылок на последовательности

SEQ ID NO:	серотип	Модифицированный капсид/вставка/дикий
------------	---------	---------------------------------------

		тип
1	AAV1	Модифицированный капсид
2	AAV2	Модифицированный капсид
3	AAV7	Модифицированный капсид
4	AAV9	Модифицированный капсид
5	AAVrh10	Модифицированный капсид
6	AAVrh10	Модифицированный капсид
7	AAV DJ-QR	Модифицированный капсид
8	Вставка A2	Вставка
9	Вставка A6	Вставка
10	Вставка P2	Вставка
11	Вставка P4	Вставка
12	Вставка QR-P2	Вставка
13	AAV1	Капсид дикого типа
14	AAV2	Капсид дикого типа
15	AAV7	Капсид дикого типа
16	AAV9	Капсид дикого типа
17	AAVrh10	Капсид дикого типа
18	AAV DJ-QR	Синтетический капсид
19	AAV5	Капсид дикого типа

Примеры

Пример 1

Начальный скрининг капсидной библиотеки

1.1. Материалы и методы

96-луночные планшеты, неравномерно покрытые (и впоследствии высушенные) с помощью неочищенного лизата, содержащего AAV из 91 различных капсидных серотипов AAV, были получены от Dirk Grimm и Kathleen Börner из

Гейдельбергского университета. Каждый вектор кодировал трансген YFP, управляемый промотором CMV. Поскольку FLS являются первичными клетками-мишенями в суставе, библиотека капсидных мутантов AAV была подвергнута скринингу на наличие серотипов, которые демонстрируют повышенную экспрессию в FLS человека, выделенных из суставов пациентов с ревматоидным артритом (RA-FLS) (как описано в van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427). RA-FLS были высеяны (2500/лунка, 37 °C / 5 % CO₂) непосредственно в неравномерно покрытые планшеты (DMEM-GlutaMAX-I (Gibco, кат.31966-021), 10 % FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка «Gold», Gibco, кат. A15-151), 10 mM HEPES (Gibco, кат. 15630-056), 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, кат. 15710-049), 100 ед/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, кат. P0781) и все лунки были визуализированы в отношении экспрессии YFP с помощью флуоресцентной микроскопии через 6 суток.

1.2. Результаты

Эффективность трансдукции капсидных мутантов против WT-AAV5 (дикий тип) в FLS от пациентов с РА.

При скрининге 91 капсидного мутанта, хотя общие уровни экспрессии были низкими, авторы данного изобретения идентифицировали 7 различных серотипов, которые показали более высокую экспрессию, чем wtAAV5: AAV9-A2, AAV7-A6, AAV1-P4, AAVDJ-QR-P2, AAVrh10-A6, AAVrh10-A2 и AAV2-P2 (аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 – 7; wtAAV5 SEQ ID NO: 19).

Неочищенные лизаты всех 7 векторов были использованы в анализе трансдукции *in vitro* в 3 разных клеточных линиях FLS пациента и в клетках HEK293T (пример 2).

Таблица 2: Условные обозначения образцов для фиг. 1

Образец	Серотип капсида	Вставленная/модифицированная последовательность	Вставка	Положение в VP1	SEQ ID NO:
5	5	отсутствует	отсутствует	-	19

			ет		
61	AAV1	GQSGNDVRSANAQAA	P4	588 – 602	1
33	AAV9	GQRGNYSRGVDAQAA	A2	586 – 600	4
34	AAVrh10	GQRGNYSRGVDAQAA	A2	588 – 602	6
50	AAV2	QGQSGCDCRGDCFCA (QAA)	P2	585 – 599	2
88	AAV-DJ-QR	QGQRGCDCRGDCFCA(QAA)	QR-P2	587 – 601	7
43	AAV7	GQRGNEARVREAQAA	A6	587 – 601	3
46	AAVrh10	GQRGNEARVREAQAA	A6	588 – 602	5

Пример 2

Экспрессия неочищенных лизатов 7 отобранных мутантов

2.1. Материалы и методы

Получение AAV

Подробную информацию о получении неочищенных лизатов AAV можно найти в Grosse et al. (J. Virol, 2017, doi: 10.1128/JVI.01198-17).

Аликвоты неочищенного лизата для каждого из 7 выбранных капсидных мутантов (плюс wtAAV5 в качестве контроля) использовали для трансдукции клеток (HEK293T или 3 различных клеточных линии FLS, выделенных от пациентов с РА), а экспрессию YFP измеряли с помощью проточной цитометрии 3 (HEK293T) - 5 суток (FLS) после трансдукции. Подробно, HEK293T высевали в 96-луночный планшет (Greiner Bio-One, кат. 655180) в количестве 45000 клеток на лунку. RA-FLS высевали в 96-луночный планшет в количестве 2500 клеток на лунку. После инкубации в течение ночи клеточные супернатанты заменяли на 40 мкл DMEM-glutaMAX-I (Gibco 31966-021), содержащего 0,001 % -ный раствор плуроника F68 (Sigma P5556). Вирусные лизаты добавляли *in duplo*, 10 мкл на лунку. Через 4 часа доксорубин (конечная концентрация 0,4 мкМ) (Sigma D1515) в DMEM-glutaMAX-I, содержащий FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка «Gold», Gibco, кат. A15-151), конечная концентрация 1 %), добавляли в лунки (50 мкл на лунку). На следующие сутки среду FLS удаляли и добавляли DMEM-glutaMAX-I (10 % FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка «Gold», Gibco, кат. A15-151), 10 мМ HEPES (Gibco, кат. 15630), 50 мкг/мл гентамицина (Gibco

кат. 15710-049), 100 ед/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, кат. P0781)) (200 мкл на лунку). Среду клеток HEK293T не меняли. Через трое (клетки HEK293T) или через 6 суток (FLS) после трансдукции клетки трипсинизировали с использованием 0,5 % трипсина/ЭДТА (Gibco кат. 15400-054) в PBS (Gibco, кат. 10010) и анализировали на экспрессию YFP с помощью проточной цитометрии FLOW.(FACSCanto II, BD Biosciences). Был определен как процент экспрессирующих клеток, так и средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для всех клеток.

2.2. Результаты

Неочищенные лизаты всех 7 векторов были использованы в анализе трансдукции *in vitro* в 3 разных клеточных линиях FLS пациента и в клетках HEK293T. Клетки анализировали на процент клеток, экспрессирующих YFP, с помощью флуоресцентной микроскопии (данные не показаны) или проточной цитометрии (фиг. 1, панели А – Е). Хотя между типами клеток наблюдалась некоторая вариабельность, все мутантные капсиды обеспечивали более высокую экспрессию в клетках FLS и HEK293T, чем AAV5-WT (фиг. 1). В таблице 2 приведены условные обозначения для фиг. 1. На основании этих результатов четыре капсидных мутанта были отобраны для дальнейшего исследования (см. Пример 3).

Пример 3

Тестирование in vitro капсидных вариантов в HEK293T и FLS

3.1 материалы и методы

3.1.1 Были дополнительно исследованы четыре мутантных капсидных белка AAV9-A2, AAV7-A6, AAV1-P4 и AAVDJ-QR-P2. Был получен очищенный вектор (градиент йодиксанола), экспрессирующий слитый белок YFP-люцифераза (для обеспечения визуализации (YFP), а также количественного определения с помощью анализа люциферазы). Три различных первичных линии FLS, выделенных от пациентов с ревматоидным артритом (как описано в van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427), трансдуцировали каждым серотипом при 2 векторных дозах (MOI 20000 или 100000) и через 4 суток клетки собирали, а экспрессию гена определяли количественно с помощью

анализа на люциферазу (Promega Luciferase assay Kit).

Подробно, RA-FLS высевали в количестве 2500 клеток/лунка в 96-луночный планшет (Greiner Bio-One, кат. 655207) в среде (DMEM-GlutaMAX (Gibco кат. 31966-021), 10 % FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка «Gold», кат. A15-151), 10 mM HEPES (Gibco кат. 15630-056), 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, кат. 15710-049), 100 ед/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich Merck кат. P0781). Через 48 часов среду удаляли и добавляли вирус (в DMEM-Glutamax, содержащий 0,001 % Pluronic-68 (Sigma, кат. P5556)) при MOI 20000 или 100000. Через 4 часа добавляли среду, содержащую доксорубин (Sigma, кат. D1515, конечная концентрация 0,4 мкМ) и FBS (конечная концентрация 1 %).

Через 24 часа среду заменяли на DMEM-GlutaMAX (10 % FBS, 10 mM HEPES, 50 мкг/мл гентамицина, 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). Через четверо суток после трансдукции клетки промывали 1 раз 100 мкл PBS (Gibco, кат. 10010) и определяли активность люциферазы с использованием системы анализа люциферазы ONE Glo™ (Promega, кат. E6110): добавляли 100 мкл лизирующего буфера и клетки помещали на шейкер на 10 минут, 900 об/мин при комнатной температуре. Затем 20 мкл лизата переносили в белый 96-луночный планшет, 80 мкл субстрата (добавляли в течение 3 минут (темнота) и определяли активность люциферазы на люминометре (1 сек/лунка, синергия HT, Biotek).

3.1.2. В аналогичном эксперименте три дополнительные клеточные линии FLS, выделенные от пациентов с ревматоидным артритом, были трансдуцированы мутантами AAV5 и 7 капсидами из препарата AAV, отличного от описанного в 3.1.1 (AAV9-A2, AAV1-P4, AAV7-A6, AAVDJ-QR -P2, AAVrh10-A6, AAVrh10-A2, AAV2-P2), содержащий ген люциферазы (MOI 10000 и 100000). Количество пустых частиц различалось между препаратами AAV. Чтобы исключить возможное влияние на эффективность трансдукции, была проведена коррекция пустого капсида путем добавления пустых частиц AAV5 для выравнивания процента пустых частиц на препарат.

3.1.3. 7 капсидных мутантов из того же препарата, который описан в 3.1.2, также тестировали в клетках HEK293T. Подробно, HEK293T высевали в 96-луночный планшет (Greiner Bio-One, кат. 655180) в количестве 50000 клеток на лунку. После инкубации в течение ночи клеточные супернатанты заменяли на DMEM-

glutaMAX-I (Gibco 31966-021), содержащего 0,001 % -ный раствор плюроника F68 (Sigma P5556). Добавляли различные векторы *in duplo*, при MOI, равной 100000. В этом протоколе была выполнена коррекция пустого капсида, как описано для 3.1.2. Через 4 часа доксорубин (конечная концентрация 0,4 мкМ) (Sigma D1515) в DMEM-glutaMAX-I-содержащем FBS (термически инактивированная (HI) бычья сыворотка «Gold», Gibco, кат. A15-151), конечная концентрация 1 %, добавляли в лунки. Через трое суток после трансдукции клетки собирали и количественно определяли экспрессию генов с помощью анализа люциферазы (Promega Luciferase assay Kit) на люминометре (BMG Labtech Fluostar Omega).

3.2. Результаты

3.2.1 Трансдукция *in vitro* из трех разных клеточных линий FLS проводили с использованием рекомбинантного AAV, содержащего одну из 4 мутантных капсид (а также AAV5 в качестве контроля, сделанного идентичным образом) в соответствии с протоколом, описанным в 3.1.1 Все 4 серотипа продемонстрировали повышенные уровни экспрессии по сравнению с AAV5, в диапазоне от 2-кратного до 35-кратного увеличения, в зависимости от используемого серотипа и клеточной линии (фиг. 2A-F).

3.2.2 В другой серии экспериментов эффективность трансдукции *in vitro* 7 капсидных мутантов (а также контроль AAV5, полученный идентичным образом) оценивали в 3 клеточных линиях FLS. Все 7 серотипов продемонстрировали повышенные уровни экспрессии люциферазы по сравнению с AAV5, в диапазоне от 6-кратного до 55-кратного увеличения в зависимости от используемого серотипа и клеточной линии (фиг. 2G-L)

3.2.3 Аналогичный эксперимент проводили на клетках HEK293T. Трансдукция со всеми 7 серотипами приводила к повышенной экспрессии люциферазы по сравнению с wtAAV5, в пределах от 2-кратного до 12-кратного увеличения (фиг. 2M).

Пример 4

Исследование *in vivo* в модели синовииума с воздушным мешком

4.1. Материалы и методы

Животные

Самок мышей Balb/c (в возрасте 8–10 недель и массой 20–25 г; (Harlan, Bxmeer, Нидерланды)) содержали в отдельных вентилируемых клетках в помещении для животных Академического медицинского центра в Амстердаме. Пища и вода были доступны *ad libitum*. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с руководящими принципами Комитета по этике исследований на животных Университета Амстердама.

Модель синовии с воздушным мешком (APS)

Два серотипа, AAV9-A2 и AAV7-A6, сравнивали с wtAAV5. Модель синовии с воздушным мешком была адаптирована из работы Edwards с соавт. (1981; J Pathol 134: 147-156). На 0 сутки подкожно вводили 3 мл воздуха на спине самок мышей Balb/cOlaHsd 7-9 недель (Harlan) (0 сутки). Сразу после образования воздушного мешка удаляли 1 мл воздуха и 1 мл AAV (2×10^{10} векторных геномов/мышь в PBS (Gibco, кат. 10010, содержащий 0,001 % плуроника F68 (Sigma, кат. p5556)) добавляли непосредственно в воздушный мешочек. Через три дня после трансдукции экспрессию гена измеряли с помощью визуализации животных *in vivo*.

Визуализация экспрессии люциферазы

Экспрессию люциферазы измеряли на 3 сутки. Изначально планировалось продолжать мониторинг экспрессии в течение до 3 месяцев после введения вектора, однако парвовирусная инфекция животного объекта привела к преждевременному прекращению всех продолжающихся экспериментов. Калийно-солевой субстрат D-люциферина (Caliper Life Sciences, Hopkinton, штат Массачусетс, США) вводили внутрибрюшинно (150 мг/кг массы тела, в объеме приблизительно 200 мкл). Подсчет фотонов снимали через 10 мин после введения субстрата в течение 5 мин с использованием системы камер с охлажденным прибором с зарядовой связью (ПЗС) (Photon Imager, Biospace Lab, Париж, Франция), а обработку и количественное определение и анализ интенсивности сигнала выполняли с использованием M3 Vision (Biospace Lab). Количество фотонов, испускаемых в секунду на квадратный сантиметр настерадиан, рассчитывали как меру активности люциферазы.

Общие условия содержания животных и этика

Формирование воздушного мешка, введение векторов и визуализацию *in vivo* проводили под анестезией изофлураном (3 % изофлуран и кислород). В конце экспериментов животных умерщвляли пункцией сердца под изофлурановым наркозом с последующей цервикальная дислокация. Исследования были рассмотрены и одобрены комитетом по уходу и использованию животных Амстердамского университета и проведены в строгом соответствии с рекомендациями голландского закона о защите животных (голландский язык: «Wet op Dierproeven»). Животные содержались в условиях отсутствия патогенов в помещении для животных Университета Амстердама.

4.2. Результаты

На основании этих многообещающих результатов, осуществляли предварительное исследование *in vivo* с использованием модели синовиального воздушного мешка (APS), в котором два серотипа AAV9-A2 и AAV7-A6, сравнивали с wtAAV5. Из-за неудачной инфекции в учреждении для животных, которая потребовала преждевременного прекращения этого исследования, мы смогли получить данные только в один момент времени, на 3 сутки после введения вектора. В этот момент времени стало ясно, что капсидные мутанты вызывают повышение экспрессии генов по сравнению с AAV5, причем AAV7-A6 демонстрирует ~ 6-кратное увеличение экспрессии и AAV9-A2 ~ 22-кратное (фиг. 3А).

Пример 5:

Исследование *in vivo*: внутрисуставных инъекций у здоровых животных

5.1. Материалы и методы

Животные

Самцов мышей DBA1/J (в возрасте 12 недель, Envigo) содержали в отдельных вентилируемых клетках в помещении для животных Академического медицинского центра в Амстердаме. Пища и вода были доступны *ad libitum*. Все эксперименты на животных проводились после одобрения Центральной комиссии по экспериментам на животных (CCD) и Комитетом по этике

исследований на животных Университета Амстердама, Нидерланды.

Исследование экспрессии

Пять rAAV, содержащих капсидные мутанты, то есть AAV9-A2, AAV1-P4, AAV7-A6, AAVrh10-A6 и AAVrh10-A2, сравнивали с wtAAV5. Поскольку нагрузка капсида может влиять на экспрессию (Aalbers CJ et al., Hum Gene Ther 2017;28(2):168-178), препараты rAAV были скорректированы для нагрузки капсида путем добавления пустых частиц wtAAV5. Здоровые мыши (n = 9 на группу) получали внутрисуставные инъекции вектора AAV, несущего ген люциферазы в обоих коленях ($7,5 \times 10^9$ вирусных геномов на колено). Экспрессию гена определяли посредством визуализации *in vivo* в несколько моментов времени после введения вектора.

Визуализация экспрессии люциферазы

Экспрессию люциферазы определяли в указанные моменты времени (фиг. 3B). В каждый момент времени, калийно-солевой субстрат D-люциферина (Caliper Life Sciences, Hopkinton, штат Массачусетс, США) вводили внутривенно (150 мг/кг массы тела, в объеме приблизительно 200 мкл). Подсчет фотонов снимали через 15 минут после введения субстрата в течение 5 минут, используя систему камер с охлажденным прибором с зарядовой связью (CCD) (Photon Imager, Biospace Lab, Париж, Франция). Обработку изображений, количественную оценку и анализ интенсивности сигналов проводили с использованием M3 Vision (Biospace Lab). Количество фотонов, испускаемых в секунду на квадратный сантиметр на стерадиан, рассчитывали как меру активности люциферазы.

Общие условия содержания животных и этика

Введение векторов и визуализацию *in vivo* проводили под анестезией изофлураном (4% изофлуран и кислород). Исследования проводили в строгом соответствии с рекомендациями Голландского закона о защите животных (голландский язык: «Wet op Dierproeven»). Животные содержались в условиях отсутствия патогенов в помещении для животных Университета Амстердама.

5.2. Результаты

В первый момент времени, на третьи сутки, AAV-опосредованная экспрессия в колене обнаруживается во всех группах и увеличивается во времени (фиг. 3B). Все капсидные мутанты, за исключением AAV1-P4, демонстрируют повышенную экспрессию по сравнению с wtAAV5, при этом AAV9-A2 демонстрирует самую высокую экспрессию (~ 5-кратное увеличение по сравнению с wtAAV5 на 14 сутки) (фиг. 3C). Уровни экспрессии на 14 сутки от высокого до низкого: AAV9-A2 > AAVrh10-A2 > AAVrh10-A6 > AAV7-A6 > wtAAV5 > AAV1-P4. На 7 сутки AAVrh10-A2, AAV9-A2 и AAVrh10-A6 показали значительно увеличенную экспрессию по сравнению с wtAAV5 (**P<0,05, ***P<0,01, ****P<0,00001 по сравнению с wtAAV5 на 14 сутки. (фиг. 3B).

Пример 6:

Определение титров нейтрализующих антител против капсидных мутантов в сыворотках человека

6.1 Материалы и методы

Клетки HEK293T высевали в DMEM, содержащую 9 % FBS, 0,9 % пенициллина/стрептомицина, в 96-луночные планшеты с прозрачным дном. Клетки оставляли в покое на 24 часа (при 37 °C, 5 % CO₂) до трансдукции. Образцы человеческой сыворотки (полученные из Французского института крови) разбавляли следующим образом: чистая неразбавленная сыворотка - 1:4 - 1:16 - 1:64 - 1:256 - 1:1024 (чистая сыворотка означает 1 объем вируса на 1 объем сыворотки). Образец объединенной мышинной плазмы (от 10 мышей DBA/1, взятый через 42 суток после внутрисуставной инъекции AAV5-вектора) серийно разводили в FBS следующим образом: 1:10 - 1:50 - 1:250 - 1:6250 - 1:31250. Раствор внутривенного иммуноглобулина человека (IVig, Sanquin, серия 15D30H4560A) серийно разбавляли полулогарифмически от 1:10 до 1:10000. Образцы и контроли инкубировали вместе с соответствующим капсидным мутантом или вектором wtAAV5 в течение 30 ± 5 мин. при 35-38 °C при MOI, равной 2500 (как определено ранее). Через 48 ± 2 часа добавляли люциферазный реагент и измеряли эмиссию люминесценции с помощью считывающего устройства для микропланшетов VictorX. Титры ингибирования трансдукции определяли как наибольшее разведение сыворотки, все еще

связанное с обнаруживаемой нейтрализующей активностью, то есть нейтрализующая активность > 50 %.

6.2 Результаты

Как представлено в таблице 3, 70-85 % образцов не содержали нейтрализующих антител против wtAAV5 или 7 капсидных мутантов.

Большинство образцов имели общую реактивность против семи капсидных мутантов, поэтому образец сыворотки, обладающий реактивностью против капсида AAV5 дикого типа, также реагировал против других капсидов. По уровню ответа они также были сопоставимы между капсидными мутантами. Количество образцов, которые не реагировали (НО = не обнаружено) указано для каждого капсидного мутанта. Эти данные приведены только в качестве информации, поскольку очень трудно сравнивать титры с разными векторами. Что касается объединенной пробы мышинной сыворотки из внутрисуставных инъектированных суставов, она реагировала только на капсид WT AAV5, который использовался для иммунизации животных, тогда как на мутантные капсиды ответа не наблюдалось (Таблица 3). Все капсидные мутанты и WT AAV5 были нейтрализованы IVIg (титры > 100) (данные не представлены).

Таблица 3: Для каждого образца сыворотки, а также для объединенной плазмы мыши сообщается об ингибирующем титре, который соответствует наибольшему разведению, все еще связанному с обнаруживаемой нейтрализующей активностью.

Титры > 8 считаются серопозитивными. Положительные сигналы выделены жирным шрифтом/курсивом. НО = не обнаружено

	AAV5	AAV9A2	AAV-DJ-QR-P2	AAVrh10-A2	AAV1-P4	AAV2-P2	AAV7-A6	AAVrh10-A6
образец 1	256	256	256	256	>1024	256	>1024	>1024
образец 2	4	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 3	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 4	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 5	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 6	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 7	64	64	64	256	256	64	256	256
образец 8	16	16	16	64	16	64	64	64
образец 9	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 10	4	4	16	4	64	64	64	64
образец 11	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 12	НО	НО	НО	НО	НО	1	НО	НО
образец 13	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 14	НО	1	НО	НО	4	1	НО	1
образец 15	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 16	1	1	4	4	4	16	1	1

образец 17	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 18	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО
образец 19	НО	НО	НО	НО	4	НО	НО	НО
образец 20	4	256	64	4	НО	256	16	16
% отрицательн ых образцов	85	80	75	85	80	70	75	75
плазма мыши	256	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО

Данное изобретение было описано выше со ссылкой на ряд иллюстративных вариантов осуществления, как показано на чертежах. Возможны модификации и альтернативные реализации некоторых частей или элементов, и они включены в объем защиты, определенный прилагаемой формулой изобретения.

Формула изобретения

1. Вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий модифицированный капсидный белок для применения при лечении или профилактике артрита, или при лечении или профилактике симптомов, связанных с артритом, причем модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой располагаются на поверхности капсидного белка.

2. Вирион rAAV по п. 1, в котором аминокислотная последовательность Z:

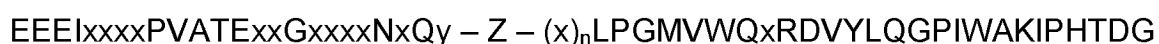
- a. содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I:



где x представляет собой один аминокислотный остаток, и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и

- b. присутствует на участке, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков с С-конца капсидного белка AAV дикого типа.

3. Вирион rAAV для применения по п. 1 или п. 2, в котором последовательность Z содержится в модифицированном капсидном белке на участке, представленном формулой II:



- a. где Z, x и y имеют значения, определенные в п. 1; и
b. где n равен 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15.

4. Вирион rAAV для применения по любому из предшествующих пунктов, в котором капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

i) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 1, и при этом аминокислоты в положениях 588 – 602 SEQ ID NO: 1 имеют, по меньшей мере, 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11,

ii) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 2, и при этом аминокислоты в положениях 585 – 599 SEQ ID NO: 2 имеют, по меньшей мере, 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10,

iii) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 3, и при этом аминокислоты в положениях 587 – 601 SEQ ID NO: 3 имеют, по меньшей мере, 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9,

iv) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 4, и при этом аминокислоты в положениях 586 – 600 SEQ ID NO: 4 имеют, по меньшей мере, 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8,

v) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 5, и при этом аминокислоты в положениях 588 – 602 SEQ ID NO: 5 имеют, по меньшей мере, 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9,

vi) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 6, и при этом аминокислоты в положениях 588 – 602 SEQ ID NO: 6 имеют, по меньшей мере, 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и

vii) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 70 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 7, и при этом аминокислоты в положениях 587 – 601 SEQ ID NO: 7 имеют, по меньшей мере, 80 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12,

при этом модифицированный капсидный белок обеспечивает, по меньшей мере, двукратное увеличение экспрессии, предпочтительно в клетках FLS человека, по сравнению с немодифицированным капсидным белком с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 – 19, при тестировании в тех же условиях, при этом предпочтительно немодифицированный капсидный белок имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или имеет тот же серотип, что и модифицированный капсидный белок.

5. Вирион gAAV для применения по любому из предшествующих пунктов, в котором капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 7.

6. Вирион gAAV для применения по любому из предшествующих пунктов, при этом вирион gAAV содержит:

- i) нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV и
- ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес генный продукт, при этом предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес генный продукт, расположена между двумя последовательностями ITR AAV.

7. Вирион gAAV для применения по п. 6, в котором представляющий интерес генный продукт лечит, предотвращает или подавляет симптомы, связанные с артритом, при этом предпочтительно представляющий интерес генный продукт выбирают из группы, состоящей из интерлейкинов, иммуномодуляторов, антител, кшРНК, микроРНК, гидовой РНК, факторов роста, протеазы, нуклеотидазы/нуклеозидазы, пептидов, ингибиторов протеаз, ингибиторов,

ферментов и их комбинации, и при этом более предпочтительно представляющий интерес генный продукт представляет собой, по меньшей мере, один из CD39, CD73 и IFN- β .

8. Вирион гAAV для применения по любому из пп. 1-7, в котором вирион гAAV содержит, по меньшей мере, один из:

- (i) полинуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую, по меньшей мере, одну гидовую РНК; при этом указанная или каждая гидовая РНК является по существу комплементарной полинуклеотидной последовательности(ям)-мишени(ям) в геноме; и
- (ii) полинуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую нуклеазу; при этом нуклеаза образует рибонуклеазный комплекс с гидовой РНК, и при этом рибонуклеазный комплекс осуществляет сайт-специфические двухцепочечные разрывы ДНК (DSDB) в геноме.

9. Композиция гAAV для применения в лечении или профилактике артрита или для лечения или профилактики симптомов, связанных с артритом, при этом композиция гAAV содержит вирион гAAV, определенный в любом из пп. 1-8, и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Композиция гAAV для применения по п. 9, при этом композиция гAAV дополнительно содержит пустой капсид в соотношении пустого капсида к вириону гAAV, равном, по меньшей мере, 1:1.

11. Композиция гAAV и иммунодепрессант для применения в лечении или профилактике артрита или для лечения или профилактики симптомов, связанных с артритом, при этом композиция гAAV является такой, как определено по любому из пп. 9 или 10 и при этом лечение или профилактика включает введение композиции гAAV и введение иммунодепрессанта индивиду.

12. Вирион гAAV для применения по любому из пп. 1–8, композиция гAAV для применения по п. 9 или п. 10, или композиция гAAV и иммунодепрессант для применения по п. 11, в которых артрит выбирают из группы, состоящей из

ревматоидного артрита (РА), ювенильного ревматоидного артрита, остеоартрита (ОА), подагры, псевдоподагры, спондилоартрита (SpA), псориатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, септического артрита, артрита, ювенильного идиопатического артрита, тупой травмы, эндопротезирования сустава и болезни Стилла.

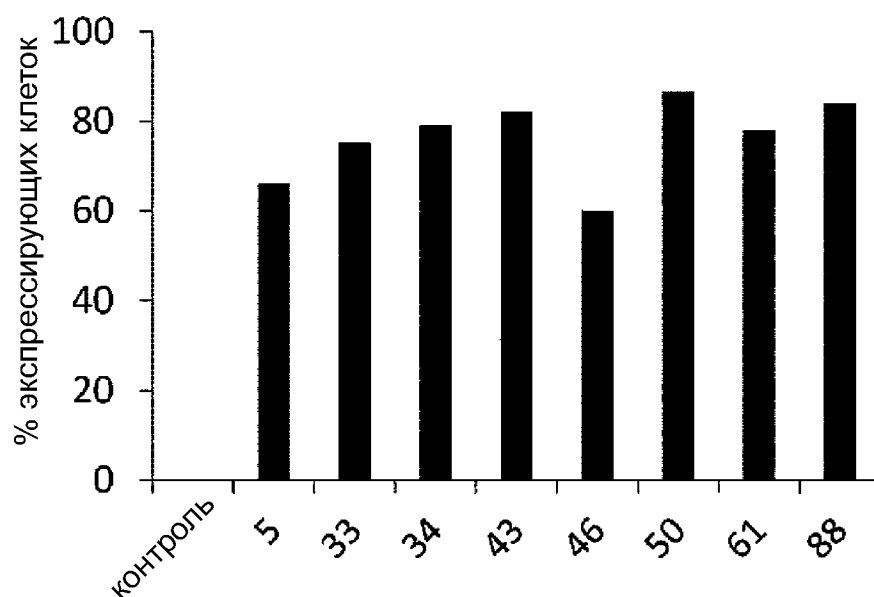
13. Вирион гAAV для применения по любому из пп. 1–8 и 12 или композиция гAAV для применения по любому из пп. 9, 10 и 12, в которых вирион гAAV или композицию гAAV вводят системно и/или местно.

14. Композиция гAAV и иммунодепрессант для применения по п. 11, где, по меньшей мере, одно из композиции гAAV и иммунодепрессанта вводят местно.

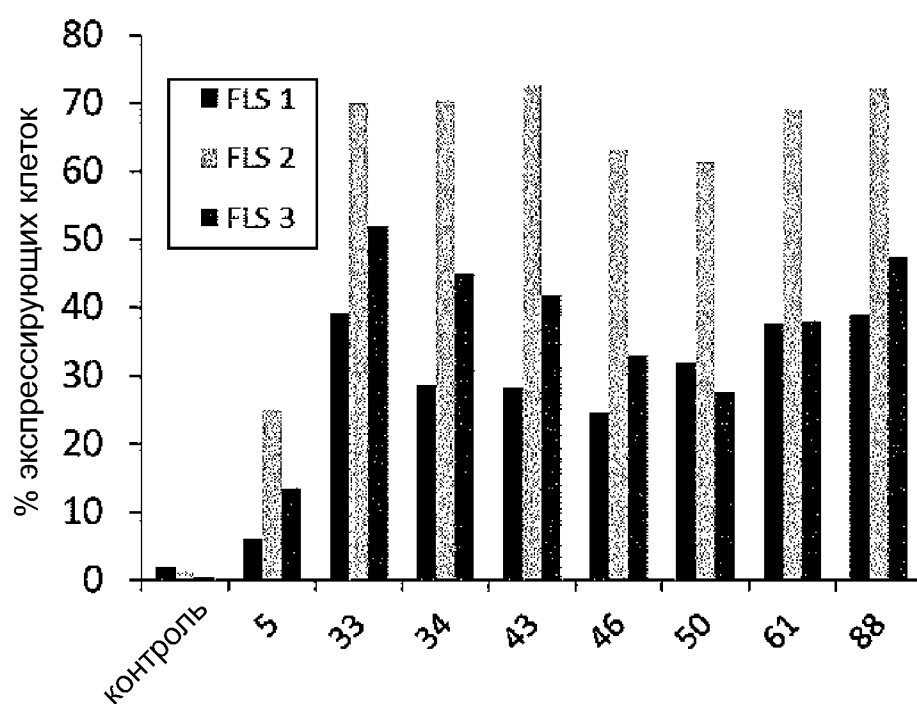
15. Вирион гAAV или композиция гAAV для применения по п. 13, или композиция гAAV и иммунодепрессант для применения по п. 14, в которых местное введение представляет собой внутрисуставное введение.

Модифицированный капсидный белок
RAAV для генной терапии

1/14



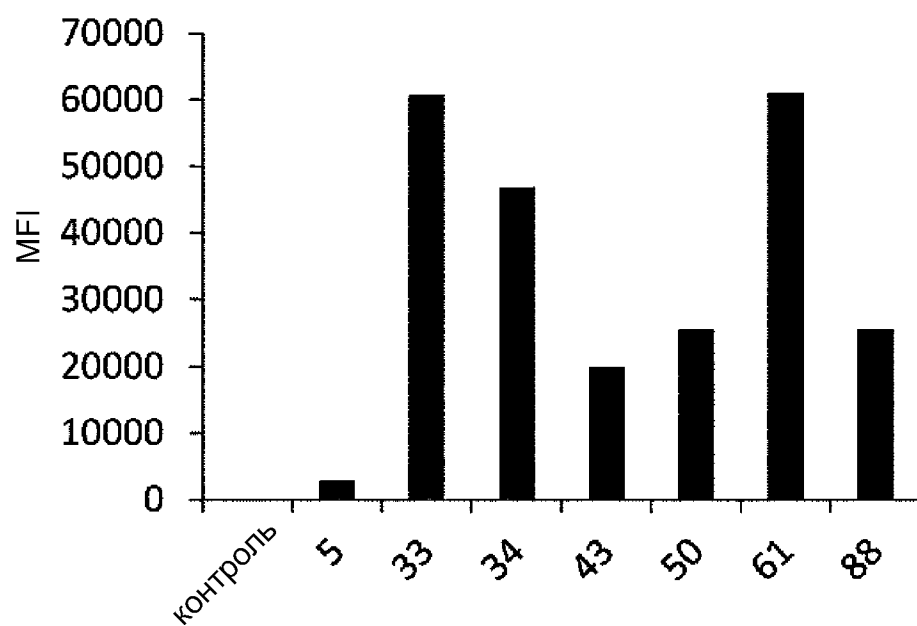
Фиг. 1А



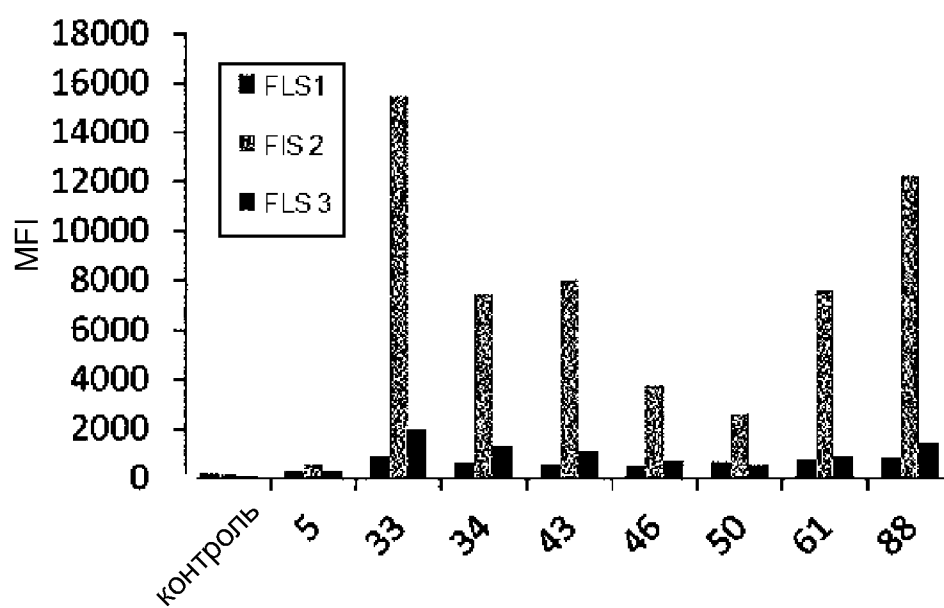
Фиг. 1В

Модифицированный капсидный белок
RAAV для генной терапии

2/14

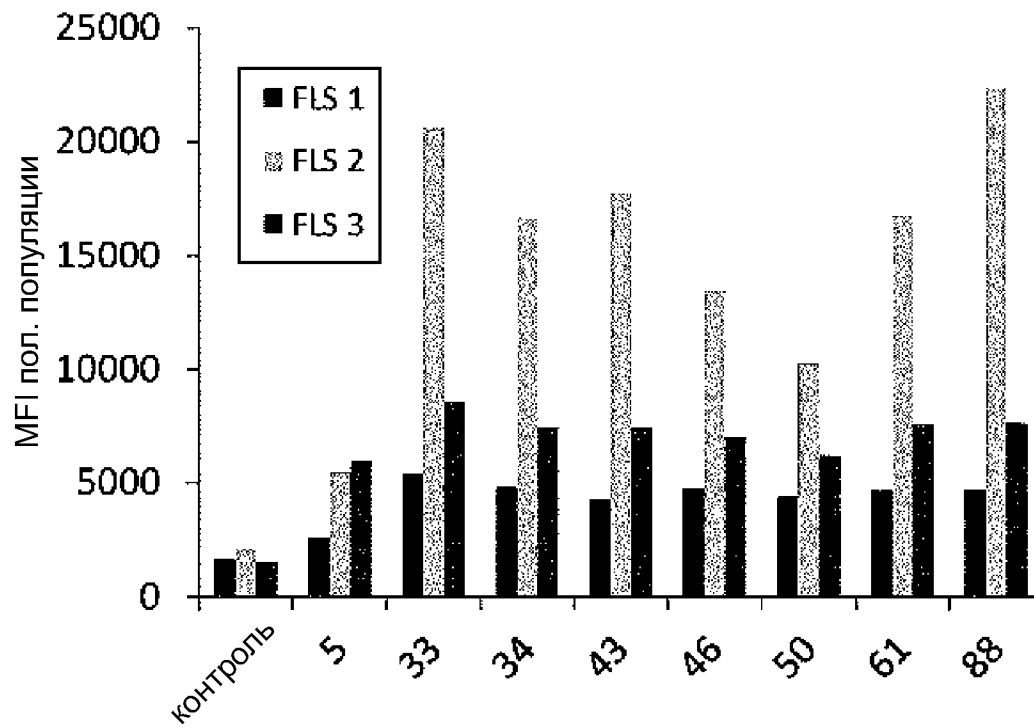


Фиг. 1С



Фиг. 1D

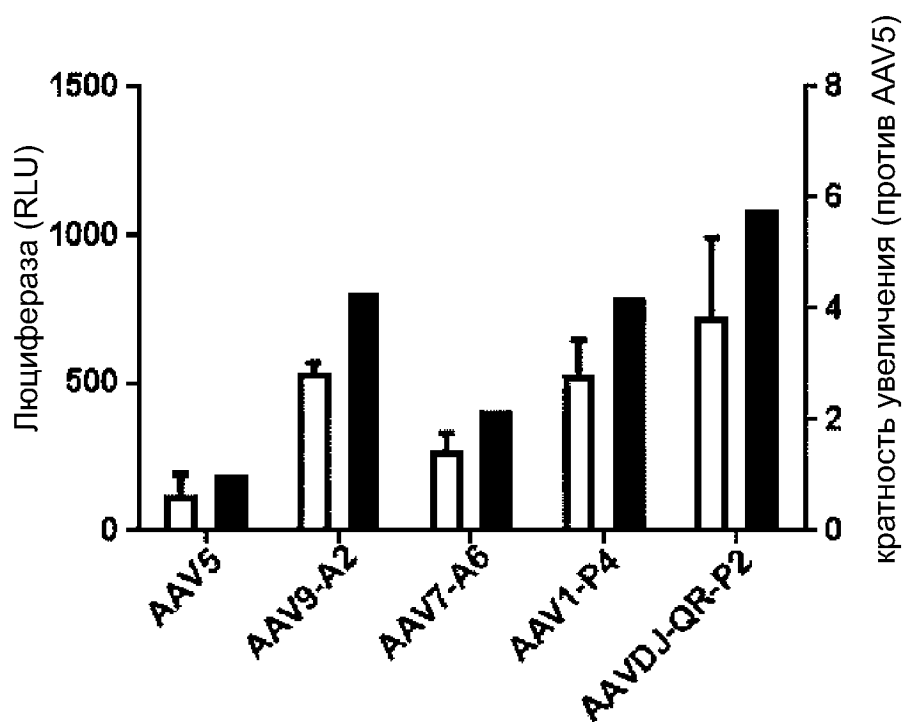
3/14



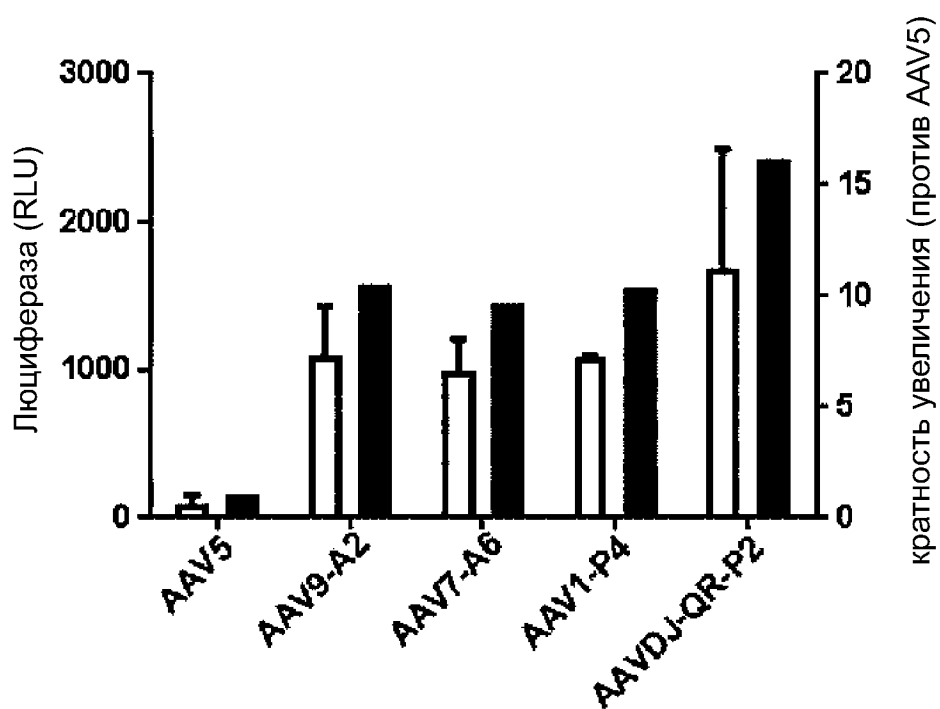
Фиг. 1Е

Модифицированный капсидный белок
RAAV для генной терапии

4/14



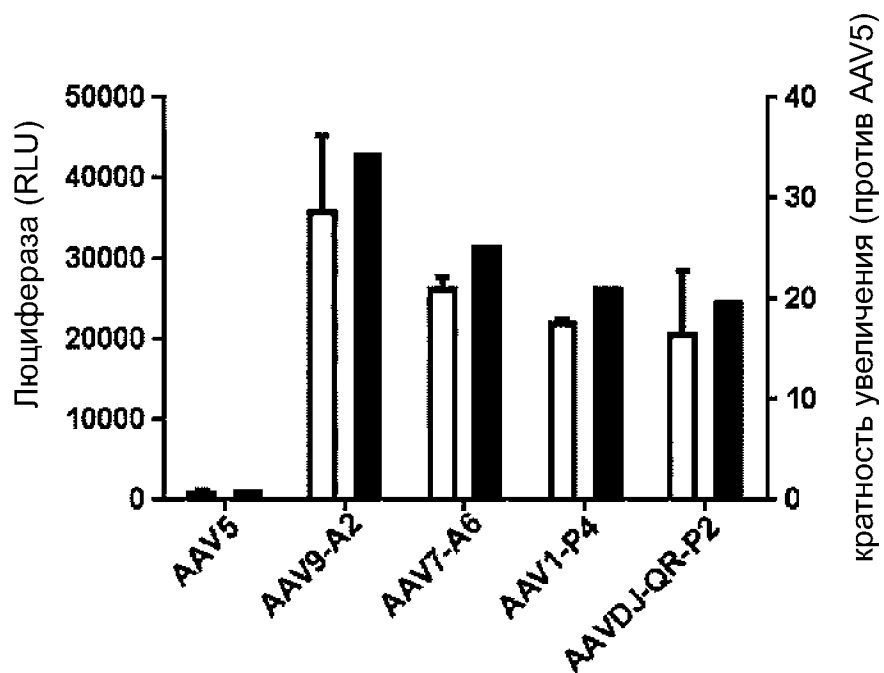
Фиг. 2А



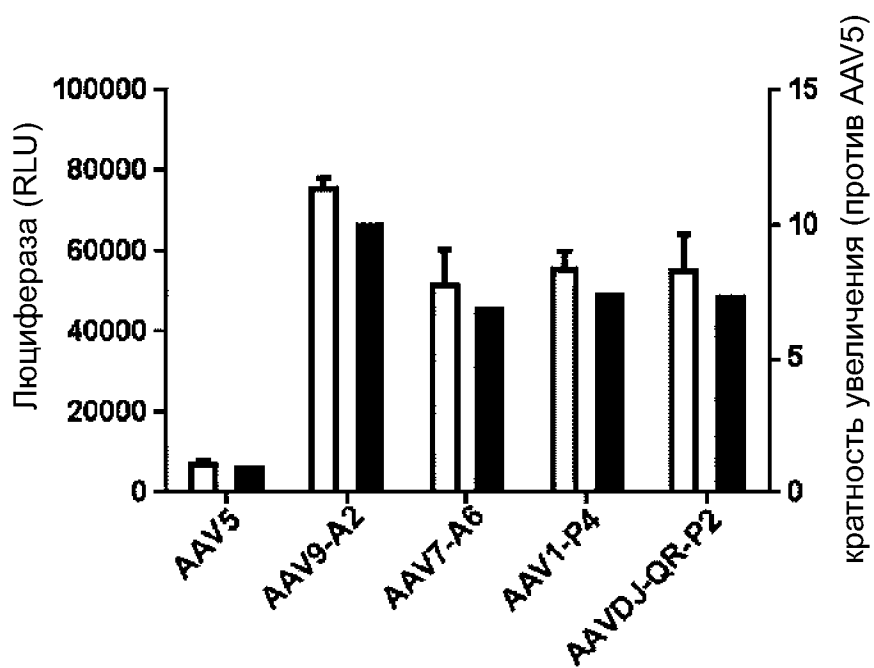
Фиг. 2В

Модифицированный капсидный белок
RAAV для генной терапии

5/14



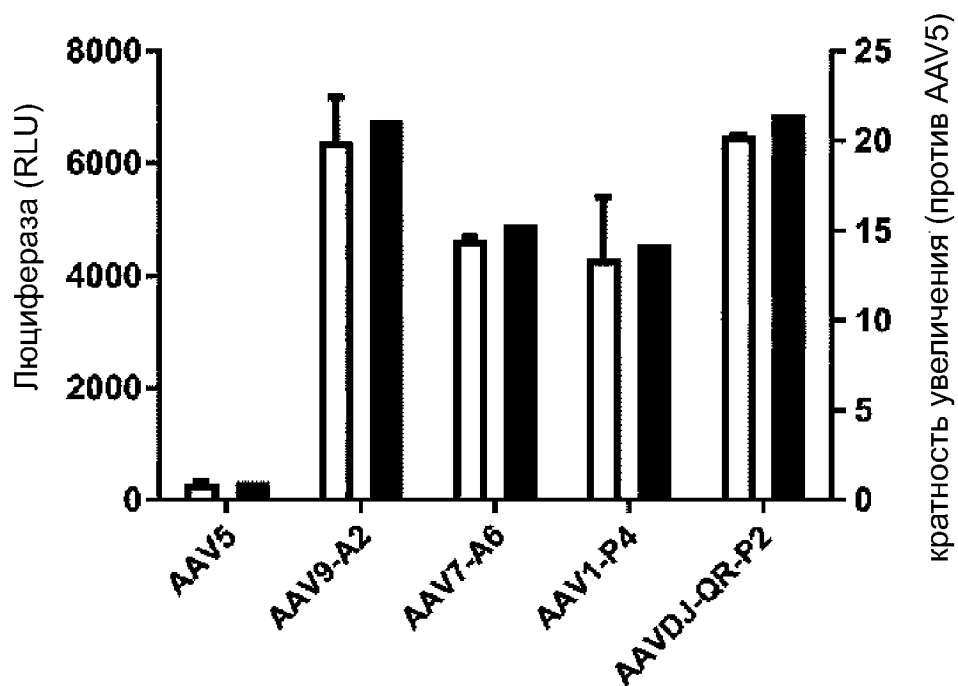
Фиг. 2С



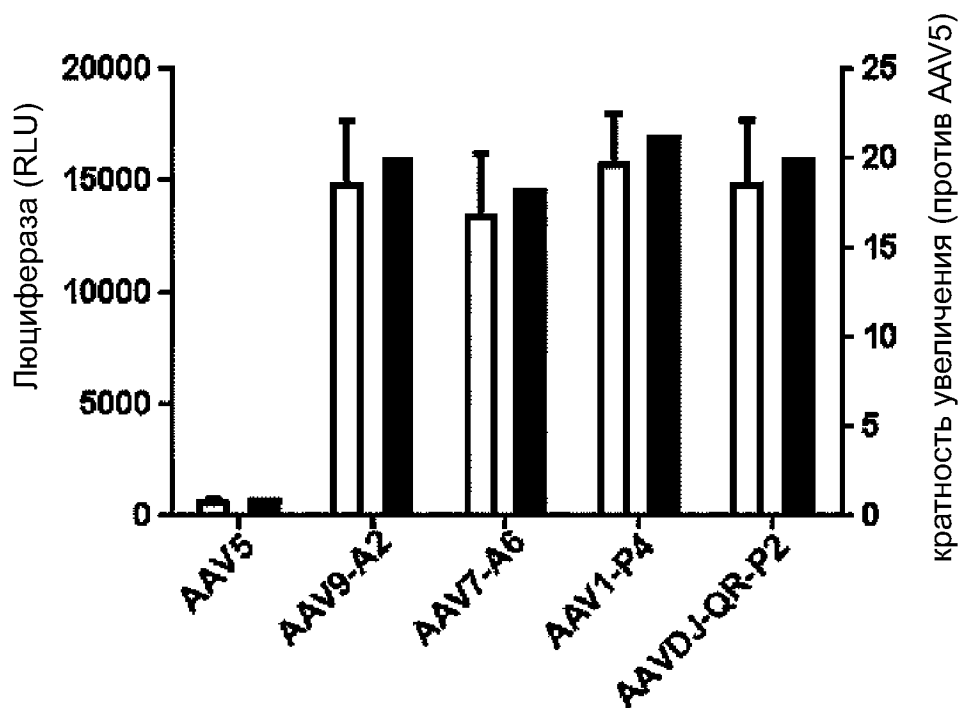
Фиг. 2D

Модифицированный капсидный белок
RAAV для генной терапии

6/14



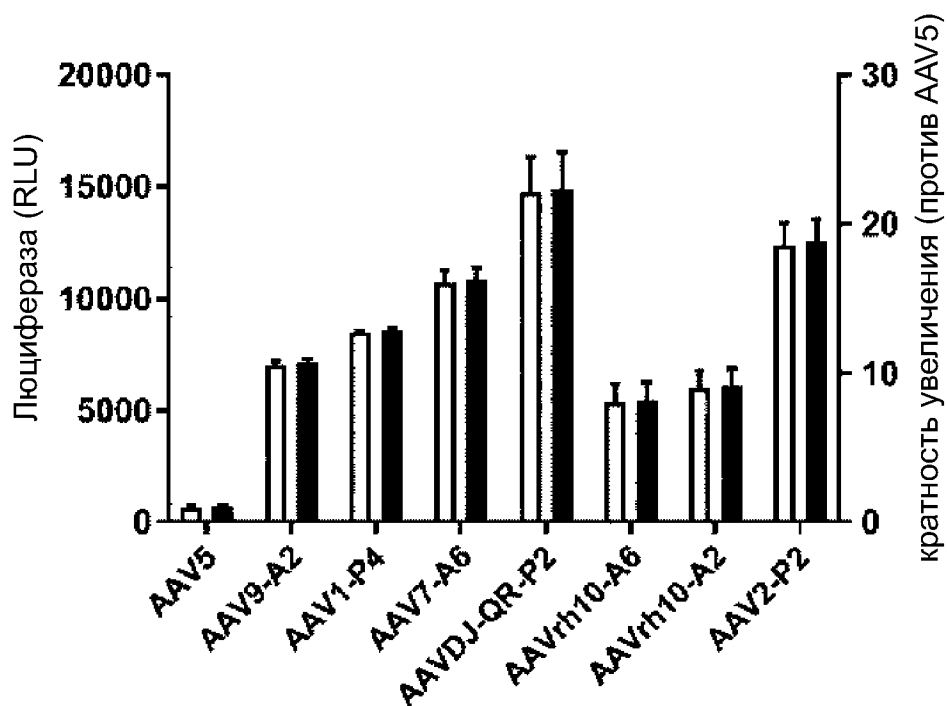
Фиг. 2Е



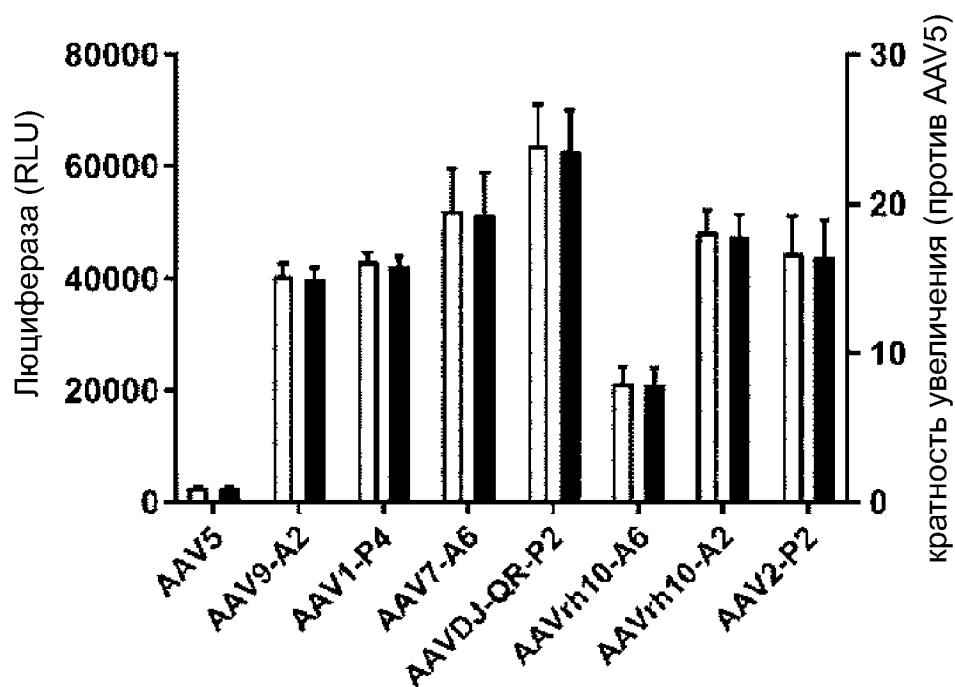
Фиг. 2F

Модифицированный капсидный белок RAAV для генной терапии

7/14

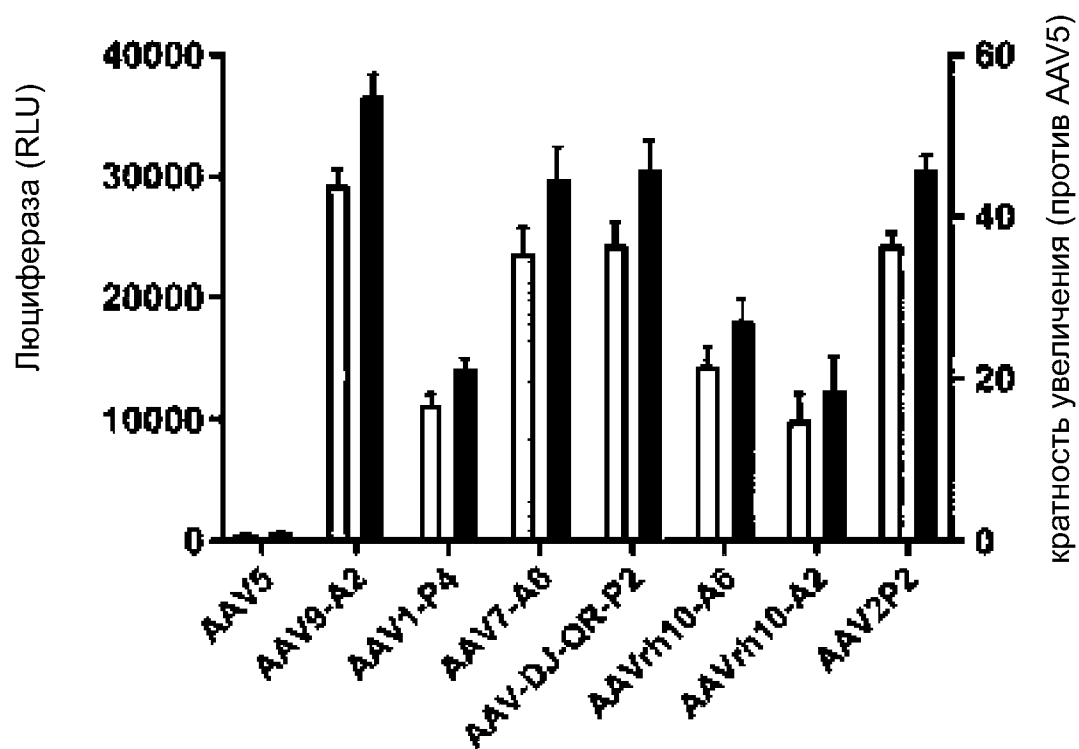


Фиг. 2G

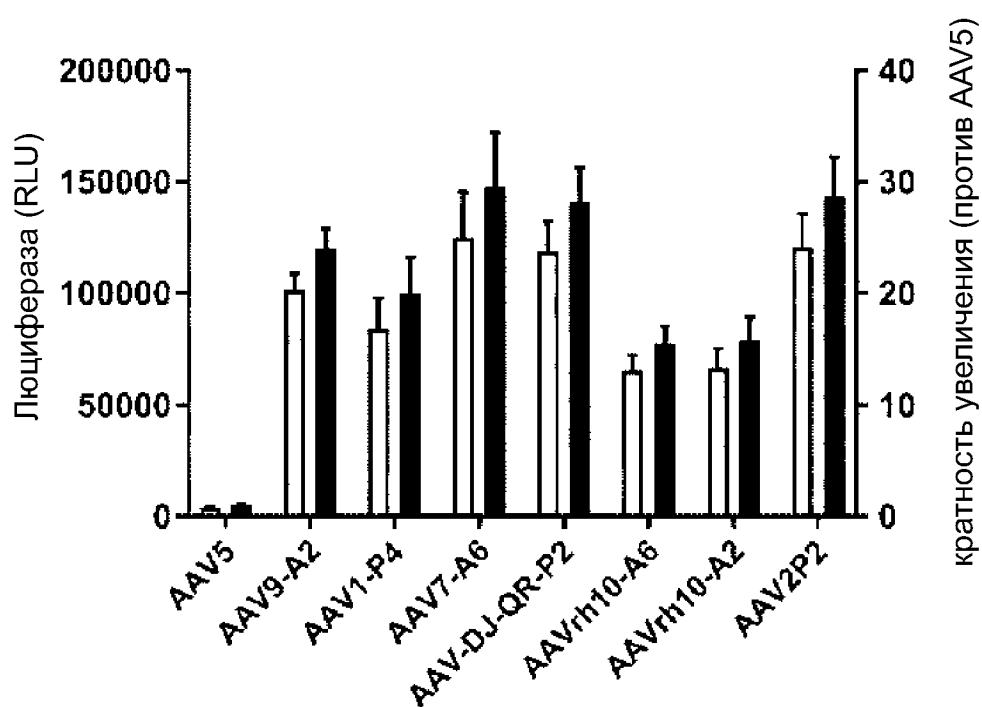


Фиг. 2H

8/14



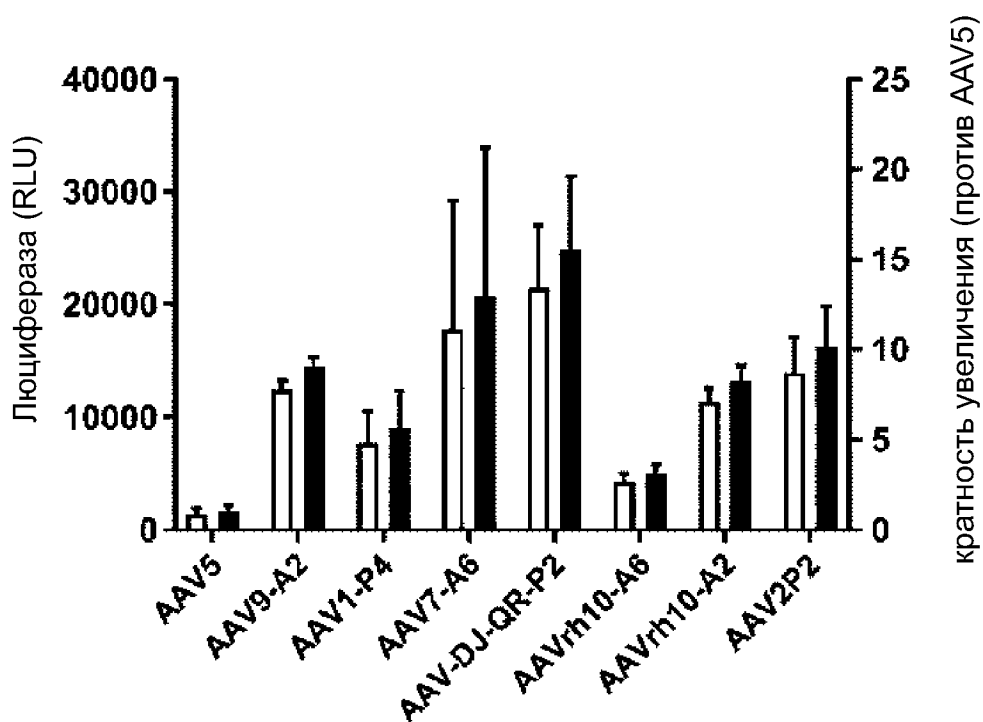
Фиг. 2I



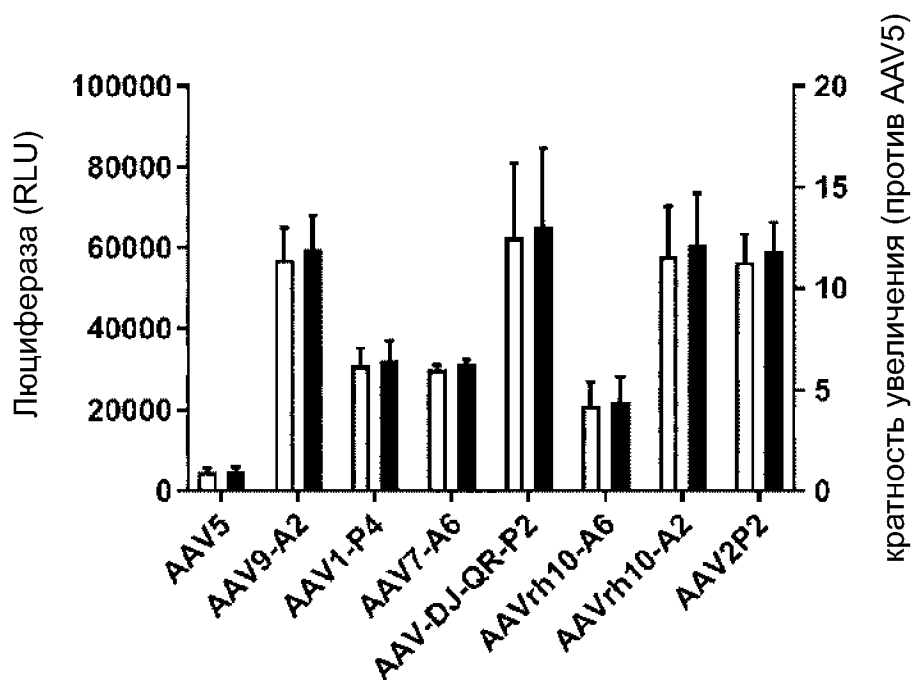
Фиг. 2J

Модифицированный капсидный белок RAAV для генной терапии

9/14



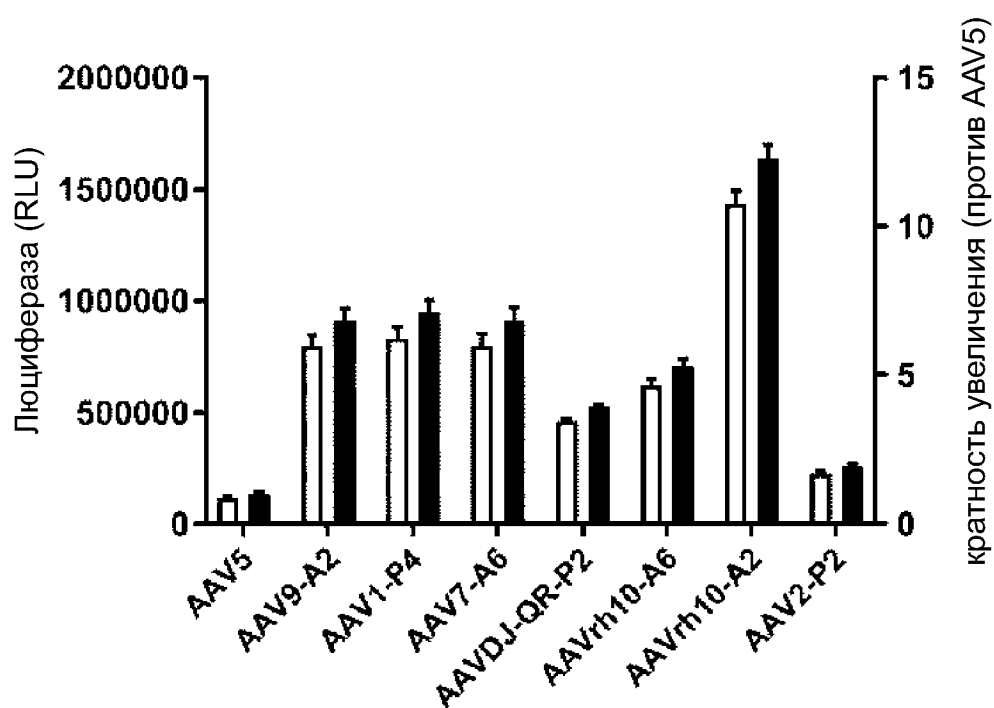
Фиг. 2К



Фиг. 2L

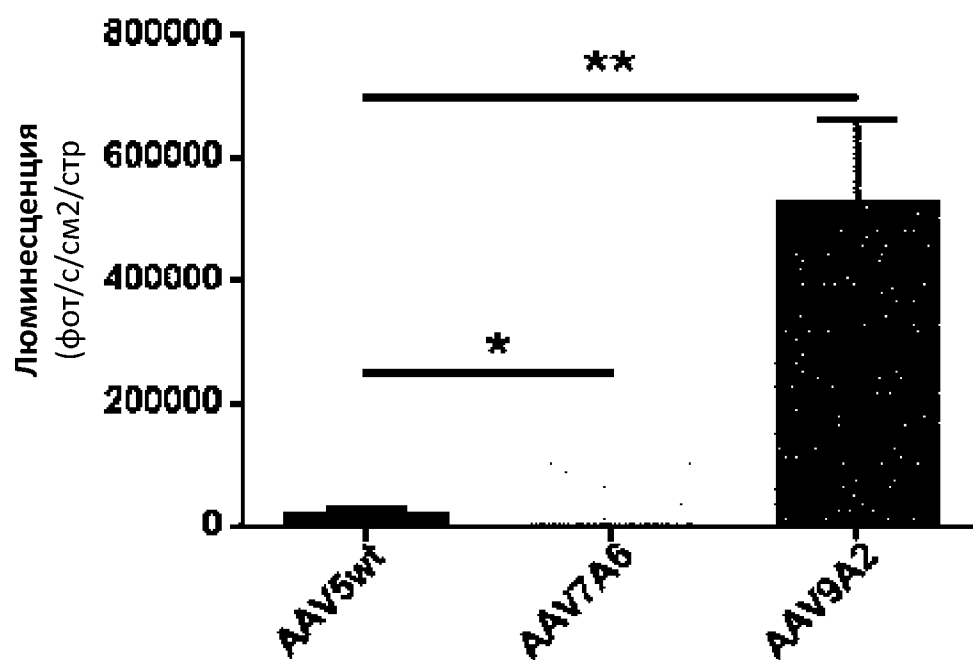
Модифицированный капсидный белок
RAAV для генной терапии

10/14

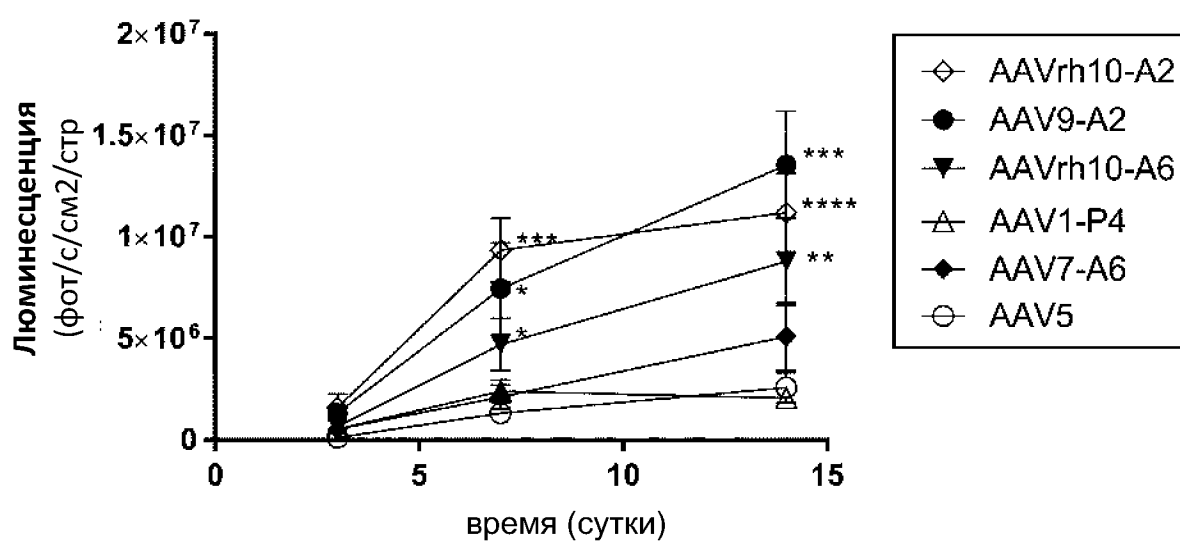


Фиг. 2М

11/14

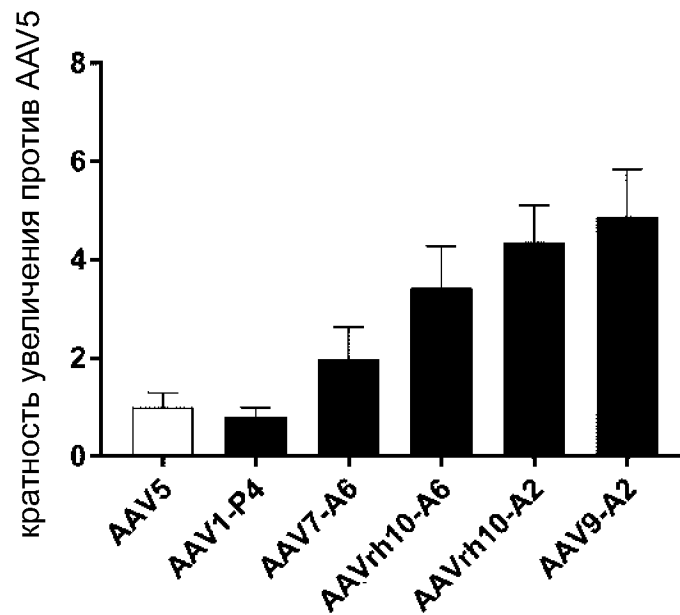


Фиг. 3А



Фиг. 3В

12/14



Фиг. 3С

выравнивание формата CLUSTALc помощью MAFFT FFT-NS-i (v7.215)

AAV1P4	-gqsgndvrs--anaqaa
AAV9A2	-gqrgnysrg--vdaqaa
AAVrh10A2	-gqrgnysrg--vdaqaa
AAV7A6	-gqrgnearv--reaq--
AAV7A6+	-gqrgnearv--reaqaa
AAV10A6	-gqrgnearv--reaqaa
AAV2P2	qgqsgcdcrqdcfca---
AAV-DJ-QR-P2	qgqrgcdcrqdcfca---
AAV2P2+	qgqsgcdcrqdcfcaqaa
AAV-DJ-QR-P2+	qgqrgcdcrqdcfcaqaa
	*** *

Фиг. 4

Модифицированный капсидный белок RAAV для генной терапии

13/14

Множественное выравнивание последовательностей
CLUSTAL с помощью MUSCLE (3.8)

AAV2P2	QGQSGCDCRG-DCFCA---
AAV2P2+	QGQSGCDCRG-DCFCAQAA
AAV-DJ-QR-P2	QGQRGCDCRG-DCFCA---
AAV-DJ-QR-P2+	QGQRGCDCRG-DCFCAQAA
AAV1P4	-GQSGNDVRSANAQAA---
AAV9A2	-GQRGNYSRGVDAQAA---
AAVrh10A2	-GQRGNYSRGVDAQAA---
AAV7A6	-GQRGNEARVREAQ-----
AAV7A6+	-GQRGNEARVREAQAA---
AAV10A6	-GQRGNEARVREAQAA---
	** * * :.

Фиг. 5

выравнивание формата CLUSTAL с помощью MAFFT FFT-NS-i (v7.215)

вставка P4	-gqsgndvrs--anaqaa
вставка A2	-gqrgnysrg--vdaqaa
вставка A6	-gqrgnearv--reaqaa
вставка P2	qgqsgcdcrqdcfcaqaa
вставка QR-P2	qgqrgcdcrqdcfcaqaa
	** * * ****

Фиг. 6

Модифицированный капсидный белок
RAAV для генной терапии

14/14

Множественное выравнивание последовательностей
CLUSTAL с помощью MUSCLE (3.8)

вставка P2	QGQSGCDCRGDCFCAQAA
вставка QR-P2	QGQRGCDCRGDCFCAQAA
вставка P4	-GQSGNDVRS-NAQAA
вставка A2	-GQRGNYSRGV-DAQAA
вставка A6	-GQRGNEARVR-EAQAA
	*** * * *****

Фиг. 7