

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091845** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.01.25

(22) Дата подачи заявки
2019.02.01

(51) Int. Cl. **A61K 35/76** (2015.01)
A61K 35/761 (2015.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
ФУНКЦИИ ГЕНА РАН И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/625,149; 62/672,377**

(32) **2018.02.01; 2018.05.16**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/016354**

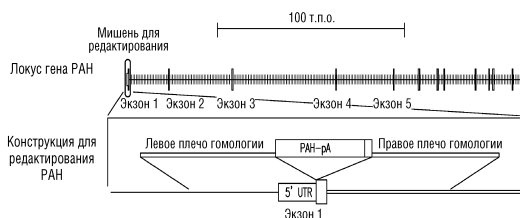
(87) **WO 2019/152843 2019.08.08**

(71) Заявитель:
**ХОМОЛОДЖИ МЕДИСИНС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Сеймур Альберт Барнс, Ахмед Симин
Сехер, Райт Джейсон Боук, Доллив
Серена Николь, МакСвиджен Джеймс
Энтони, Праут Джейми Мишель,
Сукиасиан Даниэль Лорен (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к композициям аденоассоциированного вируса (AAV), которые могут восстанавливать функцию гена фенилаланин-гидроксилазы (РАН) в клетке. Настоящее изобретение также относится к способам применения композиций AAV и к системам упаковки для получения композиций AAV.



202091845

A1

A1

202091845

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564310EA/025

КОМПОЗИЦИИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФУНКЦИИ ГЕНА РАН И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Родственные заявки

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США рег. No. 62/625149, поданной 1 февраля 2018 года, и заявки 62/672377, поданной 16 мая 2018 года, каждая из которых в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Ссылка на список последовательностей, представленных в электронной форме

[0002] Содержимое электронного списка последовательностей в текстовом файле ASCII (Имя: HMT-024PC_SeqList_ST25.txt; размер: 367287 байтов; и дата создания: 30 января 2019 г.) в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки.

Предпосылки к созданию изобретения

[0003] Фенилкетонурия (ФКУ) представляет собой аутосомно-рецессивное генетическое заболевание, которое, в большинстве случаев, вызывается мутациями в гене фенилаланин-гидроксилазы (РАН). Ген РАН кодирует печеночный фермент, который катализирует гидроксилирование L-фенилаланина (Phe) в L-тирозин (Tyr) после мультимеризации. Снижение или потеря активности РАН приводит к накоплению фенилаланина и его превращению в фенилпируват (также известный как фенилкетон). Это нарушение метаболизма фенилаланина негативно влияет на созревание нейронов и синтез миелина, что приводит к умственной отсталости, судорогам и к другим серьезным заболеваниям.

[0004] В настоящее время не существует способов лечения ФКУ. Стандартное лечение заключается в соблюдении диеты путем минимизации потребления продуктов, содержащих большое количество фенилаланина. Соблюдение диеты с низким содержанием фенилаланина с самого рождения в значительной степени предотвращает развитие неврологических последствий такого расстройства. Однако, даже при низкобелковой диете, дети все же страдают задержкой роста, а у взрослых часто наблюдается остеопороз и авитаминоз. Кроме того, людям трудно придерживаться диеты на протяжении всей жизни, особенно после школьного возраста.

[0005] В последнее время появились новые стратегии лечения, включающие добавление крупных нейтральных аминокислот (LNAA), терапию кофактором тетрагидробиоптерина, заместительную ферментную терапию и генетически модифицированную пробиотическую терапию. Однако, эти стратегии имеют определенные недостатки. Добавление LNAA является допустимым только для взрослых, не придерживающихся диеты с низким Phe. Кофактор тетрагидробиоптерин может быть использован только при лечении некоторых легких формах ФКУ. Замена фермента путем введения заменителя РАН, например, фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), может

приводить к иммунным реакциям, которые снижают эффективность и/или вызывают побочные эффекты. Что касается генетически модифицированной пробиотической терапии, то связанная с ней проблема заключается в патогенности PAL-экспрессирующей *E. coli*.

[0006] Генотерапия дает уникальную возможность вылечить ФКУ. Ретровирусные векторы, включая лентивирусные векторы, способны интегрировать нуклеиновые кислоты в геномы клетки-хозяина. Однако эти векторы могут оказаться небезопасными из-за их нецелевого встраивания в геном. Так, например, существует риск того, что вектор будет разрушать ген-супрессор опухоли или активировать онкоген, что может приводить к образованию злокачественной опухоли. Действительно, в клинических испытаниях по лечению X-связанного тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID) путем трансдукции CD34⁺-предшественников костного мозга гаммаретровирусным вектором, у четырех из десяти пациентов развивался лейкоз (Hacein-Bey-Abina et al., J Clin Invest. (2008) 118(9):3132-42).

[0007] Было также высказано предположение, что технология редактирования генов на основе нуклеаз, таких как мегануклеазы, нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), и технологии на основе кластеризованных регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов (CRISPR) могут быть использованы для исправления дефектов в гене РАН у пациентов с ФКУ. Тем не менее, каждая из этих технологий сталкивается с проблемой, связанной с безопасностью, из-за возможной нецелевой мутации сайтов в геноме человека, сходных по своим последовательностям с предполагаемым сайтом-мишенью.

[0008] В соответствии с этим, необходимо разработать улучшенные композиции и усовершенствованные способы для генотерапии, которые могут эффективно и безопасно восстанавливать функцию гена РАН у пациентов с ФКУ.

Сущность изобретения

[0009] Настоящее изобретение относится к композициям аденоассоциированного вируса (AAV), которые могут восстанавливать функцию гена РАН в клетках, и к способам их применения для лечения заболеваний, ассоциированных со снижением функции гена РАН (например, ФКУ). Настоящее изобретение также относится к системам упаковки для получения аденоассоциированных вирусных композиций.

[0010] В соответствии с этим, в одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу коррекции мутации в гене фенилаланин-гидроксилазы (РАН) в клетке, где указанный способ включает трансдукцию клетки дефектным по репликации аденоассоциированным вирусом (AAV), содержащим:

(a) капсид AAV; и

(b) корректирующий геном, содержащий: (i) элемент редактирования локуса-мишени в гене РАН; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную у 5'-конца редактирующего элемента, гомологичного первой геномной области, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени; и (iii) нуклеотидную

последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную у 3'-конца редактирующего элемента, гомологичного второй геномной области, расположенной у 3'-конца по отношению к локусу-мишени;

где клетку трансдуцируют без ко-трансдукции или совместного введения экзогенной нуклеазы или нуклеотидной последовательности, которая кодирует экзогенную нуклеазу.

[0011] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой гепатоцит, почечную клетку или клетку головного мозга, гипофиза, коры надпочечника, поджелудочной железы, мочевого пузыря, желчного пузыря, толстой кишки, тонкой кишки или молочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка присутствует у индивидуума-млекопитающего, и AAV вводят индивидууму в количестве, эффективном для трансдукции клетки у индивидуума. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием или расстройством, ассоциированным с мутацией гена РАН, где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества дефектного по репликации AAV, содержащего:

(a) капсид AAV; и

(b) корректирующий геном, содержащий: (i) элемент редактирования локуса-мишени в гене РАН; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную у 5'-конца элемента редактирования, гомологичного первой геномной области, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени; и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную у 3'-конца элемента редактирования, гомологичного второй геномной области, расположенной у 3'-конца по отношению к локусу-мишени;

где экзогенную нуклеазу или нуклеотидную последовательность, которая кодирует экзогенную нуклеазу, не вводят индивидууму совместно.

[0012] В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство представляет собой фенилкетонурию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является человек.

[0013] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к дефектному по репликации аденоассоциированному вирусу (AAV), содержащему:

(a) капсид AAV; и

(b) корректирующий геном, содержащий: (i) элемент редактирования локуса-мишени в гене РАН; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную у 5'-конца элемента редактирования, гомологичного первой геномной области, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени; и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную у 3'-конца элемента редактирования, гомологичного второй геномной области, расположенной у 3'-конца по отношению к локусу-мишени;

[0014] В каждом из вышеупомянутых аспектов используются нижеследующие

варианты изобретения.

[0015] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит кодирующую последовательность РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН имеет молчащую модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, 116, 131, 132, 138, 139 или 143.

[0016] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН, где, но необязательно, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит ненативный интрон, встроенный в кодирующую последовательность РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ненативный интрон выбран из группы, состоящей из первого интрона гена гемоглобина-бета и «минут»-вируса в интроне мышей (MVM). В некоторых вариантах осуществления изобретения, ненативный интрон состоит из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 28-30 и 120-130. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ненативный интрон состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 28-30 и 120-130.

[0017] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит от 5'- до 3'-конца: первую часть кодирующей последовательности РАН, интрон, и вторую часть кодирующей последовательности РАН, где первая часть и вторая часть, если они являются сплайсированными, образуют полноразмерную кодирующую последовательность РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН имеет молчащую мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25 или 116. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая часть кодирующей последовательности РАН содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64 или 65, и/или вторая часть кодирующей последовательности РАН содержит аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66 или 67. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая часть кодирующей последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64 или 65, а вторая часть кодирующей последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66 или 67.

[0018] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит от 5'- до 3'-конца: элемент вырезания рибосомы и кодирующую последовательность РАН или кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования также содержит последовательность полиаденилирования у 3'-конца по отношению к кодирующей последовательности РАН или кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность полиаденилирования представляет собой экзогенную последовательность полиаденилирования, где, но необязательно, экзогенная последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования SV40. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность полиаденилирования SV40 содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-34, и комплементарную ей последовательность.

[0019] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, присутствует в экзоне гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, присутствует в экзоне 1 гена РАН.

[0020] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования дополнительно содержит акцептор сплайсинга, расположенный у 5'-конца по отношению к элементу вырезания рибосомы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, присутствует в интроне гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, присутствует в интроне 1 гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35.

[0021] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 5'-плеча гомологии по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична первой геномной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 3'-плеча гомологии по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична второй геномной области.

[0022] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая геномная область расположена в первом окне редактирования, а вторая геномная область расположена во втором окне редактирования. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, первое окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 или 45. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 или 45. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, а второе окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

[0023] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая геномная область состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая геномная область состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

[0024] В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждая из нуклеотидных последовательностей 5'- и 3'-плеча гомологии независимо имеет длину приблизительно от 100 до приблизительно 2000 нуклеотидов.

[0025] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии содержит: С, соответствующий нуклеотиду -2 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 4 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 6 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 7 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 9 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -467 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -465 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -181 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду -214 гена РАН; С, соответствующий нуклеотиду -212 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 194 гена РАН; С, соответствующий нуклеотиду -433 гена РАН; С, соответствующий нуклеотиду -432 гена РАН; ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68), соответствующую нуклеотидам от -394 до -388 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -341 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -339 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -225 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН; и/или А, соответствующий нуклеотиду -203 гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии содержит:

(a) С, соответствующий нуклеотиду -2 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 4 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 6 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 7 гена РАН; и G, соответствующий нуклеотиду 9 гена РАН;

(b) А, соответствующий нуклеотиду -467 гена РАН и А, соответствующий нуклеотиду -465 гена РАН;

(c) А, соответствующий нуклеотиду -181 гена РАН;

(d) G, соответствующий нуклеотиду -214 гена РАН, С, соответствующий нуклеотиду -212 гена РАН, и А, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН;

(e) G, соответствующий нуклеотиду 194 гена РАН;

(f) С, соответствующий нуклеотиду -433 гена РАН, и С, соответствующий нуклеотиду -432 гена РАН;

(g) ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68), соответствующую нуклеотидам от -394 до -388 гена PАН; и/или

(h) А, соответствующий нуклеотиду -341 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -339 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -225 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -211 гена PАН; и А, соответствующий нуклеотид -203 гена PАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии содержит модификации (c) и (d), (f) и (g) и/или (b) и (h).

[0026] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 36-44, 111, 115 и 142. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, 112, 117, 144.

[0027] В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 46-54, 113, 118, 134, 136 и 145.

[0028] В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном дополнительно содержит нуклеотидную последовательность 5'-инвертированного концевой повтора (5'-ITR), расположенную у 5'-конца нуклеотидной последовательности 5'-плеча гомологии, и нуклеотидную последовательность 3'-инвертированного концевой повтора (3'-ITR), расположенную у 3'-конца нуклеотидной последовательности 3'-плеча гомологии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, а нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 20, а нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 26, а нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 27.

[0029] В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 55-63, 114, 119, 135, 137 и 146. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 55-63, 114, 119, 135, 137 и 146.

[0030] В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит капсидный белок AAV кладлотипа F.

[0031] В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладлотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой С; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой Н; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой А; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2 представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой С; или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления изобретения,

(a) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M;

(c) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой А, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; или

(e) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID

NO: 2, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, и аминокислота в белок капсида, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[0032] В некоторых вариантах осуществления изобретения, изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 SEQ ID NO: 2, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 из SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 2, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 2, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления изобретения,

(a) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке,

соответствующем аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в белок капсида, соответствующий аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M;

(с) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2 представляет собой R;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; а аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте, добавляют 505 SEQ ID NO: 2 представляет собой R; или

(е) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок капсида содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, или 17.

[0033] В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 SEQ ID NO: 2, представляет собой T; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 68 SEQ ID NO: 2, представляет собой V; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 SEQ ID NO: 2, представляет собой L; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 SEQ ID NO: 2, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте, добавляют 468 SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 SEQ ID NO: 2, представляет собой

R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления изобретения,

(а) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 SEQ ID NO: 2, представляет собой Т; а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой Y;

(с) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 SEQ ID NO: 2, представляет собой L, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 SEQ ID NO: 2Э представляет собой S;

(е) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G;

(f) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M;

(г) аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; и аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R;

(h) аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; и аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; или

(i) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в белок капсида, соответствующий аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C.

[0034] В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[0035] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективность интеграции элемента редактирования в локус-мишень составляет по меньшей мере 1%, если AAV вводят мышам, которым были имплантированы человеческие гепатоциты, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аллельная частота интеграции элемента редактирования в локус-мишень составляет по меньшей мере 0,5%, если AAV вводят мышам, которым были имплантированы человеческие гепатоциты, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

[0036] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей раскрытый здесь AAV.

[0037] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к системе упаковки для получения рекомбинантного препарата AAV, где система упаковки содержит:

(a) нуклеотидную последовательность Rep, кодирующую один или более белков Rep AAV;

(b) нуклеотидную последовательность Cap, кодирующую один или более описанных здесь капсидных белков AAV кладотипа F; и

(c) описанные здесь корректирующий геном или геном для переноса, где система упаковки действует в клетке и обеспечивает включение корректирующего генома или генома для переноса в капсид с образованием AAV.

[0038] В некоторых вариантах осуществления изобретения, система упаковки содержит первый вектор, включающий нуклеотидную последовательность Rep и нуклеотидную последовательность Cap, и второй вектор, включающий корректирующий геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность Rep кодирует белок Rep AAV2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок Rep AAV2 представляет собой Rep 78/68 или Rep 68/52. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок Rep AAV2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую минимальный процент идентичности с аминокислотной последовательностью Rep AAV2 SEQ ID NO: 22, где минимальный процент идентичности последовательности составляет по меньшей мере 70% по всей длине аминокислотной последовательности, кодирующей белок Rep AAV2.

[0039] В некоторых вариантах осуществления изобретения, система упаковки дополнительно содержит третий вектор, где третий вектор представляет собой вектор вируса-помощника. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор вируса-помощника представляет собой независимый третий вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор вируса-помощника интегрирован с первым вектором. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор вируса-помощника

интегрирован со вторым вектором. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третий вектор содержит гены, кодирующие белки вируса-помощника.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирус-помощник выбран из группы, состоящей из аденовируса, вируса герпеса, вируса осповакцины и цитомегаловируса (CMV). В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирус-помощник представляет собой аденовирус. В некоторых вариантах осуществления изобретения, геном аденовируса содержит один или более генов РНК аденовируса, выбранных из группы, состоящей из E1, E2, E4 и VA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирус-помощник представляет собой вирус простого герпеса (HSV). В некоторых вариантах осуществления изобретения, геном HSV содержит один или более генов HSV, выбранных из группы, состоящей из UL5/8/52, ICPO, ICP4, ICP22 и UL30/UL42.

[0040] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый вектор и третий вектор содержатся в первой трансфецирующей плазмиде. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотиды второго вектора и третьего вектора содержатся во второй трансфецирующей плазмиде. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотиды первого вектора и третьего вектора клонированы в рекомбинантный вирус-помощник. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотиды второго вектора и третьего вектора клонированы в рекомбинантный вирус-помощник.

[0041] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения рекомбинантного препарата AAV, где указанный способ включает введение описанной здесь системы упаковки в клетку в условиях, необходимых для включения корректирующего генома или генома для переноса в капсид с образованием AAV.

Краткое описание чертежей

[0042] На фигуре 1A представлена карта вектора pHMI-hPAN-hAC-008.

[0043] На фигуре 1B представлена карта карту вектора pHMI-hPAN-h1C-007.

[0044] На фигуре 1C представлена карта вектора pHMIA-hPAN-h11C-032.1.

[0045] На фигуре 2 представлено изображение Вестерн-блота, иллюстрирующее экспрессию человеческого РАН из векторов pCON-WT-PAN («WT РАН»), pCON-CO-PAN («CO РАН pCON») и pHMI-CO-PAN («CO РАН pHMI»). 5×10^5 клеток НЕК 293 трансфицировали 1 мкг вектора. Лизат клеток собирали через 48 часов после трансфекции. Экспрессию человеческого РАН детектировали с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием антитела против РАН (Sigma HPA031642). Количество белка GAPDH, детектируемое анти-GAPDH антителом (Millipore MAB 374), показано в качестве контроля загрузки.

[0046] На фигуре 3A представлен график, иллюстрирующий количественную оценку кластера кДНК РАН после линейной амплификации («обогащенной LAM») или ПЦР-амплификации («ампликона») сайта-мишени редактирования.

[0047] На фигуре 3B представлен график, иллюстрирующий количественный

анализ на интеграцию вектора рНМІ-hРАH-hA-002 посредством капельной цифровой ПЦР (кцПЦР).

[0048] На фигуре 4А показана конструкция вектора рНМІ-hРАH-mAC-006 и его ожидаемая интеграция в мышинный геном.

[0049] На фигуре 4В представлена диаграмма, иллюстрирующая способ ПЦР-детектирования аллеля, отредактированного вектором рНМІ-hРАH-mAC-006. Были сконструированы две пары праймеров: первая пара может амплифицировать ДНК размером 867 п.о. из неотредактированного аллеля («контрольная ПЦР»); вторая пара может специфически амплифицировать ДНК размером 2459 п.о. из отредактированного аллеля («ПЦР отредактированного аллеля»).

[0050] На фигуре 4С представлено изображение ДНК-электрофореза, иллюстрирующее ПЦР-продукт контрольной ПЦР («Контрольная ПЦР») и ПЦР отредактированного аллеля («ПЦР для редактирования»), как показано на фигуре 4А. Вектор рНМІ-hРАH-mAC-006, упакованный в капсид AAVHSC, внутривенно инъецировали двум новорожденным мышам дикого типа в хвостовую вену в дозе 2×10^{13} векторных геномов на кг массы тела. Образцы печени брали через 2 недели. Образец печени мыши, обработанной физиологическим раствором, и образец клеток мышинных фибробластов 3Т3 использовали в качестве негативного контроля для ПЦР отредактированного аллеля.

[0051] На фигуре 5А представлена диаграмма, иллюстрирующая способ количественной оценки отредактированного аллеля с помощью кцПЦР. Первая пара праймеров была сконструирована для амплификации первой последовательности в векторе рНМІ-hРАH-mAC-006, а первый зонд («векторный зонд») был сконструирован для гибридизации с первой последовательностью. Вторая пара праймеров была сконструирована для амплификации второй последовательности в мышинном геноме рядом с вектором, а второй зонд («локусный зонд») был сконструирован для гибридизации со второй последовательностью. Образцы ДНК были распределены по масляным каплям. Концентрация ДНК была оптимизирована до 600 пг на 20 мкл для значительного снижения вероятности того, что одна капля масла будет случайно содержать векторную частицу и частицу геномной ДНК ($p < 0,001$). После интеграции вектора в геном вероятность присутствия двух векторных зондов и локусных зондов в одной капле будет повышаться.

[0052] На фигуре 5В представлена диаграмма, иллюстрирующая ожидаемый результат, полученный способом, описанным на фигуре 5А. На этой диаграмме, каждая точка представляет одну каплю масла. Точки с отрицательным сигналом векторного зонда, но с положительным сигналом локусного зонда, представляют неотредактированные аллели, тогда как точки с положительным сигналом векторного зонда и положительным сигналом локусного зонда, представляют отредактированные аллели.

[0053] На фигуре 5С представлен график, иллюстрирующий данные, полученные

для мышинной печени способом, описанным на фигуре 5А. Вектор рНМІ-һРАН-мАС-006, упакованный в капсид AAVHSC, внутривенно инъецировали двум новорожденным мышам дикого типа в хвостовую вену в дозе 2×10^{13} векторных геномов на кг массы тела. Образцы печени брали через 2 недели. Один образец был проанализирован способом, описанным на фигуре 5А. Были детектированы капли, позитивные по векторному зонду и локусному зонду.

[0054] На фигуре 5D представлен график, иллюстрирующий данные, полученные для образца, содержащего печень мыши, обработанной физиологическим раствором и плазмидой рНМІ-һРАН-мАС-006. Было детектировано несколько капель, позитивных по зонду и локусному зонду, что позволяет предположить, что образец был достаточно разбавлен, а поэтому вероятность того, что одна масляная капля будет случайно содержать векторную частицу и частицу геномной ДНК, очень мала.

[0055] На фигуре 5Е представлен график, иллюстрирующий количественную оценку, показанную на графике на Фигуре 5D и на графиках, построенных для других образцов. У двух контрольных мышей, в печени наблюдалось 0% и 0,0395% отредактированных аллелей, соответственно, а у двух мышей, обработанных вектором рНМІ-һРАН-мАС-006, в печени наблюдалось 2,504% и 2,783% отредактированных аллелей, соответственно,

[0056] На фигуре 6 представлен график, иллюстрирующий экспрессию мРНК человеческого РАН в печени после введения вектора рНМІ-һРАН-мАС-006. РНК экстрагировали и подвергали обратной транскрипции. Пара праймеров и зонд были сконструированы для специфического детектирования экспрессии РАН из отредактированного аллеля. Каждый уровень экспрессии РАН нормализовали по уровню экспрессии эндогенного Hprt.

[0057] На фигуре 7А представлен график, иллюстрирующий эффективность трансдукции вектора рНМІ-һРАН-мАС-006, упакованного в капсиды AAVHSC в пробах крови мышей, измеренная с помощью кцПЦР с использованием наборов праймеров и зондов для оценки вектора и числа копий геномных локусов мышинного РАН. Количество векторных геномов на клетку («ВГ на клетку») рассчитывали исходя из измеренного отношения количества векторов к количеству копий геномного локуса мышинного РАН.

[0058] На фигуре 7В представлен график, иллюстрирующий процент эффективности редактирования в пробах крови мышей, оцененной с помощью мультиплексной кцПЦР с использованием наборов праймеров и зондов для измерения частоты интеграции ДНК из вектора AAV («полезная нагрузка») в локус мышинного РАН и локус человеческого РАН. Частоту редактирования вычисляли на основе обнаруженного совместного распределения полезной нагрузки и ДНК-мишени в одной капле с высокой ожидаемой вероятностью совместного распределения полезной нагрузки и ДНК-мишени в отдельных молекулах нуклеиновых кислот.

[0059] На фигуре 7С представлен график, иллюстрирующий уровни сывороточного фенилаланина в процентах относительно исходного уровня у мышей после введения

вектора рНМІ-һРАН-мАС-006, упакованного в капсид AAVHSC. Средние уровни у обработанных животных и контрольных животных (мышей, которые не получали AAV) представлены на графике.

[0060] На фигуре 7D представлен график, иллюстрирующий процентные уровни сывороточного фенилаланина относительно исходного уровня у каждой отдельной мыши, которой инъецировали вектор рНМІ-һРАН-мАС-006, упакованный в капсид AAVHSC, или у каждой контрольной мыши, которой не вводили AAV. Значения p вычисляли с помощью ANOVA по отношению к контрольному распределению.

[0061] На фигуре 7E представлен график, иллюстрирующий корреляцию между процентными уровнями сывороточного фенилаланина по отношению к исходному уровню и процентной эффективностью редактирования.

[0062] На фигуре 7F представлен набор изображений, иллюстрирующих гибридизацию *in situ* (ISH) мРНК *Rah* и, возможно, вирусной ДНК, содержащей последовательность РАН, в образцах печени мышей, которым инъецировали вектор һРАН-мАС-006 (средняя панель), неинтегрирующий вектор трансгенного *Rah* (правая панель) или контроль, то есть, физиологический раствор (левая панель).

[0063] На фигуре 8A представлен график, иллюстрирующий эффективность трансдукции вектора һРАН-һАС-008 и вектора һРАН-һАС-008-НВВ в человеческих и мышинных гепатоцитах у мышей, которым вводили вектор, упакованный в капсиды AAVHSC15, как было определено с помощью кцПЦР с использованием наборов праймеров и зондов, специфичных к вектору. На оси Y представлено измеренное количество векторов по отношению к геномам мышинных или человеческих клеток.

[0064] На фигуре 8B представлена серия фотографий, иллюстрирующих гибридизацию *in situ* человеческой мРНК *Rah* и, возможно, вирусной ДНК, содержащей последовательность РАН с молчащими модификациями кодонов в образцах печени у мышей, которым вводили немодифицированный или модифицированный вектор һРАН-һАС-008. Зонд обнаруживал только мРНК, транскрибированную из локуса гена, отредактированного немодифицированным или модифицированным вектором һРАН-һАС-008.

[0065] На фигуре 8C представлен график, иллюстрирующий процент эффективности редактирования вектора һРАН-һАС-008 в мышинных и человеческих гепатоцитах у мышей, которым были трансплантированы человеческие гепатоциты как было определено с помощью мультиплексной кцПЦР. На левой половине чертежа показана эффективность редактирования у животного, обработанного вектором һРАН-һАС-008-НВВ, а на правой половине чертежа показана эффективность редактирования у животного, обработанного вектором һРАН-һАС-008. Значения p были вычислены с помощью ANOVA.

[0066] На фигуре 9A схематически показан анализ, применяемый для определения эффективности редактирования гена РАН у мышей.

[0067] На фигуре 9B представлен график, иллюстрирующий эффективность

редактирования гена РАН в клетках мышей, которым вводили либо вектор рНМІ-һРАН-мАС-006, либо контроль-носитель.

[0068] На фигуре 10А представлен график, иллюстрирующий средние процентные уровни сывороточного фенилаланина по отношению к исходному уровню у мышей после введения вектора рНМІ-һРАН-мАС-006, упакованного в капсиды AAVHSC15, или контроля-носителя.

[0069] На фигуре 10В представлен график, иллюстрирующий средние процентные уровни сывороточного тирозина по отношению к к исходному уровню у мышей после введения вектора рНМІ-һРАН-мАС-006, упакованного в капсиды AAVHSC15, или контроля-носителя.

[0070] На фигуре 10С представлен график, иллюстрирующий соотношение между уровнями фенилаланина и уровнями тирозина в сыворотке у мышей, которые получали либо вектор рНМІ-һРАН-мАС-006, упакованный в капсиды AAVHSC15, либо контроль-носитель.

[0071] На фигуре 11А представлен график, иллюстрирующий среднюю эффективность редактирования гена РАН и эффективность трансдукции в клетках, полученных у мышей, которым вводили либо вектор рНМІ-һРАН-мАС-006, либо контроль-носитель.

[0072] На фигуре 11В представлен график, иллюстрирующий относительное количество экспрессируемой мРНК РАН, нормализованное по уровню экспрессии мышиногo GAPDH, в клетках, полученных у мышей, которым вводили вектор рНМІ-һРАН-мАС-006 (AAVHSC15-мРАН) и/или контроль-носитель.

[0073] На фигуре 12А представлена схема, иллюстрирующая HuLiv-гуманизированную модель мышиной печени.

[0074] На фигуре 12В показана средняя эффективность редактирования гена РАН в клетках, полученных у мышей через 1 и 6 недель после введения вектора рНМІК-һРАН-һІІС-032, упакованного в капсиды AAVHSC15.

[0075] На фигуре 13 представлен график, иллюстрирующий среднюю эффективность редактирования гена РАН, определенную с помощью кцПЦР и секвенирования следующего поколения (NGS), в клетках, полученных у мышей HuLiv, которым вводили вектор рНМІК-һРАН-һІІС-032, упакованный в капсиды AAVHSC15.

[0076] На фигуре 14 представлен график, иллюстрирующий средние сывороточные уровни фенилаланина у мышей с моделью нокаута РАН (РАН^{ENU2}), которым внутривенно вводили вектор рНМІК-һРАН-һІІС-032 (һРАН-032) или вектор рНМІ-һРАН-мАС-006 (мРАН-006), упакованный в капсиды AAVHSC15, по сравнению с контрольными мышами.

[0077] На фигуре 15А представлен график, иллюстрирующий взаимосвязь между экспрессией человеческого РАН и уровнями Phe в сыворотке.

[0078] На фигуре 15В представлен график, иллюстрирующий экспрессию человеческого РАН по сравнению с человеческим GAPDH у двух различных мышей

HuLiv, обработанных вектором pHMIK-hPAH-hI1C-032, упакованным в капсиды AAVHSC15.

[0079] На фигуре 16 представлен график, иллюстрирующий экспрессию гена человеческого PAH у обработанных мышей HuLiv (слева), и экспрессию мышинового гена PAH у мышей PAH^{ENU2}, обработанных вектором pHMI-hPAH-mAC-006 (справа), упакованных в капсиды AAVHSC15.

[0080] На фигурах 17A, 17B, 17C, 17D, 17E представлены карты векторов pK1TR-hPAH-mAC-006-HCR, pK1TR-hPAH-hI1C-032-HCR, pK1TR-hPAH-rnAC-006-SD.3, pHMIA2-hPAH-MIC-032-SD.3 и pHMIA2-hPAH-mAC-006-HBB1, соответственно.

Подробное описание изобретения

[0081] Настоящее изобретение относится к композициям аденоассоциированного вируса (AAV), которые могут восстанавливать функцию гена PAH в клетке. Настоящее изобретение также относится к системам упаковки для получения композиций аденоассоциированного вируса.

I. Определения

[0082] Используемый здесь термин «дефектный по репликации аденоассоциированный вирус» означает AAV, содержащий геном, в котором отсутствуют гены Rep и Cap.

[0083] Используемый здесь термин «ген PAH» означает ген фенилаланин-гидроксилазы (PAH), включая, но не ограничиваясь ими, кодирующие области, экзоны, интроны, 5'-UTR, 3'-UTR и области регуляции транскрипции гена PAH. Человеческий ген PAH идентифицирован под идентификационным номером Entrez Gene ID 5053. Репрезентативная нуклеотидная последовательность мРНК PAH представлена как SEQ ID NO: 24. Репрезентативная аминокислотная последовательность полипептида PAH представлена как SEQ ID NO: 23.

[0084] Используемый здесь термин «коррекция мутации в гене PAH» означает инсерцию, делецию или замену одного или более нуклеотидов в локусе-мишени в мутантном гене PAH для получения гена PAH, способного экспрессировать полипептид PAH дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «коррекция мутации в гене PAH» включает встраивание нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере часть полипептида PAH дикого типа или его функционального эквивалента в мутантный ген PAH, так, чтобы полипептид PAH дикого типа или его функциональный эквивалент экспрессировались из локуса мутантного гена PAH (например, под контролем промотора эндогенного гена PAH).

[0085] Используемый здесь термин «корректирующий геном» означает рекомбинантный геном AAV, который способен интегрировать элемент редактирования (например, один или более нуклеотидов или межукулеотидную связь) посредством гомологичной рекомбинации в локус-мишень для коррекции генетического дефекта в гене PAH. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень находится в человеческом гене PAH. Для специалиста в данной области очевидно, что часть

корректирующего генома, содержащая 5'-плечо гомологии, элемент редактирования и 3'-плечо гомологии могут находиться в смысловой или антисмысловой ориентации относительно локуса-мишени (например, человеческого гена РАН).

[0086] Используемый здесь термин «элемент редактирования» означает часть корректирующего генома, которая при его интеграции в локус-мишень, модифицирует этот локус-мишень. Элемент редактирования может опосредовать инсерцию, делецию или замену одного или более нуклеотидов в локусе-мишени. Используемый здесь термин «локус-мишень» означает область хромосомы или межнуклеотидную связь (например, область или межмуклеотидную связь человеческого гена РАН), которая модифицируется элементом редактирования.

[0087] Используемый здесь термин «плечо гомологии» означает часть корректирующего генома, которая расположена у 5'- или 3'-конца элемента редактирования, и которая, по существу, идентична геному, фланкирующему локус-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень находится в человеческом гене РАН, а плечо гомологии содержит последовательность, по существу, идентичную геному, фланкирующему локус-мишень.

[0088] Используемый здесь термин «капсидный белок кладотипа F» означает капсидный белок AAV VP1, VP2 или VP3, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотным последовательностям VP1, VP2 или VP3, представленным здесь, соответственно, аминокислотами 1-736, 138-736 и 203-736 SEQ ID NO: 1.

[0089] Как описано в настоящей заявке, идентичность между двумя нуклеотидными последовательностями или между двумя аминокислотными последовательностями определяют по количеству идентичных нуклеотидов или аминокислот при выравнивании, деленному на полную длину более длинной нуклеотидной или аминокислотной последовательности.

[0090] Используемый здесь термин «заболевание или расстройство, ассоциированное с мутацией гена РАН» означает любое заболевание или расстройство, вызываемое, обостряемое или генетически ассоциированное с изменением гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или расстройство, ассоциированное с мутацией гена РАН, представляет собой фенилкетонурию (ФКУ).

[0091] Используемый здесь термин «молчащая мутация» означает изменение кодирующей последовательности или кодирующей последовательности со встроенным элементом гена (например, путем нуклеотидной замены) без изменения аминокислотной последовательности полипептида, кодируемого кодирующей последовательностью или кодирующей последовательностью со встроенным элементом. Изменение кодонов может быть осуществлено любым способом, известным специалисту в данной области (например, как описано в публикации Mauro & Chappell (2014) Trends Mol Med. 20(11):604-13, которая включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки). Такая молчащая мутация имеет то преимущество, что она снижает вероятность

интеграции корректирующего генома в локусы других генов или псевдогенов, паралогичных гену-мишени. Такая молчащая мутация также снижает гомологию между элементом редактирования и геном-мишенью, и тем самым, уменьшает степень нежелательной интеграции, опосредованной элементом редактирования, а не плечом гомологии.

[0092] Используемый здесь термин «кодирующая последовательность» означает часть комплементарной ДНК (кДНК), которая кодирует полипептид, начиная от старт-кодона и заканчивая стоп-кодом. Ген может иметь одну или более кодирующих последовательностей вследствие альтернативного сплайсинга и/или альтернативной инициации трансляции. Кодированная последовательность может быть либо дикого типа, либо может иметь молчащую мутацию. Типичная кодирующая последовательность РАН дикого типа представлена в SEQ ID NO: 24.

[0093] Используемый здесь термин «кодирующая последовательность гена со встроенным интроном» означает нуклеотидную последовательность, содержащую один или более интронов, встроенных в кодирующую последовательность гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере один из интронов представляет собой ненативный интрон, то есть имеет последовательность, отличающуюся от нативного интрона гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, все интроны в кодирующей последовательности со встроенным интроном представляют собой ненативные интроны. Ненативный интрон может иметь последовательность интрона другого вида или последовательность интрона другого гена того же вида. Альтернативно или дополнительно, по меньшей мере часть последовательности ненативного интрона может быть синтетической. Специалисту в данной области очевидно, что последовательности ненативного интрона могут быть сконструированы для опосредования сплайсинга РНК путем введения любых консенсусных мотивов сплайсинга, известных специалистам в данной области. Типичные консенсусные мотивы сплайсинга представлены в публикации Sibley et al., (2016) *Nature Reviews Genetics*, 17, 407-21, которая включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Инсерция ненативного интрона может повышать эффективность и надежность векторной упаковки, поскольку промежуточные последовательности позволяют корректировать вектор до достижения оптимального размера (например, 4,5-4,8 т.п.о.). В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере один из интронов является нативным интроном гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, все интроны в кодирующей последовательности со встроенным интроном являются нативными интронами гена. Ненативные или нативные интроны могут быть встроены в любые положения межнуклеотидных связей в кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более ненативных или нативных интронов встраивают в положения межнуклеотидных связей, которые, как было предсказано, способствуют эффективному сплайсингу (см., например, публикацию Zhang (1998) *Human Molecular Genetics*, 7(5):919-32, которая включена в настоящее описание в

полном объеме посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более ненативных или нативных интронов встроены в положения межнуклеотидных связей, которые связывают два эндогенных экзона.

[0094] Используемый здесь термин «элемент вырезания рибосомы» означает нуклеотидную последовательность, кодирующую короткую пептидную последовательность, способную образовывать две пептидных цепи при трансляции одной молекулы мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент вырезания рибосомы кодирует пептид, содержащий консенсусный мотив $X_1X_2EX_3NPGP$, где X_1 представляет собой D или G; X_2 представляет собой V или I, а X_3 представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 75). В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент вырезания рибосомы кодирует пептид вируса Тосиасунья 2А (Т2А), пептид свиного тековируса-1 2А (Р2А), пептид вируса ящура 2А (F2А); пептид 2А вируса лошадиного ринита А (Е2А), пептид 2А вируса цитоплазматического полиедроза (BmCPV 2А) или пептид 2А вируса лихорадки В. mori (BmIFV 2А). Репрезентативные аминокислотные последовательности пептида Т2А и пептида Р2А представлены в SEQ ID NO: 76 и 77, соответственно. Репрезентативные нуклеотидные последовательности элемента Т2А и элемента Р2А представлены в SEQ ID NO: 78 и 79, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент вырезания рибосомы кодирует пептид, который дополнительно содержит последовательность Gly-Ser-Gly у N-конца, где, но необязательно, последовательность Gly-Ser-Gly кодируется нуклеотидной последовательностью GGCAGCGGA. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что элементы вырезания рибосомы функционируют посредством терминации трансляции первой пептидной цепи и повторной инициации трансляции второй пептидной цепи; или посредством расщепления пептидной связи в пептидной последовательности, кодируемой элементом вырезания рибосомы под действием природной протеазной активности кодируемого пептида, или другой протеазой окружающей среды (например, в цитозоле).

[0095] Используемый здесь термин «пептид вырезания рибосомы» означает пептид, кодируемый элементом вырезания рибосомы.

[0096] Используемый здесь термин «последовательность полиаденилирования» означает последовательность ДНК, которая при транскрибировании в РНК образует сигнальную последовательность полиаденилирования. Последовательность полиаденилирования может быть нативной (например, может происходить от гена РАН) или экзогенной. Экзогенная последовательность полиаденилирования может представлять собой последовательность полиаденилирования млекопитающего или вирусную последовательность полиаденилирования (например, последовательность полиаденилирования SV40).

[0097] В настоящем изобретении, нуклеотидные положения в гене РАН указаны относительно первого нуклеотида старт-кодона. Первый нуклеотид старт-кодона представляет собой положение 1; нуклеотиды, расположенные у 5'-конца по отношению к

первому нуклеотиду старт-кодона, имеют отрицательные значения; а нуклеотиды, расположенные у 3'-конца по отношению к первому нуклеотиду старт-кодона, имеют положительные значения. Используемый здесь нуклеотид 1 человеческого гена РАН представляет собой нуклеотид 5473 эталонной последовательности NCBI:NG_008690.1, а нуклеотид -1 человеческого гена РАН представляет нуклеотид 5472 эталонной последовательности NCBI:NG_008690.1.

[0098] В настоящем изобретении, экзоны и интроны в гене РАН указаны по отношению к экзону, охватывающему первый нуклеотид старт-кодона, который представляет собой нуклеотид 5473 эталонной последовательности NCBI:NG_008690.1. Экзон, охватывающий первый нуклеотид старт-кодона, представляет собой экзон 1. Экзоны у 3'-конца по отношению к экзону 1, расположены от 5'- до 3'-конца в следующем порядке: экзон 2, экзон 3 и т.п. Интроны у 3'-конца по отношению к экзону 1, расположены от 5'- до 3'-конца в следующем порядке: интрон 1, интрон 2 и т.п. В соответствии с этим, ген РАН включает от 5'- до 3'-конца: экзон 1, интрон 1, экзон 2, интрон 2, экзон 3 и т.п. В данном описании, экзон 1 человеческого гена РАН представляет собой нуклеотиды 5001-5532 эталонной последовательности NCBI:NG_008690.1, а интрон 1 человеческого гена РАН представляет собой нуклеотиды 5533-9704 эталонной последовательности NCBI:NG_008690.1.

Используемый здесь термин «интеграция» означает введение элемента редактирования в локус-мишень (например, гена РАН) посредством гомологичной рекомбинации между корректирующим геномом и локусом-мишенью. Интеграция элемента редактирования может приводить к замене, инсерции и/или делеции одного или более нуклеотидов в локусе-мишени (например, гена РАН).

[0099] Используемый здесь термин «эффективность интеграции элемента редактирования в локус-мишень» означает процент клеток в трансдуцированной популяции, в которых наблюдается интеграция элемента редактирования в локус-мишень.

[00100] Используемый здесь термин «частота аллельной интеграции элемента редактирования в локус-мишень» означает процент аллелей в популяции трансдуцированных клеток, в которых происходит интеграция элемента редактирования в локус-мишень.

[00101] Используемый здесь термин «стандартные условия введения AAV» означает трансдукцию человеческих гепатоцитов, имплантированных мышам после удаления гепатоцитов, где AAV вводят внутривенно в дозе 1×10^{13} векторных геномов на килограмм массы тела, как описано в способе примера 5, в Разделе b.

[00102] Используемый здесь термин «эффективное количество», если он относится к введению AAV индивидууму, означает количество AAV, которое достигает желаемого профилактического или терапевтического эффекта.

II. Композиции аденоассоциированного вируса

[00103] В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к новым композициям, полученным на основе дефектных по репликации AAV и используемым для

восстановления экспрессии РАН в клетках с пониженной или каким-либо иным способом нарушенной функцией гена РАН. Такие композиции AAV являются высокоэффективными для коррекции мутаций в гене РАН или восстановления экспрессии РАН и не требуют расщепления генома в локусе-мишени под действием экзогенной нуклеазы (например, мегануклеазы, нуклеазы «цинковый палец», нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN) или РНК-зависимой нуклеазы, такой как Cas9), для облегчения такой коррекции. В соответствии с этим, в некоторых вариантах осуществления изобретения, описанная здесь композиция AAV не содержит экзогенную нуклеазу или нуклеотидную последовательность, которая кодирует экзогенную нуклеазу.

[00104] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь AAV содержит: капсид AAV и корректирующий геном для редактирования локуса-мишени в гене РАН. Капсидные белки AAV, которые могут быть использованы в описанных здесь композициях AAV, включают, но не ограничиваются ими, капсидные белки AAV и их производные, происходящие от AAV кладотипа А, AAV кладотипа В, AAV кладотипа С, AAV кладотипа D, AAV кладотипа Е и AAV кладотипа F. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV или его производное AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVS, AAV9 или AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит капсидный белок AAV кладотипа F.

[00105] Любой капсидный белок AAV кладотипа F или его производное могут быть использованы в описанных здесь композициях AAV. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17, где: аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой С; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой Н; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой А, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2,

представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 из SEQ ID NO: 2, представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[00106] Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

[illegible]

I, аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[00107] Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17, где: аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 SEQ ID NO: 2, представляет собой T; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 68 SEQ ID NO: 2, представляет собой V; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 SEQ ID NO: 2, представляет собой L; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 SEQ ID NO: 2, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке,

соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 SEQ ID NO: 2, представляет собой T, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 SEQ ID NO: 2, представляет собой I, и аминокислота в капсидный белок, соответствующий аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой Y. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 SEQ ID NO: 2, представляет собой L, а аминокислота в капсидном белке соответствует аминокислотой 468 SEQ ID NO: 2, представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[00108] В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит

два или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В некоторых вариантах воплощения капсид AAV содержит: (а) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17; (b) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17; и (с) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[00109] В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит один или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 8; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 8; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит один или более из: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 8; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 8; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит два или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 8; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 8; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит: (а) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 8; (b) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из

аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 8; и (с) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 8.

[00110] В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит один или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 11; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 11; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит один или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 11; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 11; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит два или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 11; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 11; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит: (а) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 11; (b) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 11; и (с) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 11.

[00111] В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит один или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 13; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 13; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит один или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 13; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 13; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит два или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 13; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 13; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит: (а) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 13; (b) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 13; и (с) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 13.

[00112] В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит один или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 16; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 16; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит один или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 16; (b) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 16; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотную последовательность аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит два или более: (а) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 16; (b) капсидных белков

кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 16; и (с) капсидных белков кладотипа F, содержащих аминокислотная последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV содержит: (а) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 16; (b) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 16; и (с) капсидный белок кладотипа F, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 16.

[00113] Корректирующие геномы, используемые в описанных здесь композициях AAV, обычно включают: (i) элемент редактирования локуса-мишени в гене РАН; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную у 5'-конца элемента редактирования, гомологичного первой геномной области, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени; и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную у 3'-конца элемента редактирования, гомологичного второй геномной области, расположенной у 3'-конца по отношению к локусу-мишени; где часть корректирующего генома, содержащая 5'-плечо гомологии, элемент редактирования и 3'-плечо гомологии может присутствовать в смысловой или в антисмысловой ориентации по отношению к локусу гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность 5'-инвертированного концевой повтора (5'-ITR), расположенную у 5'-конца нуклеотидной последовательности 5'-плеча гомологии, и нуклеотидную последовательность 3'-инвертированного концевой повтора (3'-ITR), расположенную у 3'-конца нуклеотидной последовательности 3'-плеча гомологии.

[00114] Элементы редактирования, используемые в описанных здесь корректирующих геномах, могут опосредовать инсерцию, делецию или замену одного или более нуклеотидов в локусе-мишени.

[00115] В некоторых вариантах осуществления изобретения, при правильной интеграции посредством гомологичной рекомбинации в локус-мишень, элемент редактирования встраивает нуклеотидную последовательность, включающую по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН, в мутантный ген РАН, в результате чего полипептид РАН дикого типа или его функциональный эквивалент экспрессируются из мутантного локуса гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит полноразмерную кодирующую последовательность РАН (например, кодирующую последовательность РАН дикого типа или кодирующую последовательность РАН с молчащей модификацией). В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит нуклеотиды 4-1359 кодирующей последовательности РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН (например, содержащую интрон, встроенный в кодирующую

последовательность РАН дикого типа или с молчащей модификацией).

[00116] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН кодирует полипептид РАН дикого типа (например, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН представляет собой последовательность дикого типа (например, содержащую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24). В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН имеет молчащую модификацию, которая менее, чем на 100% (например, менее чем на 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% или 50%) идентична соответствующим экзонам гена РАН дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25. в некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН кодирует полипептид РАН дикого типа (например, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит по меньшей мере один (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) интрон, встроенный в кодирующую последовательность РАН. Интрон может содержать последовательность нативного интрона гена РАН, последовательность интрона другого вида или другого гена того же вида и/или синтетическую интронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ненативной интрон имеет длину не более, чем 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 или 2000 нуклеотидов. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что интроны могут повышать уровень экспрессии трансгена, например, посредством уменьшения сайленсинга транскрипции и увеличения экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Для специалиста в данной области очевидно, что синтетические интронные последовательности могут быть сконструированы для опосредования сплайсинга РНК путем введения любых консенсусных мотивов сплайсинга, известных специалистам в данной области (см., например, публикацию Sibley et al., (2016) *Nature Reviews Genetics*, 17, 407-21, которая включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки). Репрезентативные интронные последовательности представлены в публикации Lu et al. (2013) *Molecular Therapy* 21 (5): 954-63, и Lu et al. (2017) *Hum. Gene Ther.* 28 (1): 125-34, которая включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит первый интрон гена гемоглобина-бета любого вида (например, человека, мыши или кролика). В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит первый интрон

человеческого гена HBB (например, содержащий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит первый интрон мышинового гена HBB (например, содержащий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит интрона мышинового «минут»-вируса (MVM) (например, содержащий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 30).

[00117] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит химерный интрон MVM (также называемый здесь ChiMVM), например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит интрон SV40, например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит аденовирусный трехкомпонентный лидерный интрон (также называемый здесь AdTPL), например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 122. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит интрон мини-b-глобина (также называемый здесь MmiBGlobin), например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 123. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит химерный интрон AdV/Ig (также называемый здесь AdVIgG), например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит интрон тяжелой цепи Ig β -глобина (также называемый здесь Bglobinlg), который представляет собой химерный интрон, содержащий донорную область сплайсинга β -глобина и акцепторную область сплайсинга тяжелой цепи IgG, например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 125. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит интрон Wu MVM (также называемый здесь Wu MVM), который

представляет собой вариант интрона MVM дикого типа, например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 126. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит элемент HCR1 (также называемый здесь OptHCR), например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит интрон β -глобина (также называемый здесь Bglobin), например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 128. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит интрон фактора IX (также называемый здесь интроном tFIX или FIX), например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит интрон ch2BLood (также называемый здесь BioodEnh), например, содержащий нуклеотидную последовательность или состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН кодирует полипептид РАН дикого типа (например, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит часть кодирующей последовательности РАН, которая при сплайсинге образует полноразмерную кодирующую последовательность РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН представляет собой последовательность дикого типа (например, содержащую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24). В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН имеет молчащую модификацию, которая менее, чем на 100% (например, менее, чем на 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% или 50%) идентична соответствующим экзонам гена РАН дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80, 81, 82, 131, 132 или 143. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 80, 81, 82, 131, 132 или 143. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 80, 81, 82, 131, 132 или 143.

[00118] Интрон может быть встроен в любом положении в кодирующей последовательности РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, интрон встраивают в положение, соответствующее межнуклеотидной связи, которая связывает два нативных экзона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, интрон встраивают в положение, соответствующем межнуклеотидной связи, которая связывает нативный экзон 8 и экзон 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН, содержит от 5'- до 3'-конца: первую часть кодирующей последовательности РАН, интрон и вторую часть кодирующей последовательности РАН, где первая часть и вторая часть, при сплайсине, образуют полноразмерную кодирующую последовательность РАН (например, кодирующую последовательность РАН дикого типа или кодирующую последовательность РАН с молчащей модификацией). В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая часть кодирующей последовательности РАН содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64 или 65, и/или вторая часть кодирующей последовательности РАН содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66 или 67. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая часть кодирующей последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64 или 65, а вторая часть кодирующей последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66 или 67. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая часть кодирующей последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 65, а вторая часть кодирующей последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит от 3'- до 5'-конца: первую часть кодирующей последовательности РАН, состоящую из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64, или ее вариант с молчащей модификацией (например, состоящий из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 65);

интрон (например, состоящий из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28, 29 или 30); и вторую часть кодирующей последовательности РАН, состоящую из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66, или ее вариант с молчащей модификацией (например, состоящий из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66).

[00119] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН содержит модифицированный донорный сайт сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН, модифицированная донорным сайтом сплайсинга, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 138 или 139. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН, модифицированная донорным сайтом сплайсинга, содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 138 или 139. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодирующая последовательность РАН с модифицированным донорным сайтом сплайсинга состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 138 или 139.

[00120] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования дополнительно содержит терминатор транскрипции, расположенный у 3'-конца кодирующей последовательности РАН или кодирующей последовательности со встроенным интроном РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терминатор транскрипции содержит последовательность полиаденилирования (например, экзогенную последовательность полиаденилирования). В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность экзогенного полиаденилирования содержит последовательность полиаденилирования SV40 (например, содержащую нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-34 или, комплементарной ей последовательности). В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность полиаденилирования SV40 содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит от 5'- до 3'-конца: кодирующую последовательность РАН (например, содержащую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25), или кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН, (например, содержащую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80), и последовательность полиаденилирования SV40 (например, содержащую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31).

[00121] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования может дополнительно содержать ID-кластер, расположенный у 5'-конца последовательности полиаденилирования SV40 (например, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31). ID-кластер вводит последовательность, которая может быть использована в целях идентификации при

проведении экспериментов по секвенированию следующего поколения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ID-кластер содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ID-кластер содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ID-кластер состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит от 5'- до 3'-конца: кодирующую последовательность РАН или кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН, ID-кластер, и последовательность полиаденилирования SV40.

[00122] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования также содержит элемент вырезания рибосомы, расположенный у 5'-конца по отношению к кодирующей последовательности РАН или кодирующей последовательности со встроенным интроном РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит от 5'- до 3'-конца: элемент вырезания рибосомы; кодирующую последовательность РАН или кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН; и, необязательно, терминатор транскрипции (например, последовательность полиаденилирования). В некоторых вариантах осуществления изобретения, вышеупомянутые элементы редактирования могут быть интегрированы в экзон гена РАН (например, в нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени в экзоне гена РАН) посредством гомологичной рекомбинации с получением рекомбинантной последовательности, содержащей от 5'- до 3'-конца: часть гена РАН, расположенную у 5'-конца по отношению к локусу-мишени; элемент вырезания рибосомы; кодирующую последовательность РАН или кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН; и терминатор транскрипции (например, последовательность полиаденилирования), где элемент вырезания рибосомы расположен так, что он находится в одной рамке считывания с частью гена РАН, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени и полноразмерной кодирующей последовательности РАН. Транскрипция и трансляция этой рекомбинантной последовательности продуцирует первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую частью гена РАН, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, связанному с 5'-частью кодируемого пептида вырезания рибосомы, и второй полипептид, содержащий 3'-часть кодируемого пептида вырезания рибосомы, связанного с полноразмерной аминокислотной последовательностью полипептида РАН.

[00123] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, присутствует в экзоне (например, в экзоне 1, в экзоне 2, в экзоне 3, в экзоне 4, в экзоне 5, в экзоне 6, в экзоне 7, в экзоне 8, в экзоне 9, в экзоне 10, в экзоне 11, в экзоне 12 или в экзоне 13) гена РАН. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой межнуклеотидную связь в экзоне (например, в экзоне 1, в экзоне 2, в экзоне 3, в экзоне 4, в экзоне 5, в экзоне 6, в экзоне 7, в экзоне 8, в экзоне 9, в экзоне 10, в экзоне 11, в экзоне 12 или в экзоне 13) гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой последовательность в гене РАН, где 5'-конец этой последовательности находится в экзоне (например, в экзоне 1, в экзоне 2, в экзоне 3, в экзоне 4, в экзоне 5, в экзоне 6, в экзоне 7, в экзоне 8, в экзоне 9, в экзоне 10, в экзоне 11, в экзоне 12 или в экзоне 13) гена РАН или в межгенной области между гомологом *Achaete-scute 1* (*ASCL1*) и РАН, и где 3'-конец этой последовательности может быть любым нуклеотидом в гене РАН или в межгенной области между РАН и инсулиноподобным фактором роста 1 (*IGF1*). В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени находится в экзоне 1, в экзоне 2, или в экзоне 3 гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой межнуклеотидную связь в экзоне 1, экзоне 2 или экзоне 3 гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой последовательность в гене РАН, где 5'-конец этой последовательности находится в экзоне 1, в экзоне 2 или в экзоне 3 гена РАН, где 3'-конец этой последовательности может быть любым нуклеотидом в гене РАН или в межгенной области между РАН и *IGF1*.

[00124] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит акцептор сплайсинга, расположенный у 5'-конца по отношению к элементу вырезания рибосомы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит от 5'- до 3'-конца: акцептор сплайсинга; элемент вырезания рибосомы; кодирующую последовательность РАН или кодирующую со встроенным интроном РАН; и, необязательно, терминатор транскрипции (например, последовательность полиаденилирования). В некоторых вариантах осуществления изобретения, вышеупомянутый элемент редактирования может быть интегрирован в интрон гена РАН (например, нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени находится в интроне гена РАН) посредством гомологичной рекомбинации с получением рекомбинантной последовательности, содержащей от 5'- до 3'-конца: часть гена РАН, расположенную у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, включая эндогенный донорный сайт сплайсинга, но не эндогенный акцептор сплайсинга интрона; акцептор сплайсинга; элемент вырезания рибосомы; кодирующую последовательность РАН или кодирующую последовательность РАН со встроенным интроном; и терминатор транскрипции (например, последовательность полиаденилирования), где элемент вырезания рибосомы расположен так, что он находится в одной рамке считывания с кодирующей последовательностью РАН или кодирующей последовательностью со встроенным интроном РАН, и так, что сплайсинг акцептора сплайсинга с эндогенным донором сплайсинга интрона РАН происходит в одной рамке считывания с частью гена РАН, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени. Экспрессия этой рекомбинантной последовательности продуцирует первый полипептид, содержащий

аминокислотную последовательность, кодируемую частью гена РАН, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, связанному с 5'-частью кодируемого пептида вырезания рибосомы, и второй полипептид, содержащий полноразмерную аминокислотную последовательность полипептида РАН, присоединенного к 3'-части кодируемого пептида вырезания рибосомы.

[00125] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, находится в интроне (например, в интроне 1, в интроне 2, в интроне 3, в интроне 4, в интроне 5, в интроне 6, в интроне 7, в интроне 8, в интроне 9, в интроне 10, в интроне 11 или в интроне 12) гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой межнуклеотидную связь в интроне (например, в интроне 1, в интроне 2, в интроне 3, в интроне 4, в интроне 5, в интроне 6, в интроне 7, в интроне 8, в интроне 9, в интроне 10, в интроне 11, или в интроне 12) гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой последовательность гена РАН, где 5'-конец этой последовательности находится в интроне (например, в интроне 1, в интроне 2, в интроне 3, в интроне 4, в интроне 5, в интроне 6, в интроне 7, в интроне 8, в интроне 9, в интроне 10, в интроне 11 или в интроне 12) гена РАН, где 3'-концом этой последовательности может быть любой нуклеотид в гене РАН или в межгенной области между РАН и IGF1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, находится в интроне 1, интроне 2 или интроне 3 гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой межнуклеотидную связь в интроне 1, интроне 2 или интроне 3 гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой последовательность в гене РАН, где 5'-конец этой последовательности находится в интроне 1, в интроне 2 или в интроне 3 гена РАН, где 3'-конец этой последовательности может быть любым нуклеотидом в гене РАН или в межгенной области между РАН и IGF1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, находится в интроне 1 гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой последовательность в гене РАН, где 5'-конец этой последовательности находится в интроне 1 гена РАН, где 3'-конец этой последовательности может быть любым нуклеотидом в гене РАН или в межгенной области между РАН и IGF1.

[00126] Любой и все описанные здесь элементы редактирования могут также содержать сайт рестриктирующей эндонуклеазы, не присутствующий в гене РАН дикого типа. Такие сайты рестриктирующей эндонуклеазы позволяют идентифицировать клетки, которые имеют элемент редактирования, интегрированный в локусе-мишени, исходя из анализа на полиморфизм длин рестрикционных фрагментов или анализа путем секвенирования нуклеиновых кислот в локусе-мишени и в его фланкирующих областях или нуклеиновых кислот, амплифицированных из этих нуклеиновых кислот.

[00127] Любой и все описанные здесь элементы редактирования могут содержать

одну или более нуклеотидных модификаций, которые вызывают одну или более аминокислотных мутаций в полипептиде РАН при интеграции в локус-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутантный полипептид РАН представляет собой функциональный эквивалент полипептида РАН дикого типа, то есть, он может функционировать как полипептид РАН дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, функционально эквивалентный полипептид РАН дополнительно обладает по меньшей мере одним свойством, не обнаруженным в полипептиде РАН дикого типа, например способностью стабилизировать белок РАН (например, димер или тетрамер) или способностью предотвращать разложение белка.

[00128] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь элемент редактирования содержит по меньшей мере 0, 1, 2, 10, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 или 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит, или состоит из них, от 1 до 5000, от 1 до 4500, от 1 до 4000, от 1 до 3000, от 1 до 2000, от 1 до 1000, от 1 до 500, от 1 до 200, от 1 до 100, от 1 до 50 или от 1 до 10 нуклеотидов.

[00129] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь элемент редактирования содержит, или состоит из них, кодирующую последовательность РАН или ее часть (например, полноразмерную кодирующую последовательности человеческого РАН или нуклеотиды 4-1359 кодирующей последовательности человеческого РАН); 5'-нетранслируемую область (UTR), 3'-UTR, промотор, донор сплайсинга, акцептор сплайсинга, последовательность, кодирующую некодирующую РНК, изолятор, ген или их комбинацию.

[00130] В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 35, 83 или 84. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, 83 или 84. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 35, 83 или 84. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 147, 148, 149, 150, 151, 152 или 153. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 147, 148, 149, 150, 151, 152 или 153. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элемент редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 147, 148, 149, 150, 151, 152 или 153.

[00131] Плечи гомологии, используемые в описанных здесь корректирующих

геномах, могут быть нацелены на любую область гена РАН или на ген, находящийся рядом на геноме. Точную идентичность и расположение плечей гомологии определяют по идентичности элемента редактирования и/или локуса-мишени.

[00132] Плечи гомологии, используемые в описанных здесь корректирующих геномах, являются, по существу, идентичными геному, фланкирующему локус-мишень (например, локус-мишень в гене РАН). В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% (например, по меньшей мере, приблизительно на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентична нуклеотидной последовательности первой геномной области, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии имеет нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична нуклеотидной последовательности первой геномной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% (например, по меньшей мере, приблизительно на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентична нуклеотидной последовательности первой геномной области, расположенной у 3'-конца по отношению к локусу-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии имеет нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична нуклеотидной последовательности первой геномной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'- и 3'-плечи гомологии по меньшей мере приблизительно на 90% (например, по меньшей мере, приблизительно на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичны нуклеотидной последовательности первой и второй геномным областям, фланкирующим локус-мишень (например, локус-мишень в гене РАН), соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'- и 3'-плечи гомологии на 100% идентичны первой и второй геномным областям, фланкирующим локус-мишень (например, локус-мишень в гене РАН), соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, различия в нуклеотидных последовательностях 5'-плеча гомологии и/или 3'-плеча гомологии и в соответствующих областях генома, фланкирующего локус-мишень, включают, по существу состоят или состоят из них, различия в некодирующих нуклеотидных последовательностях.

[00133] Для специалистов в данной области очевидно, что плечи гомологии не обязательно должны быть на 100% идентичны геномной последовательности, фланкирующей локус-мишень, и обладать способностью опосредовать интеграцию элемента редактирования в локус-мишень посредством гомологичной рекомбинации. Так, например, плечи гомологии могут содержать одну или более генетических модификаций у групп людей и/или одну или более модификаций (например, нуклеотидных замен, инсерций или делеций), введенных для повышения уровня или специфичности экспрессии. Генетические модификации у человека включают как наследственные модификации, так и модификации *de novo*, которые являются уникальными для генома-

мишени и охватывают простые полиморфизмы, инсерции, делеции, реарранжировки, инверсии, дубликации, микроповторы нуклеотидов и их комбинации. Такие модификации известны специалистам в данной области и имеются, например, в базах данных dnSNP (см. Sherry et al. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(1):308-11), в базе данных геномных вариантов (см. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42 (Database issue):D986-92), ClinVar (см. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42 (Database issue): D980-D985), Genbank (см. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (Database issue): D67-D72), ENCODE (genome.ucsc.edu/encode/terms.html), JASPAR (см. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D260-D266), и PROMO (см. Messeguer et al. *Bioinformatics* 2002; 18(2):333-334; Farré et al. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13):3651-3653), каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки. Специалисту в данной области также очевидно, что в тех случаях, когда плечо гомологии не идентично на 100% геномной последовательности, фланкирующей локус-мишень, гомологичная рекомбинация между плечом гомологии и геномом может изменять геномную последовательность, фланкирующую локус-мишень, таким образом, что она становится идентичной используемой последовательности плеча гомологии.

[00134] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая геномная область, расположенная у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, находится в первом окне редактирования, где первое окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая геномная область, расположенная у 3'-конца по отношению к локусу-мишени, находится во втором окне редактирования, где второе окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая геномная область, расположенная у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, находится в первом окне редактирования, где первое окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, а вторая геномная область, расположенная у 3'-конца по отношению к локусу-мишени, находится во втором локусе-мишени РАН, где второе окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

[00135] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое и второе окна редактирования являются различными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое окно редактирования расположено у 5'-конца по отношению ко второму окну редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая геномная область состоит из последовательности, которая короче, чем последовательность первого окна редактирования, в котором находится первая геномная область. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая геномная область состоит из последовательности первого окна редактирования, в котором находится первая геномная область. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая геномная область состоит из последовательности, которая короче, чем последовательность второго окна редактирования, в котором находится вторая геномная область. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, вторая геномная область состоит из последовательности, второго окна редактирования, в котором находится вторая геномная область. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая геномная область, расположенная у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая геномная область, расположенная у 3'-конца по отношению к локусу-мишени, имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая геномная область, расположенная у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, и вторая геномная область, расположенная у 3'-конца по отношению к локусу-мишени, имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 36 и 45, соответственно.

[00136] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое и второе окна редактирования являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус-мишень представляет собой межнуклеотидную связь или нуклеотидную последовательность в окне редактирования, где первая геномная область состоит из первой части окна редактирования, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, а вторая геномная область состоит из второй части окна редактирования, расположенной у 3'-конца по отношению к локусу-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая часть окна редактирования состоит из последовательности, расположенной у 5'-конца окна редактирования по отношению к нуклеотиду, находящемуся непосредственно у 5'-конца по отношению к локусу-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая часть окна редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, расположенной непосредственно у 3'-конца по отношению к локусу-мишени, находящемуся у 3'-конца окна редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая часть окна редактирования состоит из последовательности, находящейся у 5'-конца окна редактирования по отношению к нуклеотиду, расположенному непосредственно у 3'-конца по отношению к локусу-мишени, а вторая часть окна редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, расположенной непосредственно у 3'-конца по отношению к локусу-мишени, находящемуся у 3'-конца окна редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения, окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 или 45. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая и вторая части окон редактирования имеют по существу одинаковые длины (например, отношение длины более короткой части к длине более длинной части составляет более, чем 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7; 0,75; 0,8; 0,85; 0,9; 0,95; 0,96; 0,97; 0,98 или 0,99).

[00137] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии имеет длину приблизительно от 50 и до приблизительно 4000 нуклеотидов (например, приблизительно от 100 и приблизительно до 3000, приблизительно от 200 и приблизительно до 2000, приблизительно от 500 и приблизительно до 1000 нуклеотидов).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии имеет длину приблизительно 800 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии имеет длину приблизительно 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии имеет длину приблизительно от 50 и приблизительно до 4000 нуклеотидов (например, приблизительно от 100 и приблизительно до 3000, приблизительно от 200 и приблизительно до 2000, приблизительно от 500 и приблизительно до приблизительно 1000 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии имеет длину приблизительно 800 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии имеет длину приблизительно 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждое из 5'- и 3'-плеч гомологии независимо имеет длину приблизительно от 50 и приблизительно до 4000 нуклеотидов (например, приблизительно от 100 и приблизительно до 3000, приблизительно от 200 и приблизительно до 2000, приблизительно от 500 и приблизительно до 1000 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'- и 3'-плечи гомологии имеют длину приблизительно 800 нуклеотидов.

[00138] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'- и 3'-плечи гомологии имеют по существу равные длины нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'- и 3'-плечи гомологии имеют асимметричные длины нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, асимметрию длин нуклеотидов определяют по различию между 5'- и 3'-плечами гомологии длиной до 90%, например, до 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10%.

[00139] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии содержит: С, соответствующий нуклеотиду -2 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 4 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 6 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 7 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 9 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -467 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -465 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -181 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду -214 гена РАН; С, соответствующий нуклеотиду -212 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 194 гена РАН; С, соответствующий нуклеотиду -433 гена РАН; С, соответствующий нуклеотиду -432 гена РАН; ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68), соответствующую нуклеотидам от -394 до -388 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -341 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -339 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -225 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН; и/или А, соответствующий нуклеотиду -203 гена РАН.

[00140] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии содержит:

(а) С, соответствующий нуклеотиду -2 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 4 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 6 гена РАН; G, соответствующий

нуклеотиду 7 гена РАН; и G, соответствующий нуклеотиду 9 гена РАН;

(b) A, соответствующий нуклеотиду -467 гена РАН, и A, соответствующий нуклеотиду -465 гена РАН;

(c) A, соответствующий нуклеотиду -181 гена РАН;

(d) G, соответствующий нуклеотиду -214 гена РАН; C, соответствующий нуклеотиду -212 гена РАН; и A, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН;

(e) G, соответствующий нуклеотиду 194 гена РАН;

(f) C, соответствующий нуклеотиду -433 гена РАН, и C, соответствующий нуклеотиду -432 гена РАН;

(g) ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68), соответствующую нуклеотидам от -394 до -388 гена РАН; и/или

(h) A, соответствующий нуклеотиду -341 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -339 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -225 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН; и A, соответствующий нуклеотид -203 гена РАН.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии содержит:

(a) C, соответствующий нуклеотиду -2 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 4 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 6 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 7 гена РАН; и G, соответствующий нуклеотиду 9 гена РАН;

(b) A, соответствующий нуклеотиду -467 гена РАН; и A, соответствующий нуклеотиду -465 гена РАН;

(c) A, соответствующий нуклеотиду -181 гена РАН;

(d) G, соответствующий нуклеотиду -214 гена РАН, C, соответствующий нуклеотиду -212 гена РАН, и A, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН;

(e) G, соответствующий нуклеотиду 194 гена РАН;

(f) C, соответствующий нуклеотиду -433 гена РАН, и C, соответствующий нуклеотиду -432 гена РАН;

(g) C, соответствующий нуклеотиду -433 гена РАН, и C, соответствующий нуклеотиду -432 гена РАН; и ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68), соответствующую нуклеотидам от -394 до -388 гена РАН; и/или

(h) A, соответствующий нуклеотиду -467 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -465 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -341 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -339 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -225 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН, и A, соответствующий нуклеотиду -203 гена РАН.

[00141] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% (например, по меньшей мере приблизительно на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, и необязательно включает один или более нуклеотидов в положениях,

указанных выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии дополнительно содержит одну или более генетических модификаций у группы людей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44.

[00142] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% (например, по меньшей мере приблизительно на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии дополнительно содержит одну или более генетических модификаций у группы людей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

[00143] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% (например, по меньшей мере приблизительно на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 и 45, соответственно, где необязательно 5'-плечо гомологии содержит один или более нуклеотидов в положениях, указанных выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии содержат нуклеотидные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 36 и 45, 37 и 45, 38 и 45, 39 и 45, 40 и 45, 41 и 45, 42 и 45, 43 и 45 или 44 и 45, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии состоят из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 36 и 45, 37 и 45, 38 и 45, 39 и 45, 40 и 45, 41 и 45, 42 и 45, 43 и 45 или 44 и 45, соответственно.

[00144] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69 или 72. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 69 или 72. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70 или 73. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 70 или 73. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии содержат нуклеотидные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 69 и 70 или 72 и 73, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии

и 3'-плечо гомологии состоят из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 69 и 70 или 72 и 73, соответственно.

[00145] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 111, 115 или 142. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 111, 115 или 142. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 112, 117 или 144. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-плечо гомологии состоит из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 112, 117 или 144. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии содержат нуклеотидные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 111 и 112, 115 и 117 или 142 и 144, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии состоят из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 111 и 112, 115 и 117 или 142 и 144, соответственно.

[00146] В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 99,5%) идентична SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 85, 86, 113, 118, 134, 136 или 145. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 85, 86, 113, 118, 134, 136 или 145. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 85, 86, 113, 118, 134, 136 или 145

[00147] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь корректирующие геномы дополнительно содержат нуклеотидную последовательность 5'-инвертированного концевой повтора (5'-ITR), расположенную у 5'-конца по отношению к нуклеотидной последовательности 5'-плеча гомологии, и нуклеотидную последовательность 3'-инвертированного концевой повтора (3'-ITR), расположенную у 3'-конца по отношению к нуклеотидной последовательности 3'-плеча гомологии. Последовательности ITR AAV любого серотипа или его варианта могут быть использованы в описанных здесь корректирующих геномах. 5'- и 3'-ITR могут происходить от AAV одного и того же серотипа или от AAV различных серотипов. Репрезентативные ITR, используемые в описанных здесь корректирующих геномах, представлены здесь в SEQ ID NO: 18-21. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 5'-ITR и нуклеотидная последовательность 3'-ITR по существу комплементарны друг другу (например, являются комплементарными друг другу, за исключением ошибочного спаривания в положениях

нуклеотидов 1, 2, 3, 4 или 5 в 5'- или 3'-ITR).

[00148] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR или 3'-ITR происходят от AAV2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR и 3'-ITR происходят от AAV2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% (например, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 18, или нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% (например, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% (например, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 18, и нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% (например, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит элемент редактирования, имеющий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, нуклеотидную последовательность 5'-ITR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 18, и нуклеотидную последовательность 3'-ITR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 46-54, нуклеотидную последовательность 5'-ITR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 18, и нуклеотидную последовательность 3'-ITR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном состоит, от 5'- до 3'-конца, из нуклеотидной последовательности 5'-ITR, имеющей последовательность SEQ ID NO: 18, нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 46-54, и нуклеотидной последовательности 3'-ITR, имеющей последовательность SEQ ID NO: 19.

[00149] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR или 3'-ITR происходят от AAV5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR и 3'-ITR происходят от AAV5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% (например, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 20, или нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% (например, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере

на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 20, и нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% (например, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100%) идентична последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит элемент редактирования, имеющий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, нуклеотидную последовательность 5'-ITR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеотидную последовательность 3'-ITR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 46-54, нуклеотидную последовательность 5'-ITR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеотидную последовательность 3'-ITR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном состоит, от 5'- до 3'-конца, из нуклеотидной последовательности 5'-ITR, имеющей последовательность SEQ ID NO: 20, нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 46-54, и нуклеотидной последовательности 3'-ITR, имеющей последовательность SEQ ID NO: 21.

[00150] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 5'-ITR и нуклеотидная последовательность 3'-ITR по существу комплементарны друг другу (например, комплементарны друг другу, за исключением ошибочного спаривания в положениях нуклеотидов 1, 2, 3, 4 или 5 в 5'-ITR или 3'-ITR).

[00151] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR или 3'-ITR модифицируют для снижения или отмены разделения под действием белка Rep («неразделяемый ITR»). В некоторых вариантах осуществления изобретения, неразделяемый ITR включает инсерцию, делецию или замену в нуклеотидной последовательности концевой сайта разделения. Такая модификация позволяет получить аутокомплемментарный двухцепочечный геном ДНК AAV после репликации генома для переноса в инфицированную клетку. Репрезентативные неразделяемые последовательности ITR известны специалистам в данной области (см., например, последовательности, представленные в патентах США №№ 7790154 и 9783824, которые включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентична SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентична SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-ITR содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или

99%, идентична SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентична SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, а 3'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, а 3'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19.

[00152] В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-ITR фланкирован дополнительной нуклеотидной последовательностью, происходящей от геномной последовательности AAV2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-ITR фланкирован дополнительной 37 п.о.-последовательностью, происходящей от последовательности AAV2 дикого типа, смежной с ITR AAV2 дикого типа. См., например, публикацию Savy et al., Human Gene Therapy Methods (2017) 28 (5): 277-289 (которая включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления изобретения, дополнительная 37 п.о.-последовательность является внутренней по отношению к 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 37 п.о.-последовательность состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-ITR содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-ITR содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 3'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность 3'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 141.

[00153] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь корректирующий геном имеет длину приблизительно от 0,5 и приблизительно до 8 т.п.о. (например, приблизительно от 1 и приблизительно до 5, приблизительно от 2 и приблизительно до 5, приблизительно от 3 и приблизительно до 5, приблизительно от 4 и приблизительно до 5, приблизительно от 4,5 до 4,8 или приблизительно 4,7 т.п.о.).

[00154] В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 99,5%) идентична SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 87, 88, 114, 119, 135, 137 или 146. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном

содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 87, 88, 114, 119, 135, 137 или 146. В некоторых вариантах осуществления изобретения, корректирующий геном состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 87, 88, 114, 119, 135, 137 или 146.

[00155] В некоторых вариантах осуществления изобретения, дефектный по репликации AAV содержит: (а) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 16, и геном для переноса, содержащий, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR (например, 5'-ITR SEQ ID NO: 18), 5'-плечо гомологии (например, 5'-плечо гомологии SEQ ID NO: 115), акцептор сплайсинга (например, акцептор сплайсинга SEQ ID NO: 14), элемент 2A (например, элемент 2A из SEQ ID NO: 74), кодирующую последовательность человеческого PАН с молчащей модификацией (например, кодирующую последовательность PАН SEQ ID NO: 116), последовательность полиаденилирования SV40 (например, последовательность полиаденилирования SV40 SEQ ID NOs: 31), 3'-плечо гомологии (например, 3'-плечо гомологии SEQ ID NO: 117) и элемент 3'-ITR (например, 3'-ITR SEQ ID NO: 19); (б) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 16, и геном для переноса, содержащий, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR (например, 5'-ITR SEQ ID NO: 18); 5'-плечо гомологии (например, 5'-плечо гомологии SEQ ID NO: 115); акцептор сплайсинга (например, акцептор сплайсинга SEQ ID NO: 14); элемент 2A (например, элемент 2A из SEQ ID NO: 74); кодирующую последовательность человеческого PАН с молчащей модификацией (например, кодирующую последовательность PАН SEQ ID NO: 116); последовательность полиаденилирования SV40 (например, последовательность полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 31); 3'-плечо гомологии (например, 3'-плечо гомологии SEQ ID NO: 117); и элемент 3'-ITR (например, 3'-ITR SEQ ID NO: 19); и/или (с) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и геном для переноса, содержащий, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR (например, 5'-ITR SEQ ID NO: 18); 5'-плечо гомологии (например, 5'-плечо гомологии SEQ ID NO: 115); акцептор сплайсинга (например, акцептор сплайсинга SEQ ID NO: 14); элемент 2A (например, элемент 2A из SEQ ID NO: 74); кодирующую последовательность человеческого PАН с молчащей модификацией (например, кодирующую последовательность PАН SEQ ID NO: 116); последовательность полиаденилирования SV40 (например, последовательность полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 31); 3'-плечо гомологии (например, 3'-плечо гомологии SEQ ID NO: 117); и элемент 3'-ITR (например, 3'-ITR SEQ ID NO: 19).

[00156] В некоторых вариантах осуществления изобретения, дефектный по репликации AAV содержит: (а) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 16, и корректирующий геном,

содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 25, 46-63, 113, 114, 116, 118, 119, 134-137, 145 и 146; (b) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 16, и корректирующий геном, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 25, 46-63, 113, 114, 116, 118, 119, 134-137, 145 и 146; и/или (c) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и корректирующий геном, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 25, 46-63, 113, 114, 116, 118, 119, 134-137, 145 и 146.

[00157] Описанные здесь композиции AAV являются особенно предпочтительными, поскольку они способны корректировать ген РАН в клетке с высокой эффективностью как *in vivo*, так и *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективность интеграции элемента редактирования в локус-мишень составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%), если AAV вводят мышам с имплантированными человеческими гепатоцитами в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аллельная частота интеграции элемента редактирования в локус-мишень составляет по меньшей мере 0,5% (например, по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%), если AAV вводят мышам с имплантированными человеческими гепатоцитами в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

[00158] Могут быть использованы любые методы определения эффективности редактирования гена РАН. В некоторых вариантах осуществления изобретения, отдельные клетки выделяют из популяции трансдуцированных клеток и подвергают моноклеточной ПЦР с использованием ПЦР-праймеров, которые могут идентифицировать присутствие элемента редактирования, правильно интегрированного в локус-мишень гена РАН. Такой способ может дополнительно включать моноклеточную ПЦР одних и тех же клеток с использованием ПЦР-праймеров, которые селективно амплифицируют немодифицированный локус-мишень. Таким образом можно определить генотип клеток. Так, например, если моноклеточная ПЦР показала, что клетка имеет как отредактированный локус-мишень, так и немодифицированный локус-мишень, то такую клетку можно считать гетерозиготной по отредактированному гену РАН.

[00159] Дополнительно или альтернативно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, ПЦР, опосредованная линейной амплификацией (LAM-PCR), количественная ПЦР (кол.ПЦР) или цифровая капельная ПЦР (кцПЦР), могут быть осуществлены на ДНК, экстрагированной из популяции трансдуцированных клеток с использованием праймеров и зондов, которые детектируют только отредактированные аллели РАН. Такие способы могут также включать дополнительные кол.ПЦР или кцПЦР

(либо в одной и той же реакции, либо в отдельной реакции) для определения числа общих геномов в образце и количества неотредактированных аллелей РАН. Эти числа могут быть использованы для определения аллельной частоты интеграции элемента редактирования в локус-мишень.

[00160] Дополнительно или альтернативно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, локус РАН может быть амплифицирован из ДНК, выделенной из популяции трансдуцированных клеток, либо посредством ПЦР с использованием праймеров, которые связываются с областями гена РАН, фланкирующими локус-мишень, либо посредством LAM-PCR с использованием праймера, который связывается с областью в корректирующем геноме (например, в области, содержащей экзогенную последовательность, которая является ненативной для локуса). Полученные ПЦР-ампликоны могут быть отдельно секвенированы с применением методов секвенирования одной молекулы следующего поколения (NGS) для определения относительного числа отредактированных и неотредактированных аллелей РАН, присутствующих в популяции трансдуцированных клеток. Эти количества могут быть использованы для определения аллельной частоты интеграции элемента редактирования в локус-мишень.

[00161] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим описанный здесь AAV вместе с фармацевтически приемлемым наполнителем, адъювантом, разбавителем или носителем или их комбинацией. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любой материал, который в комбинации с активным ингредиентом композиции позволяет этому ингредиенту сохранять биологическую активность и не вызывать негативных физиологических реакций, таких как случайная иммунная реакция. Фармацевтически приемлемые носители включают воду, забуференный фосфатом физиологический раствор, эмульсии, такие как эмульсия типа «масло в воде» и смачивающие агенты. Композиции, содержащие такие носители, получают хорошо известными стандартными методами, такими как методы, описанные в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, current Ed., Mack Publishing Co., Easton Pa. 18042, USA; A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al, 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; и Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al, 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

III. Способ применения

[00162] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способам коррекции мутации в гене РАН или экспрессии полипептида РАН в клетке. Эти способы обычно включают трансдукцию клетки дефектным по репликации AAV, описаным в настоящей заявке. Такие способы в высокой степени эффективны для коррекции мутаций в гене РАН или для восстановления экспрессии РАН и не требуют расщепления генома в локусе-мишени под действием экзогенной нуклеазы (например, мегануклеазы, нуклеазы «цинковые пальцы», нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), или РНК-

зависимой нуклеазы, такой как Cas9), для облегчения данной коррекции. В соответствии с этим, в некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь способы включают трансдукцию клетки описанным здесь дефектным по репликации AAV без совместной трансдукции или совместного введения экзогенной нуклеазы или нуклеотидной последовательности, кодирующей экзогенную нуклеазу.

[00163] Описанные здесь способы могут быть использованы к любой клетке, содержащей мутацию в гене РАН. Для специалиста в данной области очевидно, что особый интерес представляют клетки, которые активно экспрессируют РАН. В соответствии с этим, в некоторых вариантах осуществления изобретения, этот способ применяют к клеткам печени, почек, головного мозга, гипофиза, коры надпочечников, поджелудочной железы, мочевого пузыря, желчного пузыря, толстой кишки, тонкой кишки или молочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот способ применяют к гепатоцитам и/или к почечным клеткам.

[00164] Описанные здесь способы могут быть осуществлены *in vitro* в исследовательских целях, или они могут быть осуществлены *ex vivo* или *in vivo* в терапевтических целях.

[00165] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка, подвергаемая трансдукции, присутствует у млекопитающего, и AAV вводят индивидууму в количестве, эффективном для трансдукции клетки у индивидуума. В соответствии с этим, в некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием или расстройством, ассоциированным с мутацией гена РАН, где указанный способ обычно включает введение индивидууму эффективного количества описанного здесь дефектного по репликации AAV. Индивидуумом может быть человек или грызун (например, мышь), содержащий человеческие клетки печени. Подходящими мышинными особями являются, но не ограничиваются ими, мыши, которым были трансплантированы человеческие клетки печени (например, человеческие гепатоциты). Любое заболевание или расстройство, ассоциированное с мутацией гена РАН, может быть подвергнуто лечению с применением описанных здесь способов. Подходящими заболеваниями или расстройствами являются, но не ограничиваются ими, фенилкетонурия. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки трансдуцируют без совместной трансдукции или совместного введения экзогенной нуклеазы или нуклеотидной последовательности, кодирующей экзогенную нуклеазу.

[00166] Описанные здесь способы являются особенно предпочтительными, поскольку они способны корректировать ген РАН в клетке с высокой эффективностью как *in vivo*, так и *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективность интеграции элемента редактирования в локус-мишень составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%), если AAV вводят мышам с имплантированными человеческими гепатоцитами в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV. В некоторых вариантах

осуществления изобретения, аллельная частота интеграции элемента редактирования в локус-мишень составляет по меньшей мере 0,5% (например, по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%), если AAV вводят мышам с имплантированными человеческими гепатоцитами в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

[00167] В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансдукция клетки описанной здесь композицией AAV может быть осуществлена как описано в настоящей заявке или любым способом трансдукции, известным специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка может быть подвергнута контактированию с AAV при множественности заражения (MOI) 50000; 100000; 150000; 200000; 250000; 300000; 350000; 400000; 450000 или 500000, или при любой MOI, которая обеспечивает оптимальную трансдукцию клетки.

[00168] В некоторых вариантах осуществления изобретения, в вышеупомянутых способах используют дефектный по репликации AAV, содержащий: (а) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 16, и геном для переноса, содержащий, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR (например, 5'-ITR SEQ ID NO: 18), 5'-плечо гомологии (например, 5'-плечо гомологии SEQ ID NO: 115), акцептор сплайсинга (например, акцептор сплайсинга SEQ ID NO: 14), элемент 2A (например, элемент 2A из SEQ ID NO: 74), кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией (например, кодирующую последовательность РАН SEQ ID NO: 116), последовательность полиаденилирования SV40 (например, последовательность полиаденилирования SV40 SEQ ID NOs: 31), 3'-плечо гомологии (например, 3'-плечо гомологии SEQ ID NO: 117) и элемент 3'-ITR (например, 3'-ITR SEQ ID NO: 19); (b) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 16, и геном для переноса, содержащий, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR (например, 5'-ITR SEQ ID NO: 18); 5'-плечо гомологии (например, 5'-плечо гомологии SEQ ID NO: 115); акцептор сплайсинга (например, акцептор сплайсинга SEQ ID NO: 14); элемент 2A (например, элемент 2A из SEQ ID NO: 74); кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией (например, кодирующую последовательность РАН SEQ ID NO: 116); последовательность полиаденилирования SV40 (например, последовательность полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 31); 3'-плечо гомологии (например, 3'-плечо гомологии SEQ ID NO: 117); и элемент 3'-ITR (например, 3'-ITR SEQ ID NO: 19); и/или (c) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и геном для переноса, содержащий, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR (например, 5'-ITR SEQ ID NO: 18); 5'-плечо гомологии (например, 5'-плечо гомологии SEQ ID NO: 115); акцептор сплайсинга (например, акцептор сплайсинга SEQ ID NO: 14); элемент 2A (например, элемент 2A из SEQ ID NO: 74); кодирующую последовательность

человеческого РАН с молчащей модификацией (например, кодирующую последовательность РАН SEQ ID NO: 116); последовательность полиаденилирования SV40 (например, последовательность полиаденилирования SV40 SEQ ID NO: 31); 3'-плечо гомологии (например, 3'-плечо гомологии SEQ ID NO: 117) и элемент 3'-ITR (например, 3'-ITR SEQ ID NO: 19).

[00169] В некоторых вариантах осуществления изобретения, в вышеупомянутых способах используют дефектный по репликации AAV, содержащий: (а) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 16, и корректирующий геном, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 25, 46-63, 113, 114, 116, 118, 119, 134-137, 145 и 146; (б) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 16, и корректирующий геном, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 25, 46-63, 113 114, 116, 118, 119, 134-137, 145 и 146; и/или (с) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и корректирующий геном, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 25, 46-63, 113, 114, 116, 118, 119, 134-137, 145 и 146.

[00170] Описанная здесь композиция AAV может быть введена индивидууму любым подходящим способом, включая, но не ограничиваясь ими, способ внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, интраназального, местного или интрадермального введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композицию приготавливают для введения посредством внутривенной инъекции или подкожной инъекции.

IV. Системы упаковки AAV

[00171] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к системам упаковки для рекомбинантного получения описанного здесь дефектного по репликации AAV. Такие системы упаковки обычно содержат: нуклеотидную последовательность Rep, кодирующую один или более белков Rep AAV; нуклеотидную последовательность Cap, кодирующую один или более описанных здесь капсидных белков AAV кладотипа F; и корректирующий геном для коррекции гена РАН или геном для переноса в целях достижения экспрессии описанного здесь гена РАН, где система упаковки функционирует в клетке и способствует включению корректирующего генома в капсид с образованием AAV.

[00172] В некоторых вариантах осуществления изобретения, система упаковки содержит первый вектор, включающий нуклеотидную последовательность Rep и нуклеотидную последовательность Cap, и второй вектор, включающий корректирующий геном или геном для переноса. Термин «вектор», используемый здесь при описании системы упаковки, означает молекулу нуклеиновой кислоты, которая является носителем для введения нуклеиновых кислот в клетку (например, плазмидой, вирусом, космидой, искусственной хромосомой и т.п.).

[00173] В описанных здесь системах упаковки может быть использован любой белок Rep AAV. В некоторых вариантах системы упаковки, нуклеотидная последовательность Rep кодирует белок Rep AAV2. Подходящие белки AAV2 Rep включают, но не ограничиваются ими, Rep 78/68 или Rep 68/52. В некоторых вариантах системы упаковки, нуклеотидная последовательность, кодирующая белок Rep AAV 2, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, имеющий минимальную процентную идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью Rep AAV2 SEQ ID NO: 22, где минимальный процент идентичности последовательностей составляет по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) по всей длине аминокислотной последовательности белка Rep AAV2. В некоторых вариантах системы упаковки, белок Rep AAV2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

[00174] В некоторых вариантах системы упаковки, система упаковки дополнительно содержит третий вектор, например вектор вируса-помощника. Третий вектор может представлять собой независимый третий вектор и может быть интегрирован с первым вектором или со вторым вектором. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третий вектор содержит гены, кодирующие белки вируса-помощника.

[00175] В некоторых вариантах системы упаковки, вирус-помощник выбран из группы, состоящей из аденовируса, вируса герпеса (включая вирус простого герпеса (HSV)), поксвируса (такого как вирус осповакцины), цитомегаловируса (CMV) и бакуловируса. В некоторых вариантах системы упаковки, где вирусом-помощником является аденовирус, геном аденовируса содержит один или более генов аденовирусной РНК, выбранных из группы, состоящей из E1, E2, E4 и VA. В некоторых вариантах системы упаковки, где вирусом-помощником является HSV, геном HSV содержит один или более генов HSV, выбранных из группы, состоящей из UL5/8/52, ICP0, ICP4, ICP22 и UL30/UL42.

[00176] В некоторых вариантах системы упаковки, первый, второй и/или третий векторы содержатся в одной или более трансфецирующих плазмидах. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый вектор и третий вектор содержатся в первой трансфецирующей плазмиде. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй вектор и третий вектор содержатся во второй трансфецирующей плазмиде.

[00177] В некоторых вариантах системы упаковки, первый, второй и/или третий векторы содержатся в одном или более рекомбинантных вирусах-помощниках. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый вектор и третий вектор содержатся в рекомбинантном вирусе-помощнике. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй вектор и третий вектор содержатся в рекомбинантном вирусе-помощнике.

[00178] В своем дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к

способу получения рекомбинантного AAV, как описано в настоящей заявке, где способ включает трансфекцию или трансдукцию клетки описанной здесь системой упаковки, в условиях, подходящих для включения корректирующего генома в капсид с образованием описанного здесь AAV. Репрезентативные способы получения рекомбинантного AAV включают временную трансфекцию (например, одной или более трансфецирующими плазмидами, содержащими первый и второй, и, необязательно, третий вектор, описанные в настоящей заявке), инфицирование вирусом (например, одним или более рекомбинантными вирусами-помощниками, такими как аденовирус, поксвирус (такой как, например, вирус осповакцины), вирус герпеса (включая HSV, цитомегаловирус или бакуловирус, содержащий первый и второй и, необязательно, третий вектор, описанный в настоящей заявке), и трансфекцию или инфицирование стабильной клеточной линии-продуцента (например, стабильной клеточной линии-продуцента, такой как клетка млекопитающего или насекомого, содержащая нуклеотидную последовательность Rep, кодирующую один или более белков Rep AAV и/или нуклеотидную последовательность Cap, кодирующую один или более капсидных белков AAV кладотипа F, и содержащая корректирующий геном, описанный в настоящей заявке и доставляемый в форме трансфецирующей плазмиды или рекомбинантного вируса-помощника).

V. Примеры

[00179] Описанные здесь рекомбинантные векторы AAV опосредуют высокоэффективное редактирование генов *in vitro* и *in vivo*. В нижеследующих примерах описаны корректирующие векторы, которые могут быть упакованы с капсидом AAV кладотипа F (например, AAVHSC7, AAVHSC15 или AAVHSC17, как описано в патенте США № 9623120, который включен в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки), и продемонстрировано эффективное восстановление экспрессии гена РАН, который мутирует при некоторых заболеваниях у человека, таких как фенилкетонурия. Эти примеры приводятся лишь для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничение изобретения.

Пример 1: РАН-корректирующий вектор pHMI-hРАН-hAC-008

a) РАН-корректирующий вектор pHMI-hРАН-hAC-008

[00180] РАН-корректирующий вектор pHMI-hРАН-hAC-008, как показано на фиг. 1A, содержит, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией; последовательность полиаденилирования SV40, рестрикционный кластер для нацеленной интеграции («TI RE»), 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности этих элементов приведены в таблице 1. 5'-плечо гомологии содержит геномную последовательность дикого типа из 800 нуклеотидов, расположенных выше старт-кодона человеческого РАН и, таким образом, обладает способностью корректировать мутации в старт-кодоне и/или в 5'-нетранслируемой области (UTR), которая негативно влияет на экспрессию РАН, наблюдаемую у некоторых пациентов с ФКУ. 3'-плечо гомологии содержит геномную последовательность дикого типа из 800

нуклеотидов, расположенных ниже старт-кодона. Интеграция РАН-корректирующего вектора рНМІ-hРАH-hAC-008 в человеческий геном позволяет встраивать кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией, последовательность полиаденилирования SV40 и рестрикционный кластер для нацеленной интеграции в локус-мишень старт-кодона РАН (то есть, с заменой нуклеотидов 1-3 гена РАН), и тем самым восстанавливать экспрессию белка РАН дикого типа, который был поврежден в результате мутаций в 5'-UTR, в кодирующей последовательности или 3'-UTR гена РАН.

Таблица 1: Генетические элементы в РАН-корректирующем векторе рНМІ-hРАH-hAC-008

Генетический элемент	SEQ ID NO
Элемент 5'-ITR	18
5'-плечо гомологии	69
Кодирующая последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией	25
Последовательность полиаденилирования SV40	31
Рестрикционный кластер для нацеленной интеграции	71
3'-плечо гомологии	70
Элемент 3'-ITR	19
Элемент редактирования	83
Корректирующий геном от 5'-плеча гомологии до 3'-плеча гомологии	85
Корректирующий геном от 5'-ITR до 3'-ITR	87

б) РАН-корректирующий вектор рНМІ-hРАH-h1C-007

[00181] РАН-корректирующий вектор рНМІ-hРАH-h1C-007, как показано на фигуре 1В, содержит, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; акцептор сплайсинга; элемент 2А; кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией; последовательность полиаденилирования SV40, рестрикционный кластер для нацеленной интеграции («TI RE»), 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности этих элементов приведены в Таблице 2. 5'-плечо гомологии содержит геномную последовательность дикого типа из 800 нуклеотидов, расположенных выше нуклеотида 2128 человеческого РАН, расположенного в интроне 1. 3'-плечо гомологии содержит геномную последовательность дикого типа из 800 нуклеотидов, расположенных ниже нуклеотида 2127 человеческого РАН. Интеграция РАН-корректирующего вектора рНМІ-hРАH-h1C-007 в человеческий геном позволяет осуществлять транскрипцию локуса РАН в пре-мРНК, содержащую от 5'- до 3'-конца следующие элементы: экзон 1 эндогенного РАН; часть интрона 1, расположенную от 5'-донора сплайсинга до нуклеотида 2127; акцептор сплайсинга в векторе рНМІ-hРАH-h1C-007; элемент 2А; кодирующую

последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией; и последовательность полиаденилирования SV40. Сплайсинг этой пре-мРНК приводит к образованию мРНК, содержащей от 5'- до 3'-конца следующие элементы: экзон 1 эндогенного РАН; элемент 2А (в одной рамке считывания с экзоном 1 РАН); кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией (в одной рамке считывания с элементом 2А); и последовательность полиаденилирования SV40. Элемент 2А способствует образованию двух полипептидов: усеченного пептида РАН, расположенного на конце экзона 1, связанного с N-концевой частью пептида 2А, и пролина пептида 2А, связанного с полноразмерным полипептидом РАН. Следовательно, интеграция вектора рНМІ-һРАН-һ1С-007 может восстанавливать экспрессию белка РАН дикого типа, которая была нарушена в результате мутаций в кодирующей последовательности или в 3'-UTR гена РАН.

Таблица 2: Генетические элементы в РАН-корректирующем векторе рНМІ-һРАН-һ1С-007

Генетический элемент	SEQ ID NO
Элемент 5'-ITR	18
5'-плечо гомологии	72
Акцептор сплайсинга	14
Элемент 2А	74
Кодирующая последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией	25
Последовательность полиаденилирования SV40	31
Рестрикционный кластер для нацеленной интеграции	71
3'-плечо гомологии	73
Элемент 3'-ITR	19
Элемент редактирования	84
Корректирующий геном от 5'-плеча гомологии до 3'-плеча гомологии	86
Корректирующий геном от 5'-ITR до 3'-ITR	88

[00182] Молчащая модификация, введенная в два вышеупомянутых вектора, значительно повышала экспрессию белка РАН, как было продемонстрировано по сравнению с экспрессионными векторами рСОН-WT-РАН, рСОН-СО-РАН и рНМІ-СО-РАН. Вектор рСОН-WT-РАН содержит промотор СВА, функционально присоединенный к кодирующей последовательности РАН дикого типа, представленной в SEQ ID NO: 24. Каждый из векторов рСОН-СО-РАН и рНМІ-СО-РАН содержат промотор СВА, функционально присоединенный к кодирующей последовательности человеческого РАН с молчащей модификацией, представленной в SEQ ID NO: 25. Векторы рСОН-СО-РАН и рНМІ-СО-РАН были в высокой степени сходными. Каждый вектор трансфицировали в

клетки НЕК 293, которые по своей природе являются дефектными по РАН. Как показано на фигуре 2, VG-GT-CO-РАН («CO-hРАН») давал значительно более высокий уровень экспрессии человеческого РАН, чем VG-GT-РАН («WT-hРАН»).

Пример 2. РАН-корректирующий вектор рНМІА-hРАН-hIIC-032.1 и его варианты.

[00183] Для идентификации последовательностей плечей гомологии, которые облегчают эффективное редактирование генов, было сконструировано 130 корректирующих векторов, и 70 из них были протестированы в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека. Вектор рНМІА-hРАН-hIIC-032.1 показал наивысшую эффективность редактирования *in vitro*. В этом примере представлена структура этого вектора и его вариантов.

а) РАН-корректирующий вектор рНМІА-hРАН-hIIC-032.1

[00184] РАН-корректирующий вектор рНМІА-hРАН-hIIC-032.1, как показано на фигуре 1С, содержит, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; акцептор сплайсинга; элемент Р2А; кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией; последовательность полиаденилирования SV40, 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности этих элементов приведены в таблице 3. 5'-плечо гомологии содержит геномную последовательность дикого типа из нуклеотидов от -686 до 274 человеческого РАН, 3'-конец которого расположен в интроне 1. 3'-плечо гомологии содержит геномную последовательность дикого типа из нуклеотидов 415-1325 человеческого РАН. Интеграция РАН-корректирующего вектора рНМІА-hРАН-hIIC-032.1 в человеческий геном позволяет осуществлять транскрипцию локуса РАН в пре-мРНК, содержащую, от 5'- до 3'-конца, следующие элементы: экзон 1 эндогенного РАН; часть интрона 1, расположенную от 5'-донора сплайсинга до нуклеотида 274; акцептор сплайсинга в векторе рНМІА-hРАН-hIIC-032.1; элемент 2А; кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией; и последовательность полиаденилирования SV40. Сплайсинг этой пре-мРНК приводит к образованию мРНК, содержащей от 5'- до 3'-конца следующие элементы: экзон 1 эндогенного РАН; элемент Р2А (в одной рамке считывания с экзоном 1 РАН); кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией (в одной рамке считывания с элементом Р2А); и последовательность полиаденилирования SV40. Элемент Р2А способствует образованию двух полипептидов: усеченного пептида РАН, расположенного на конце экзона 1, связанного с N-концевой частью пептида Р2А, и пролина пептида Р2А, связанного с полноразмерным полипептидом РАН. Следовательно, интеграция вектора рНМІА-hРАН-hIIC-032.1 может восстанавливать экспрессию белка РАН дикого типа, которая была нарушена в результате мутаций в кодирующей последовательности или в 3'-UTR гена РАН.

Таблица 3: Генетические элементы в РАН-корректирующем векторе рНМІА-hРАН-hIIC-032.1

Генетический элемент	SEQ ID NO
Элемент 5'-ITR	18
5'-плечо гомологии	36
Акцептор сплайсинга	14
Элемент Р2А	79
Кодирующая последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией	25
Последовательность полиаденилирования SV40	31
3'-плечо гомологии	45
Элемент 3'-ITR	19
Элемент редактирования	35
Корректирующий геном от 5'-плеча гомологии до 3'-плеча гомологии	46
Корректирующий геном от 5'-ITR до 3'-ITR	55

b) Варианты РАН-корректирующего вектора рНМ1А-hРАН-hI1C-032.1

[00185] Восемь вариантов вектора рНМ1А-hРАН-hI1C-032.1 были сконструированы для повышения уровня экспрессии локуса гена РАН. Эти варианты, названные рНМ1А-hРАН-hI1C-032.2 - рНМ1А-hРАН-hI1C-032.9, отличаются от рНМ1А-hРАН-hI1C-032.1 только в 5'-плече гомологии. Последовательности различных элементов представлены в Таблице 4.

Таблица 4: Варианты вектора рНМ1А-hРАН-hI1C-032.1

Название вектора	SEQ ID NO		
	5'-плечо гомологии (НА)	Корректирующий геном от 5'-НА до 3'-НА	Корректирующий геном от 5'-ITR до 3'-ITR
рНМ1А-hРАН-hI1C-032.2	37	47	56
рНМ1А-hРАН-hI1C-032.3	38	48	57
рНМ1А-hРАН-hI1C-032.4	39	49	58
рНМ1А-hРАН-hI1C-032.5	40	50	59
рНМ1А-hРАН-hI1C-032.6	41	51	60
рНМ1А-hРАН-hI1C-032.7	42	52	61
рНМ1А-hРАН-hI1C-032.8	43	53	62
рНМ1А-hРАН-hI1C-032.9	44	54	63

[00186] Вектор рНМ1А-hРАН-hI1C-032.2 был сконструирован для оптимизации последовательности Козака в целях улучшения рекрутинга рибосомы в транскрипт. Этот

вектор отличается от рНМIA-hPAH-hUC-032.1 наличием нуклеотидов С, G, G, G и G в положениях -2, 4, 6, 7 и 9 гена PAH, соответственно.

[00187] Вектор рНМIA-hPAH-hIIC-032.3 был сконструирован для удаления одного квадруплекса в 5'-UTR гена PAH, который может подавлять экспрессию. Этот вектор отличается от рНМIA-hPAH-hIIC-032.1 наличием нуклеотидов А и А в положениях -467 и -465 гена PAH, соответственно.

[00188] Вектор рНМIA-hPAH-hIIC-Q32.4 был сконструирован для оптимизации элемента ответа на циклический AMP в целях повышения уровня экспрессии. Этот вектор отличается от рНМIA-hPAH-hIIC-032.1 наличием нуклеотида А в положении -181 гена PAH.

[00189] Вектор рНМIA-hPAH-hIIC-032,5 был сконструирован для оптимизации двух элементов ответа на циклический AMP в целях повышения уровня экспрессии. Этот вектор отличается от рНМIA-hPAH-hIIC-032.1 наличием нуклеотидов G, С, А и А в положениях -214, -212, -211 и -181 гена PAH, соответственно.

[00190] Вектор рНМIA-hPAH-hIIC-032.6 был сконструирован для включения минорного аллеля SNP-rsl522295, который коррелирует с измененной экспрессией PAH у человека. Этот вектор отличается от рНМIA-hPAH-hIIC-032.1 наличием нуклеотида G в положении 194 гена PAH.

[00191] Вектор рНМIA-hPAH-hIIC-032,7 был сконструирован для оптимизации сайта связывания с глюкокортикоидом в 5'-UTR для повышения уровня экспрессии. Этот вектор отличается от рНМIA-hPAH-hIIC-032.1 наличием нуклеотидов С и С в положениях -433 и -432 гена PAH, соответственно.

[00192] Вектор рНМIA-hPAH-hIIC-032.8 был сконструирован для модификации двух сайтов связывания с глюкокортикоидами и одного сайта связывания с AP2 для повышения уровня экспрессии. Этот вектор отличается от рНМIA-hPAH-hIIC-032.1 наличием нуклеотидов С и С в положениях -433 и -432 гена PAH, соответственно, и наличием нуклеотидной последовательности ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68) в положениях от -394 до -388 гена PAH.

[00193] Вектор рНМIA-hPAH-hIIC-032,9 был сконструирован для дизрупции трех G-квадруплексов в 5'-UTR, которые могут подавлять экспрессию. Этот вектор отличается от рНМIA-hPAH-hIIC-032.1 наличием нуклеотида А в каждом из положений нуклеотидов -467, -465, -341, -339, -225, -211 и -203 гена PAH.

Пример 3: Редактирование гена человеческого PAH in vitro

[00194] В этом примере описан метод in vitro для исследования PAH-корректирующих векторов, таких как векторы, описанные в предыдущих примерах.

[00195] PAH-корректирующий вектор рНМI-hPAH-hA-002, вариант рНМI-hPAH-hAC-008, где кодирующая последовательность PAH представляет собой последовательность дикого типа (то есть, без молчащей модификации), и PAH-корректирующий вектор рНМI-hPAH-h1-001, вариант рНМI-hPAH-h1C-007, где кодирующая последовательность PAH представляет собой последовательность дикого

типа (то есть, без молчащей модификации), оценивали на нацеленную интеграцию. Клетки K562 трансдуцировали вектором pHMI-hPAN-hA-002, упакованным в AAVHSC17, при MOI 150000. Геномную ДНК клеток собирали через 48 часов. Отдельные биотинилированные праймеры с последовательностями cсаатсссaccagctcact (SEQ ID NO: 89) и tcccatgaaactgaggtgtga (SEQ ID NO: 90), каждая из которых локализована за пределами плечей гомологии, отдельно использовали для амплификации образцов ДНК путем линейной амплификации. Отредактированные и неотредактированные аллели были амплифицированы без смещения. Образцы амплифицированной ДНК собирали и обогащали путем добавления стрептавидина. Количество аллелей с интеграцией pHMI-hPAN-hA-002 оценивали с помощью кцПЦР с использованием набора праймеров/зондов в серии 1 геномов PAN.

[00196] Как показано на фигуре 3А, на левой панели («LAM-обогащенный»), желаемая интеграция была детектирована в образце клеток, трансдуцированных вектором pHMI-hPAN-hA-002 («R1 ATG»), но не детектировалась в образцах клеток, трансдуцированных вектором pHMI-hPAN-h1-001 («Инtron R1») или нетрансдуцированных клеток («R1 WT»). На правой панели на фигуре 3А («Ампликон») степень интеграции вектора определяли с помощью кцПЦР с использованием набора праймеров/зондов в серии 1 SV40_FAM. Положительные сигналы были детектированы в образцах клеток, трансдуцированных вектором pHMI-hPAN-hA-002 («фрагмент T001»), и клеток, трансдуцированных вектором pHMI-hPAN-h1-001 («фрагмент T002»), что указывает на то, что обе клетки были подвергнуты векторной интеграции.

[00197] Для количественной оценки нацеленной интеграции, три набора праймеров и зондов, как показано в Таблице 6, были сконструированы для детектирования интеграции с помощью кцПЦР. Серия 1 геномов PAN обнаруживала неотредактированный геном и отредактированный геном после нацеленной интеграции pHMI-hPAN-hA-002. Серия 1 SV40_FAM обнаруживала последовательность в последовательности полиаденилирования SY40, которая присутствовала в отредактированном геноме и неинтегрированных векторах. Серия 1 SV40_FAM обнаруживала область в плече гомологии, которая присутствовала в отредактированном и в неотредактированном геномах, а также в неинтегрированных векторах.

[00198] Образцы ДНК распределяли по масляным каплям. Концентрацию ДНК оптимизировали до концентрации 600 пг на 20 мкл для значительного снижения вероятности того, что одна масляная капля будет случайно содержать две молекулы ДНК (например, векторную частицу и частицу геномной ДНК) ($p < 0,001$). Количество ДНК, идентифицированное в Серии 1 геномов PAN (Количество геномов), представляет собой общее количество неотредактированных и отредактированных геномов. Количество ДНК, идентифицированное в Серии 1 SV40_FAM (Количество полезной нагрузки), представляет собой общее количество отредактированных геномов и неинтегрированных векторов. Количество ДНК, идентифицированное в Серии 1 PAN_HA (Количество HA), представляет собой общее количество неотредактированных геномов, отредактированных

геномов и неинтегрированных векторов. Таким образом, количество отредактированных геномов может быть вычислено по следующей формуле: Количество геномов+Количество полезной нагрузки - Количество НА. Геномная фракция, имеющая правильную интеграцию, может быть вычислена как количество отредактированных геномов, деленное на количество геномов.

Таблица 5: Праймеры и зонды для количественной оценки интеграции человеческого РАН в геном человека

Праймер или зонд	Последовательность	SEQ ID NO
Серия 1 геномов РАН, праймер F	GCTCCATCCTGCACATAGTT	91
Серия 1 геномов РАН, праймер R	CCTATGCTTTCCTGATGAGATC C	92
Серия 1 геномов РАН, зонд	TTGGTGCTGCTGGCAATACGGT C	93
Серия 1 SV40_FAM, праймер F	GCAATAGCATCACAAATTTTCAC	94
Серия 1 SV40_FAM, праймер R	GATCCAGACATGATAAGATAC ATTG	95
Серия 1 SV40_FAM, зонд	TCACTGCATTCTAGTTGTGGTTT GTCCA	96
Серия 1 РАН_НА, праймер F	TCCAGTCACCAGACAGTTAGT	97
Серия 1 РАН_НА, праймер R	GGAGAGAAATGGAGCAAGTGA A	98
Серия 1 РАН_НА, зонд	ACAGCCTATATTTTACCATGCT GATCCC	99

[00199] Как показано на фигуре 3В, процентное содержание геномов, имеющих правильную интеграцию вектора рНМІ-һРАН-һА-002, как было измерено с использованием вышеуказанных наборов праймеров/зондов, составляло 17,86%. В контрольных клетках, которые не были трансдуцированы вектором рНМІ-һРАН-һА-002, интеграция не обнаруживалась.

Пример 4: Редактирование гена РАН in vivo в мышинной печени

[00200] В этом примере представлены животные-модели для исследования РАН-коорректирующих векторов, способных редактировать мышинный ген РАН, и определения их эффективности редактирования в мышинной печени.

а) Редактирование мышинного РАН у мышей дикого типа

[00201] В конкретном примере описано in vivo редактирование мышинного генома с использованием вектора рНМІ-һРАН-мАС-006. Вектор рНМІ-һРАН-мАС-006 подобен вектору рНМІ-һРАН-һАС-008, но обладает способностью редактировать мышинный ген РАН, но не человеческий ген РАН (фигура 4А). В частности, рНМІ-һРАН-тнАС-006

содержит, от 5' - до 3' -конца, следующие генетические элементы: элемент 5' -ITR; 5' -плечо гомологии; кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией; последовательность полиаденилирования SV40, рестрикционный кластер для нацеленной интеграции («TI RE»), 3' -плечо гомологии и элемент 3' -ITR. Последовательности этих элементов представлены в Таблице 6. 5' -плечо гомологии содержит геномную последовательность дикого типа, расположенную выше старт-кодона мышиногo РАН и включающую этот старт-кодон, и, таким образом, обладает способностью корректировать мутации в старт-кодоне и/или в 5'-нетранслируемой области (UTR) мышиногo гена РАН. 3' -плечо гомологии содержит геномную последовательность дикого типа, расположенную ниже старт-кодона мышиногo РАН. Интеграция РАН-корректирующего вектор рНМІ-һРАН-мАС-006 в мышиный геном позволяет встраивать кодирующую последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией, последовательность полиаденилирования SV40 и рестрикционный кластер для нацеленной интеграции в старт-кодоне мышиногo гена РАН (то есть, с заменой нуклеотидов 1-3 мышиногo гена РАН), и тем самым экспрессировать человеческий белок РАН дикого типа в мышинной клетке. Один отдельно взятый вектор не включал промоторную последовательность и не мог регулировать независимую экспрессию РАН без геномной интеграции.

Таблица 6: Генетические элементы в РАН-корректирующем векторе рНМІ-һРАН-мАС-006

Генетический элемент	SEQ ID NO
Элемент 5' -ITR	18
5' -плечо гомологии	100
Кодирующая последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией	25
Последовательность полиаденилирования SV40	31
Рестрикционный кластер для нацеленной интеграции	71
3' -плечо гомологии	101
Элемент 3' -ITR	19

[00202] Вектор рНМІ-һРАН-мАС-006 упаковывали в капсид AAVHSC17 и инъецировали двум новорожденным мышам дикого типа внутривенно через хвостовую вену в дозе 2×10^{13} векторных геномов на кг массы тела. Две контрольные мыши получали инъекцию физиологического раствора через хвостовую вену. Образцы печени собирали через 2 недели.

[00203] Был разработан метод ПЦР для детектирования интеграции вектора рНМІ-һРАН-мАС-006 в мышиный геном. Как показано на фигуре 4В, первая пара праймеров (SEQ ID NO: 62 и 63) была сконструирована для амплификации ДНК длиной 867 п.о. из неотредактированного аллеля («Контрольная ПЦР»); вторая пара праймеров (SEQ ID NO:

64 и 65) была сконструирована для специфической амплификации ДНК размером 2459 п.о. из отредактированного аллеля («ПЦР отредактированного аллеля»). Как показано на фигуре 4С, образец печени мыши, обработанной физиологическим раствором, и образец мышечных фибробластов 3Т3 не продуцировали ПЦР-продукт, соответствующий отредактированному аллелю, тогда как образцы печени от двух мышей, которым инъецировали вектор рНМ1-hРАH-mAC-006, продуцировали ПЦР-продукт, соответствующий отредактированному аллелю. Все четыре образца давали одинаковые уровни ПЦР-продукта, соответствующего неотредактированному аллелю, что позволяет предположить, что эти образцы обладают сравнимыми качествами.

[00204] Был разработан метод кцПЦР для количественной оценки интеграции вектора рНМ1-hРАH-mAC-006 в мышечный геном. Два набора праймеров и зондов, как показано в Таблице 7, были сконструированы для обнаружения интеграции с помощью кцПЦР. Серия 1 mРАH_ATG_gDNA_FAM обнаружила неотредактированный геном и отредактированный геном после нацеленной интеграции рНМ1-hРАH-mAC-006. Серия 1 SV40_FAM 1 обнаруживала последовательность в последовательности полиаденилирования SV40, которая присутствовала в отредактированном геноме и в неинтегрированных векторах (фигура 5А).

[00205] Образцы ДНК распределяли по масляным каплям. Концентрацию ДНК оптимизировали до концентрации 600 пг на 20 мкл для значительного снижения вероятности того, что одна масляная капля будет случайно содержать векторную частицу и частицу геномной ДНК ($p < 0,001$) (фигуры 5С и 5D). После интеграции вектора в геном, уровни двойной позитивности векторного зонда и локусного зонда в одной и той же капле увеличиваются (фигура 5В). Как показано на фигуре 5Е, у двух контрольных мышей в печени наблюдалось 0% и 0,0395% отредактированных аллелей, соответственно, а у двух мышей, обработанных вектором рНМ1-hРАH-mAC-006, наблюдалось 2,504% и 2,783% отредактированных аллелей в печени, соответственно. Таким образом, общая эффективность интеграции вектора рНМ1-hРАH-mAC-006 в печени при данных условиях составляла приблизительно 2,6%. Ожидается, что эффективность интеграции для каждой отдельной клетки будет выше, поскольку не все клетки были трансдуцированы вектором.

Таблица 7: Праймеры и зонды для количественной оценки интеграции человеческого РАH в мышечный геном

Праймер или зонд	Последовательность	SEQ ID NO
Серия 1 mРАH_ATG_gDNA_FAM, праймер F	CAGCATCAGAAGCAGAACATTT	102
Серия 1 mРАH_ATG_gDNA_FAM, праймер R	AAAGCACATCAGCAGTTTCAA	103
Серия 1 mРАH_ATG_gDNA_FAM, зонд	AGATGAAAGCAACTGAACATCGA CTACGA	104

Серия 1 SV40_FAM, праймер F	GCAATAGCATCACAAATTTTCAC	105
Серия 1 SV40_FAM, праймер R	GATCCAGACATGATAAGATACATT G	106
Серия 1 SV40_FAM Set 1, зонд	TCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT CCA	107
Серия 1 mPah_1C_LHA_FAM, праймер F	gcaagctccagatcaccaata	108
Серия 1 mPah_1C_LHA_FAM, праймер R	ctgagcaatgcattcagcaataa	109
Серия 1 mPah_1C_LHA_FAM, зонд	CCCTGAACATCCCTTGACAGAGCA	110

[00206] Относительное количество мРНК, экспрессируемой из отредактированного аллеля, определяли с помощью кцПЦР. Серию 1 SV40 FAM использовали для специфического детектирования экспрессии человеческого РАН из отредактированного аллеля. Каждый уровень экспрессии РАН нормализовали по уровню экспрессии эндогенного Hprt. Как показано на фигуре 6, у контрольных мышей не наблюдалась экспрессия человеческого РАН, что позволяет предположить, что праймеры и зонд перекрестно не реагировали с эндогенным мышинным РАН. Процент экспрессии РАН по отношению к уровням дикого типа вычисляли на основе сигнала человеческого РАН по отношению к Hprt, нормализованному по сигналу эндогенного мышинного РАН по отношению к Hprt. У двух мышей, обработанных вектором рНМИ-hРАН-mAC-006, наблюдались уровни мРНК 5,378% и 4,846% по отношению к уровням эндогенного мышинного РАН, соответственно. Таким образом, общий уровень мРНК вектора рНМИ-hРАН-mAC-006 в печени в данных условиях составлял приблизительно 5%. Ожидается, что уровень мРНК для каждой отдельной клетки будет выше, поскольку не все клетки были трансдуцированы вектором.

б) Редактирование мышинного гена РАН у мышей с нокаутом pah

[00207] В одном эксперименте, эффективность вектора рНМИ-hРАН-mAC-006 в отношении фенотипической коррекции определяли с использованием мышей с моделью нокаута РАН (РАН^{ENU2}). Вкратце, вектор hРАН-mAC-006, упакованный в капсиды AAVHSC15, вводили этим мышам внутривенно в течение 5 дней подряд в дозе $1,16 \times 10^{14}$ векторных геномов на килограмм массы тела. Сывороточный фенилаланин (Phe) определяли еженедельно в течение 5 месяцев с помощью масс-спектрометрии. Через 5 месяцев, ДНК экстрагировали из образцов печени, и количество векторных геномов на клетку анализировали с помощью кцПЦР с использованием наборов праймеров и зондов для определения числа копий вектора и геномного локуса человеческого РАН.

[00208] Эффективность трансдукции (измеряемая по количеству векторных геномов на клетку («ВГ на клетку»)) определяли с помощью кцПЦР с использованием

наборов праймеров и зондов для определения числа копий вектора и геномных локусов мышиногo и человеческого РАН. Частоту редактирования измеряли с помощью мультиплексной кцПЦР с использованием наборов праймеров и зондов для оценки частоты ДНК элемента редактирования вектора AAV («полезная нагрузка»), интегрированного в локус мышиногo и человеческого РАН. Вкратце, отдельные цепи ДНК распределяли по масляным каплям. Каждую каплю тестировали на присутствие ДНК человеческого или мышиногo РАН, а также на присутствие или отсутствие полезной нагрузки. Частоту редактирования вычисляли на основе детектируемого совместного распределения полезной нагрузки и ДНК-мишени в одной капле, с точки зрения ожидаемого повышения вероятности совместного распределения полезной нагрузки и ДНК-мишени в отдельных молекулах нуклеиновой кислоты.

[00209] У мышей с нокаутом РАН наблюдался фенотип повышенных уровней фенилаланина (Phe) в крови. Для изучения фенотипических изменений измеряли уровни Phe в сыворотке после введения векторов AAV, а затем вычисляли процентные уровни относительно базовой линии на время 0, и эти процентные уровни сравнивали с процентными уровнями у контрольных мышей, которым не вводили векторы AAV.

[00210] У мышей, которым вводили вектор hРАН-mAC-006, упакованный в капсиды AAVHSC15, наблюдалась эффективность трансдукции приблизительно от 8 до 18 векторных геномов на клетку (фигура 7A), а средняя эффективность редактирования составляла приблизительно 4,4% по отношению к числу аллелей (фигура 7B). Эта эффективность редактирования поддерживала уровень экспрессии РАН, достаточный для снижения уровней Phe в сыворотке мышей приблизительно на 50% в течение по меньшей мере 5 месяцев (фигуры 7C и 7D), и фенотипические изменения коррелировали с эффективностью редактирования (фигура 7E). Правильную гомологичную рекомбинацию вектора в локусе *Ran* проверяли по длине ПЦР-продукта, амплифицированного из отредактированного геномного локуса, с использованием первого праймера, который гибридизовался с полезной нагрузкой, и второго праймера, который гибридизовался с геномной последовательностью, расположенной ниже правого плеча гомологии (данные не приводятся).

[00211] Для того чтобы определить, может ли гомологичная рекомбинация вносить какие-либо геномные изменения в отредактированные аллели, последовательности ДНК в геномных областях, соответствующих плечам гомологии, были дополнительно проанализированы методом глубокого секвенирования (Illumina). Все образцы имели высококачественные риды последовательности, и все положения были секвенированы с глубиной более 20000 ридов. Инсерции и делеции (далее обозначаемые «Indel») идентифицировали с помощью запроса соматических вариантов с фильтром качества Indel и с фильтром смещения цепи. В частности, область в правом плече гомологии, содержащая 10 непрерывных G, показала повышенный уровень Indel приблизительно 0,02-0,05%, как у контрольных, так и у обработанных животных. Indel в этом локусе, а также в нескольких других локусах не прошли фильтры на качественные изменения и

были исключены из дальнейшего анализа. Как показано в Таблице 8, необработанные контрольные животные имели уровень Indel 0,002-0,006%. Обработанное животное 1 имело уровень Indel 0,031%; обработанное животное 2 не имело Indel, прошедших фильтры; а обработанное животное 3 имело уровень Indel, аналогичный уровню у контрольных животных. Все идентифицированные Indel были локализованы в нетранслируемых областях.

Таблица 8. Данные глубокого секвенирования для отдельных животных

Животное	Общее число ридов	Средняя глубина на основание	Число мутаций, прошедших фильтр	Аккумулятивные мутации, прошедшие фильтр, %
Контрольное животное 1	4218356	341291	1	0,002%
Контрольное животное 2	5599928	453069	2	0,006%
Обработанное животное 1	4785826	387203	9	0,031%
Обработанное животное 2	3353288	271302	0	0,000%
Обработанное животное 3	9514938	769817	9	0,006%

[00212] Приведенные выше результаты продемонстрировали возможность реверсии фенотипов дефицита РАН с использованием корректирующих векторов, которые встраивают кодирующую последовательность РАН в геном.

[00213] Для выявления экспрессии человеческого РАН в отдельных мышинных гепатоцитах после трансдукции *in vivo* была проведена гибридизация РНК *in situ* (ISH) на срезах ткани печени с использованием зонда, специфичного к >1 т.п.о. РНК человеческого РАН, имеющей молчащее изменение кодона как описано выше (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Hayward, CA). Как показано на фигуре 7F, этот зонд обнаруживал человеческую РНК РАН и, возможно, вирусную ДНК, содержащую последовательность РАН, в мышинных гепатоцитах, трансдуцированных вектором hРАН-mAC-006, но перекрестно не гибридизовался с эндогенной РНК мышинного Rah. Образец мышинной печени, трансдуцированный трансгенной конструкцией, содержащей промотор CMV, регулирующий экспрессию РНК человеческого Rah, имеющей то же самое молчащее изменение кодонов, использовали в качестве позитивного контроля.

с) РАН-корректирующий вектор pHMI-hРАН-mAC-006

[00214] Вектор pHMI-hРАН-mAC-006 содержал, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; кодирующую

последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией; последовательность полиаденилирования SV40; 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности этих элементов приведены в Таблице 9.

Таблица 9: Генетические элементы в РАН-корректирующем векторе рНМІ-hРАН-mAC-006

Генетический элемент	SEQ ID NO
Элемент 5'-ITR	18
5'-плечо гомологии	111
Кодирующая последовательность человеческого РАН с молчащей модификацией	25
Последовательность полиаденилирования SV40	31
Рестрикционный кластер для нацеленной интеграции	71
3'-плечо гомологии	112
Элемент 3'-ITR	19
Корректирующий геном (от 5'-НА до 3'- НА)	113
Корректирующий геном (от 5'-ITR до 3'-ITR)	114

d) Эффективность редактирования гена РАН у мышей, которым вводили рНМІ-hРАН-mAC-006

[00215] На фигуре 9А представлена схема анализа, используемого для определения эффективности редактирования гена РАН у мышей, которым вводили вектор рНМІ-hРАН-mAC-006. кцПЦР и LAM-NGS (LAM-ПЦР с последующим секвенированием следующего поколения (NGS)) осуществляли, как описано в настоящей заявке и как показано на фигуре 9А. На фигуре 9В показан график эффективности редактирования гена РАН, определенной в клетках мышей, которым вводили вектор рНМІ-hРАН-mAC-006 или контроль-носитель. Как показано на фигуре 9В, эффективность редактирования гена РАН у мышей, которым вводили вектор НМІ-hРАН-mAC-006, составляла приблизительно 8% по отношению к числу аллелей. В отредактированных областях, каких-либо ошибок не обнаруживалось.

e) Длительная фенотипическая коррекция гиперфенилаланинемии у мышей-моделей

[00216] В одном эксперименте, эффективность вектора рНМІ-hРАН-mAC-006 в отношении фенотипической коррекции определяли с использованием мышей с моделью нокаута РАН (РАН^{ENU2}). Вектор рНМІ-hРАН-mAC-006 упаковывали в капсиды AAVHSC15 и внутривенно вводили мышам в дозе 1×10^{14} векторных геномов на килограмм массы тела. Для изучения фенотипических изменений, уровни фенилаланина (Phe) и тирозина (Tyr) в сыворотке после введения вектора рНМТ-hРАН-mAC-006, упакованного в капсиды AAVHSC15, измеряли еженедельно через 7 недель, процентные уровни вычисляли относительно базовой линии на время 0 и эти процентные уровни

сравнивали с уровнями у контрольных мышей, которым вводили контроль-носитель. Всего 4 мышам вводили вектор pHMI-hPAH-mAC-006, упакованный в капсиды AAVHSC15, а 2 мышам вводили контроль-носитель. Как показано на фигуре 10, значительное снижение уровня Phe в сыворотке (фигура 10A; * означает $p < 0,0001$ при повторных измерениях с помощью 2-стороннего ANOVA по сравнению с носителем; $p < 0,0001$ при повторных измерениях с помощью 2-стороннего ANOVA в зависимости от времени) и значительное повышение уровня Туг в сыворотке (фигура 10B; * означает $p < 0,05$ при повторных измерениях с помощью 2-стороннего ANOVA по сравнению с носителем; $p < 0,0003$ при повторных измерениях с помощью 2-стороннего ANOVA в зависимости от времени) наблюдалось у мышей, которым вводили вектор. На фигуре 10C показано отношение между сывороточным Phe и сывороточным Туг у мышей, которым вводили вектор или контроль-носитель (* означает $p < 0,002$ при повторных измерениях с помощью 2-стороннего ANOVA по сравнению с носителем; $p < 0,0004$ при повторных измерениях с помощью 2-стороннего ANOVA в зависимости от времени).

[00217] На фигуре 11A представлен график, показывающий эффективность редактирования гена PAH и эффективность трансдукции клеток, взятых у мышей, которым вводили либо вектор pHMI-hPAH-mAC-006, либо контроль-носитель. На левой оси Y на фигуре 11A показан процент эффективности редактирования и показано, что у мышей, которым вводили вектор pHMI-hPAH-mAC-006 (AAVHSC15-mPAH), эффективность редактирования составляла приблизительно 5% относительно числа аллелей. На правой оси Y на фигуре 11A указано число векторных геномов на клетку и показано, что мыши, которым вводили вектор pHMI-hPAH-mAC-006 (AAVHSC15-mPAH), имели эффективность трансдукции приблизительно 140 векторных геномов на клетку.

[00218] На фигуре 11B представлен график, иллюстрирующий относительное количество экспрессируемой мРНК PAH, нормализованной по уровню экспрессии мышинового GAPDH, в клетках, взятых у мышей, которым вводили вектор pHMI-hPAH-mAC-006 (AAVHSC15-mPAH) или контроль-носитель. Как уже было показано, клетки, взятые у мышей, которым вводили вектор pHMI-hPAH-mAC-006 (AAVHSC15-mPAH), имели значительные уровни мРНК человеческого PAH, по сравнению с мышами, которым вводили контроль-носитель (* означает $p < 0,005$ как было определено с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни по сравнению с носителем).

Пример 5: Редактирование *in vivo* человеческого гена PAH у мыши-модели

[00219] В этом примере предоставлены животные-модели для оценки PAH-корректирующих векторов, таких как векторы, описанные в предыдущих примерах, при редактировании человеческого гена PAH у мыши-модели.

а) Редактирование человеческого PAH в клетках крови человека у мыши-модели

[00220] Вкратце, мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) вводили миелобласты посредством сублетального облучения и трансплантировали человеческие гемопоэтические стволовые CD34⁺-клетки. Степень приживания определяли через 12 недель путем идентификации количества человеческих и мышинных CD45⁺-клеток в

периферической крови с помощью проточной цитометрии, и отбирали мышей, имеющих более, чем 50% человеческих CD45⁺-клеток в кровотоке. Вектор hРАН-hAC-008, упакованный в капсид AAVHSC17, вводили внутривенно 12 таким мышам, разделенным поровну на четыре группы. Первой и второй группе мышей вводили дозу $1,54 \times 10^{13}$ векторных геномов на килограмм массы тела, а третьей и четвертой группе вводили дозу $2,1 \times 10^{12}$ векторных геномов на килограмм массы тела. Мышей умерщвляли через 6 недель после инъекций. Затем брали пробы крови, образцы костного мозга и тканей селезенки, и экстрагировали геномную ДНК.

[00221] Частоту редактирования в мышинных и человеческих клетках измеряли с помощью мультиплексной цифровой капельной ПЦР (кцПЦР) с использованием наборов праймеров и зондов для определения частоты интеграции ДНК из вектора AAV («полезная нагрузка»), в мышинный локус РАН и человеческий локус РАН. Короче говоря, отдельные цепи ДНК были распределяли по масляным каплям. Каждую каплю тестировали на присутствие ДНК человеческого или мышинного РАН, а также на присутствие или отсутствие полезной нагрузки. Частоту редактирования вычисляли на основе детектируемого совместного распределения полезной нагрузки и ДНК-мишени в одной капле, с точки зрения ожидаемого повышения вероятности совместного распределения полезной нагрузки и ДНК-мишени в отдельных молекулах нуклеиновой кислоты.

[00222] Как показано в Таблице 10, редактирование человеческих клеток было детектировано в образцах костного мозга в зависимости от дозы. Примечательно то, что редактирование было специфичным для человеческого генома, поскольку редактирование не было обнаружено в мышинных клетках.

Таблица 10: Эффективность редактирования hРАН-hAC-008 в мышинных тканях

Группа	% редактирования в костном мозге	% редактирования в селезенке	% редактирования в крови
1	0,16	0,0	0,0
2	0,25	0,01	0,0
3	0,09	0,09	0,0
4	0,02	0,013	0,001

[00223] На фигуре 8А показана эффективность трансдукции вектора hРАН-hAC-008 и вектора hРАН-hAC-008-HBB в человеческих и мышинных гепатоцитах у мышей, которым вводили вектор, упакованный в капсиды AAVHSC15.

б) Редактирование человеческого РАН в человеческих гепатоцитах у мыши-модели с использованием вектора, содержащего интрон HBB

[00224] Вектор hРАН-hAC-008 содержит полноразмерную кодирующую последовательность человеческой РАН без какого-либо интрона. Модифицированный вектор hРАН-hAC-008-HBB, в котором первый интрон человеческого гена HBB

(имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28) был встроен между нуклеотидами 912 и 913 кодирующей последовательности человеческого РАН, был создан для улучшения ядерного экспорта и повышения стабильности молекул РНК, транскрибируемых из вектора. Межнуклеотидная связь между нуклеотидами 912 и 913 соответствует сайту сплайсинга между экзоном 8 и экзоном 9 нативного гена РАН, который не был разрушен под действием молчащей модификации кодонов.

[00225] Векторы представляли собой упаковки с капсидами AAVHSC15 и были введены мышам внутривенно в дозе 1×10^{13} векторных геномов на килограмм массы тела. Через шесть недель после введения брали образцы печени, и оценивали локализацию мРНК человеческого РАН с молчащей модификацией и, возможно, вирусной ДНК, содержащей последовательность РАН, путем гибридизации *in situ*. Как показано на фигуре 8В, добавление интрона HBB значительно улучшало экспорт мРНК из ядра. Этот результат продемонстрировал, что добавление интрона в кодирующую последовательность РАН может потенциально повышать уровень экспрессии гена РАН, и этот элемент может быть включен в конструкцию РАН-корректирующих векторов.

с) Редактирование человеческого РАН в человеческих гепатоцитах у мыши-модели

[00226] Вкратце, FaH^{-/-} Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}-мыши с фенотипом C57B1/6, которых обычно называют мышами с нокаутом FRG®, были использованы в качестве модели для гуманизации печени. У этих мышей наблюдался иммунодефицит и отсутствовал тирозин-катаболический фермент фумарилацетоацетат-гидролаза (Fah). Удаление мышинных гепатоцитов индуцировали путем удаления защитного лекарственного препарата 2-(2-нитро-4-трифторметилбензоил)-1,3-циклогександиона (NTBC). Затем мышам трансплантировали человеческие гепатоциты и вводили аденовирус, экспрессирующий урокиназу, для повышения репопуляции человеческих гепатоцитов. Приживание поддерживалось в течение всей жизни животного с помощью соответствующей схемы введения нитизинона CuRx™ (20-0026) и профилактического лечения антибиотиками SMX/TMP (20-0037). Масса животных составляла в среднем 22 грамма, а продолжительность жизни обычно составляла 18-24 месяца.

[00227] Вектор hРАН-hAC-008 или hРАН-hAC-008-HBB упаковывали в капсиды AAVHSC15 и вводили мышам внутривенно в дозе 1×10^{13} векторных геномов на килограмм массы тела. Через шесть недель после введения брали образцы печени, а затем мышинные и человеческие гепатоциты разделяли и очищали на колонках Miltenyi autoMACS после перфузии печени. ДНК выделяли и эффективность редактирования генов измеряли с применением того же самого метода кцПЦР, который был описан выше.

[00228] Как показано на фигуре 8С, процент эффективности редактирования в человеческих гепатоцитах, измеренный как процент отредактированных аллелей от всех аллелей, составлял 2,2% у животного, обработанного вектором hРАН-hAC-008, и 4,3% у животного, обработанного вектором hРАН-hAC-008-HBB. Редактирование не было детектировано в мышинных гепатоцитах ни у одного животного. Маловероятно, что отсутствие детектированного редактирования в мышинных гепатоцитах у любого

животного обусловлено отсутствием эффективности трансдукции, поскольку мышинные гепатоциты были хорошо трансдуцированы (фигура 8A). В отдельном эксперименте, редактирование человеческого генома с использованием вектора hPAN-hAC-008 было обнаружено на уровне 2,131% по отношению к числу аллелей человеческого генома, тогда как редактирование мышинного генома в образце печени было обнаружено на уровне 0,05% по отношению к числу аллелей мышинного генома. Эти результаты показали наличие специфичного для человека редактирования гена PAN с использованием вектора hPAN-hAC-008 или его модифицированного варианта, и подтвердили создание модели *in vivo* для оценки эффективности редактирования в гепатоцитах.

d) Редактирование человеческого PAN в человеческих гепатоцитах у мышин-модели.

[00229] В одном эксперименте, FaH^{-/-} Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}-мыши с фенотипом C57B1/6, которых обычно называют мышами с нокаутом FRG® (также называемых здесь как мышами NuLiv), были использованы в качестве модели для гуманизации печени как описано выше (см. фигуру 12A).

[00230] Вектор рНМІК-hPAN-hIIC-032 содержал, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; акцептор сплайсинга; элемент 2A; кодирующую последовательность человеческого PAN с молчащей модификацией; последовательность полиаденилирования SV40; 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности этих элементов представлены в Таблице 11.

Таблица 11: Генетические элементы в PAN-корректирующем векторе рНМІК-hPAN-hIIC-032

Генетический элемент	SEQ ID NO
Элемент 5'-ITR	18
5'-плечо гомологии	115
Акцептор сплайсинга	14
Элемент 2A	74
Кодирующая последовательность человеческого PAN с молчащей модификацией	116
Последовательность полиаденилирования SV40	31
3'-плечо гомологии	117
Элемент 3'-ITR	19
Корректирующий геном (от 5'-НА до 3'-НА)	118
Корректирующий геном (от 5'-ITR до 3'-ITR)	119

[00231] Вектор рНМІК-hPAN-hIIC-032 упаковывали в капсиды AAVHSC15 и вводили мышам внутривенно в дозе 1×10^{14} векторных геномов на килограмм массы тела. Были взяты образцы печени от 3 мышей, которым вводили вектор рНМІК-hPAN-hIIC-032, упакованный в капсиды AAVHSC15, а затем человеческие и мышинные гепатоциты

разделяли и очищали, и ДНК экстрагировали. Эффективность редактирования генов оценивали методом кцПЦР, описанным выше.

[00232] Длительность редактирования гена РАН в человеческих гепатоцитах оценивали путем определения процента отредактированных аллелей от всех аллелей в клетках, взятых у обработанных мышей через 1 неделю и через 6 недель после введения вектора. Как показано на фигуре 12В, приблизительно 4% редактирования гена РАН наблюдалось в клетках, взятых у мышей через 1 неделю после введения вектора, и приблизительно 7% в клетках, взятых у мышей через 6 недель после введения вектора.

[00233] Было обнаружено, что редактирование генома, опосредованное вектором рНМІК-hРАН-hI1C-032, является специфичным для человеческих гепатоцитов у мышей HuLiv. Как показано на фигуре 13, через 1 неделю после введения вектора, редактирование гена РАН (как было определено с помощью кцПЦР и NGS) составляло на уровне приблизительно от 3% до 3,5% по отношению к числу аллелей генома человека, тогда как редактирование мышинного генома в образце печени было близко к 0% по отношению к числу аллелей мышинного генома. Через 6 недель после введения вектора, редактирование составляло приблизительно от 5% до 6,5% по отношению к числу аллелей человеческого генома. * означает $p < 0,0025$ по сравнению со значениями для мыши.

[00234] Кроме того, было обнаружено, что вектор рНМІК-hРАН-hI1C-032 неэффективен в клетках, не являющихся человеческими клетками. Как показано на фигуре 14, если мышам с нокаутом РАН (РАН^{ENU2}) внутривенно вводили вектор рНМІК-hРАН-hI1C-032 (hРАН-032), упакованный в капсиды AAVHSC15, в дозе 1×10^{14} векторных геномов на килограмм массы тела, то уровень фенилаланина в сыворотке был аналогичен уровню у мышей, которым вводили контроль через 3 недели после инъекции. В противоположность этому, у мышей, которым вводили вектор рНМІ-hРАН-mAC-006 (mРАН-006), наблюдалось снижение уровней Phe в сыворотке уже через 1 неделю после инъекции.

[00235] На фигуре 15А показана взаимосвязь между уровнями экспрессии человеческого РАН и уровнями Phe в сыворотке. Как показали данные, полученные из экспериментов с использованием вектора рНМІ-hРАН-mAC-006 у мышей РАН^{ENU2}, 10% экспрессия человеческого РАН корректирует фенотип у мышей РАН^{ENU2}. Таким образом, было определено, что 10% уровень экспрессии человеческого РАН по сравнению с эндогенными уровнями представляет собой уровень, необходимый для коррекции фенилаланинемии (например, терапевтический уровень).

[00236] Терапевтические уровни экспрессии детектировали с использованием вектора рНМІК-hРАН-hI1C-032. Экспрессию человеческого РАН в человеческих гепатоцитах оценивали по отношению к человеческому GAPDH у мышей HuLiv, которым вводили вектор рНМІК-hРАН-hI1C-032 (hРАН-032) в дозе 1×10^{14} векторных геномов на килограмм массы тела. Как показано на фигуре 15В, с использованием двух различных экспрессионных зондов для оценки экспрессии человеческого РАН у двух различных мышей HuLiv, обработанных вектором, экспрессия человеческого РАН была определена

как экспрессия, превышающая 10% в человеческих гепатоцитах. Уровень редактирования гена РАН в человеческих гепатоцитах у мышей HuLiv, которым вводили вектор, составлял приблизительно от 5% и приблизительно до 11% у 13 различных мышей в 3 различных экспериментах.

[00237] Было обнаружено, что вектор рНМІК-hРАH-hI1C-032 нацелен на ген человеческого РАН и дает скорректированные уровни отредактированной мРНК у мышей HuLiv. Уровень мРНК РАН, необходимый для фенотипической коррекции, был впервые установлен у мышей-моделей (мышей с моделью нокаута РАН (РАН^{ENU2})). Было установлено, что этот уровень экспрессии РАН составляет приблизительно 10% по сравнению с эндогенными уровнями (см. Фигуру 15А). Как показано на фигуре 16, экспрессия человеческого гена РАН по отношению к экспрессии GAPDH составляла приблизительно 44,9% (слева), а экспрессия мышинного гена РАН по отношению к экспрессии GAPDH, составляла приблизительно 39,7% (справа).

Пример 6: Человеческие РАН-корректирующие векторы

[00238] В этом примере представлены человеческие РАН-корректирующие векторы рKІTR-hРАH-mAC-006-HCR, рKІTR-hРАH-hI1C-032-HCR, рKІTR-hРАH-mAC-006-SD.3, рНМІА2-hРАH-hI1C-G32-SD.3 и рНМІА2-hРАH-mAC-006-HBB1. Эти векторы схематически представлены на фигурах 17А, 17В, 17С, 17D и 17Е, соответственно.

а) рKІTR-hРАH-mAC-006-HCR, рKІTR-hРАH-hI1C-032-HCR и рНМІА2-hРАH-mAC-006-HBB1

[00239] Векторы рKІTR-hРАH-mAC-006-HCR и рKІTR-hРАH-hI1C-032-HCR получали путем встраивания интрона HCR в кодирующую последовательность РАН. Вектор рНМІА2-hРАH-mAC-006-HBB1 получали путем встраивания интрона HBB1 в кодирующую последовательность РАН. Интроны HCR и HBB1 были отобраны исходя из их эффективности в экспериментах по скринингу интронов с использованием люциферазного репортера для определения интронов, которые обнаруживают высокий уровень экспрессии в клеточных линиях печени и крови. Интроны, используемые для скрининга, представлены в Таблице 12.

Таблица 12: Последовательности интронов, используемые в скрининге с помощью люциферазных репортеров

Интрон	SEQ ID NO
Химерный интрон MVM (ChiMVM)	120
Интрон SV40	121
Аденовирусный трехкомпонентный лидерный интрон (AdTPL)	122
Интрон мини-В-глобина	123
Химерный интрон AdV/Ig (AdVIgG)	124
Интрон тяжелой цепи Ig В-глобина (BGlobinIg)	125
Интрон Wu MVM (Wu MVM)	126

Интрон HCR1 (OptHCR)	127
Интрон В-глобина	128
Интрон tFIX (FIX)	129
Интрон ch2BLood (BloodEnh)	130

[00240] pKlTR-hPAH-mAC-006-HCR содержит, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; кодирующую последовательность человеческого PAH с молчащей модификацией и со встроенным интроном HCR; последовательность полиаденилирования SV40; рестрикционный кластер для нацеленной интеграции («TI RE»), 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. pKlTR-hPAH-hl1C-032-HCR содержит, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; акцептор сплайсинга; элемент 2A; кодирующую последовательность человеческого PAH с молчащей модификацией и со встроенным интроном HCR; последовательность полиаденилирования SV40; 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. pHMTA2-hPAH-mAC-006-HBB1 содержит, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; кодирующую последовательность человеческого PAH с молчащей модификацией и со встроенным интроном HBB; последовательность полиаденилирования SV40; рестрикционный кластер для нацеленной интеграции («TI RE»), 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности этих элементов представлены в Таблице 13.

Таблица 13: Генетические элементы в PAH-корректирующих векторах pKlTR-hPAH-mAC-006-HCR, pKlTR-hPAH-hl1C-032-HCR и pHMTA2-hPAH-mAC-006-HBB1

Генетический элемент	SEQ ID NO		
	-006-HCR	-032-HCR	-006-HBB1
Элемент 5'-ITR	18	18	18
5'-плечо гомологии	111	115	142
Акцептор сплайсинга	N/A	14	N/A
Элемент 2A	N/A	74	N/A
Кодирующая последовательность человеческого PAH	131	132	143
Последовательность полиаденилирования SV40	31	31	31
Рестрикционный кластер для нацеленной интеграции	71	N/A	71
3'-плечо гомологии	112	117	144
Элемент 3'-ITR	19	19	19
Корректирующий геном (от 5'-НА до 3'-НА)	134	136	145
Корректирующий геном (от 5'-ITR до 3'-ITR)	135	137	146

b) pHMIA2-hPAH-mAC-006-SD.3 и pHMIA2-hPAH-hI1C-032-SD.3.

[00241] Векторы pK1TR-hPAH-mAC-006-SD.3 и pHMIA2-hPAH-hNC-032-SD.3 были получены путем модификации донорного сайта сплайсинга. Донор сплайсинга был модифицирован как показано на фигурах 17C и 17D, соответственно. pKTTR-hPAH-mAC-006-SD.3 содержал, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; кодирующую последовательность человеческого PAH с молчащей модификацией и с модификацией донора сплайсинга; последовательность полиаденилирования SV40; рестрикционный кластер для нацеленной интеграции («TI RE»), 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. pHMIA2-hPAH-hI1C-032-SD.3 содержал, от 5'- до 3'-конца, следующие генетические элементы: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; акцептор сплайсинга; элемент 2A; кодирующую последовательность человеческого PAH с молчащей модификацией и с модификацией донора сплайсинга; последовательность полиаденилирования SV40; 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности этих элементов представлены в Таблице 14.

Таблица 14: Генетические элементы в PAH-корректирующих векторах pK1TR-hPAH-mAC-006-SD.3 и pHMIA2-hPAH-hI1C-032-SD.3

Генетический элемент	SEQ ID NO	
	-006-SD.3	-032-SD.3
Элемент 5'-ITR	18	18
5'-плечо гомологии	111	115
Акцептор сплайсинга	N/A	14
Элемент 2A	N/A	74
Кодирующая последовательность человеческого PAH	138	139
Последовательность полиаденилирования SV40	31	31
Рестрикционный кластер для нацеленной интеграции	71	N/A
3'-плечо гомологии	112	117
Элемент 3'-ITR	19	19

* * *

[00242] Объем настоящего изобретения не ограничивается описанными здесь конкретными вариантами его осуществления. Действительно, в настоящее изобретение могут быть внесены различные модификации, которые будут очевидны для специалистов в данной области техники исходя из предшествующего описания и прилагаемых чертежей. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00243] Все цитируемые здесь документы (например, публикации или патенты или патентные заявки) включены в настоящее описание в полном объеме и во всех целях посредством ссылки так, как если бы каждый отдельный документ (например, публикация или патент или патентная заявка) был конкретно и отдельно введен в настоящее описание в полном объеме и во всех целях посредством ссылки. Другие варианты осуществления

изобретения входят в объем нижеследующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ коррекции мутации в гене фенилаланин-гидроксилазы (РАН) в клетке, включающий трансдукцию клетки дефектным по репликации аденоассоциированным вирусом (AAV), содержащим:

(a) капсид AAV; и

(b) корректирующий геном, содержащий: (i) элемент редактирования локуса-мишени в гене РАН; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную у 5'-конца элемента редактирования, гомологичного первой геномной области, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени; и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную у 3'-конца элемента редактирования, гомологичного второй геномной области, расположенной у 3'-конца по отношению к локусу-мишени;

где клетку трансдуцируют без ко-трансдукции или совместного введения экзогенной нуклеазы или нуклеотидной последовательности, которая кодирует экзогенную нуклеазу.

2. Способ по п.1, в котором клетка представляет собой гепатоцит, почечную клетку или клетку головного мозга, гипофиза, коры надпочечника, поджелудочной железы, мочевого пузыря, желчного пузыря, толстой кишки, тонкой кишки или молочной железы.

3. Способ по п.1 или 2, в котором клетка присутствует у индивидуума-млекопитающего, и AAV вводят индивидууму в количестве, эффективном для трансдукции клетки у индивидуума.

4. Способ лечения индивидуума, страдающего заболеванием или расстройством, ассоциированным с мутацией гена РАН, включающий введение индивидууму эффективного количества дефектного по репликации AAV, содержащего:

(a) капсид AAV; и

(b) корректирующий геном, содержащий: (i) элемент редактирования локуса-мишени в гене РАН; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную у 5'-конца элемента редактирования, гомологичного первой геномной области, расположенной у 5'-конца по отношению к локусу-мишени; и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную у 3'-конца элемента редактирования, гомологичного второй геномной области, расположенной у 3'-конца по отношению к локусу-мишени;

где экзогенную нуклеазу или нуклеотидную последовательность, которая кодирует экзогенную нуклеазу, не вводят индивидууму совместно.

5. Способ по п.4, в котором заболевание или расстройство представляет собой фенилкетонурию.

6. Способ по п.4 или 5, в котором индивидуумом является человек.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором элемент редактирования содержит по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН.

8. Способ по п.7, в котором элемент редактирования содержит кодирующую

последовательность РАН.

9. Способ по п.7 или 8, в котором кодирующая последовательность РАН кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23.

10. Способ по пп. 7-9, в котором кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

11. Способ по любому из пп. 7-9, в котором кодирующая последовательность РАН имеет молчащую модификацию.

12. Способ по п.11, в котором кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, 116, 131, 132, 138, 139 или 143.

13. Способ по п.7, в котором элемент редактирования содержит кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН, где, но необязательно, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит ненативный интрон, встроенный в кодирующую последовательность РАН.

14. Способ по п.13, в котором ненативный интрон выбран из группы, состоящей из первого интрона гена гемоглобина-бета и «минут»-вируса в интроне у мышей (MVM).

15. Способ по п.14, в котором ненативный интрон состоит из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 28-30 и 120-130.

16. Способ по п.15, в котором ненативный интрон состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 28-30 и 120-130.

17. Способ по любому из пп. 13-16, в котором кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23.

18. Способ по любому из пп. 13-17, в котором кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит от 5'- до 3'-конца: первую часть кодирующей последовательности РАН; интрон, и вторую часть кодирующей последовательности РАН, где первая часть и вторая часть, если они являются сплайсированными, образуют полноразмерную кодирующую последовательность РАН.

19. Способ по п.18, в котором кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

20. Способ по п.18, в котором кодирующая последовательность РАН имеет молчащую модификацию.

21. Способ по п.20, в котором кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, 116, 131, 132, 138, 139 или 143.

22. Способ по любому из пп. 18-21, в котором первая часть кодирующей последовательности РАН содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64 или 65, и/или вторая часть кодирующей последовательности РАН содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66 или 67.

23. Способ по любому из пп. 18-22, в котором первая часть кодирующей

последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64 или 65, а вторая часть кодирующей последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66 или 67.

24. Способ по любому из пп. 7-23, в котором элемент редактирования содержит, от 5'- до 3'-конца: элемент вырезания рибосомы и кодирующую последовательность РАН или кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН.

25. Способ по п.24, в котором элемент редактирования также содержит последовательность полиаденилирования, расположенную у 3'-конца по отношению к кодирующей последовательности РАН или кодирующей последовательности со встроенным интроном РАН.

26. Способ по п.25, в котором последовательность полиаденилирования представляет собой экзогенную последовательность полиаденилирования, где, в случае необходимости, экзогенная последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования SV40.

27. Способ по п.26, в котором последовательность полиаденилирования SV40 содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-34.

28. Способ по любому из пп. 24-27, в котором нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, находится в экзоне гена РАН.

29. Способ по любому из пп. 24-28, в котором нуклеотид, расположенный у 5'-конца по отношению к локусу-мишени, находится в экзоне 1 гена РАН.

30. Способ по любому из пп. 24-27, в котором элемент редактирования дополнительно содержит акцептор сплайсинга у 5'-конца по отношению к элементу вырезания рибосомы.

31. Способ по п.30, в котором нуклеотид у 5'-конца по отношению к локусу-мишени находится в интроне гена РАН.

32. Способ по п.30 или 31, в котором нуклеотид у 5'-конца по отношению к локусу-мишени находится в интроне 1 гена РАН.

33. Способ по любому из пп. 1-32, в котором элемент редактирования содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35.

34. Способ по любому из пп. 1-33, в котором нуклеотидная последовательность 5'-плеча гомологии по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична первой геномной области.

35. Способ по любому из пп. 1-34, в котором нуклеотидная последовательность 3'-плеча гомологии по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична второй геномной области.

36. Способ по любому из пп. 1-35, в котором первая геномная область расположена в первом окне редактирования, а вторая геномная область расположена во втором окне редактирования.

37. Способ по п.36, в котором первое окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 или 45.

38. Способ по п.36 или 37, в котором второе окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 или 45.

39. Способ по любому из пп. 36-38, в котором первое окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, а второе окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

40. Способ по любому из пп. 1-39, в котором первая геномная область состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36.

41. Способ по любому из пп. 1-40, в котором вторая геномная область состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

42. Способ по любому из пп. 1-41, в котором каждая из нуклеотидных последовательностей 5'- и 3'-плечей гомологии независимо имеет длину приблизительно от 100 и приблизительно до 2000 нуклеотидов.

43. Способ по любому из пп. 1-42, где 5'-плечо гомологии содержит: С, соответствующий нуклеотиду -2 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 4 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 6 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 7 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 9 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -467 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -465 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -181 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду -214 гена РАН; C, соответствующий нуклеотиду -212 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 194 гена РАН; C, соответствующий нуклеотиду -433 гена РАН; C, соответствующий нуклеотиду -432 гена РАН; ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68), соответствующую нуклеотидам от -394 до -388 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -341 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -339 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -225 гена РАН; A, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН; и/или A, соответствующий нуклеотиду -203 гена РАН.

44. Способ по любому из пп. 1-43, где 5'-плечо гомологии содержит:

(a) С, соответствующий нуклеотиду -2 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 4 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 6 гена РАН; G, соответствующий нуклеотиду 7 гена РАН; и G, соответствующий нуклеотиду 9 гена РАН;

(b) A, соответствующий нуклеотиду -467 гена РАН и A, соответствующий нуклеотиду -465 гена РАН;

(c) A, соответствующий нуклеотиду -181 гена РАН;

(d) G, соответствующий нуклеотиду -214 гена РАН, C, соответствующий нуклеотиду -212 гена РАН, и A, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН;

(e) G, соответствующий нуклеотиду 194 гена РАН;

(f) C, соответствующий нуклеотиду -433 гена РАН, и C, соответствующий нуклеотиду -432 гена РАН;

(g) ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68), соответствующую нуклеотидам от -394 до -388 гена РАН; и/или

(h) А, соответствующий нуклеотиду -341 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -339 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -225 гена РАН; А, соответствующий нуклеотиду -211 гена РАН; и А, соответствующий нуклеотид -203 гена РАН.

45. Способ по п.44, в котором 5'-плечо гомологии содержит модификации (с) и (d), (f) и (g) и/или (b) и (h).

46. Способ по любому из пп. 1-45, в котором 5'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 36-44, 111, 115 и 142.

47. Способ по любому из пп. 1-46, в котором 3'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, 112, 117, 144.

48. Способ по любому из пп. 1-47, в котором корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 46-54, 113, 118, 134, 136 и 145.

49. Способ по любому из пп. 1-48, в котором корректирующий геном дополнительно содержит нуклеотидную последовательность 5'-инвертированного концевого повтора (5'-ITR), расположенную у 5'-конца нуклеотидной последовательности 5'-плеча гомологии, и нуклеотидную последовательность 3'-инвертированного концевого повтора (3'-ITR), расположенную у 3'-конца нуклеотидной последовательности 3'-плеча гомологии.

50. Способ по п.49, в котором нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, а нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 19.

51. Способ по п.49, в котором нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 20, а нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 21.

52. Способ по п.49, в котором нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 26, а нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 27.

53. Способ по любому из пп. 1-52, в котором корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 55-63, 114, 119, 135, 137 и 146.

54. Способ по любому из пп. 1-53, в котором корректирующий геном состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 55-63, 114, 119, 135, 137 и 146.

55. Способ по любому из пп. 1-54, в котором капсид AAV содержит капсидный белок AAV кладотипа F.

56. Способ по любому из пп. 1-55, в котором капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

57. Способ по п.56, в котором: аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой С; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой Н; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой А; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2 представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой С; или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G.

58. Способ по п.57, в котором

(а) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой Н, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M;

(с) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID

NO: 2, представляет собой A, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; или

(е) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, и аминокислота в белок капсида, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C.

59. Способ по п.57, в котором капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16, или 17.

60. Способ по любому из пп. 1-59, в котором капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

61. Способ по п.60, в котором аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 SEQ ID NO: 2, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте, добавляющей 468 SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G.

62. Способ по п.61, в котором:

(а) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID

NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в белок капсида, соответствующий аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M;

(с) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2 представляет собой R;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; а аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте, добавляют 505 SEQ ID NO: 2 представляет собой R; или

(е) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C.

63. Способ по п.61, в котором капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

64. Способ по любому из пп. 1-63, в котором капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 1-736 последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

65. Способ по п.64, в котором: аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 SEQ ID NO: 2, представляет собой T; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 68 SEQ ID NO: 2, представляет собой V; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 SEQ ID NO: 2, представляет собой L; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 SEQ ID NO: 2, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте, добавляют 468 SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в

(а) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 SEQ ID NO: 2, представляет собой Т; а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q;

(с) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K;

(е) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G;

(g) аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; и аминокислота в капсидном белке, соответствующем аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R;

(i) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующем

аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в белок капсида, соответствующий аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C.

67. Способ по п.65, в котором капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

68. Способ по любому из пп. 1-67, в котором эффективность интеграции элемента редактирования в локус-мишень составляет по меньшей мере 1%, если AAV вводят мышам, которым были имплантированы человеческие гепатоциты, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

69. Способ по любому из пп. 1-68, в котором частота аллельной интеграции элемента редактирования в локус-мишень составляет по меньшей мере 0,5%, если AAV вводят мышам, которым были имплантированы человеческие гепатоциты, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

70. Дефектный по репликации аденоассоциированный вирус (AAV), содержащий:

(a) капсид AAV; и

(b) корректирующий геном, содержащий: (i) элемент редактирования локуса-мишени в гене РАН; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную у 5'-конца элемента редактирования, гомологичного первой геномной области у 5'-конца по отношению к локусу-мишени; и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную у 3'-конца элемента редактирования, гомологичного второй геномной области у 3'-конца по отношению к локусу-мишени;

71. AAV по п.70, в котором элемент редактирования содержит по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН.

72. AAV по п.70 или 71, в котором элемент редактирования содержит кодирующую последовательность РАН.

73. AAV по п.71 или 72, в котором кодирующая последовательность РАН кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23.

74. AAV по п.73, в котором кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

75. AAV по п.73, в котором кодирующая последовательность РАН имеет молчащую модификацию.

76. AAV по п.75, в котором кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, 116, 131, 132, 138, 139 или 143.

77. AAV по п.71, в котором элемент редактирования содержит кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН, где, но необязательно, кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН содержит ненативный интрон, встроенный в кодирующую последовательность РАН.

78. AAV по п.77, в котором ненативный интрон выбран из группы, состоящей из первого интрона гена гемоглобина-бета и «минут»-вируса в интроне у мышей (MVM).

79. AAV по п.78, в котором ненативный интрон состоит из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 28-30 и 120-130.

80. AAV по п.79, в котором ненативный интрон состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 28-30 и 120-130.

81. AAV по любому из пп. 77-80, в котором кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23.

82. AAV по любому из пп. 77-81, в котором кодирующая последовательность со встроенным интроном РАН, содержит от 5'- до 3'-конца: первую часть кодирующей последовательности РАН, интрон и вторую часть кодирующей последовательности РАН, где первая часть и вторая часть, при их сплайсинге, образуют полноразмерную кодирующую последовательность РАН.

83. AAV по п.82, в котором кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

84. AAV по п.82, в котором кодирующая последовательность РАН имеет молчащую модификацию.

85. AAV по п.84, в котором кодирующая последовательность РАН содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, 116, 131, 132, 138, 139 или 143.

86. AAV по любому из пп. 82-85, в котором первая часть кодирующей последовательности РАН содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64 или 65, и/или вторая часть кодирующей последовательности РАН содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66 или 67.

87. AAV по любому из пп. 82-86, в котором первая часть кодирующей последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64 или 65, а вторая часть кодирующей последовательности РАН состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66 или 67.

88. AAV по любому из пп. 71-87, в котором элемент редактирования содержит от 5'- до 3'-конца: элемент вырезания рибосомы и кодирующую последовательность РАН или кодирующую последовательность со встроенным интроном РАН.

89. AAV по п.88, в котором элемент редактирования дополнительно содержит последовательность полиаденилирования у 3'-конца по отношению к кодирующей последовательности РАН или кодирующей последовательности со встроенным интроном РАН.

90. AAV по п.89, в котором последовательность полиаденилирования представляет собой экзогенную последовательность полиаденилирования, где, но необязательно, экзогенная последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования SV40.

91. AAV по п.90, в котором последовательность полиаденилирования SV40 содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-34.

92. AAV по любому из пп. 88-91, в котором нуклеотид у 5'-конца по отношению к локусу-мишени находится в экзоне гена PАН.

93. AAV по любому из пп. 88-92, в котором нуклеотид у 5'-конца по отношению к локусу-мишени находится в экзоне 1 гена PАН.

94. AAV по любому из пп. 88-91, в котором элемент редактирования дополнительно содержит акцептор сплайсинга у 5'-конца по отношению к элементу вырезания рибосомы.

95. AAV по п.94, в котором нуклеотид у 5'-конца по отношению к локусу-мишени находится в интроне гена PАН.

96. AAV по п.94 или 95, в котором нуклеотид у 5'-конца по отношению к локусу-мишени находится в интроне 1 гена PАН.

97. AAV по любому из пп. 70-96, в котором элемент редактирования содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35.

98. AAV по любому из пп. 70-97, в котором нуклеотидная последовательность 5'-плеча гомологии по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична первой геномной области.

99. AAV по любому из пп. 70-98, в котором нуклеотидная последовательность 3'-плеча гомологии по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична второй геномной области.

100. AAV по любому из пп. 70-99, в котором первая геномная область расположена в первом окне редактирования, а вторая геномная область расположена во втором окне редактирования.

101. AAV по п.100, в котором первое окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 или 45.

102. AAV по п.100 или 101, в котором второе окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 или 45.

103. AAV по любому из пп. 100-102, в котором первое окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, а второе окно редактирования состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

104. AAV по любому из пп. 70-103, в котором первая геномная область состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36.

105. AAV по любому из пп. 70-104, в котором вторая геномная область состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

106. AAV по любому из пп. 70-105, в котором каждая из нуклеотидных последовательностей 5'- и 3'-плеч гомологии независимо имеет длину приблизительно от 100 и до приблизительно 2000 нуклеотидов.

107. AAV по любому из пп. 70-106, в котором 5'-плечо гомологии содержит: С, соответствующий нуклеотиду -2 гена PАН; G, соответствующий нуклеотиду 4 гена PАН; G, соответствующий нуклеотиду 6 гена PАН; G, соответствующий нуклеотиду 7 гена PАН; G, соответствующий нуклеотиду 9 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -467 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -465 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -181 гена PАН; G, соответствующий нуклеотиду -214 гена PАН; С, соответствующий нуклеотиду -212 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -211 гена PАН; G, соответствующий нуклеотиду 194 гена PАН; С, соответствующий нуклеотиду -433 гена PАН; С, соответствующий нуклеотиду -432 гена PАН; ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68), соответствующую нуклеотидам от -394 до -388 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -341 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -339 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -225 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -211 гена PАН; и/или А, соответствующий нуклеотиду -203 гена PАН.

108. AAV по любому из пп. 70-107, в котором 5'-плечо гомологии содержит:

(a) С, соответствующий нуклеотиду -2 гена PАН; G, соответствующий нуклеотиду 4 гена PАН; G, соответствующий нуклеотиду 6 гена PАН; G, соответствующий нуклеотиду 7 гена PАН; и G, соответствующий нуклеотиду 9 гена PАН;

(b) А, соответствующий нуклеотиду -467 гена PАН и А, соответствующий нуклеотиду -465 гена PАН;

(c) А, соответствующий нуклеотиду -181 гена PАН;

(d) G, соответствующий нуклеотиду -214 гена PАН, С, соответствующий нуклеотиду -212 гена PАН, и А, соответствующий нуклеотиду -211 гена PАН;

(e) G, соответствующий нуклеотиду 194 гена PАН;

(f) С, соответствующий нуклеотиду -433 гена PАН, и С, соответствующий нуклеотиду -432 гена PАН;

(g) ACGCTGTTCTTCGCC (SEQ ID NO: 68), соответствующую нуклеотидам от -394 до -388 гена PАН; и/или

(h) А, соответствующий нуклеотиду -341 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -339 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -225 гена PАН; А, соответствующий нуклеотиду -211 гена PАН; и А, соответствующий нуклеотид -203 гена PАН.

109. AAV по п.108, в котором 5'-плечо гомологии содержит модификации (c) и (d), (f) и (g) и/или (b) и (h).

110. AAV по любому из пп. 70-109, в котором 5'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 36-44, 111, 115 и 142.

111. AAV по любому из пп. 70-110, в котором 3'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, 112, 117, 144.

112. AAV по любому из пп. 70-111, в котором корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 46-54, 113,

118, 134, 136 и 145.

113. AAV по любому из пп. 70-112, в котором корректирующий геном дополнительно содержит нуклеотидную последовательность 5'-инвертированного концевой повтора (5'-ITR), расположенную у 5'-конца нуклеотидной последовательности 5'-плеча гомологии, и нуклеотидную последовательность 3'-инвертированного концевой повтора (3'-ITR), расположенную у 3'-конца нуклеотидной последовательности 3'-плеча гомологии.

114. AAV по п.113, в котором нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, а нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 19.

115. AAV по п.113, в котором нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 20, а нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 21.

116. AAV по п.113, в котором нуклеотидная последовательность 5'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 26, а нуклеотидная последовательность 3'-ITR имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 27.

117. AAV по любому из пп. 70-116, в котором корректирующий геном содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 55-63, 114, 119, 135, 137 и 146.

118. AAV по любому из пп. 70-117, в котором корректирующий геном состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 55-63, 114, 119, 135, 137 и 146.

119. AAV по любому из пп. 70-118, в котором капсид AAV содержит капсидный белок AAV кладотипа F.

120. AAV по любому из пп. 70-119, в котором капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

121. AAV по п.120, в котором: аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой С; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой Н; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой А; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2,

представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2 представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G.

122. AAV по п.121, в котором

(a) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M;

(c) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; или

(e) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, и аминокислота в белок капсида, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C.

123. AAV по п.121, в котором капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

124. AAV по любому из пп. 70-123, в котором капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

125. AAV по п.121, в котором аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке,

127. AAV по п.125, в котором капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

128. AAV по любому из пп. 70-127, в котором капсидный белок AAV кладотипа F содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

129. AAV по п.128, в котором: аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 SEQ ID NO: 2, представляет собой T; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 68 SEQ ID NO: 2, представляет собой V; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 SEQ ID NO: 2, представляет собой L; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 SEQ ID NO: 2, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте, добавляющей 468 SEQ ID NO: 2, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C; или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G.

130. AAV по п.129, в котором:

(a) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 SEQ ID NO: 2, представляет собой T; а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 SEQ ID NO: 2, представляет собой Q;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 SEQ ID

NO: 2, представляет собой I; а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой Y;

(с) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 SEQ ID NO: 2, представляет собой R, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 SEQ ID NO: 2, представляет собой K;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 SEQ ID NO: 2, представляет собой L, а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 SEQ ID NO: 2, представляет собой S;

(е) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 SEQ ID NO: 2, представляет собой G, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 SEQ ID NO: 2, представляет собой G;

(f) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 SEQ ID NO: 2, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 SEQ ID NO: 2, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 SEQ ID NO: 2, представляет собой M;

(g) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 SEQ ID NO: 2, представляет собой R;

(h) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 SEQ ID NO: 2, представляет собой A; и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; или

(i) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 SEQ ID NO: 2, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 SEQ ID NO: 2, представляет собой R; а аминокислота в белок капсида, соответствующая аминокислоте 706 SEQ ID NO: 2, представляет собой C.

131. AAV по п.129, в котором капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

132. AAV по любому из пп. 70-131, в котором эффективность интеграции элемента редактирования в locus-мишень составляет по меньшей мере 1%, если AAV вводят мыши, которой были имплантированы человеческие гепатоциты, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

133. AAV по любому из пп. 70-132, в котором частота аллельной интеграции элемента редактирования в locus-мишень составляет по меньшей мере 0,5%, если AAV вводят мыши, которой были имплантированы человеческие гепатоциты, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

134. Фармацевтическая композиция, содержащая AAV по любому из пп. 70-133.

135. Система упаковки для получения рекомбинантного дефектного по репликации

AAV, содержащая:

(а) нуклеотидную последовательность Rep, кодирующую один или более белков AAV Rep;

(b) нуклеотидную последовательность Cap, кодирующую один или более капсидных белков AAV кладотипа F по любому из пп. 119-131; и

(с) корректирующий геном по любому из пп. 70-118, 132 и 133, где система упаковки функционирует в клетке, так, что она включает корректирующий геном в капсид с образованием AAV.

136. Система упаковки по п.135, где система упаковки содержит первый вектор, включающий нуклеотидную последовательность Rep и нуклеотидную последовательность Cap, и второй вектор, включающий корректирующий геном.

137. Система упаковки по п.135 или 136, в которой нуклеотидная последовательность Rep кодирует белок Rep AAV2.

138. Система упаковки по п.137, в которой белок Rep AAV2 представляет собой Rep 78/68 или Rep 68/52.

139. Система упаковки по п.137 или 138, в которой белок Rep AAV2 содержит аминокислотную последовательность с минимальным процентом идентичности аминокислотной последовательности Rep AAV2 SEQ ID NO: 22, где минимальная процентная идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 70% по всей длине аминокислотной последовательности, составляющей белок Rep AAV2.

140. Система упаковки по любому из пп. 136-139, дополнительно включающая третий вектор, где третий вектор представляет собой вектор вируса-помощника.

141. Система упаковки по п.140, в которой вектор вируса-помощника представляет собой независимый третий вектор.

142. Система упаковки по п.140, в которой вектор вируса-помощника объединен с первым вектором.

143. Система упаковки по п.140, в которой вектор вируса-помощника объединен со вторым вектором.

144. Система упаковки по любому из пп. 140-143, в которой третий вектор содержит гены, кодирующие белки вируса-помощника.

145. Система упаковки по любому из пп. 140-144, в которой вирус-помощник выбран из группы, состоящей из аденовируса, вируса герпеса, вируса осповакцины и цитомегаловируса (CMV).

146. Система упаковки по п.145, в которой вирусом-помощником является аденовирус.

147. Система упаковки по п.146, в которой геном аденовируса содержит один или более генов РНК аденовируса, выбранных из группы, состоящей из E1, E2, E4 и VA.

148. Система упаковки по п.145, в которой вирусом-помощником является вирус простого герпеса (HSV).

149. Система упаковки по п.148, в которой геном HSV содержит один или более

генов HSV, выбранных из группы, состоящей из UL5/8/52, ICPO, ICP4, ICP22 и UL30/UL42.

150. Система упаковки по любому из пп. 140-149, в которой первый вектор и третий вектор содержатся в первой трансфецирующей плазмиде.

151. Система упаковки по любому из пп. 140-149, в которой нуклеотиды второго вектора и третьего вектора содержатся во второй трансфецирующей плазмиде.

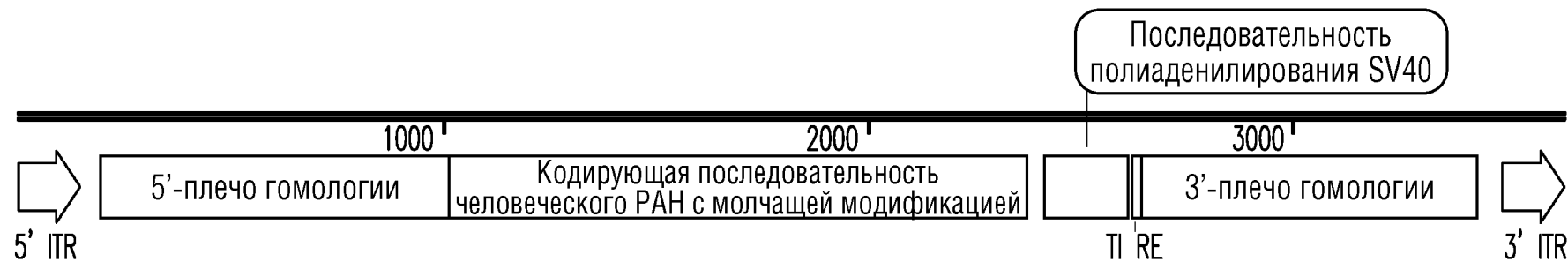
152. Система упаковки по любому из пп. 140-149, в которой нуклеотиды первого вектора и третьего вектора клонированы в рекомбинантный вирус-помощник.

153. Система упаковки по любому из пп. 140-149, в которой нуклеотиды второго вектора и третьего вектора клонированы в рекомбинантный вирус-помощник.

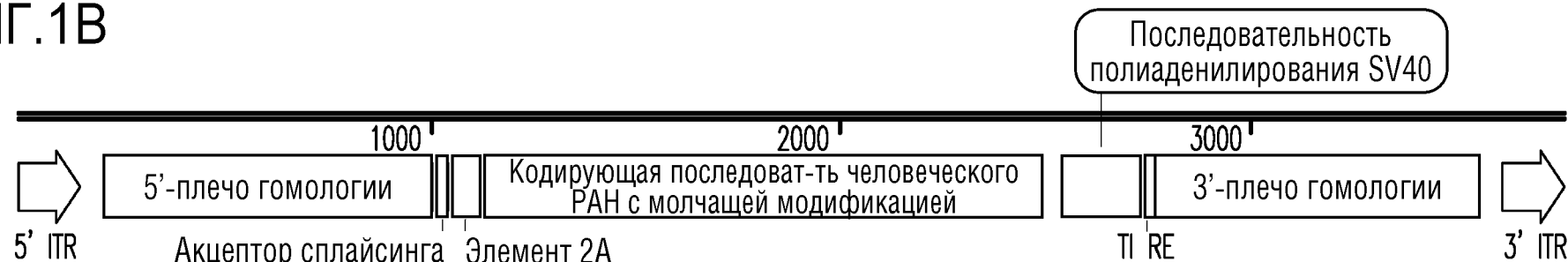
154. Способ получения рекомбинантного и дефектного по репликации AAV, включающий введение системы упаковки по любому из пп. 135-153 в клетку в условиях, подходящих для включения корректирующего генома в капсид с образованием AAV.

По доверенности

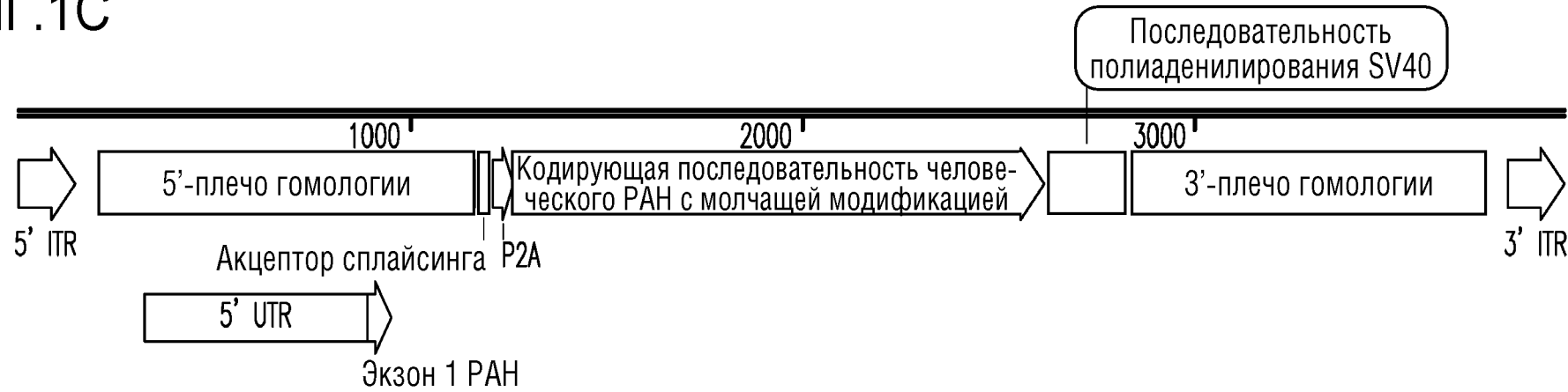
ФИГ.1А



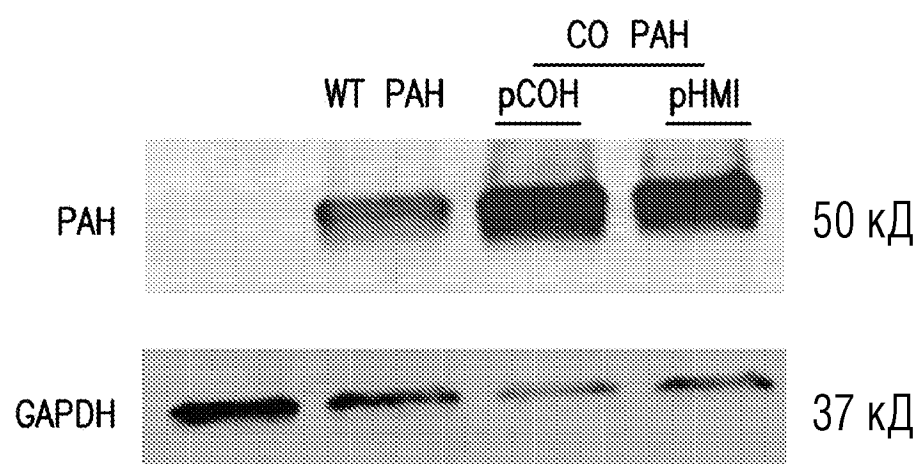
ФИГ.1В



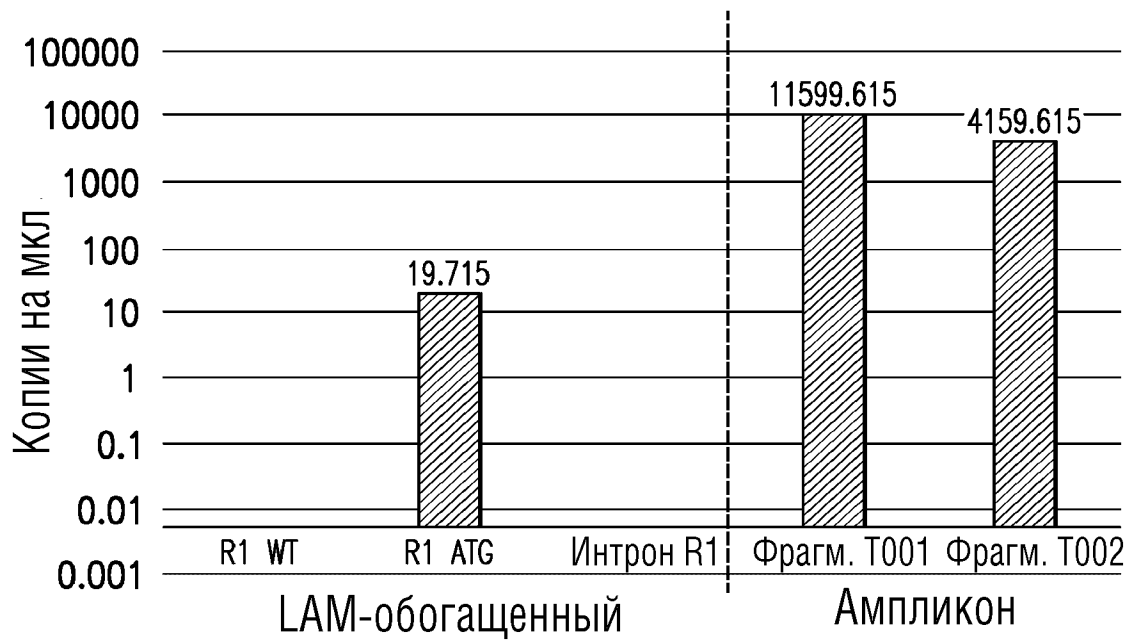
ФИГ.1С



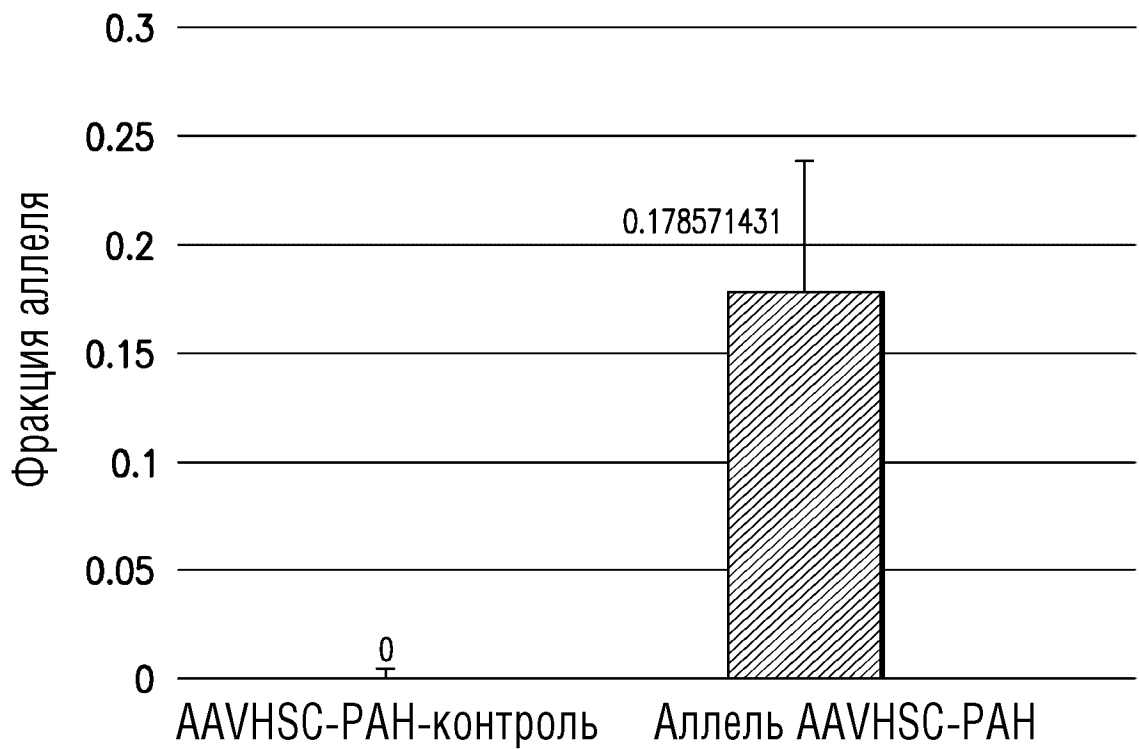
ФИГ.2



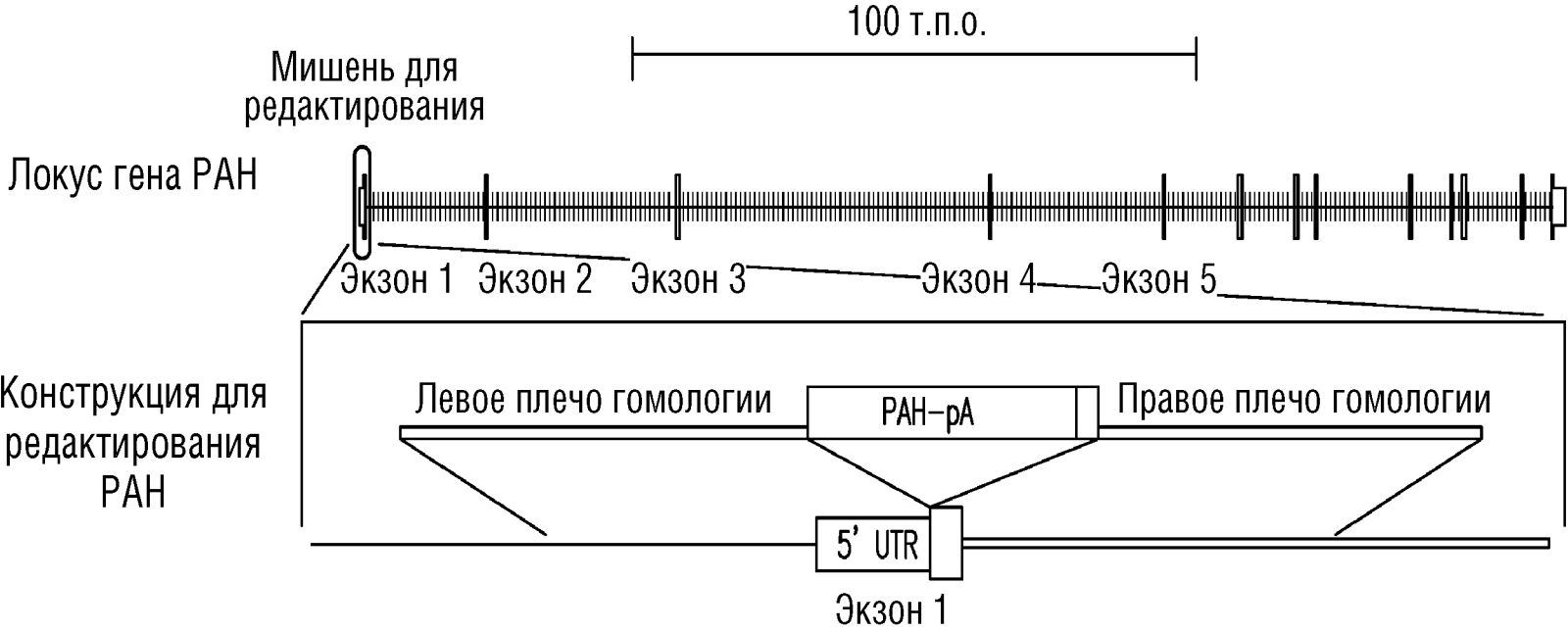
ФИГ.3А



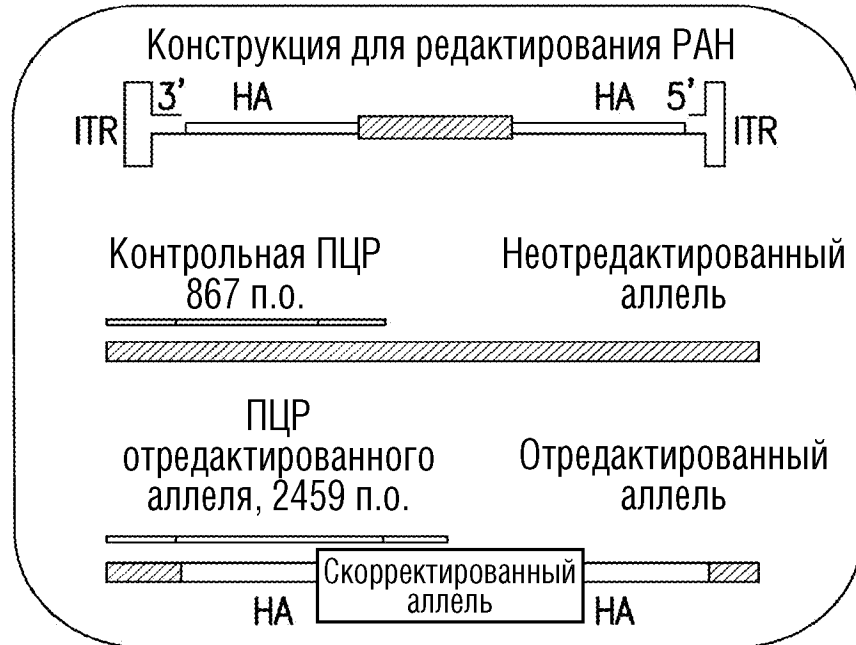
ФИГ.3В



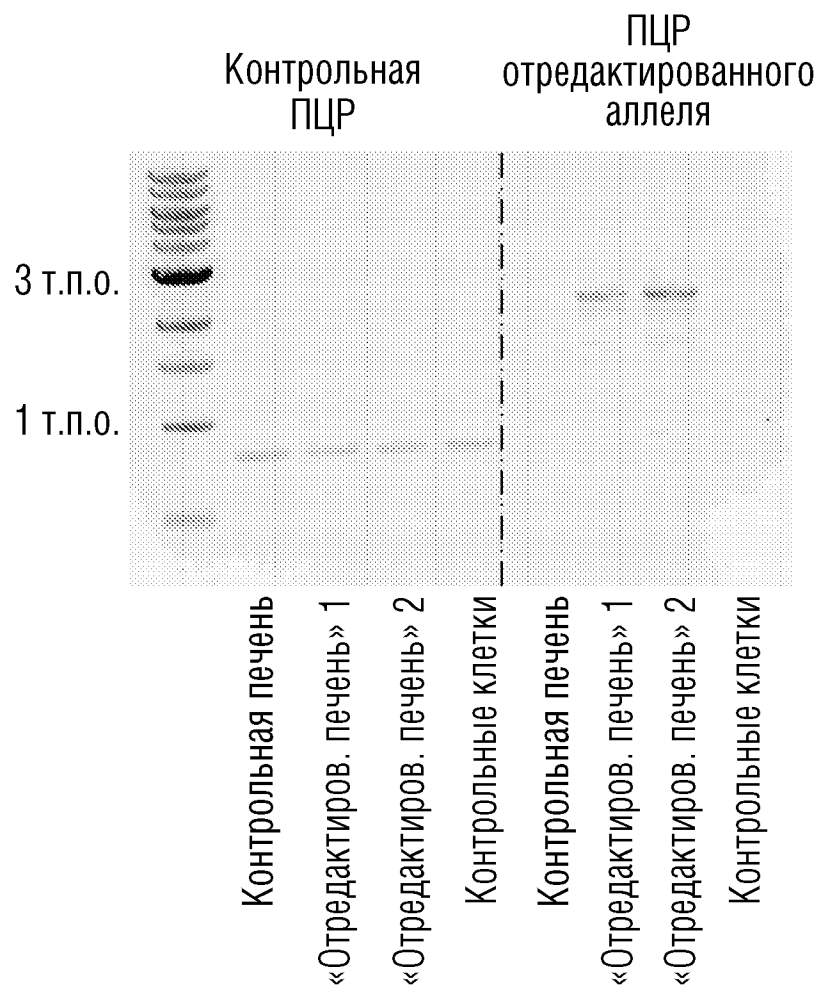
ФИГ.4А



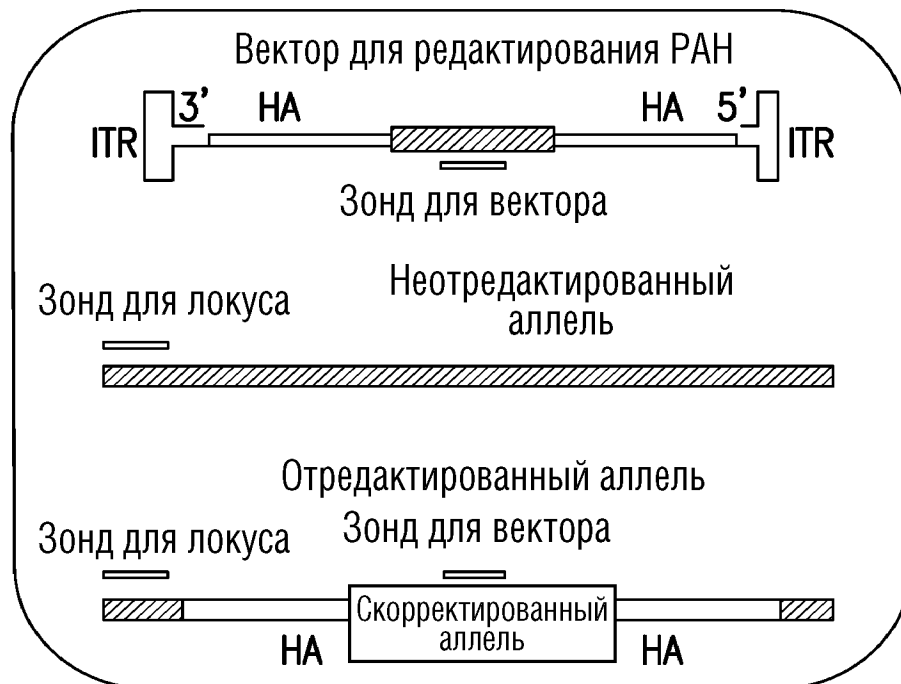
ФИГ.4В



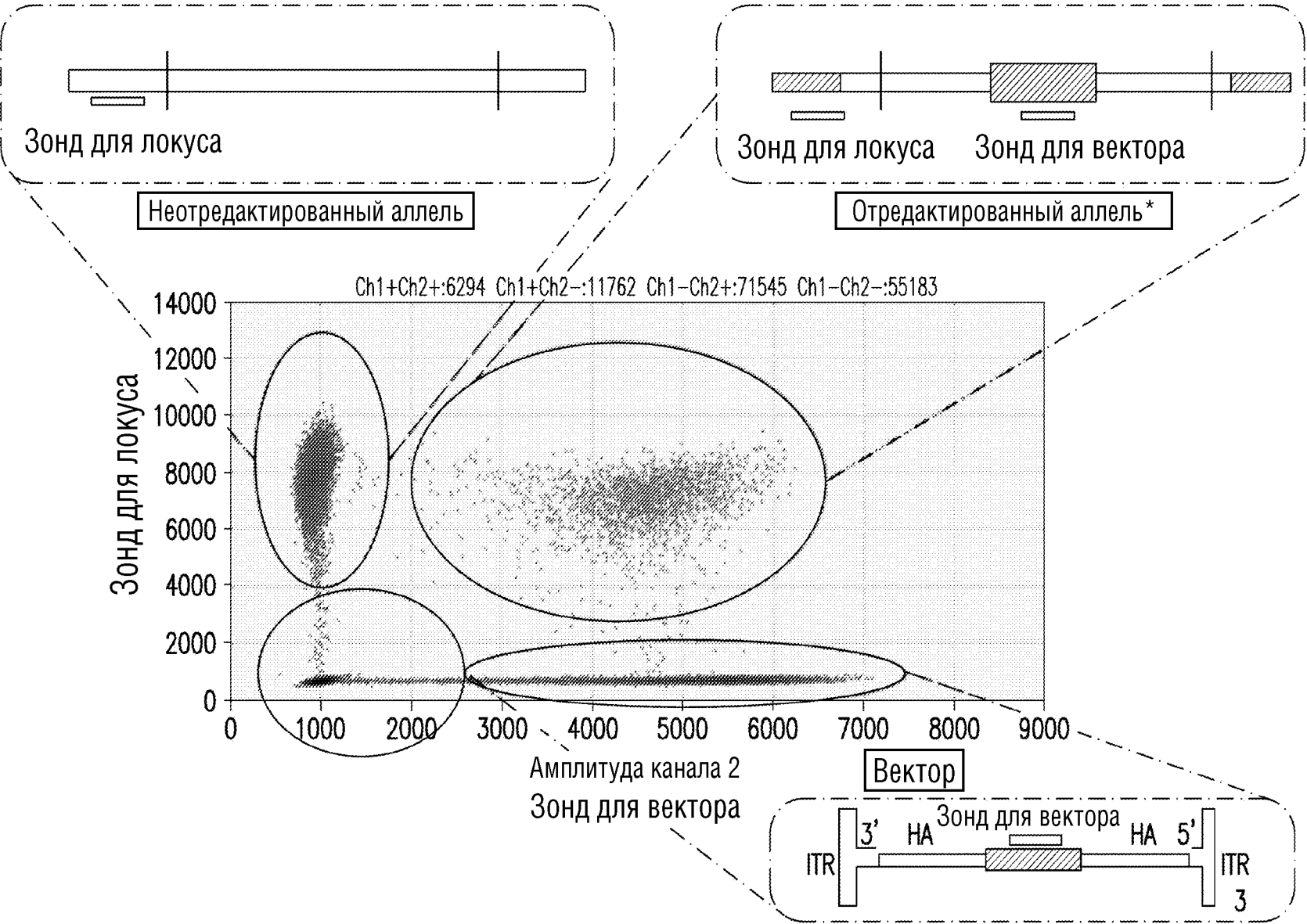
ФИГ.4С



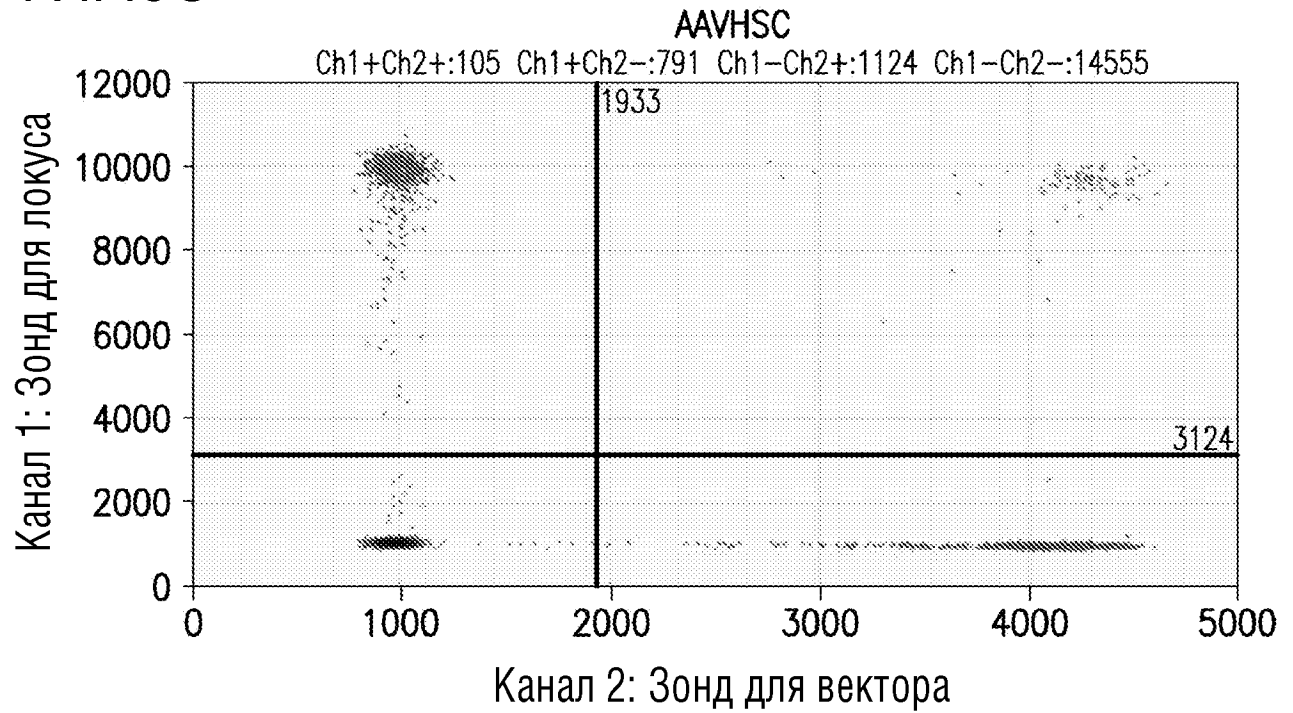
ФИГ.5А



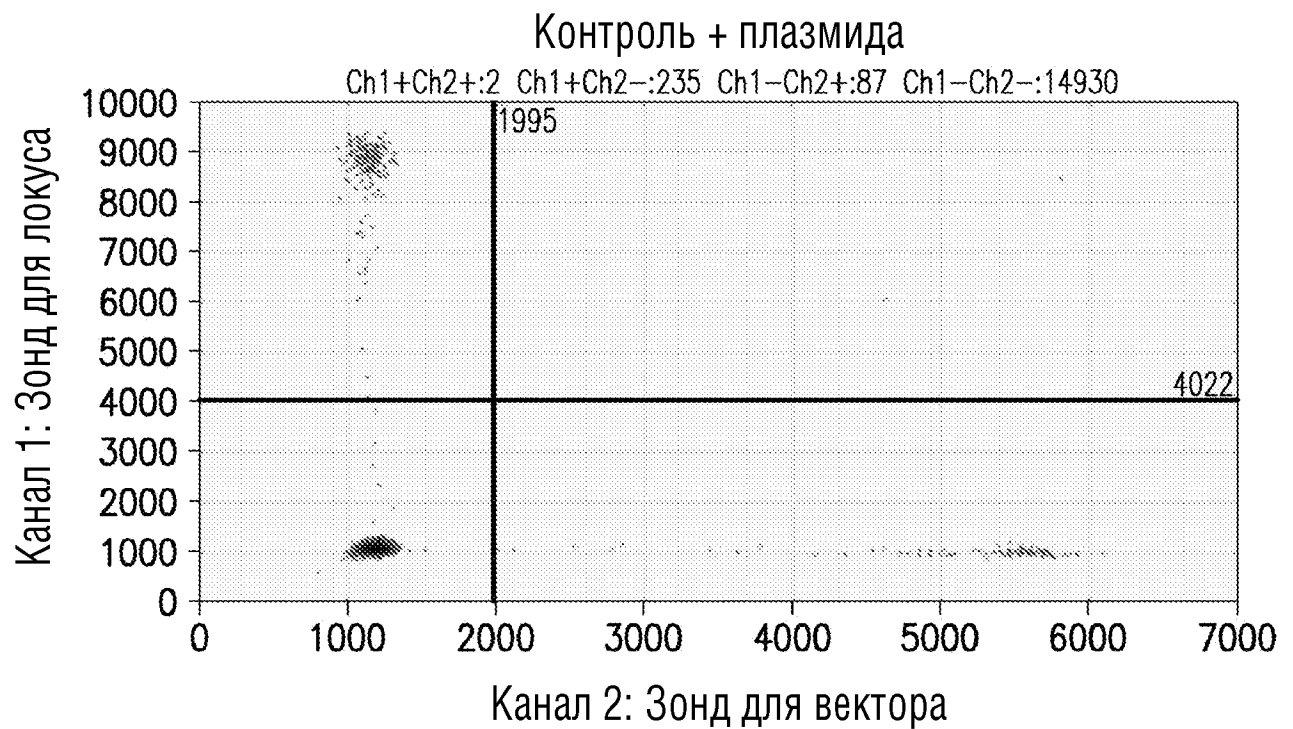
ФИГ.5В



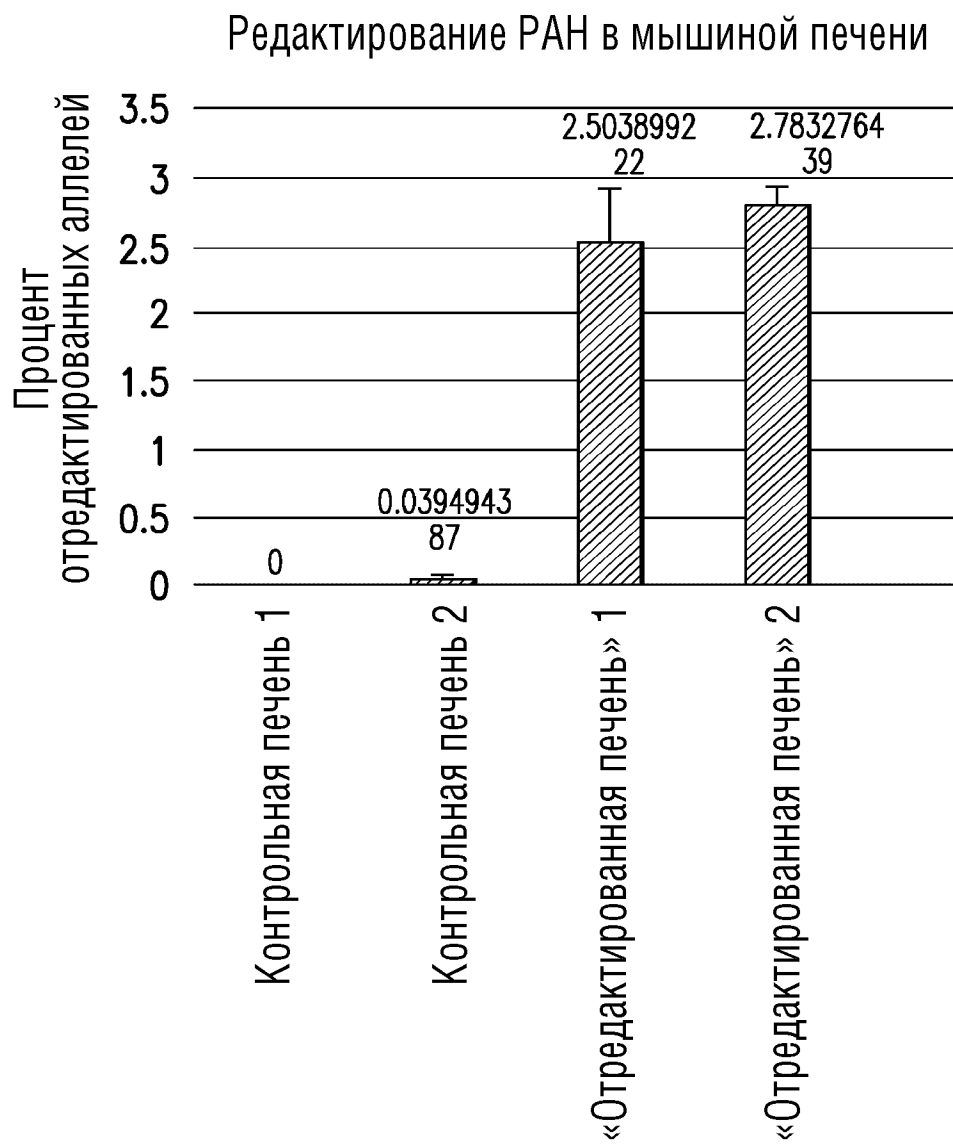
ФИГ.5С



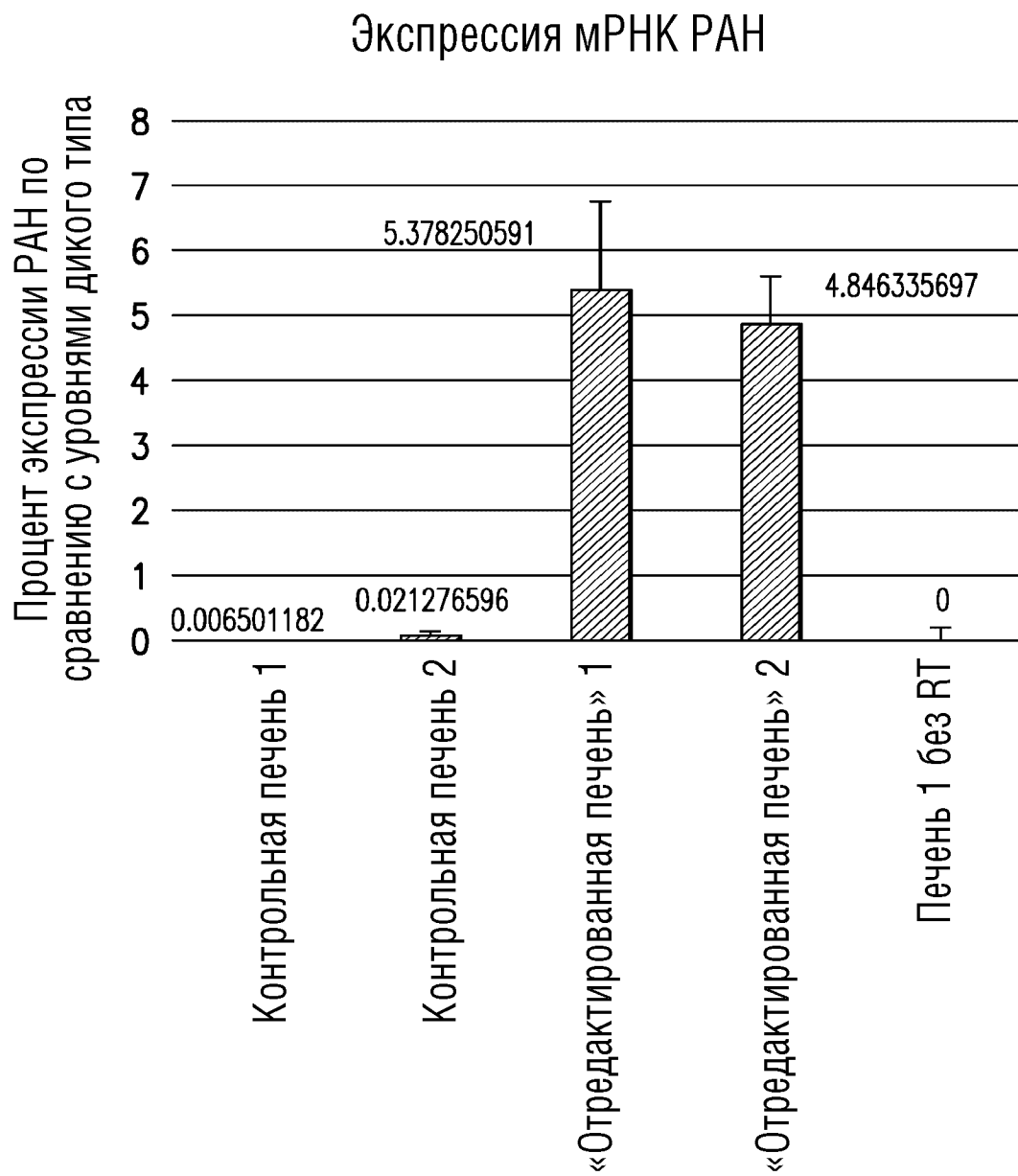
ФИГ.5D



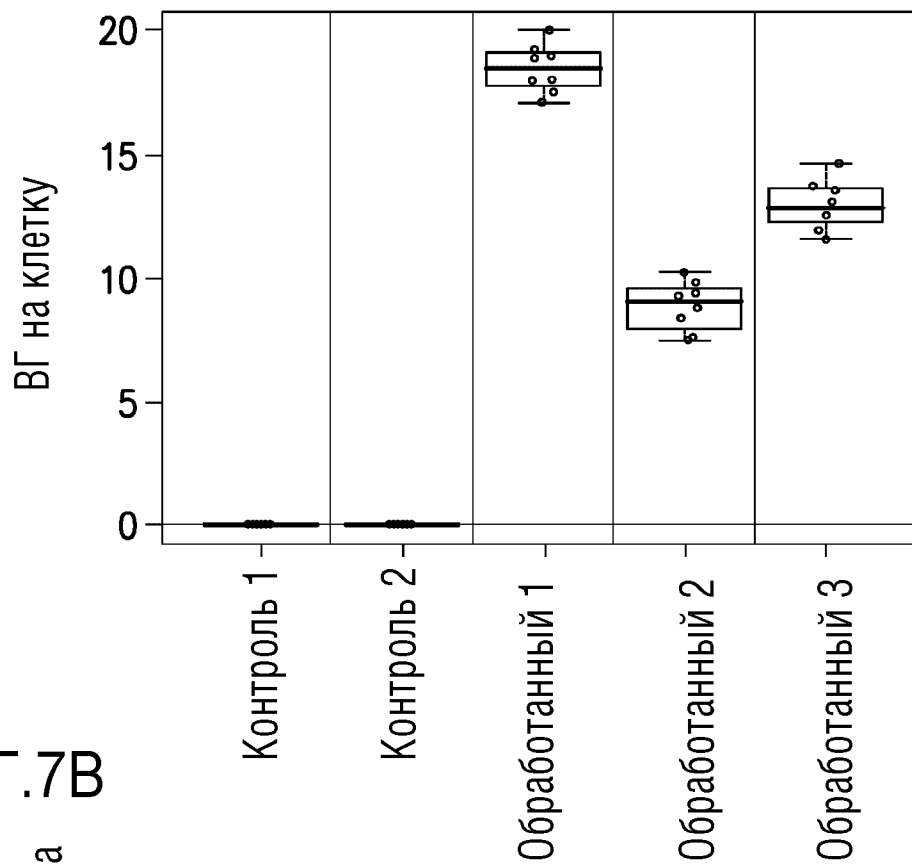
ФИГ.5Е



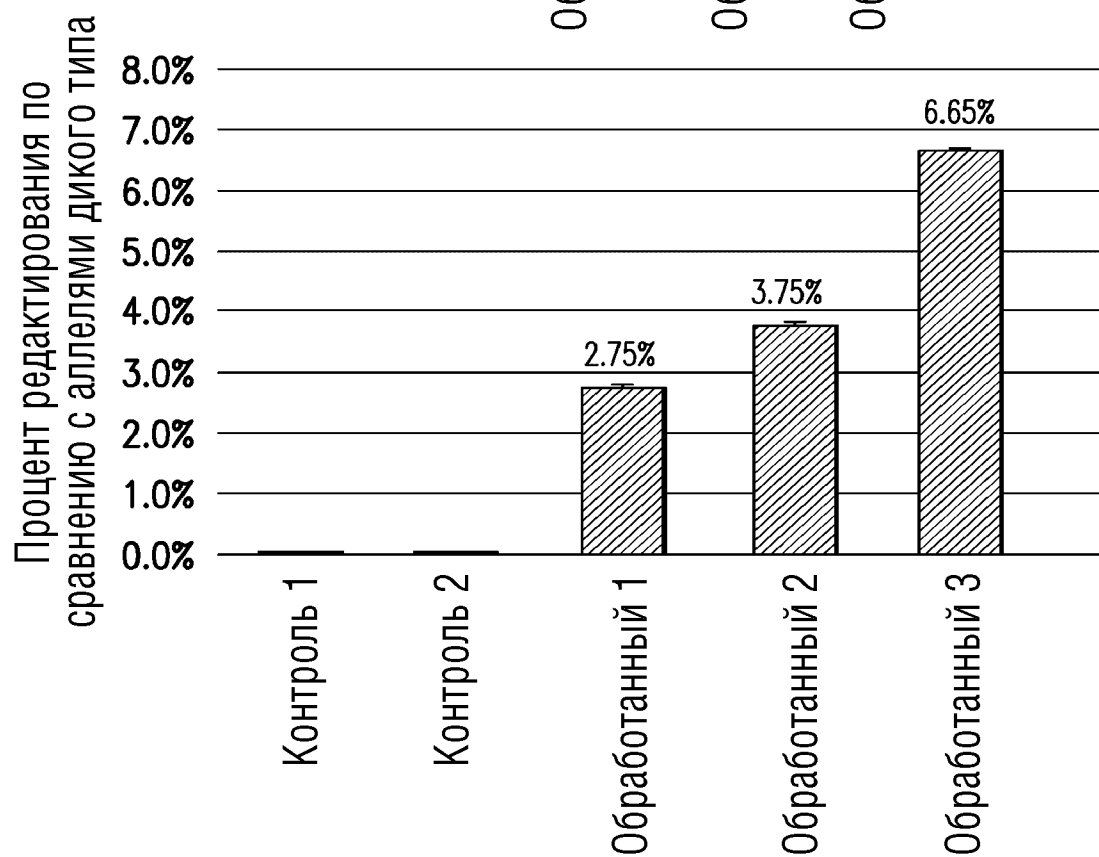
ФИГ.6



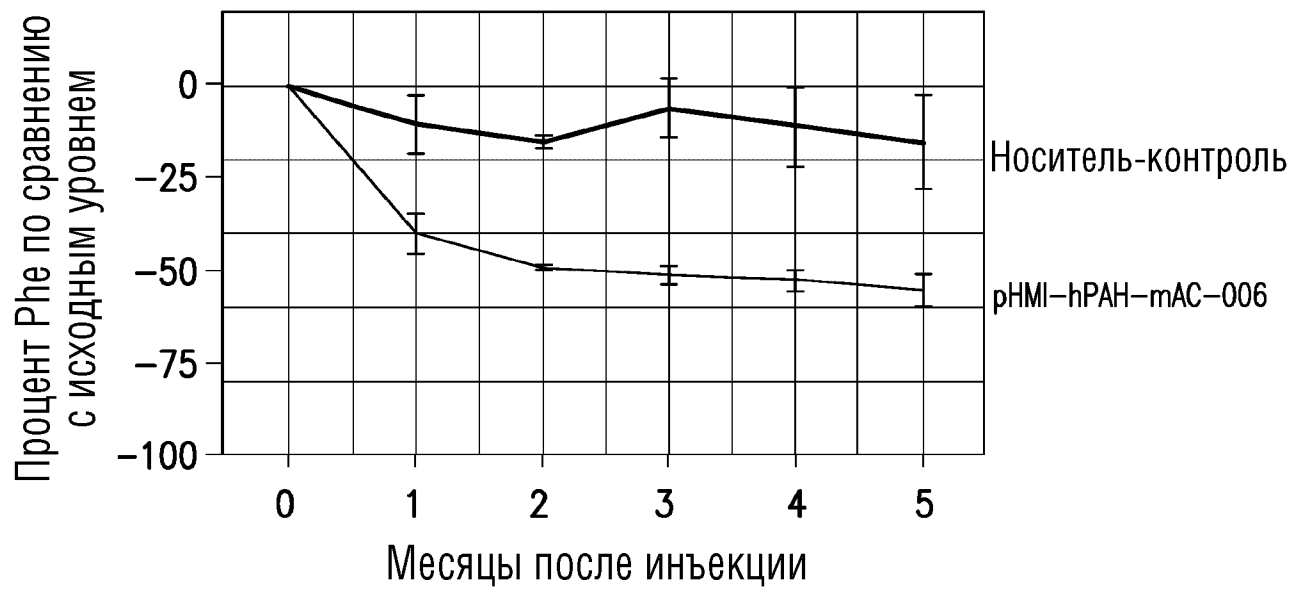
ФИГ.7А



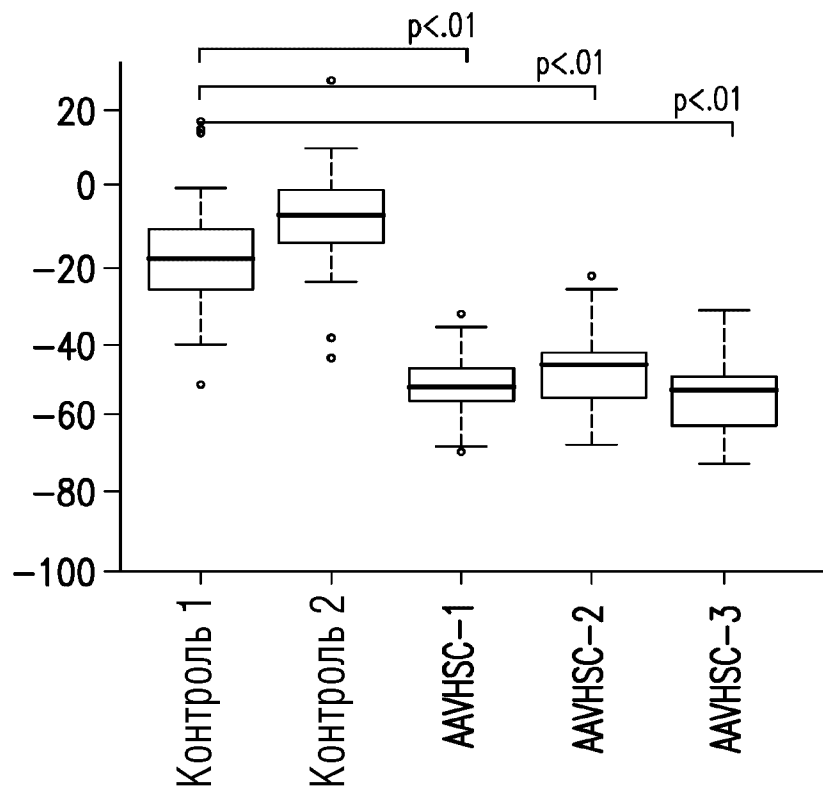
ФИГ.7В



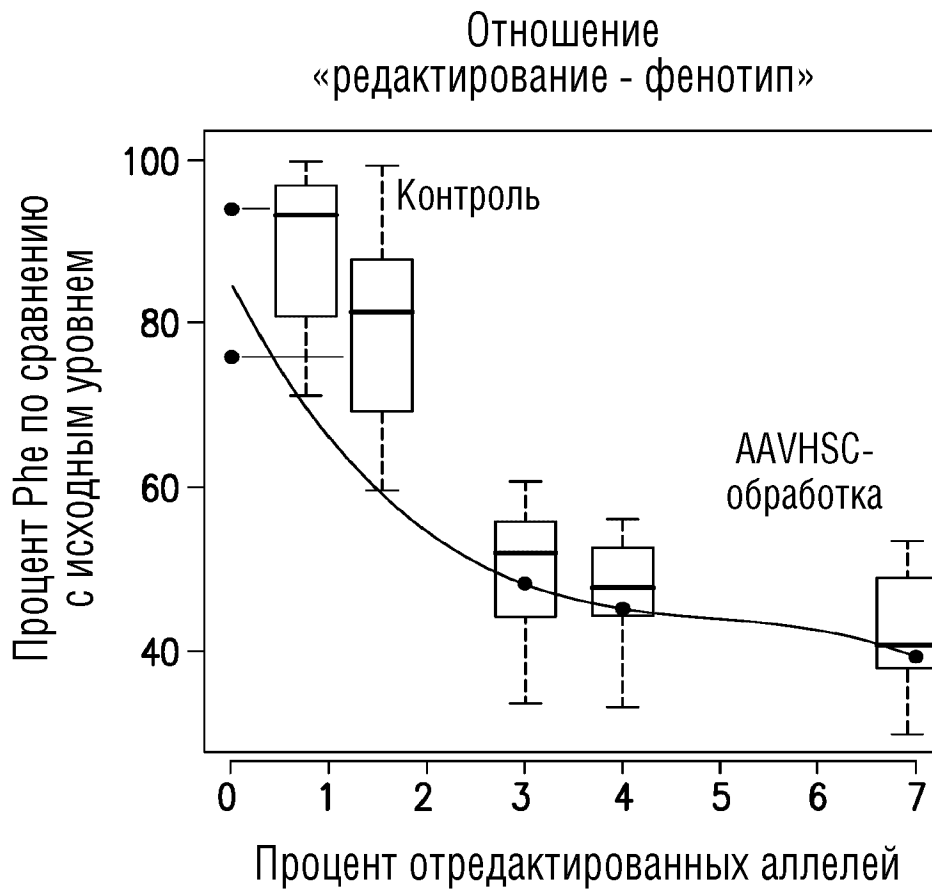
ФИГ.7С



ФИГ.7D

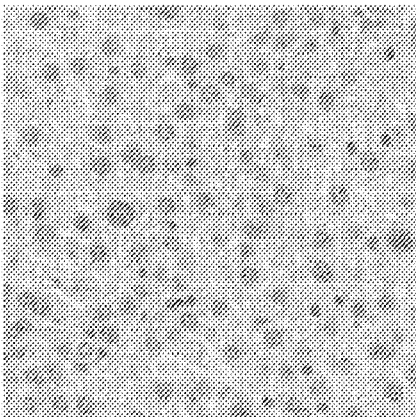


ФИГ.7Е

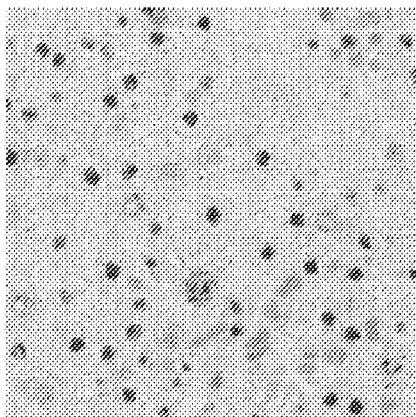


ФИГ.7F

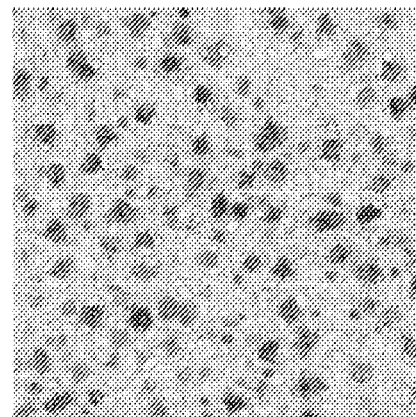
Физиологический
раствор



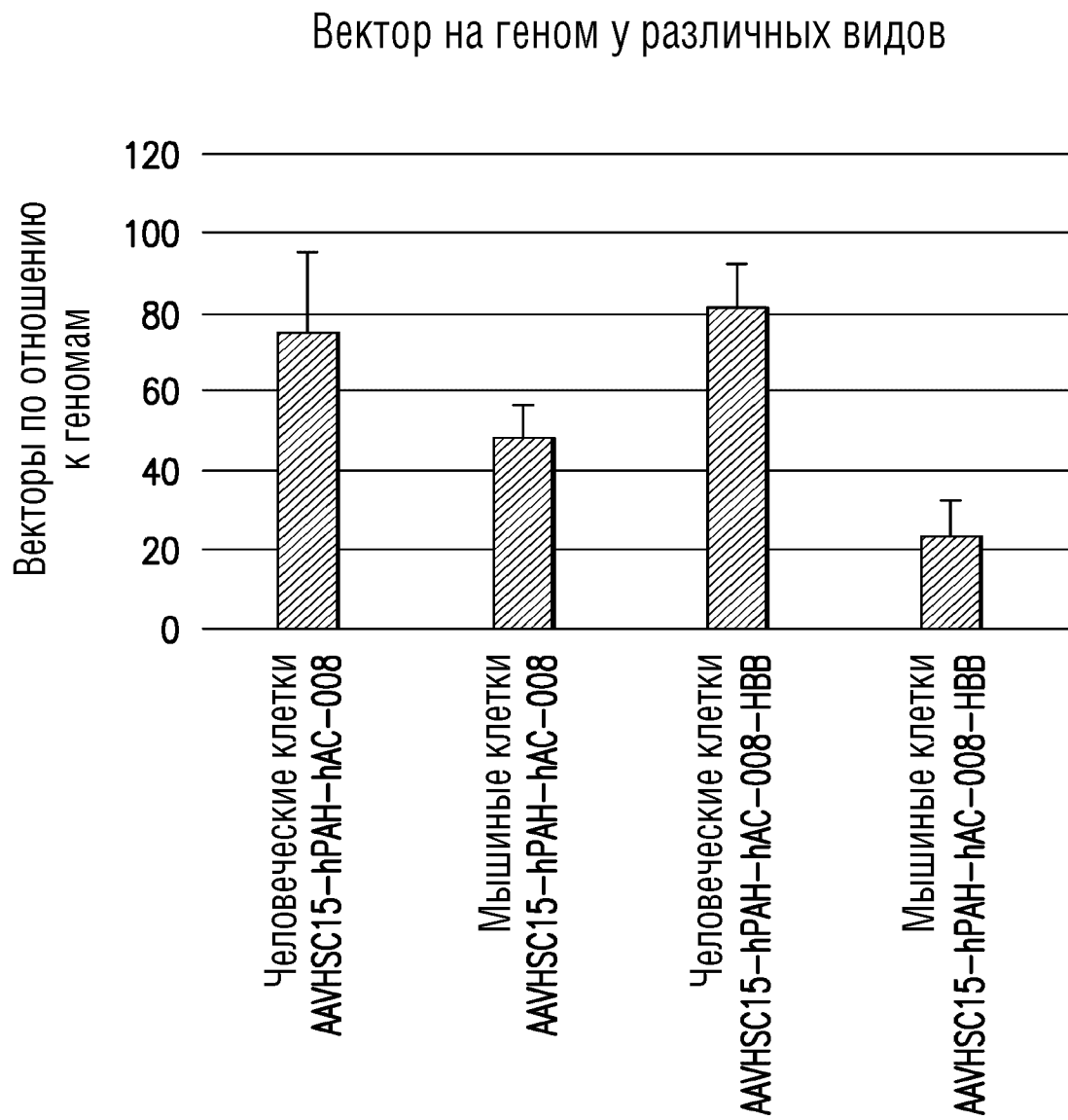
AAVHSC-Pah-PAH



AAVHSC-CMV-PAH

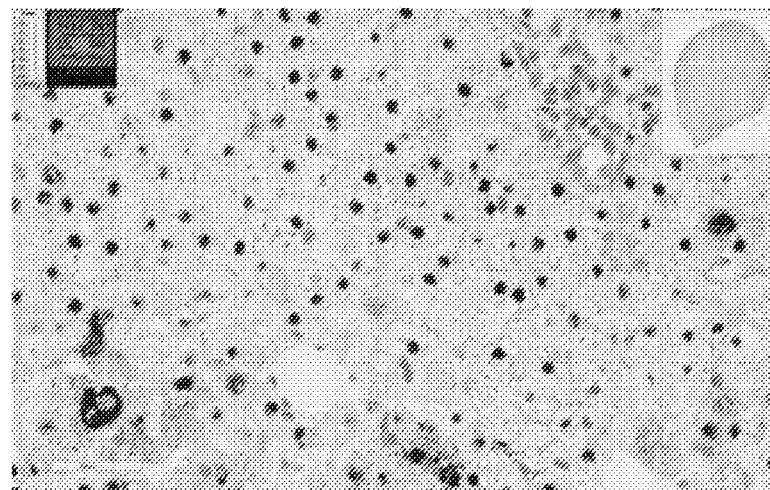
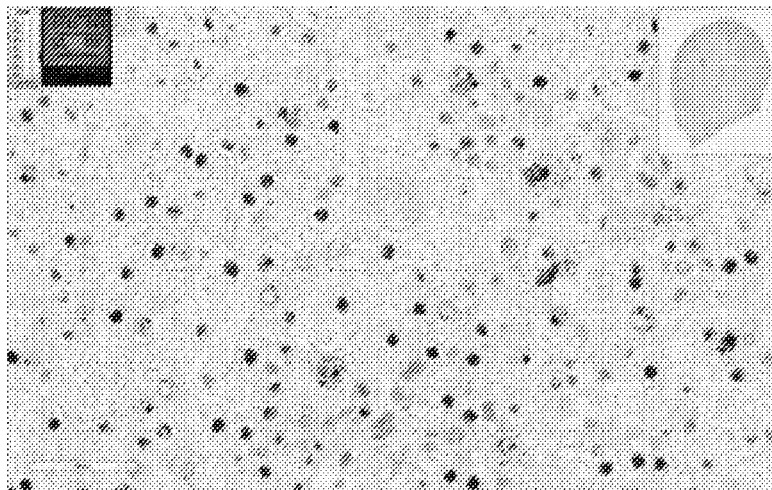


ФИГ.8А

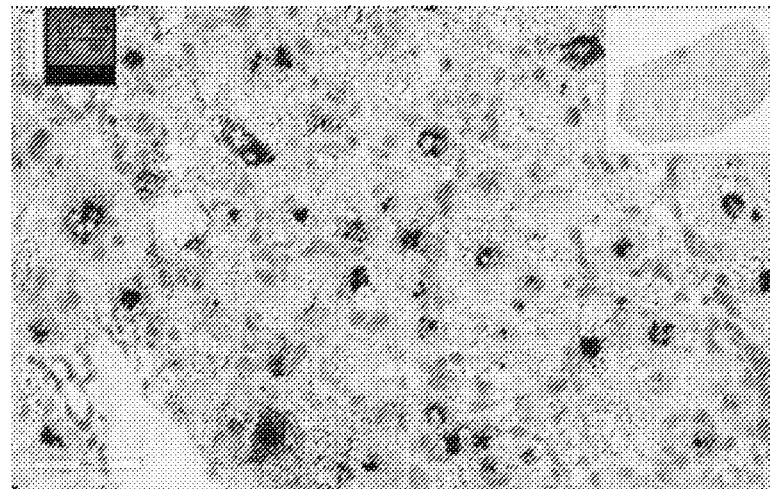
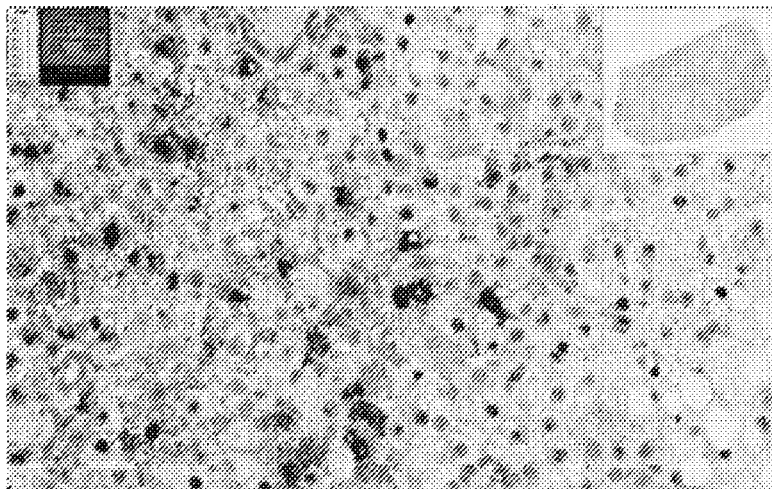


ФИГ.8В

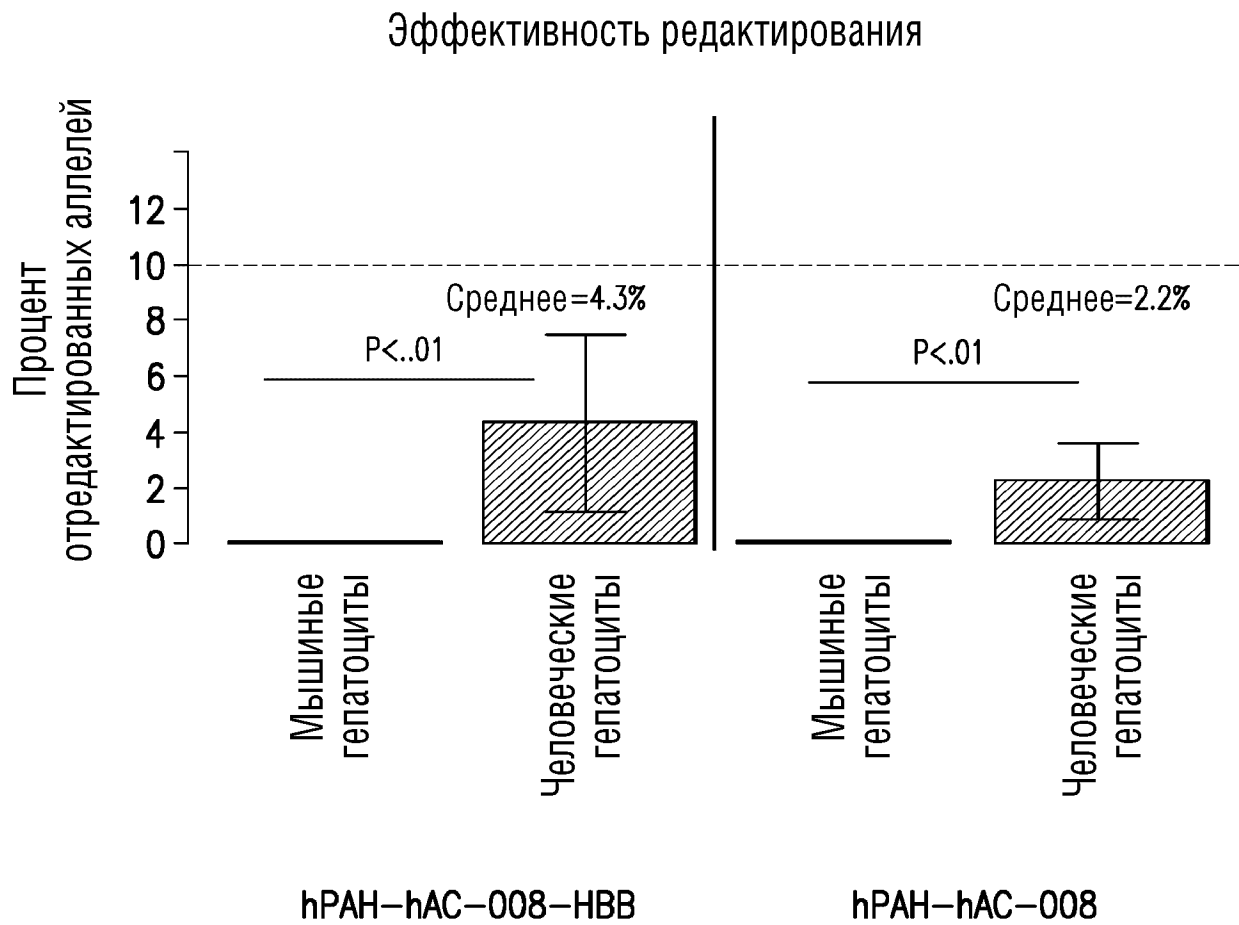
Вектор hPAH-hAC-008



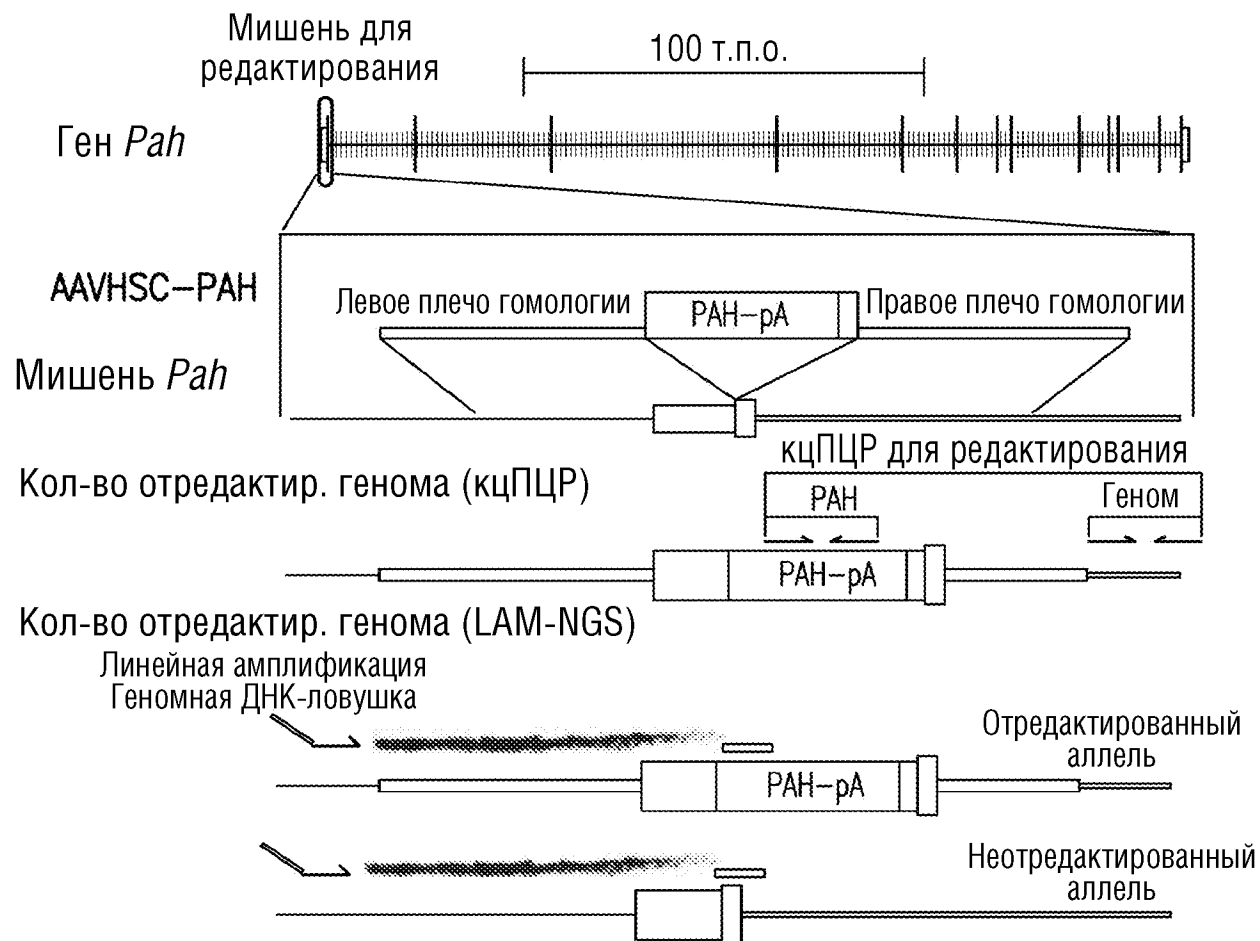
Вектор hPAH-hAC-008-HBB



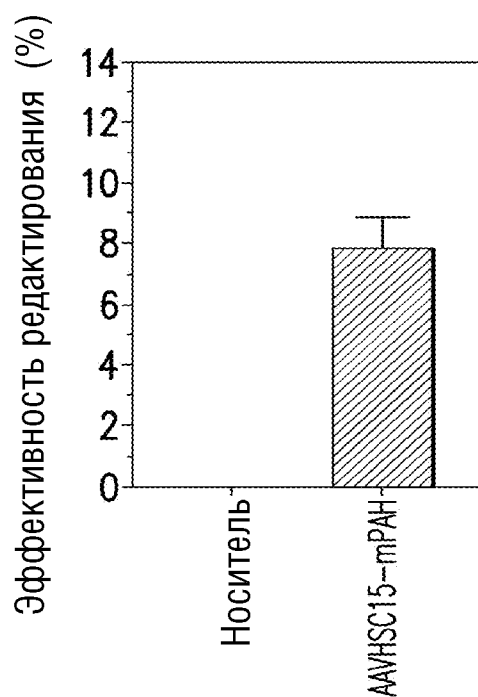
ФИГ.8С



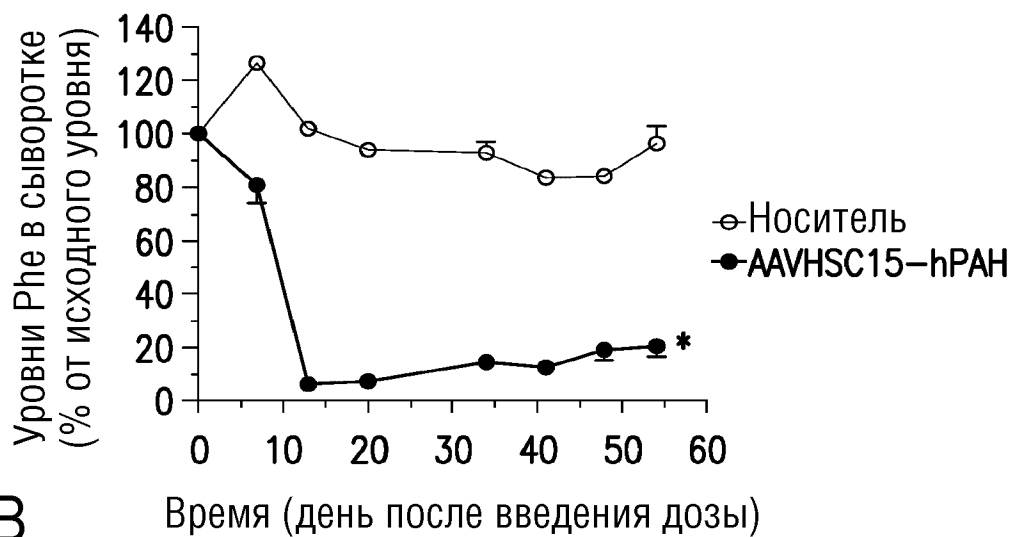
ФИГ.9А



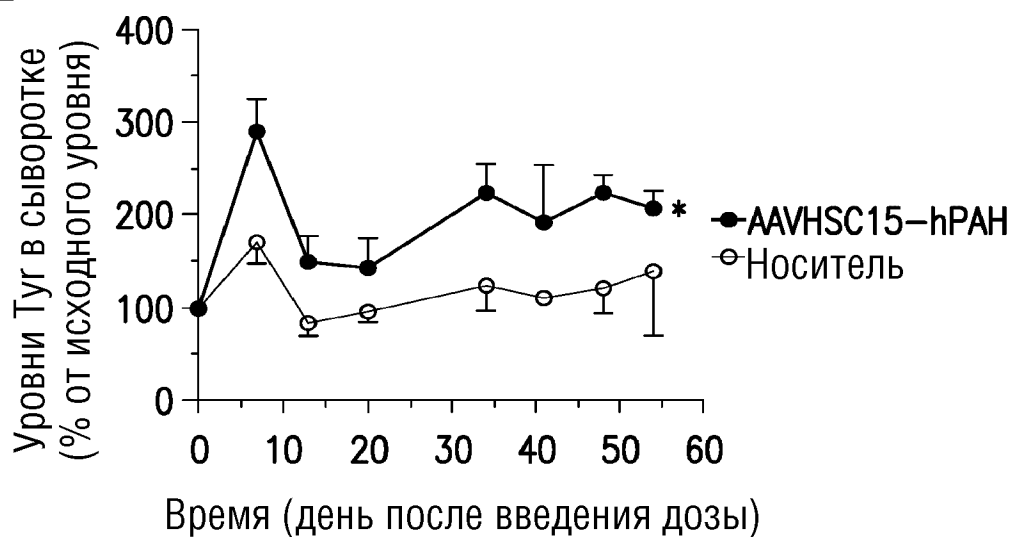
ФИГ.9В



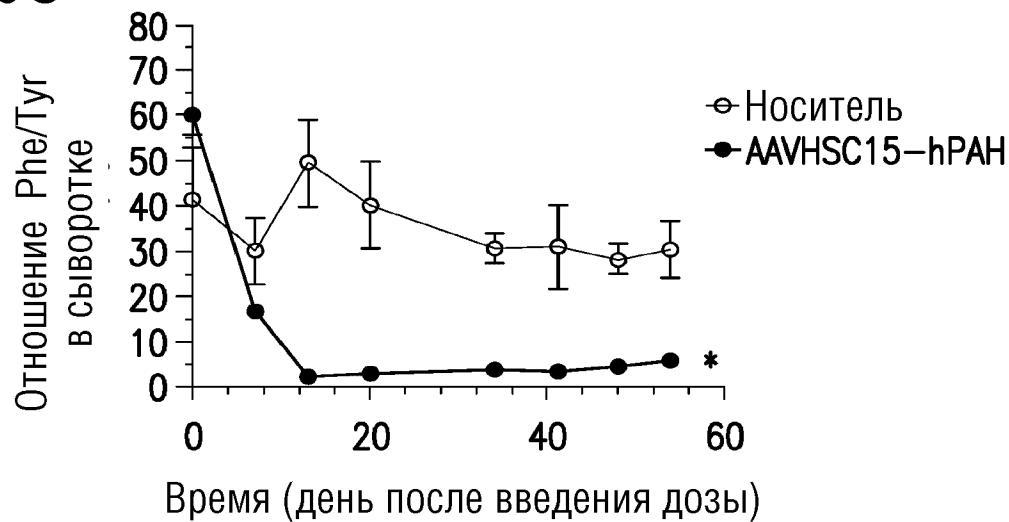
ФИГ.10А



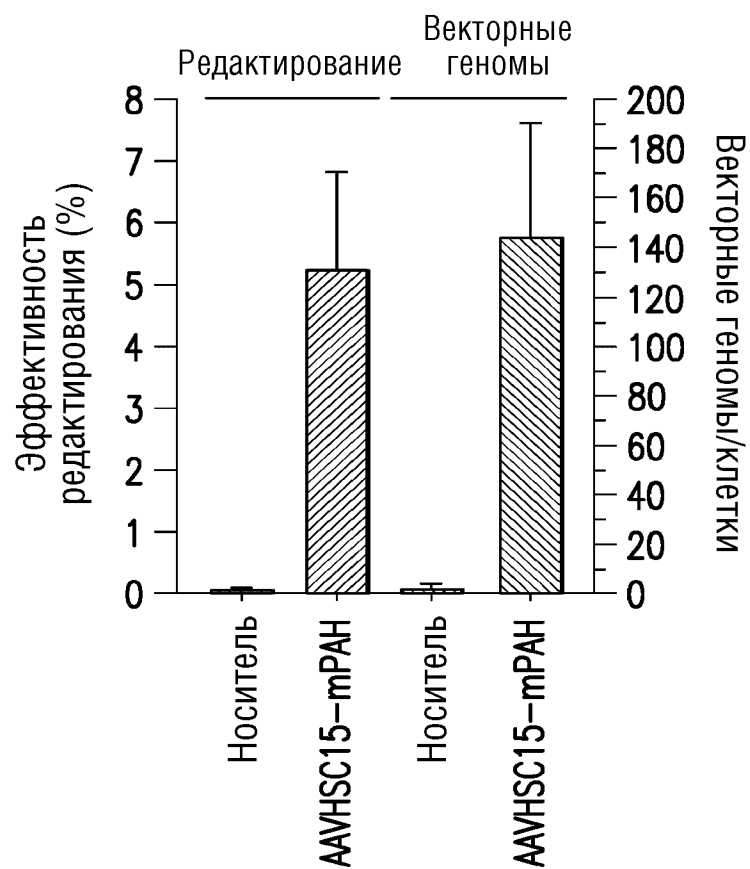
ФИГ.10В



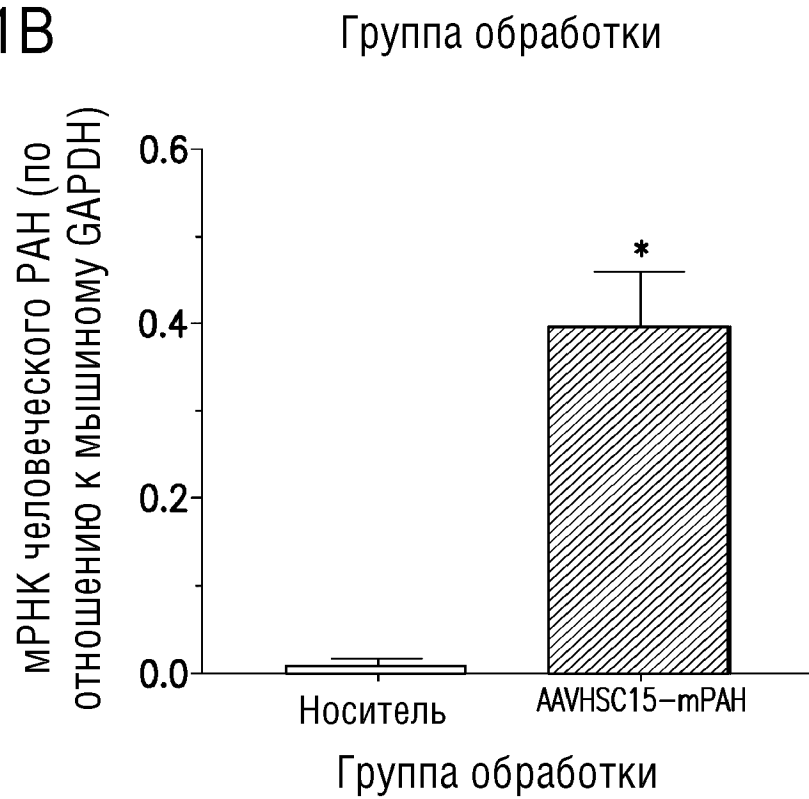
ФИГ.10С



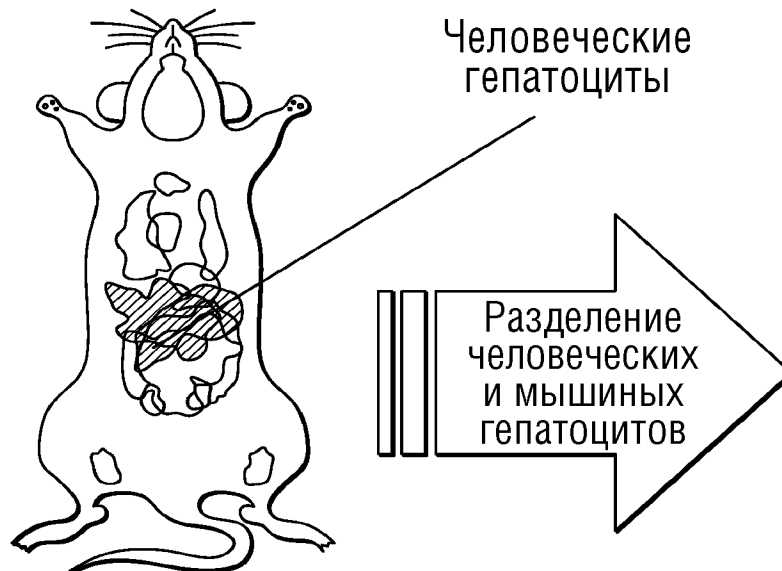
ФИГ.11А



ФИГ.11В

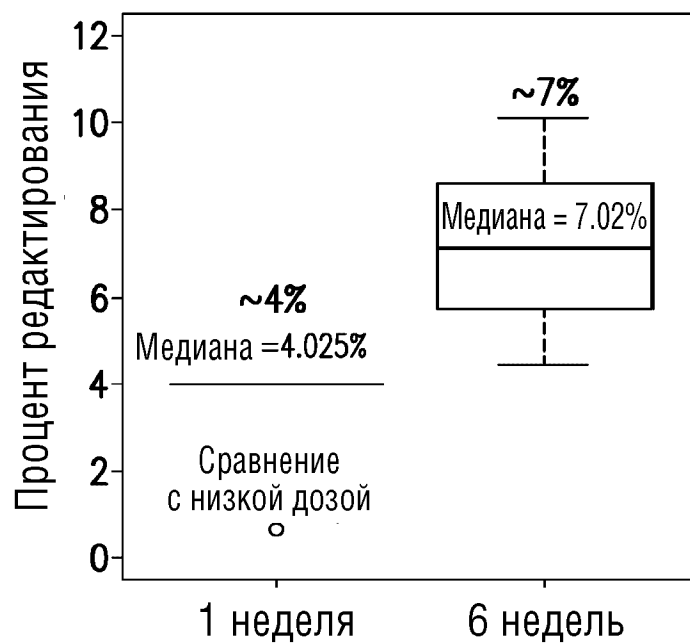


ФИГ.12А

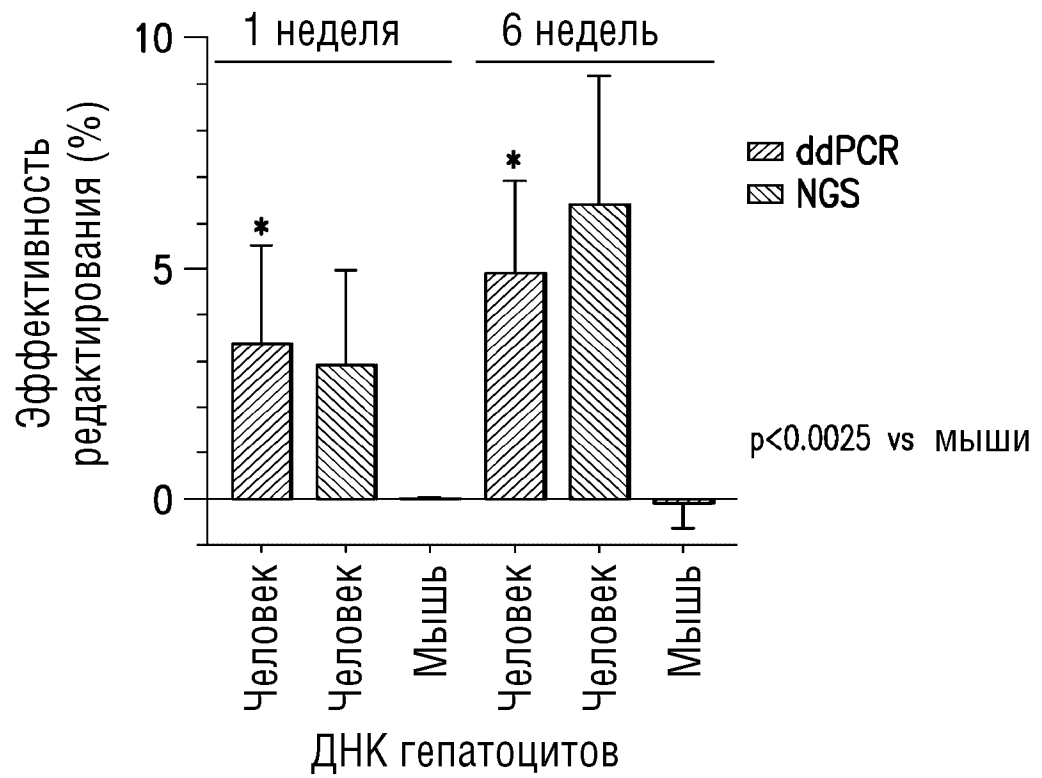


ФИГ.12В

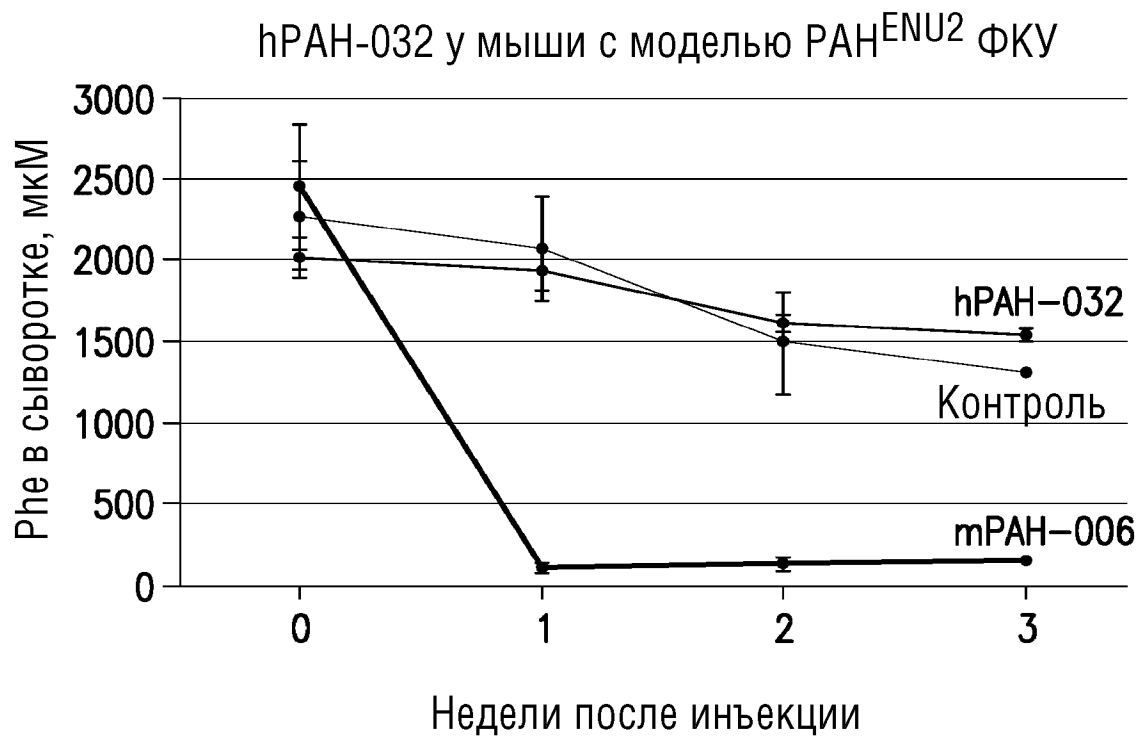
Длительность редактирования hРАН-032



ФИГ.13

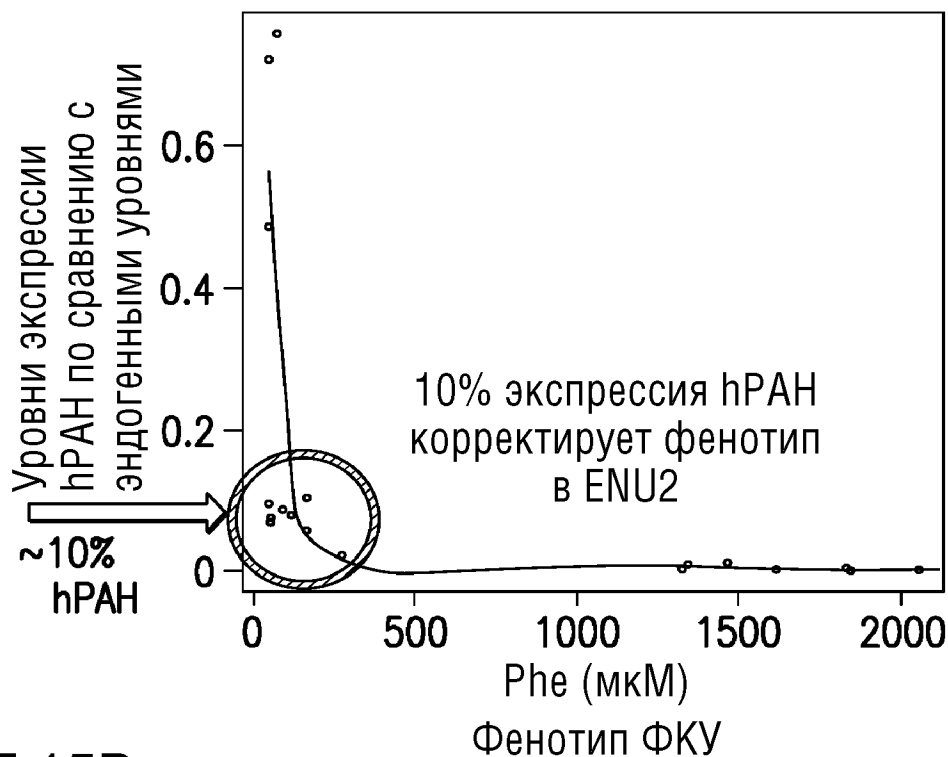


ФИГ.14

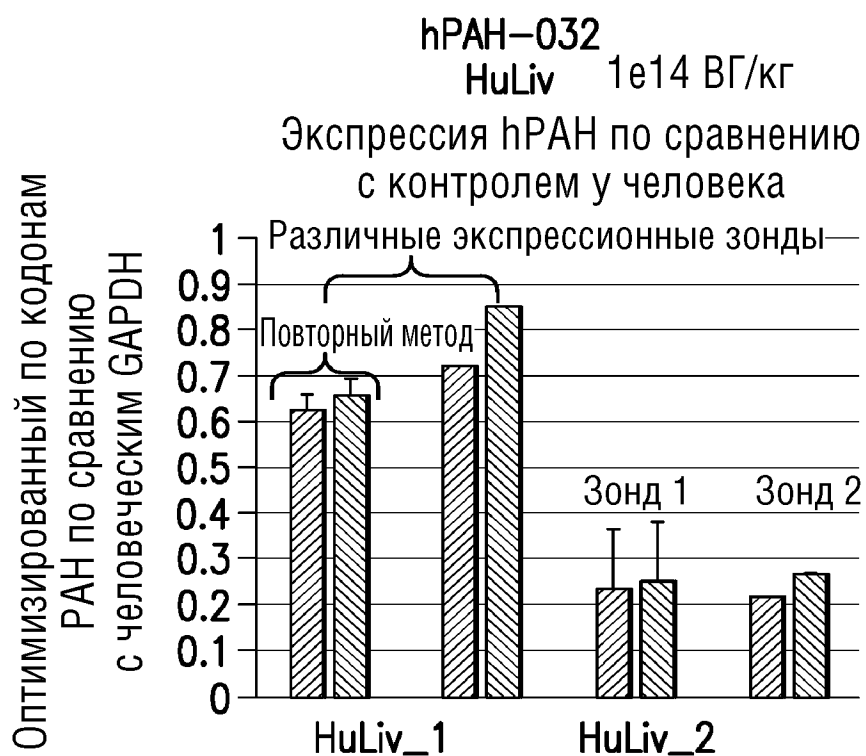


ФИГ.15А

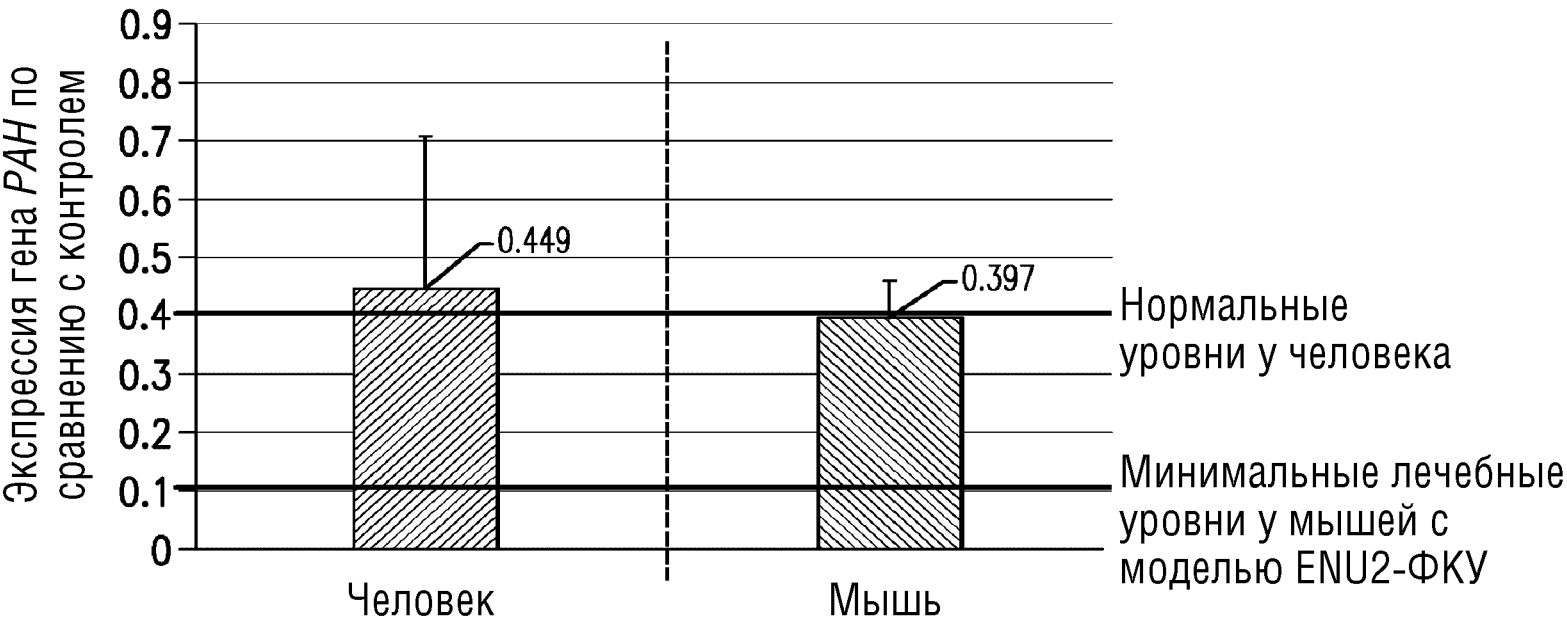
Взаимосвязь между экспрессией hPAH и Phe



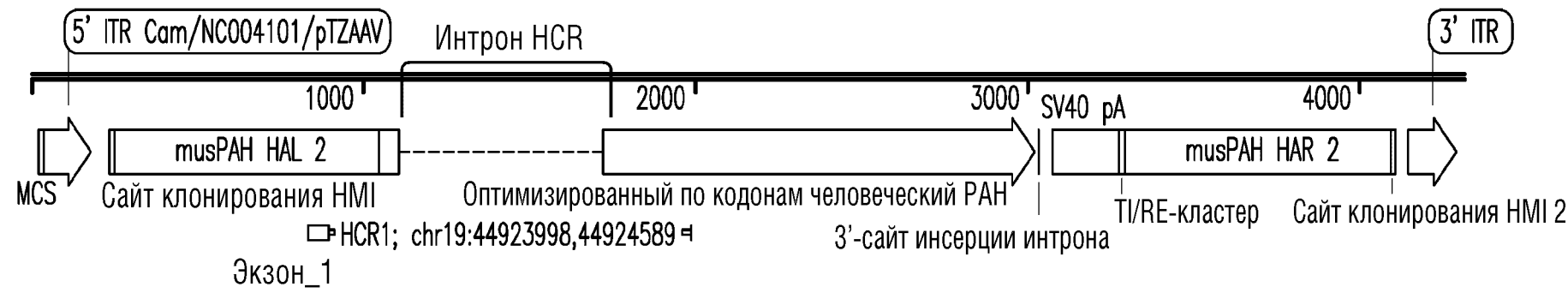
ФИГ.15В



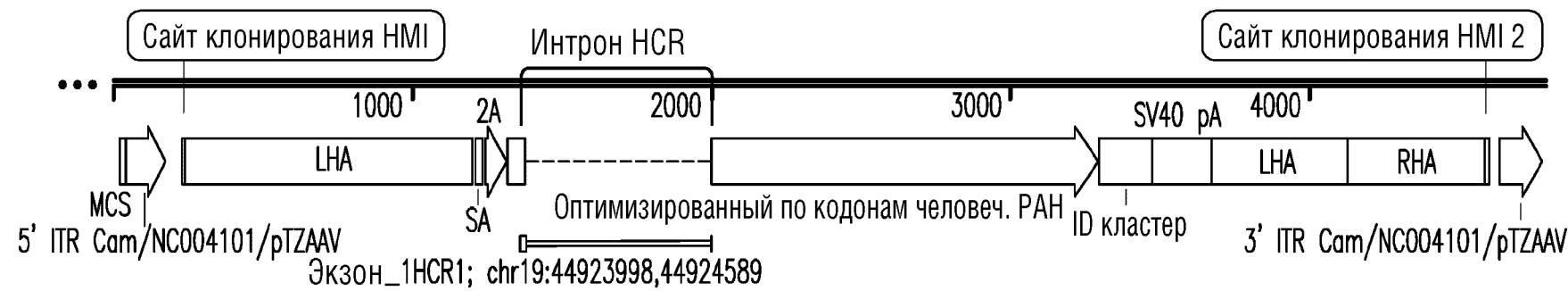
ФИГ.16



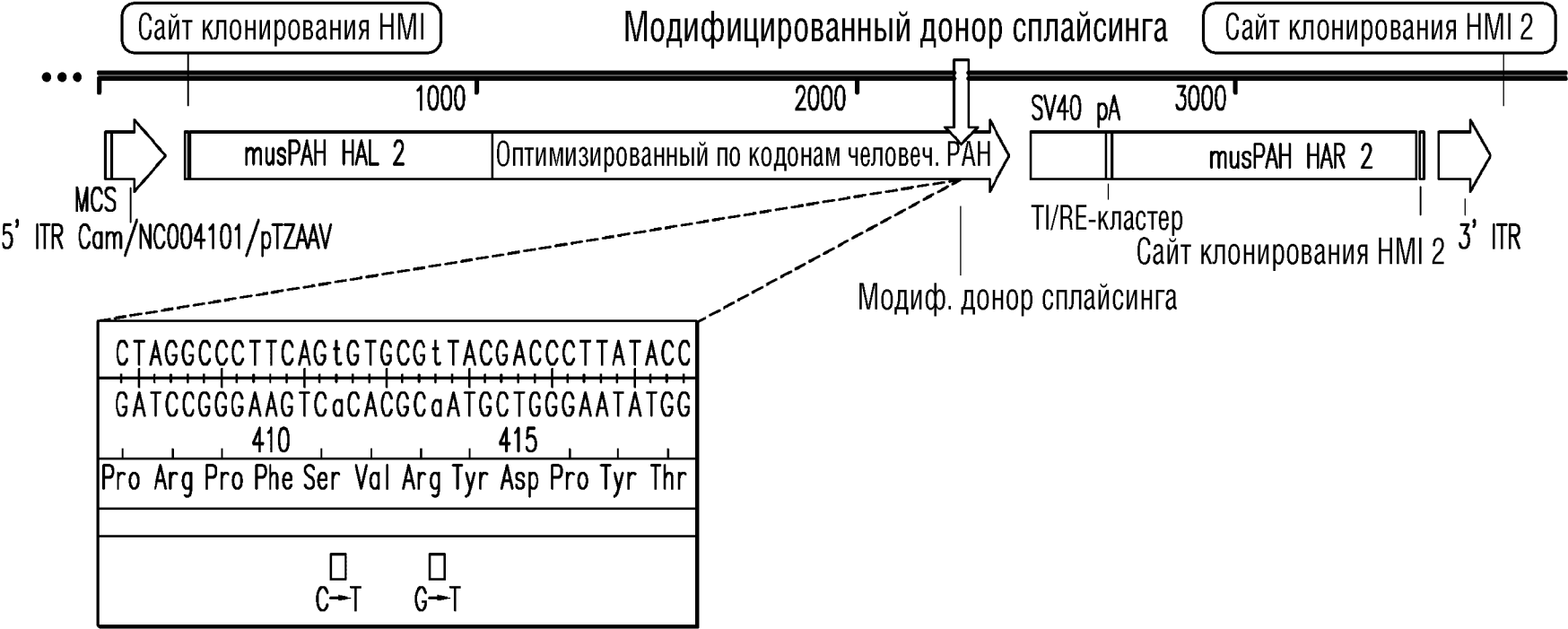
ФИГ.17А



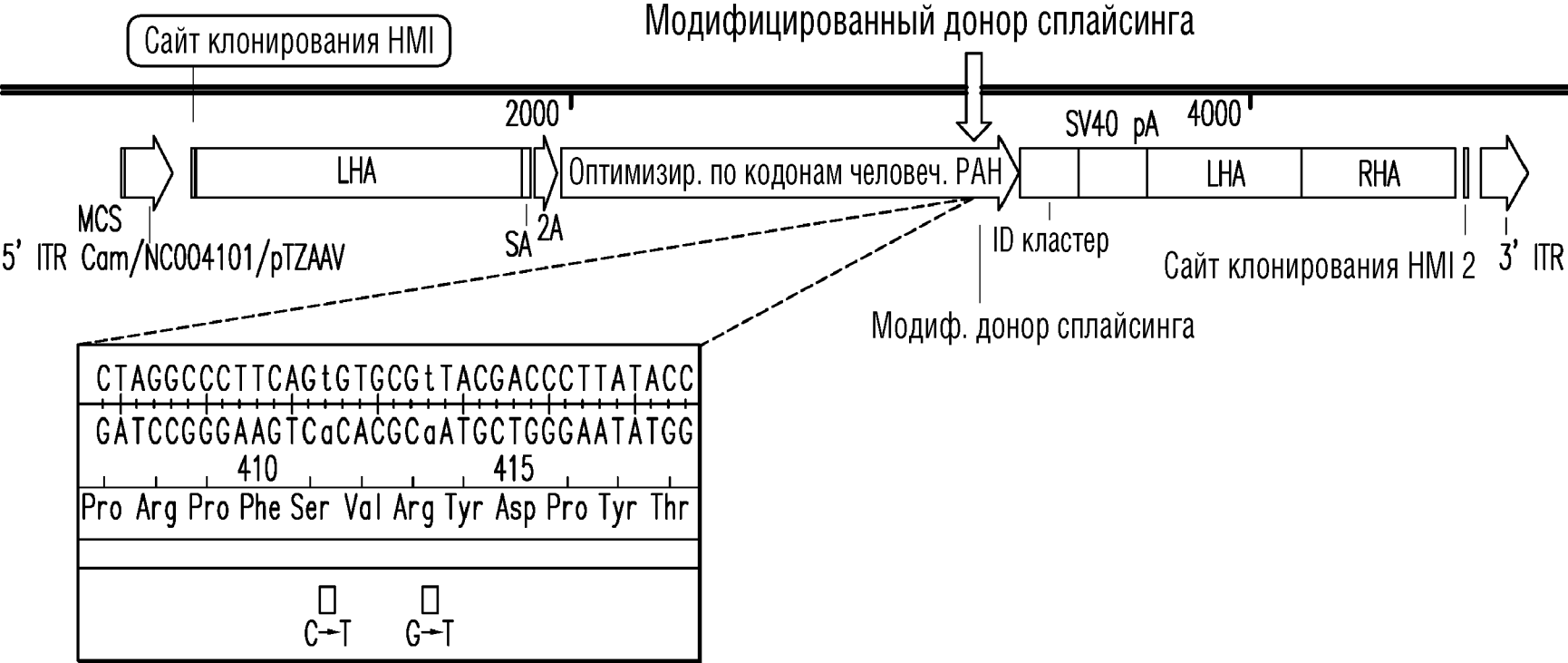
ФИГ.17В



ФИГ.17С



ФИГ.17D



ФИГ.17Е

