

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192819** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.02.18

(22) Дата подачи заявки
2020.04.15

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА**

(31) 62/833,979; 62/926,317; 62/967,219

(32) 2019.04.15; 2019.10.25; 2020.01.29

(33) US

(86) PCT/US2020/028269

(87) WO 2020/214672 2020.10.22

(71) Заявитель:

**ЮНИВЕРСИТИ ОФ АЙОВА
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШН;
СПАЙРОВАНТ САЙЕНСИЗ, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:

**Энгельхард Джон Ф., Янь Цзыин, Тан
Инхуа, Юэнь Эрик, Линь Шэнь (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам экспрессии трансгена в клетке, способам лечения нарушений у субъекта, нуждающегося в этом, и фармацевтическим композициям. В частности, способы включают контакт клетки (например, клетки субъекта, страдающего таким заболеванием, как муковисцидоз) с рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (гAAV), который содержит, в одном варианте осуществления, капсидный белок AV.TL65 и полинуклеотид, который содержит трансген в комбинации с усилителем трансдукции AAV, тем самым экспрессируя трансген в клетке. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат гAAV, который содержит, в одном варианте осуществления, капсидный белок AV.TL65 и полинуклеотид, содержащий трансген в комбинации с одним или более усилителями.

A1

202192819

202192819

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571829EA/081

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет даты подачи заявки США № 62/833,979, поданной 15 апреля 2019 г., заявки США № 62/926,317, поданной 25 октября 2019 г., и заявки США № 62/967,219, поданной 29 января 2020 г., описание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ПРАВАХ

Это изобретение создано при государственной поддержке R43HL137583, присвоенной National Institutes of Health. Правительство имеет определенные права на изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Генная терапия с использованием аденоассоциированного вируса (AAV) является новым методом лечения, в том числе для лечения дефектов одного гена. Муковисцидоз (CF) является летальным аутосомно-рецессивным заболеванием, которым страдают не менее 30000 человек только в США, и не менее 70000 человек во всем мире. Средний возраст выживания пациентов с CF составляет около 40 лет. CF вызывается мутациями в гене, кодирующем муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR), канал, по которому ионы хлора и бикарбоната проходят через мембраны эпителиальных клеток. Нарушение функции CFTR приводит к воспалению дыхательных путей и прогрессирующему бронхоэктазу. Из-за этиологии одного гена CF и различных мутаций CFTR в популяции пациентов, генная терапия потенциально обеспечивает универсальное средство для вылечивания от CF.

Аденоассоциированный вирус (AAV), член семейства парвовирусов человека, представляет собой непатогенный вирус, репликация которого зависит от вспомогательных вирусов. По этой причине рекомбинантные векторы AAV (rAAV) являются одними из наиболее часто используемых в доклинических исследованиях и клинических испытаниях генной терапии. Действительно, клинические испытания CF заболевания легких с использованием rAAV2 продемонстрировали как хороший профиль безопасности, так и длительную стойкость вирусного генома в ткани дыхательных путей (по данным биопсии) по сравнению с другими агентами переноса генов (такими как рекомбинантный аденовирус). Тем не менее, перенос гена не смог улучшить функцию легких у пациентов с CF, поскольку транскрипция иРНК CFTR, полученной из вектора rAAV, не была обнаружена.

Следовательно, в данной области техники сохраняется потребность в улучшенных способах экспрессии трансгена в подходах генной терапии на основе AAV.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрытие относится, *среди прочего*, к способам экспрессии трансгена в клетке, способам лечения нарушений у субъекта, нуждающегося в этом, и фармацевтическим

композициям. В одном аспекте, субъектом является новорожденный человек. В другом аспекте, субъектом является несовершеннолетний человек.

В одном аспекте, в раскрытии представлен способ экспрессии трансгена в клетке, включающий контакт клетки с (i) рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (rAAV), содержащим капсидный белок AV.TL65 или его вариант, и полинуклеотид, содержащий трансген; и (ii) усилителем трансдукции AAV, тем самым экспрессируя трансген в клетке. В одном варианте осуществления, вариантный белок капсида имеет по меньшей мере 80% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления, усилитель представляет собой агент, модулирующий протеасомы.

В некоторых вариантах осуществления, агентом, модулирующим протеасомы, является антрациклин, ингибитор протеасом, трипептидилальдегид или их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления, антрациклином является доксорубицин, идарубицин, акларубицин, даунорубицин, эпирубицин, валрубицин, митоксантрон или их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления, антрациклином является доксорубицин, идарубицин или их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитором протеасом является бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб.

В некоторых вариантах осуществления, трипептидилальдегидом является N-ацетил-1-лейцил-1-лейцил-1-норлейцин (LLnL).

В некоторых вариантах осуществления, клетка контактирует последовательно с rAAV и усилителем.

В других вариантах осуществления клетка контактирует одновременно с rAAV и усилителем.

В некоторых вариантах осуществления, контакт клетки с rAAV и усилителем приводит к увеличению экспрессии трансгена по сравнению с контактом клетки только с rAAV. В некоторых вариантах осуществления, увеличение экспрессии составляет приблизительно 100%, приблизительно 200%, приблизительно 300%, приблизительно 400%, приблизительно 500%, приблизительно 600% или больше.

В некоторых вариантах осуществления, контакт включает введение субъекту rAAV и усилителя.

В другом аспекте, в раскрытии представлен способ лечения нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту (i) рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего капсидный белок AV.TL65 и полинуклеотид, содержащий терапевтический трансген; и (ii) усилителя трансдукции AAV, где введение приводит к экспрессии трансгена в клетках субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляют путем ингаляции, распыления, аэролизации, интраназально, интратрахеально, внутрибронхиально, перорально, внутривенно, подкожно или внутримышечно.

В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляют путем ингаляции, распыления, аэрозолизации, интраназально, интратрахеально и/или внутривнутрибронхиально.

В некоторых вариантах осуществления, клеткой является клетка дыхательных путей. В некоторых вариантах осуществления, клеткой является эпителиальная клетка дыхательных путей. В некоторых вариантах осуществления, эпителиальной клеткой дыхательных путей является эпителиальная клетка легкого.

В некоторых вариантах осуществления, нарушением является муковисцидоз.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит энхансер F5 и/или промотор tg83. В некоторых вариантах осуществления, энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 14 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления, энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления, промотор tg83 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления, трансгеном является CFTR или его производное.

В некоторых вариантах осуществления, производным CFTR является трансген CFTRAR (например, трансген CFTRAR человека). В некоторых вариантах осуществления, трансген CFTRAR человека кодирован полинуклеотидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 4 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит в направлении от 5'-к-3' энхансер F5, промотор tg83 и трансген CFTRAR.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 7 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид дополнительно содержит в 3' направлении нетранслируемую 3' область (3'-UTR), содержащую последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид дополнительно содержит в 3' направлении синтетический сайт полиаденилирования, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) 5' аденоассоциированного вируса (AAV) на 5' конце полинуклеотида и 3' ITR AAV на 3' конце полинуклеотида. В некоторых вариантах

осуществления, 5' ITR AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 15 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления, 3' ITR AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 16 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит: 5' AAV ITR содержащий последовательность SEQ ID NO: 15, F5 энхансер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 14 (который может включать 5' сайт EcoRI и 3' сайт XhoI, как в SEQ ID NO: 1), tg83 промотор, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, 5'-UTR, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, трансген hCFTRAR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4, 3'-UTR, содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, сайт полиаденилирования (s-pA), содержащий последовательность SEQ ID NO: 6 и 3' AAV ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 17 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления, капсидный белок AV.TL65 содержит аминокислотную последовательность

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYL
GPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSF
GGNLGRAVFQAKKRVLPEFGLVEEAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDA
EAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTW
MGDRVVTKSTRTWLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSH
WSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANLNTSTVQVFTDDDYQ
LPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGN
NFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYAN
TYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNL
QGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNN
QSSTTAPTTGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHP
PPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNN
YNDPQFVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:13).

Вариант полинуклеотидной или полипептидной последовательности может быть на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более, идентичен нативной или эталонной последовательности, например, варианту полинуклеотида с любой из SEQ ID NOS: 1-12 и 14-17 или варианту полипептида с SEQ ID NO: 13.

В другом аспекте, в раскрытии представлена фармацевтическая композиция, содержащая (i) rAAV, содержащий капсидный белок AV.TL65, и полинуклеотид,

содержащий трансген; и (ii) усилитель трансдукции AAV.

В некоторых вариантах осуществления, усилителем является агент, модулирующий протеасомы.

В некоторых вариантах осуществления, агентом, модулирующим протеасомы, является антрациклин, ингибитор протеасом, трипептидилальдегид или их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления, антрациклином является доксорубин, идарубин, акларубин, даунорубин, эпирубин, валрубин, митоксантрон или их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления, антрациклин является доксорубин, идарубин или их комбинация. В некоторых вариантах осуществления, усилителем является доксорубин. В других вариантах осуществления, усилителем является идарубин.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитором протеасом является бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб.

В некоторых вариантах осуществления, трипептидилальдегидом является N-ацетил-1-лейцил-1-лейцил-1-норлейцин (LLnL).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **Фиг. 1А** и **1В** представлен ряд графиков, показывающих соотношение активности люциферазы в клетках, обработанных AV.TL65+ингибитором протеасом (PI) по сравнению с только AAV (фиг. 1А) и соотношение активности LDH в клетках, обработанных AV.TL65+PI по сравнению с только AAV (фиг. 1В). Эти результаты получены на клетках CF (HBE и HTE, dF508/dF508, пассаж 0) через 4 дня после инфицирования (AV.TL65, 10K MOI). Относительные единицы люминесценции в CF HBE, обработанных AV.TL65 с PI, в 200 раз превышают AV.TL65 без PI. Токсичность AV.TL65 с PI, измеренная по активности LDH, была в основном ниже 150% от AV.TL65 без PI.

На **Фиг. 2** представлен ряд графиков, показывающих трансдукцию и относительную активность LDG для клеток отдельных доноров при указанных условиях обработки, которые при усреднении приводят к данным, представленным на фиг. 1А и 1В.

Фиг. 3А-3Д. Сравнение эффективности вектора rAAV *in vitro* и *in vivo*. (А) CF (F508del/F508del) поляризованные культуры ALI дыхательных путей человека инфицируют апикально AV1-SP183-hCFTRΔR или AV.TL65-SP183-hCFTRΔR (MOI=100000 DRP/клетку) в присутствии усилителя. Затем в камерах Ussing проводят измерения тока короткого замыкания (Isc) через 12 дней после инфекции. Показан ответ ΔIsc на форсколин/IBMX и GlyH101 (ингибитор CFTR). Данные показывают среднее значение ± СО для n=4 трансвелов от двух доноров. Не инфицированные ALI культуры служат базовым контролем (n=4 от двух доноров). (В) После измерений Isc, две вставки трансвел из каждой группы объединяют и лизируют для количественного определения полученных из вектора копий иРНК hCFTRΔR с помощью количественной ПЦР с обратной транскриптазой (RT-qPCR) и нормализованы по копиям иРНК GAPDH человека.

Затем значения показывают как отношение hCFTRΔR/GAPDH. Данные показывают среднее значение ± диапазон для n=2. (C) Поляризованный трахеобронхиальный эпителий человека и хорька на ALI инфицируют апикально AV.TL65-SP183gLuc при множественности заражения (MOI) 100000. Устойчивые к ДНКазе частицы (DRP)/клетку в присутствии усилителя. Активность люциферазы Gaussia измеряют через 5 дней после инфицирования в виде относительных единиц люминесценции (RLU). Данные показывают среднее значение ± CO для n=6 трансвеллов от двух доноров каждого вида. (D) Трехдневных или месячных хорьков интратрахеально инфицируют AV.TL65-SP183-hCFTRΔR, смешанным с усидителем (4×10^{10} DRP на грамм массы тела). Группу с ложной инфекцией инокулируют PBS с усилителем. Затем через 11 дней после инфицирования собирают трахеи и легкие для количественного определения полученных из вектора hCFTRΔR и эндогенных копий иРНК fCFTR с помощью RT-qPCR с нормализацией количества копий иРНК GAPDH. Данные представляют собой соотношение (hCFTRΔR/fCFTR) копий иРНК hCFTRΔR и fCFTRΔR. Данные показывают среднее значение ± CO для n=3 животных в каждой группе. ns, существенно не отличается.

Фиг. 4А-4С. Повторяют дозирование AV.TL65 новорожденным хорькам. (А) Дизайн исследования с участием трех групп новорожденных хорьков, получавших 0, 1 или 2 дозы вируса в дозе 1×10^{13} DRP/кг посредством интратрахеального введения. Хорькам, получавшим одну дозу, вводят репортерный вектор AV.TL65-SP183-gLuc в возрасте 4 недель, тогда как хорькам, получавшим две дозы, вводят AV.TL65-SP183-fCFTRΔR в возрасте 1 недели и AV.TL65-SP183-gLuc в возрасте 4 недель. Образцы плазмы и BALF собирают в указанном возрасте. (В) Активность люциферазы Gaussia в плазме в указанные моменты времени после доставки AV.TL65-SP183-gLuc. (С) Активность люциферазы Gaussia в BALF через 14 дней после доставки AV.TL65-SP183-gLuc. Результаты показывают среднее значение ± CO для n=6 животных на группу. Статистическую значимость анализируют с помощью однофакторного ANOVA с последующим пост-тестом Тьюки. ns, незначительно. RLU, относительные единицы люминесценции.

Фиг. 5А-5С. Повторяют дозирование AV.TL65 молодым хорькам. (А) План исследования с участием трех групп молодых хорьков, получавших 0, 1 или 2 дозы вируса в дозе 1×10^{13} DRP/кг посредством интратрахеального введения. Хорькам, получавшим одну дозу, вводят репортерный вектор AV.TL65-SP183-gLuc в возрасте 8 недель, тогда как хорькам, получавшим две дозы, вводят AV.TL65-SP183-fCFTRΔR в возрасте 4 недель и AV.TL65-SP183-gLuc в возрасте 8 недель. Образцы плазмы и BALF собирают в указанном возрасте. (В) Активность люциферазы Gaussia в плазме в указанные моменты времени после доставки AV.TL65-SP183-gLuc. (С) Активность люциферазы Gaussia в BALF через 14 дней после доставки AV.TL65-SP183-gLuc. Результаты показывают среднее значение ± CO для n=9-10 животных на группу. Статистическую значимость анализируют с помощью однофакторного ANOVA с последующим пост-тестом Тьюки:

P <0,01, **P <0,0001. RLU, относительные единицы люминесценции.

Фиг. 6А-6D. Титры нейтрализующих антител AV.TL65 в BALF и плазме инфицированных хорьков. (А, В) Образцы новорожденных хорьков, собранные на Фигуре 4А, оценивают на NAb в (А) BALF и (В) плазме с использованием анализа ингибирования трансдукции. Серийные разведения BALF или плазмы инкубируют с AV.TL65-fLuc до инфицирования клеток А549. Титр NAb рассчитывают как концентрацию BALF или плазмы (коэффициент разведения), которая приводит к 50% ингибированию (IC50) трансдукции, по данным активности люциферазы светлячков. Клетки, инфицированные только AV.TL65-fLuc, служат базовым контролем, и ложно инфицированные клетки служили холостой пробой. (С, D) Образцы молодых хорьков, собранные на Фигуре 5А, оценивают на NAb в (С) BALF и (D) плазме с использованием описанных выше анализов ингибирования трансдукции. Результаты показывают среднее значение \pm СО для n=6 новорожденных животных на группу и n=9-10 молодых животных на группу. Статистическую значимость анализируют с помощью однофакторного ANOVA с последующим пост-тестом Тьюки: **P <0,01, ****P <0,0001. ns, незначительно.

Фиг. 7А-7В. Разработка анализа на основе ELISA для количественного определения изотипов анти-капсидных антител. Иммунную плазму получают от хорька, инфицированного AV-TL65 в легкие, четыре раза с интервалами 1-2 месяца, начиная с 1-месячного возраста. Наивную плазму получают от хорька того же возраста. Планшеты для ELISA покрывают (А) AAV5 или (В) AAV2 и затем оценивают на связывание иммунной и наивной плазмы хорьков. Вторичное определение антител были против IgG. Результаты показывают среднее значение \pm диапазон для двух технических повторов для каждого образца.

Фиг. 8А-8F. Количественная оценка антител, связывающих капсид IgG, IgM и IgA в плазме хорьков, инфицированных AV.TL65. (А-F) Количественная оценка антител, связывающих капсид в плазме (А-С) новорожденных и (D-F) молодых хорьков для (А, D) IgG, (В, E) IgM и (С, F) IgA. Результаты показывают среднее значение \pm СО для n=6 новорожденных животных на группу и n=9-10 молодых животных на группу. Статистическую значимость анализируют с помощью однофакторного ANOVA с последующим пост-тестом Тьюки: *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001, ****P <0,0001. Не меченые сравнения между группами однократной и многократной доз существенно не различаются.

Фиг. 9А-9F. Количественная оценка антител, связывающих капсид IgG, IgM и IgA в BALF хорьков, инфицированных AV.TL65. (А-F) Количественная оценка антител, связывающих капсид в BALF (А-С) новорожденных и (D-F) молодых хорьков для (А, D) IgG, (В, E) IgM и (С, F) IgA. Результаты показывают среднее значение \pm СО для n=6 новорожденных животных на группу и n=9-10 молодых животных на группу. Статистическую значимость анализируют с помощью однофакторного ANOVA с последующим пост-тестом Тьюки: *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001, ****P <0,0001. Не меченые сравнения между группами однократной и многократной доз существенно не различаются.

различаются.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ СОГЛАСНО РАСКРЫТИЮ

Капсидный белок AV.TL65 обеспечивает значительное усиление апикальной трансдукции эпителиальных клеток дыхательных путей по сравнению с другими серотипами AAV. Как описано в Excoffon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(10):3865-3870, 2009, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки, этот капсидный белок обеспечивает по меньшей мере 10-100-кратное улучшение экспрессии репортерной трансгенной люциферазы по сравнению с rAAV, типированными с капсидными белками AAV2, AAV5 или AAV9. Настоящее описание основано, по меньшей мере частично, на неожиданном открытии того, что трансдукция и/или экспрессия трансгенов, переносимых векторами rAAV, серотипированными капсидными белками AV.TL65, может быть значительно улучшена в еще большей степени с минимальной токсичностью при использовании в комбинации с одним или несколькими усилителями, как описано здесь. Например, как описано в Примере 1, комбинирование AV.TL65Luciferase-mCherry с усилителями, такими как доксорубицин или идарубицин, обеспечивает не токсичное усиление экспрессии люциферазы на границе раздела водной и воздушной сред (ALI) культур бронхиального эпителия человека (HBE) более чем 600-кратно по сравнению с AV.TL65Luciferase-mCherry без усилителя. Таким образом, описанные здесь способы позволяют высокоэффективно трансдукцию и экспрессию трансгенов из rAAV, содержащих капсидные белки AV.TL65, и находят применение, например, в улучшенных способах лечения таких заболеваний, как муковисцидоз. В одном аспекте субъектом, страдающим муковисцидозом, является новорожденный человек. В другом аспекте субъектом, страдающим муковисцидозом, является несовершеннолетний человек. В описании также представлены фармацевтические композиции, которые включают (i) rAAV, который включает капсидный белок AV.TL65 и полинуклеотид, включающий трансген (например, CFTR Δ R); и (ii) усилитель трансдукции AAV.

Определения

Термин «AAV» относится к аденоассоциированному вирусу и может использоваться для обозначения самого встречающегося в природе вируса дикого типа или его производных. Термин охватывает все подтипы, серотипы и псевдотипы, а также встречающиеся в природе и рекомбинантные формы, если не требуется иное. Геном AAV построен из одноцепочечной ДНК и содержит инвертированные концевые повторы (ITR) на обоих концах цепи ДНК и две открытые рамки считывания: гер и сар, кодирующие репликацию и капсидные белки, соответственно. Чужеродный полинуклеотид может заменить нативные гены гер и сар. AAV могут быть получены с использованием множества капсидов различных серотипов, которые имеют различные профили трансдукции или, как используется в настоящем изобретении, «тропизм» для разных типов тканей. Используемый в настоящем изобретении термин «серотип» относится к

AAV, который идентифицируется и отличается от других AAV на основе реактивности капсидного белка с определенными антисыворотками, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAVrh10. Например, серотип AAV2 используют для обозначения AAV, который содержит капсидные белки, кодированные геном кэпа AAV2, и геном, содержащий 5' и 3' последовательности ITR из того же серотипа AAV2. Под псевдотипированным AAV понимается AAV, который содержит капсидные белки одного серотипа и вирусный геном, включающий 5'-3' ITR второго серотипа. Предполагается, что псевдотипированный rAAV будет обладать свойствами связывания с клеточной поверхностью капсидного серотипа и генетическими свойствами, соответствующими серотипу ITR. Псевдотипированные rAAV получают с использованием стандартных методик, описанных в данной области техники.

Термин «приблизительно» используется в настоящем изобретении для обозначения значения, которое составляет $\pm 10\%$ от приведенного значения.

Используемый в настоящем изобретении термин «введение» означает способ введения дозы композиции, описанной в настоящем изобретении (например, rAAV, усилителя и/или его фармацевтической композиции) субъекту. Композиции, используемые в описанных в настоящем изобретении способах, можно вводить любым подходящим путем, включая, например, ингаляцию, распыление, аэролизацию, интраназально, интратрахеально, внутрибронхиально, перорально, парентерально (например, внутривенно, подкожно или внутримышечно), перорально, назально, ректально, местно или буккально. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем изобретении композицию вводят в виде аэрозольных частиц интратрахеально и/или внутрибронхиально с использованием распылителя (например, с помощью устройства для распыления на слизистую оболочку ларинго-трахеи MADgic®). Композиции, используемые в описанных в настоящем изобретении способах, также можно вводить местно или системно. Способ введения может варьироваться в зависимости от различных факторов (например, компонентов вводимой композиции и тяжести состояния, которое лечат).

Термин «антрациклин» относится к классу лекарственных средств, используемых, например, в химиотерапии. Примеры антрациклинов включают доксорубицин, идарубицин, акларубицин, даунорубицин, эпирубицин, валрубицин и митоксантрон.

Термин «AV.TL65» относится к эволюционировавшему химерному капсидному белку AAV, который является высоко тропичным для дыхательных путей человека. AV.TL65 описан в Excoffon et al., выше, и также известен в данной области техники как AAV2.5T. AV.TL65 является химерой между AAV2 (аминокислотные остатки 1-128) и AAV5 (аминокислотные остатки 129-725) с заменой на основе одной точечной мутации (A581T). Аминокислотная последовательность капсида AV.TL65 показана ниже:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYL
GPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSTF
GGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDA

EAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTW
 MGDRVVTKSTRTWLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSH
 WSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQ
 LPYVVGNNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGN
 NFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYAN
 TYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNL
 QGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNN
 QSSTTAPTGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLGPIWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHP
 PPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNN
 YNDPQFVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:13).

«Контрольным элементом» или «контрольной последовательностью» является нуклеотидная последовательность, участвующая во взаимодействии молекул, которое способствует функциональной регуляции полинуклеотида, включая репликацию, дупликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию или деградацию полинуклеотида. Регулирование может влиять на частоту, скорость или специфичность процесса и может быть по своей природе усиливающим или ингибирующим. Элементы управления, известные в данной области техники, включают, например, транскрипционные регуляторные последовательности, такие как промоторы и энхансеры. Промотором является участок ДНК, способный в определенных условиях связывать РНК полимеразу и инициировать транскрипцию кодирующей области, обычно расположенной ниже (в 3' направлении) от промотора. Промоторы включают промоторы AAV, например промоторы P5, P19, P40 и AAV ITR, а также гетерологичные промоторы.

«Вектором экспрессии» является вектор, содержащий область, которая кодирует представляющий интерес полипептид, и используется для воздействия на экспрессию белка в наметенной клетке-мишени. Вектор экспрессии также содержит элементы управления, оперативно связанные с кодирующей областью, чтобы облегчить экспрессию белка в мишени. Комбинацию контрольных элементов и гена или генов, с которыми они функционально связаны для экспрессии, иногда называют «кассетой экспрессии», большое количество которых известно и доступно в данной области техники или может быть легко сконструировано из компонентов, которые в доступны в данной области техники.

«Ген» относится к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере одну открытую рамку считывания, которая способна кодировать конкретный белок после транскрибирования и трансляции.

Термин «доставка гена» относится к введению экзогенного полинуклеотида в клетку для переноса гена и может включать таргетирование, связывание, поглощение, транспорт, локализацию, интеграцию репликона и экспрессию.

Термин «перенос гена» относится к введению экзогенного полинуклеотида в клетку, которое может включать таргетирование, связывание, поглощение, транспорт, локализацию и интеграцию репликона, но отличается от и не подразумевает

последующую экспрессию гена.

Термин «экспрессия гена» или «экспрессия» относится к процессу транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации гена.

«Вирус-помощник» для AAV относится к вирусу, который позволяет AAV (например, AAV дикого типа) реплицироваться и упаковываться клеткой млекопитающего. В данной области техники известно множество таких вспомогательных вирусов для AAV, включая аденовирусы, вирусы герпеса и поксвирусы, такие как коровья оспа. Аденовирусы охватывают ряд различных подгрупп, хотя чаще всего используется аденовирус 5 типа из подгруппы С. Известно множество аденовирусов человека, млекопитающих и птиц, которые могут быть получены из депозитариев, таких как ATCC. Вирусы семейства герпеса включают, например, вирусы простого герпеса (HSV) и вирусы Эпштейн-Барр (EBV), а также цитомегаловирусы (CMV) и вирусы псевдобешенства (PRV); которые также доступны из депозитариев, таких как ATCC.

«Определяемым маркерным геном» является ген, который позволяет специфически обнаруживать клетки, несущие этот ген (например, отличать от клеток, которые не несут маркерный ген). В данной области известно большое количество таких маркерных генов.

«Геном селективируемого маркера» является ген, который позволяет клеткам, несущим ген, быть специально селективными за или против, в присутствии соответствующего селективного агента. В качестве иллюстрации, ген устойчивости к антибиотикам можно использовать в качестве положительно селективируемого маркерного гена, который позволяет положительно выбрать клетку-хозяина в присутствии соответствующего антибиотика. В данной области известно множество положительно и отрицательно селективируемых маркеров, некоторые из которых описаны ниже.

«Гетерологичный» означает производный от объекта, генотипически отличного от остальной части объекта, с которым его сравнивают. Например, полинуклеотид, введенный методами генной инженерии в другой тип клеток, является гетерологичным полинуклеотидом (и при экспрессии может кодировать гетерологичный полипептид).

«Клетки-хозяева», «клеточные линии», «культуры клеток», «линия упаковывающих клеток» и другие подобные термины обозначают эукариотические клетки, например, клетки млекопитающих, такие как клетки человека, используемые в настоящем описании. Эти клетки можно использовать в качестве реципиентов для рекомбинантных векторов, вирусов или других полинуклеотидов для переноса, и они включают потомство исходной клетки, которая была трансдуцирована. Понятно, что потомство отдельной клетки не обязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или геномному дополнению) исходной родительской клетке.

«Повышенная трансдукция или частота трансдукции», «измененная трансдукция или частота трансдукции» или «улучшенная трансдукция или частота трансдукции» относятся к увеличению одной или нескольких из описанных выше активностей в обработанной клетке по сравнению с не обработанной клеткой. Описанные здесь агенты, которые увеличивают эффективность трансдукции, могут быть определены путем

измерения воздействия на одну или несколько активностей трансдукции, что может включать измерение экспрессии трансгена, измерение функции трансгена или определение количества векторных частиц гAAV, необходимых для получения такого же действия трансгена по сравнению с клетками-хозяевами, не обработанными агентами. Усилитель, описанный в настоящем изобретении, может приводить к увеличению трансдукции или частоты трансдукции гAAV, содержащего капсидный белок AV.TL65, по сравнению с эталонным уровнем (например, трансдукцией или частотой трансдукции гAAV в отсутствие усилителя).

«Выделенная» плаزمид, вирус или другое вещество относится к препарату вещества, лишенному по меньшей мере некоторых других компонентов, которые также могут присутствовать там, где это вещество или подобное вещество встречается в природе или изначально получено из него. Таким образом, например, выделенное вещество может быть получено с использованием метода очистки для обогащения его из исходной смеси. Обогащение можно измерить на абсолютной основе, например, по весу на объем раствора, или его можно измерить по отношению ко второму, потенциально мешающему веществу, присутствующему в исходной смеси. Увеличивающееся обогащение вариантов осуществления настоящего описания являются все большей степенью. Таким образом, например, 2-кратное обогащение является степенью, 10-кратное обогащение является большей степенью, 100-кратное обогащение является еще большей степенью, 1000-кратное обогащение является еще большей степенью.

Используемый в настоящем изобретении термин «функциональная связь» или «функционально связанный» относится к физическому или функциональному сопоставлению компонентов, описанных таким образом, чтобы позволить им функционировать предполагаемым образом. Более конкретно, например, две функционально связанные последовательности ДНК означают, что две ДНК расположены (*цис* или *транс*) таким образом, что по меньшей мере одна из последовательностей ДНК способна оказывать физиологическое воздействие на другую последовательность. Например, энхансер и/или промотор могут быть функционально связаны с трансгеном (например, терапевтическим трансгеном, таким как миниген CFTRΔR).

Используемый в настоящем изобретении термин «упаковка» относится к серии субклеточных событий, которые приводят к сборке и инкапсидации вирусного вектора, в частности вектора AAV. Таким образом, когда подходящий вектор вводят в линию упаковывающих клеток в соответствующих условиях, он может быть собран в вирусную частицу. Функции, связанные с упаковкой вирусных векторов, в частности векторов AAV, описаны в настоящем изобретении и в данной области техники.

Термин «полинуклеотид» относится к полимерной форме нуклеотидов любой длины, включая дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды или их аналоги. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные или кэпированные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги, и может прерываться не нуклеотидными компонентами. Если присутствует, модификации

нуклеотидной структуры могут быть внесены до или после сборки полимера. Термин полинуклеотид, используемый в настоящем описании, взаимозаменяемо относится к двух- и одноцепочечным молекулам. Если не указано или не требуется иное, любой вариант осуществления, описанный в настоящем изобретении, который является полинуклеотидом, охватывает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, которые, как известно или предположительно, составляют двухцепочечную форму.

Термины «полипептид» и «белок» используют в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Термины также охватывают модифицированный аминокислотный полимер; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, липидизацию или конъюгацию с метящим компонентом. Полипептиды, такие как «CFTR» и подобные, когда они обсуждаются в контексте генной терапии и композиций для нее, относятся к соответствующему интактному полипептиду или любому его фрагменту или генетически сконструированному производному, которое сохраняет желаемую биохимическую функцию интактного белка. Точно так же, ссылки на CFTR и другие подобные гены для использования в генной терапии (обычно называемые «трансгенами» для доставки в реципиентную клетку) включают полинуклеотиды, кодирующие интактный полипептид или любой фрагмент или генетически сконструированное производное, обладающее желаемой биохимической функцией.

Под «фармацевтической композицией» подразумевают любую композицию, которая содержит терапевтически или биологически активный агент (например, полинуклеотид, содержащий трансген (например, миниген CFTRAR; см., например, Ostedgaard et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(7):2921-6, 2011)), либо включенный в вирусный вектор (например, вектор гAAV), либо независимый от вирусного вектора (например, включенный в липосому, микрочастицу или наночастицу)), который подходит для введения субъекту. Любой из этих составов может быть приготовлен хорошо известными и принятыми в данной области техники способами. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, ed. J. Swarbrick, Informa Healthcare, 2006, каждый из которых включен сюда посредством ссылки.

Под «фармацевтически приемлемым разбавителем, эксципиентом, носителем или адьювантом» подразумевают разбавитель, эксципиент, носитель или адьювант, который физиологически приемлем для субъекта, сохраняя терапевтические свойства фармацевтической композиции, с которой его вводят.

Термины «агент, модулирующий протеасомы» и «модулятор протеасомы» относятся к агенту или классу агентов, которые изменяют или усиливают трансдукцию гAAV или частоту трансдукции гAAV путем взаимодействия, связывания или изменения функции, и/или транспортировки или локализации протеасома. Модуляторы протеасом могут иметь другие клеточные функции, как описано в данной области техники,

например, как доксорубин, химиотерапевтическое лекарственное средство. Модуляторы протеасом по настоящему описанию включают ингибиторы протеасом, например бортезомиб, карфилзомиб, иксазомиб, трипептидилальдегиды (Z-LLL или LLnL), агенты, которые ингибируют кальпаины, катепсины, цистеиновые протеазы и/или химотрипсин-подобную протеазную активность протеасом (см., например, Wagner et al., Hum. Gene Ther., 13:1349 (2002); Young et al., J. Virol., 74:3953 (2000); и Seisenberger et al., Science, 294:1029 (2001)).

«Рекомбинантный» в отношении полинуклеотида означает, что полинуклеотид является продуктом различных комбинаций стадий клонирования, рестрикции и/или лигирования, а также других процедур, которые приводят к созданию конструкции, отличной от полинуклеотида, встречающегося в природе. Рекомбинантным вирусом является вирусная частица, содержащая рекомбинантный полинуклеотид. Термины, соответственно, включают репликаты исходной полинуклеотидной конструкции и потомство исходной вирусной конструкции.

Под «рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (AAV)» или «гAAV вектором» подразумевают полученный рекомбинантным путем AAV или частицу AAV, которая содержит полинуклеотидную последовательность, не происходящую из AAV (например, полинуклеотид, содержащий трансген, который может быть функционально связан с одним или несколькими энхансерами и/или промоторами) для доставки в клетку *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Не встречающиеся в природе (например, химерные) капсиды могут использоваться в гAAV, описанных в настоящем изобретении, например, AV.TL65.

Под «эталонным» подразумевают любой образец, стандарт или уровень, который используют для целей сравнения. «Нормальный эталонный образец» или «эталонный образец дикого типа» может быть, например, образцом от субъекта, не страдающего заболеванием (например, муковисцидозом). «Положительным эталонным» образцом, стандартом или значением является образец, стандарт, значение или число, полученное от субъекта, о котором известно, что он страдает заболеванием (например, муковисцидозом), который может быть сопоставлен с образцом субъекта по меньшей мере одному из следующих критериев: возраст, масса тела, стадия заболевания и общее состояние здоровья.

Термины «субъект» и «пациент» используют в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения любого млекопитающего (например, человека, примата, кошки, собаки, хорька, коровы, лошади, свиньи, козы, крысы или мыши). В одном варианте осуществления, субъектом является человек.

«Терминатор» относится к полинуклеотидной последовательности, которая имеет тенденцию уменьшать или предотвращать сквозную транскрипцию (т.е. она уменьшает или предотвращает транскрипции, происходящую с одной стороны терминатора к другой стороне терминатора). Степень прерывания транскрипции обычно зависит от последовательности оснований и/или длины последовательности терминатора. В частности, как хорошо известно во многих молекулярно-биологических системах,

определенные последовательности ДНК, обычно называемые «последовательностями терминации транскрипции», представляют собой специфические последовательности, которые имеют тенденцию нарушать сквозную транскрипцию РНК-полимеразой, предположительно, заставляя молекулу РНК-полимеразы останавливать и/или отсоединиться от транскрибируемой ДНК. Типовой пример таких последовательность-специфичных терминаторов включает последовательности полиаденилирования («polyA»), например, SV40 polyA. В дополнение или вместо таких последовательность-специфичных терминаторов, вставки относительно длинных последовательностей ДНК между промотором и кодирующей областью также имеют тенденцию нарушать транскрипцию кодирующей области, как правило, пропорционально длине промежуточной последовательности. Этот эффект предположительно возникает из-за того, что всегда существует некоторая тенденция молекулы РНК-полимеразы к отсоединению от транскрибируемой ДНК, и увеличение длины последовательности, которую необходимо пройти до достижения кодирующей области, обычно увеличивает вероятность того, что отсоединение произойдет до того, как транскрипция кодирующей области будет завершена или, возможно, даже начата. Таким образом, терминаторы могут предотвращать транскрипцию только с одного направления («однонаправленные» терминаторы) или с обоих направлений («двунаправленные» терминаторы) и могут состоять из последовательностей терминации, специфичных для последовательности, или неспецифических для последовательности терминаторов, или обоих. В данной области техники известно множество таких терминаторных последовательностей; и иллюстративное использование таких последовательностей в контексте настоящего описания представлено ниже.

«Терапевтический ген», «профилактический ген», «полинуклеотид-мишень», «транген», «представляющий интерес ген» и т.п. обычно относятся к гену или генам, которые должны быть перенесены с использованием вектора. Обычно в контексте настоящего описания такие гены расположены внутри вектора гAAV (этот вектор фланкирован областями инвертированного концевой повтора (ITR) и, таким образом, может быть реплицирован и инкапсидирован в частицы гAAV). Полинуклеотиды-мишени можно использовать в этом описании для создания векторов гAAV для ряда различных областей применения. Такие полинуклеотиды включают, но не ограничиваются ими: (i) полинуклеотиды, кодирующие белки, полезные в других формах генной терапии для устранения недостатков, вызванных отсутствием, дефектом или субоптимальными уровнями структурного белка или фермента; (ii) полинуклеотиды, которые транскрибируются в антисмысловые молекулы; (iii) полинуклеотиды, которые транскрибируются в ловушки, связывающие факторы транскрипции или трансляции; (iv) полинуклеотиды, кодирующие клеточные модуляторы, такие как цитокины; (v) полинуклеотиды, которые могут делать клетки-реципиенты чувствительными к определенным лекарственным средствам, таким как ген тимидинкиназы вируса герпеса; (vi) полинуклеотиды для лечения рака, такие как гены-супрессоры опухолей E1A или

гены-супрессоры опухолей p53, для лечения различных видов рака; и (vii) полинуклеотиды для редактирования генов (например, CRISPR). Чтобы осуществить экспрессию трансгена в реципиентной клетке-хозяине, в одном варианте осуществления, он функционально связан с промотором, либо собственным, либо гетерологичным промотором. В данной области техники известно большое количество подходящих промоторов, выбор которых зависит от желаемого уровня экспрессии полинуклеотидами; того, требуется ли конститутивная экспрессия, индуцируемая экспрессия, клеточно-специфическая или тканеспецифическая экспрессия и т. д. Вектор гAAV может также содержать селективируемый маркер. Примеры трансгенов включают, без ограничения, муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR) или его производные (например, миниген CFTR Δ R; см., например, Ostedgaard et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(7):2921-6, 2011, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки), α -антитрипсин, β -глобин, γ -глобин, тирозингидроксилазу, глюкоцереброзидазу, арилсульфатазу А, фактор VIII, дистрофин, эритропоэтин, альфа-1-антитрипсин, поверхностно-активный белок SP-D, SP-A или SP-C, эритропоэтин или цитокин, например, IFN-альфа, IFN γ , TNF, IL-1, IL-17 или IL-6, или профилактический белок, который является антигеном, таким как вирусный, бактериальный, опухолевый или грибковый антиген, или нейтрализующее антитело, или его фрагмент, таргетирующий эпитоп антигена, например, антигена респираторного вируса человека, например вируса гриппа или RSV, включая, но не ограничиваясь ими, белок HBoV, белок вируса гриппа, белок RSV или белок SARS.

Под «терапевтически эффективным количеством» подразумевают количество композиции, вводимой для улучшения, ингибирования или улучшения состояния субъекта или симптома нарушения или заболевания, например муковисцидоза, клинически значимым образом. Любое улучшение состояния субъекта считается достаточным для достижения лечения. В одном варианте осуществления, количеством, достаточным для лечения, является количество, которое уменьшает, ингибирует или предотвращает возникновение одного или нескольких симптомов муковисцидоза, или является количеством, которое снижает тяжесть или продолжительность времени, в течение которого субъект страдает от одного или нескольких симптомов кистозного фиброза (например, по меньшей мере приблизительно на 10%, приблизительно 20% или приблизительно 30%, или, по меньшей мере приблизительно на 50%, приблизительно 60% или приблизительно 70%, или, по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 99% или более по отношению к контрольному субъекту, которого не лечат композицией, описанной в настоящем изобретении). Эффективное количество фармацевтической композиции, используемой для практического применения описанных в настоящем изобретении способов (например, лечения муковисцидоза), варьируется в зависимости от способа введения и возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта, подвергаемого лечению. Врач или исследователь может выбрать подходящее количество и схему дозирования.

«Трансдукция» или «трансдуцирование» в контексте настоящего описания являются терминами, относящимися к процессу введения экзогенного полинуклеотида, например, трансгена в rAAV, в клетку-хозяина, приводящего к экспрессии полинуклеотида, например, трансгена в клетке. Этот процесс обычно включает 1) эндоцитоз AAV после его связывания с рецептором на поверхности клетки, 2) выход из эндосом или других внутриклеточных компартментов в цитозоле клетки, 3) перенос вирусной частицы или вирусного генома в ядро, 4) снятие оболочки с вирусных частиц и образование экспрессируемых двухцепочечных геномных форм AAV, включая кольцевые промежуточные соединения. Экспрессируемая двухцепочечная форма rAAV может сохраняться в виде ядерной эписомы или, необязательно, может интегрироваться в геном хозяина. Изменение любого или комбинации эндоцитоза AAV после его связывания с рецептором клеточной поверхности, выхода из эндосом или других внутриклеточных компартментов в цитозоль клетки, переноса вирусной частицы или вирусного генома в ядро или снятия оболочки вирусных частиц, и образования экспрессионных форм двухцепочечного генома AAV, включая кольцевые промежуточные соединения, может привести к измененным уровням экспрессии или постоянству экспрессии, или измененному переносу в ядро, или измененным типам или относительному количеству клеток-хозяев или популяции клеток, экспрессирующих введенный полинуклеотид. Измененная экспрессия или устойчивость полинуклеотида, введенного через rAAV, может быть определена способами, хорошо известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, экспрессию белка, например, с помощью ELISA, проточную цитометрию и вестерн-блоттинг, измерение продуцирования ДНК и РНК с помощью анализов гибридизации, например, Нозерн-блоттинга, Саузерн-блоттинга и анализа задержки сдвига в геле, или количественного или не количественного анализа обратной транскрипции, полимеразной цепной реакции (PCR) или цифровой капельной PCR.

«Лечением» индивидуума или клетки является вмешательство любого типа в попытке изменить естественное состояние индивидуума или клетки в момент начала лечения, например, вызывая профилактический, лечебный или другой положительный эффект у индивидуума. Например, лечение индивидуума может быть предпринято для уменьшения или ограничения патологии, вызванной любым патологическим состоянием, включая (но не ограничиваясь ими) наследственный или индуцированный генетический дефицит (например, муковисцидоз), инфекцию, вызванную вирусным, бактериальным или паразитарным организмом, неопластическое или апластическое состояние или дисфункцию иммунной системы, такую как аутоиммунитет или иммунодепрессия. Лечение включает (но не ограничивается этим) введение композиции, такой как фармацевтическая композиция, и введение совместимых клеток, обработанных композицией. Лечение может проводиться как профилактически, так и терапевтически; то есть либо до, либо после начала патологического события или контакта с этиологическим агентом. Лечение может уменьшить один или несколько симптомов патологического состояния. Например, симптомы муковисцидоза известны в данной области и включают,

например, постоянный кашель, хрипы, одышку, непереносимость физических упражнений, повторяющиеся легочные инфекции, воспаление носовых ходов или заложенный нос, неприятный запах или жирный стул, плохой набор веса и рост, кишечную непроходимость, запор, повышенную концентрацию солей в поту, панкреатит и пневмонию. Обнаружение улучшения или отсутствия одного или нескольких симптомов заболевания (например, муковисцидоза) указывает на успешное лечение.

Используемый в настоящем изобретении термин «вектор» относится к макромолекуле или ассоциации макромолекул, которая содержит или ассоциируется с полинуклеотидом, и которая может использоваться для опосредования доставки полинуклеотида в клетку либо *in vitro*, либо *in vivo*. Иллюстративные векторы включают, например, плазмиды, вирусные векторы, липосомы и другие средства доставки генов. Доставляемый полинуклеотид, иногда называемый трансгеном, может включать представляющую интерес кодирующую последовательность, в генной терапии (например, ген, кодирующий представляющий интерес белок или терапевтический агент), кодирующую последовательность, представляющую интерес для разработки вакцины (например, полинуклеотид, экспрессирующий белок, полипептид или пептид, подходящий для индукции иммунного ответа у млекопитающего), и/или селективируемый или определяемый маркер.

Рекомбинантные векторы AAV и полинуклеотиды

Рекомбинантные векторы AAV являются потенциально мощными инструментами для генной терапии человека, особенно при таких заболеваниях, как муковисцидоз и серповидноклеточная анемия. Основное преимущество векторов гAAV перед другими подходами к генной терапии состоит в том, что они, как правило, не требуют постоянной репликации клетки-мишени, чтобы существовать эписомально или стабильно интегрироваться в клетку-хозяина. В настоящем изобретении представлены гAAV, которые содержат капсидный белок AV.TL65 и полинуклеотид, содержащий трансген, который может быть скомбинирован с усилителями AAV трансдукции, как описано в настоящем изобретении.

Векторы и/или вирусы гAAV также потенциально эффективны для разработки терапевтических или профилактических вакцин для профилактики инфекции, прогрессирования и/или тяжести заболевания. Основное преимущество гAAV векторов для разработки вакцин состоит в том, что они способны сохраняться в течение практически всей жизни клетки в качестве ядерной эписомы и, следовательно, обеспечивать долгосрочную экспрессию пептида, полипептида или белка, представляющего иммунологический интерес. Представляющие интерес трансгены включают вирусный ген, например гены оболочки (*env*) или *gag* ВИЧ; бактериальные гены, например белки клеточной стенки стрептококков; грибы, например, кокидомикоз; паразитов, например лейшманиоз, или гены рака, например p53.

Векторы и/или вирусы гAAV могут также содержать один или несколько определяемых маркеров. Известно множество таких маркеров, включая, в качестве

иллюстрации, ген бактериальной бета-галактозидазы (*lacZ*); ген плацентарной щелочной фосфатазы (AP) человека и гены, кодирующие различные маркеры клеточной поверхности, которые используют в качестве репортерных молекул как *in vitro*, так и *in vivo*. Векторы и/или вирусы гAAV могут также содержать один или несколько селективируемых маркеров.

Рекомбинантные AAV векторы и/или вирусы могут также содержать полинуклеотиды, которые не кодируют белки, включая, например, полинуклеотиды, кодирующие антисмысловую иРНК (комплемент иРНК), которые можно использовать для блокирования трансляции нормальной иРНК путем образования с ней дуплекса, и полинуклеотиды, кодирующие рибозимы (катализаторы РНК).

Вектор AAV обычно содержит полинуклеотид, гетерологичный AAV. Полинуклеотид обычно представляет интерес благодаря способности обеспечивать функцию клетки-мишени в контексте генной терапии, такую как повышающая или понижающая регуляция экспрессии определенного фенотипа. Такой гетерологичный полинуклеотид или «трансген» обычно имеет достаточную длину для обеспечения желаемой функции или кодирующей последовательности.

Если транскрипция гетерологичного полинуклеотида желательна в предполагаемой клетке-мишени, он может быть функционально связан с собственным промотором или с гетерологичным промотором, в зависимости, например, от желаемого уровня и/или специфичности транскрипции внутри клетки-мишени, как известно в данной области техники. В этом контексте подходят различные типы промоторов и энхансеров. Конститутивные промоторы обеспечивают постоянный уровень транскрипции гена, и их можно использовать, когда желательно, чтобы терапевтический или профилактический полинуклеотид экспрессировался на постоянной основе. Индуцируемые промоторы обычно проявляют низкую активность в отсутствие индуктора и активируются в присутствии индуктора. Они могут применяться, когда экспрессия желательна только в определенное время или в определенных местах, или когда желательно титровать уровень экспрессии с помощью индуцирующего агента. Промоторы и энхансеры также могут быть тканеспецифичными: то есть они проявляют свою активность только в определенных типах клеток, предположительно из-за генных регуляторных элементов, уникально обнаруженных в этих клетках.

Иллюстративными примерами промоторов являются поздний промотор SV40 из вируса 40 обезьяны, энхансерный/промоторный элемент многогранника бакуловируса, тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV tk), немедленно-ранний промотор из цитомегаловируса (CMV) и различные ретровирусные промоторы, включая элементы LTR. Индуцируемые промоторы включают индуцируемые ионами тяжелых металлов промоторы (такие как промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV) или промоторы различных гормонов роста) и промоторы фага T7, которые активны в присутствии РНК-полимеразы T7. В качестве иллюстрации, примеры тканеспецифических промоторов включают различные промоторы сурфактина (для экспрессии в легких),

промоторы миозина (для экспрессии в мышцах) и промоторы альбумина (для экспрессии в печени). Большое количество других промоторов известно и обычно доступно в данной области техники, и последовательности многих таких промоторов доступны в базах данных последовательностей, таких как база данных GenBank.

Если трансляция также желательна в намеченной клетке-мишени, гетерологичный полинуклеотид, вероятно, также будет содержать элементы управления, которые облегчают трансляцию (такие как сайт связывания рибосомы или «RBS» и сигнал полиаденилирования). Соответственно, гетерологичный полинуклеотид обычно включает, по меньшей мере одну кодирующую область, функционально связанную с подходящим промотором, и может также включать, например, функционально связанный энхансер, сайт связывания рибосомы и сигнал poly-A. Гетерологичный полинуклеотид может содержать одну кодирующую область или несколько кодирующих областей под контролем одного или разных промоторов. Всю единицу, содержащую комбинацию элементов управления и кодирующую область, часто называют кассетой экспрессии.

Гетерологичный полинуклеотид интегрируется рекомбинантными методами в или вместо кодирующей области генома AAV (т.е. вместо генов *гер* и *сар* AAV), но обычно фланкируется с обеих сторон участками инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Это означает, что ITR появляется как выше, так и ниже от кодирующей последовательности, либо в прямом сопоставлении, например (хотя и не обязательно) без какой-либо промежуточной последовательности, происходящей из AAV, чтобы снизить вероятность рекомбинации, которая может регенерировать компетентный к репликации AAV геном. Однако одного ITR может быть достаточно для выполнения функций, обычно связанных с конфигурациями, содержащими два ITR (см., например, WO 94/13788), и векторные конструкции только с одним ITR могут, таким образом, использоваться в сочетании со способами упаковки и продуцирования настоящего описания.

Нативные промоторы для *гер* являются саморегулирующимися и могут ограничивать количество продуцируемых частиц AAV. Ген *гер* также может быть функционально связан с гетерологичным промотором, независимо от того, предоставлен ли *гер* как часть векторной конструкции или отдельно. Подходит любой гетерологичный промотор, который не сильно подавляется экспрессией гена *гер*; но индуцируемые промоторы предпочтительней, потому что конститутивная экспрессия гена *гер* может оказывать негативное влияние на клетку-хозяин. В данной области техники известно большое количество индуцируемых промоторов; включая, в качестве иллюстрации, промоторы, индуцируемые ионами тяжелых металлов (такие как промоторы металлотioneина); промоторы, индуцируемые стероидным гормоном (такие как промоторы MMTV или промоторы гормона роста); и промоторы, такие как промоторы фага T7, которые активны в присутствии T7 РНК полимеразы. Один подкласс индуцируемых промоторов включает такие, которые индуцируются вспомогательным вирусом, который используется для комплемента репликации и упаковки вектора rAAV. Также описан ряд промоторов, индуцируемых вирусом-помощником, включающих

промотор раннего гена аденовируса, который индуцируется белком E1A аденовируса; главный поздний промотор аденовируса; промотор вируса герпеса, который индуцируется белками вируса герпеса, такими как VP16 или ICP4; а также промоторы, индуцируемые вирусом осповакцины или поксвируса.

Были описаны способы идентификации и тестирования промоторов, индуцируемых вирусом-помощником (см., например, WO 96/17947). Таким образом, в данной области техники известны способы определения того, являются ли кандидатные промоторы индуцируемыми вирусом-помощником и будут ли они полезны для создания высокоэффективных упаковывающих клеток. Коротко, один из таких способов включает замену промотора р5 гена гер AAV предполагаемым промотором, индуцируемым вирусом-помощником (известным в данной области или идентифицированным с использованием хорошо известных способов, таких как связывание с «репортерными» генами без промотора). Гены гер-сар AAV (с замененным р5), необязательно связанные с положительно селективируемым маркером, таким как ген резистентности к антибиотикам, затем стабильно интегрируют в подходящую клетку-хозяин (такую как клетки HeLa или A549, примеры которых приведены ниже). Клетки, которые способны относительно хорошо расти в условиях селекции (например, в присутствии антибиотика), затем тестируют на их способность экспрессировать гены гер и сар при добавлении вируса-помощника. В качестве начального теста на экспрессию гер и/или сар клетки можно легко проверить с помощью иммунофлуоресценции для обнаружения белков Rep и/или Cap. Подтверждение возможностей упаковки и эффективности можно затем определить с помощью функциональных тестов для репликации и упаковки входящих векторов гAAV. Используя эту методологию, индуцируемый вирусом-помощником промотор, полученный из гена металлотioneина мыши, был идентифицирован в качестве подходящей замены промотора р5 и использован для получения высоких титров частиц гAAV (как описано в WO 96/17947).

Учитывая относительные пределы размера инкапсидации различных геномов AAV, вставка большого гетерологичного полинуклеотида в геном требует удаления части последовательности AAV. Удаление одного или нескольких генов AAV в любом случае желательно для снижения вероятности образования репликационно-компетентного AAV («RCA»). Соответственно, кодирующие или промоторные последовательности для гер, сар или обоих, в одном варианте осуществления, удалены, поскольку функции, обеспечиваемые этими генами, могут быть обеспечены *in транс*.

Полученный вектор называется "дефектным" по этим функциям. Чтобы реплицировать и упаковать вектор, недостающие функции дополняются упаковывающим геном или их множеством, которые вместе кодируют необходимые функции для различных продуктов недостающего гена гер и/или сар. Упаковочные гены или генные кассеты в одном варианте осуществления не фланкированы AAV ITR и, в одном варианте осуществления, не имеют какой-либо существенной гомологии с геномом гAAV. Таким образом, чтобы минимизировать гомологичную рекомбинацию во время репликации

между векторной последовательностью и отдельно предоставленными упаковывающими генами, желательно избежать наложения двух полинуклеотидных последовательностей. Уровень гомологии и соответствующая частота рекомбинации увеличиваются с увеличением длины гомологичных последовательностей и с уровнем их общей идентичности. Уровень гомологии, который будет представлять интерес для данной системы, может быть определен теоретически и подтвержден экспериментально, как это известно в данной области техники. Однако, как правило, рекомбинация может быть существенно уменьшена или исключена, если перекрывающейся последовательностью является менее приблизительно 25 нуклеотидная последовательность, если она по меньшей мере по меньшей мере 80% идентична по всей своей длине, или менее приблизительно 50 нуклеотидная последовательность, если она по меньшей мере по меньшей мере 70% идентична по всей своей длине. Конечно, даже более низкие уровни гомологии еще больше уменьшают вероятность рекомбинации. Похоже, что даже без какой-либо перекрывающейся гомологии существует некоторая остаточная частота образования RCA. Еще большее снижение частоты образования RCA (например, за счет не гомологической рекомбинации) может быть получено путем «расщепления» функций репликации и инкапсидации AAV, как описано у Allen et al., WO 98/27204).

Конструкция вектора rAAV и конструкции комплементарного упаковывающего гена могут быть реализованы в этом описании в ряде различных форм. Все вирусные частицы, плазмиды и стабильно трансформированные клетки-хозяева можно использовать для введения таких конструкций в упаковывающую клетку либо временно, либо стабильно.

В некоторых вариантах осуществления настоящего описания, вектор AAV и комплементарный упаковывающие ген(ы), если таковые имеются, представлены в форме бактериальных плазмид, частиц AAV или любой их комбинации. В других вариантах осуществления, либо последовательность вектора AAV, либо упаковывающие ген(ы), либо оба, представлены в форме генетически измененных (например, наследственно измененных) эукариотических клеток. Развитие клеток-хозяев, наследственно измененных для экспрессии последовательности вектора AAV, генов упаковки AAV или того и другого, обеспечивает установленный источник материала, который экспрессируется на надежном уровне.

Таким образом, в контексте этого описания можно использовать множество различных генетически измененных клеток. В качестве иллюстрации можно использовать клетку-хозяин млекопитающего, по меньшей мере с одной интактной копией стабильно интегрированного вектора rAAV. Плазида, упаковывающая AAV, содержащая, по меньшей мере ген *rep* AAV, функционально связанный с промотором, может использоваться для обеспечения функций репликации (как описано в патенте США № 5,658,776). Альтернативно, стабильная линия клеток млекопитающих с геном *rep* AAV, функционально связанным с промотором, может быть использована для обеспечения функций репликации (см., например, Trempe et al. (WO 95/13392); Burstein et al. (WO

98/23018)); и Johnson et al (патент США № 5,656,785)). Ген cap AAV, обеспечивающий белки инкапсидации, как описано выше, может быть предоставлен вместе с геном гер AAV или отдельно (см., например, упомянутые выше заявки и патенты, а также Allen et al. (WO 98/27204). Возможны и другие комбинации, которые включены в объем этого описания.

Подходы к продуцированию гAAV, которые содержат капсидные белки AV.TL65, известны в данной области. См., например, Excoffon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(10):3865-3870, 2009 и патент США № 10,046,016, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид может содержать любые из усилителей или промоторов, описанных в заявке на патент США № 16/082,767, которая полностью включена посредством ссылки в настоящее описание.

гAAV может включать полинуклеотид, содержащий любой из энхансеров и/или промоторов, описанных в настоящем изобретении или известных в данной области техники. Например, гAAV может включать полинуклеотид, включающий энхансер F5 и/или промотор tg83. В некоторых вариантах осуществления, энхансер F5 включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 14 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, F5 включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления, энхансер F5 включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, промотор tg83 включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 2.

гAAV может включать любой подходящий трансген. В некоторых вариантах осуществления, трансгеном является CFTR или его производное. В некоторых вариантах осуществления, производным CFTR является трансген CFTRΔR (например, трансген CFTRΔR человека). В некоторых вариантах осуществления, трансген CFTRΔR человека кодирован полинуклеотидом, включающим последовательность SEQ ID NO: 4 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит, в направлении от 5'-к-3', энхансер F5, промотор tg83 и трансген CFTRΔR. Например, в некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 7 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 7.

Полинуклеотид может дополнительно содержать в 3' направлении 3' нетранслируемую область (3'-UTR), включающую последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 5.

Полинуклеотид может дополнительно содержать в 3' направлении синтетический сайт полиаденилирования, включающий последовательность SEQ ID NO: 6 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 6.

Полинуклеотид может дополнительно содержать один или несколько ITR, например, 5' инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV) на 5' конце полинуклеотида и 3' AAV ITR на 3' конце полинуклеотида. Может использоваться любой подходящий 5' ITR и/или 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления, 5' AAV ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 15 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления, 3' AAV ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 16 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 16. Последовательности ITR могут быть палиндромными, например, как в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, где последовательность ITR на 5' конце расположена на обратной цепи, а последовательность ITR на 3' конце расположена на прямой цепи.

В некоторых примерах, полинуклеотид содержит: 5' AAV ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 15, энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO: 14 (который может содержать 5' сайт EcoRI и 3' сайт XhoI, как в SEQ ID NO: 1), промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, 5'-UTR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3, трансген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4, 3' UTR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, s-pA, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6, и 3' AAV ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 16.

В конкретных примерах, полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 17 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 17.

Применение rAAV и его фармацевтических композиций для генной терапии

Векторы AAV можно использовать для введения индивиду в целях генной терапии или вакцинации. Подходящие заболевания для терапии rAAV включают, но не ограничиваются ими, заболевания, вызванные вирусными, бактериальными или паразитарными инфекциями, различными злокачественными новообразованиями и гиперпролиферативными состояниями, аутоиммунными состояниями и врожденными дефицитами (например, муковисцидозом).

Генную терапию можно проводить для повышения уровня экспрессии конкретного белка либо внутри клетки, либо секретируемого ей. Описанные здесь векторы могут использоваться для генетического изменения клеток либо для маркировки гена, либо для замены отсутствующего или дефектного гена, либо для встраивания терапевтического гена. Альтернативно, в клетку может быть введен полинуклеотид, который снижает уровень экспрессии. Это может быть использовано для подавления нежелательного

фенотипа, такого как продукт гена, амплифицированного или сверхэкспрессируемого в ходе злокачественного новообразования, или гена, введенного или сверхэкспрессированного в ходе микробной инфекции. Уровни экспрессии могут быть снижены путем введения терапевтического или профилактического полинуклеотида, содержащего последовательность, способную, например, образовывать стабильный гибрид либо с геном-мишенью, либо с транскриптом РНК (антисмысловая терапия), способную действовать как рибозим для расщепления соответствующей иРНК или способную действовать как приманка для продукта гена-мишени.

Особый интерес представляет коррекция генетического дефекта муковисцидоза путем подачи правильно функционирующего муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (CFTR) в эпителий дыхательных путей. Таким образом, векторы rAAV, кодирующие нативный белок CFTR, и его мутанты и фрагменты, например, CFTRΔR, и его фармацевтические композиции, все являются некоторыми вариантами осуществления этого описания.

В раскрытии представлена фармацевтическая композиция, которая включает (i) rAAV, который включает капсидный белок AV.TL65 и полинуклеотид, содержащий трансген (например, CFTRΔR); и (ii) усилитель трансдукции AAV. В некоторых вариантах осуществления, усилителем является агент, модулирующий протеасомы. В некоторых вариантах осуществления, агентом, модулирующим протеасомы, является антрациклин, ингибитор протеасом, трипептидилальдегид или их комбинация. В некоторых вариантах реализации антрациклином является доксорубин, идарубин, акларубин, даунорубин, эпирубин, валрубин, митоксантрон или их комбинация. В некоторых вариантах осуществления, антрациклином является доксорубин, идарубин или их комбинация. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором протеасом является бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб. В некоторых вариантах осуществления, трипептидилальдегидом является N-ацетил-1-лейцил-1-лейцил-1-норлейцин (LLnL).

rAAV фармацевтической композиции может содержать полинуклеотид, содержащий любой из энхансеров и/или промоторов, описанных в настоящем изобретении или известных в данной области техники. Например, rAAV может содержать полинуклеотид, включающий энхансер F5 и/или промотор tg83. В некоторых вариантах осуществления, энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления, энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, промотор tg83 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 2.

rAAV может содержать любой подходящий трансген. В некоторых вариантах осуществления, трансгеном является CFTR или его производное. В некоторых вариантах осуществления, производным CFTR является трансген CFTRΔR (например, трансген

CFTRΔR человека). В некоторых вариантах осуществления, трансген CFTRΔR человека кодирован полинуклеотидом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 4 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит, в направлении от 5'-к-3', энхансер F5, промотор tg83 и трансген CFTRΔR. Например, в некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 7 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 7.

Полинуклеотид может дополнительно содержать в 3' направлении 3'-UTR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 5.

Полинуклеотид может дополнительно содержать в 3' направлении синтетический сайт полиаденилирования, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 6.

Полинуклеотид может дополнительно содержать один или несколько ITR, например, 5' инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV) на 5' конце полинуклеотида и 3' AAV ITR на 3' конце полинуклеотида. Может использоваться любой подходящий 5' ITR и/или 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления, 5' AAV ITR включает последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления, 3' AAV ITR включает последовательность SEQ ID NO: 16 или ее вариант с по меньшей мере 80% последовательностью нуклеиновой кислоты идентичность SEQ ID NO: 16.

В некоторых примерах, полинуклеотид содержит: 5' AAV ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 15, энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO: 14 (который может содержать 5' сайт EcoRI и 3' сайт XhoI, как в SEQ ID NO: 1), промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, 5'-UTR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3, трансген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4, 3' UTR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, s-pA, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6, и 3' AAV ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 16.

В конкретных примерах, полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 17 или ее вариант с по меньшей мере 80% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 17.

Композиции, описанные в настоящем изобретении (например, rAAV, фармацевтические композиции и/или усилители), можно использовать *in vivo*, а также *ex vivo*. Генная терапия *in vivo* включает введение векторов по настоящему описанию непосредственно субъекту. Фармацевтические композиции могут поставляться в виде жидких растворов или суспензий, эмульсий или твердых форм, подходящих для

растворения или суспендирования в жидкости перед применением. Для введения в дыхательные пути, одним типовым способом введения является аэрозольный, с использованием композиции, которая обеспечивает либо твердый, либо жидкий аэрозоль при использовании с подходящим аэролюбилитатором. Другим способом введения в дыхательные пути является использование гибкого волоконно-оптического бронхоскопа для введения векторов. Обычно вирусные векторы находятся в фармацевтически подходящем апирогенном буфере, таком как сбалансированный солевой раствор Рингера (рН 7,4). Хотя это и не требуется, фармацевтические композиции необязательно могут поставляться в стандартной дозированной форме, подходящей для введения точного количества.

Композиция, описанная в настоящем изобретении (например, rAAV, фармацевтические композиции и/или усилители), может вводиться любым подходящим путем, например, путем ингаляции, распыления, аэролизации, интраназально, интратрахеально, внутривентриально, перорально, парентерально (например, внутривенно, подкожно или внутримышечно), перорально, назально, ректально, местно или буккально. Их также можно вводить локально или системно. В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем изобретении композиция вводится в виде аэрозольных частиц интратрахеально и/или внутривентриально с использованием распылителя (например, с помощью устройства для распыления на слизистую оболочку ларинго-трахеи MADgic®). В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию вводят парентерально. В некоторых других вариантах осуществления, фармацевтическую композицию вводят системно. Векторы также могут быть введены посредством биопротезов, включая, в качестве иллюстрации, сосудистые трансплантаты (ПТФЭ и дакрон), сердечные клапаны, внутрисосудистые стенты, внутрисосудистые прокладки, а также другие не сосудистые протезы. Общие методы, касающиеся доставки, частоты, композиции и диапазонов доз векторных растворов, известны специалистам в данной области.

Для введения в верхние (носовые) или нижние дыхательные пути путем ингаляции, описанные в настоящем изобретении композиции (например, rAAV, фармацевтические композиции и/или усилители) удобно доставлять из инсуффлятора, небулайзера или баллона под давлением или других удобных средств доставки аэрозольного спрея. Баллоны под давлением могут содержать подходящий пропеллент, такой как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другой подходящий газ. В случае аэрозоля под давлением, стандартная дозировка может быть определена с помощью клапана для доставки отмеренного количества.

Альтернативно, для введения ингаляцией или инсуффляцией, композиция может принимать форму сухого порошка, например порошковой смеси агента и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал. Порошковая композиция может быть представлена в стандартной дозированной форме, например, в капсулах или картриджах, или, например, в желатиновых или блистерных упаковках, из которых порошок можно

вводить с помощью ингалятора, инсуффлятора или ингалятора с дозирующим клапаном.

Для интраназального введения, агент можно вводить в виде капель в нос, жидкого спрея, например, через распылитель из пластиковой бутылки или ингалятор с дозирующим клапаном. Типовыми распылителями являются Mistometer (Wintrop) и Medihaler (Riker).

Введение описанных в настоящем изобретении композиций (например, rAAV, фармацевтические композиции и/или усилители) может быть непрерывным или периодическим, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, от того, является ли цель введения терапевтической или профилактической, а также от других факторов, известных квалифицированным практикам. rAAV или фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, можно вводить один или несколько раз, в одно и то же или в разные места. Введение агентов по настоящему описанию может быть по существу непрерывным в течение заранее выбранного периода времени или может осуществляться серией разнесенных доз.

Описанные в настоящем изобретении композиции (например, rAAV, фармацевтические композиции и/или усилители) можно вводить в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Могут быть использованы любые подходящие дополнительные терапевтические агенты, включая стандартные методы лечения CF. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько дополнительных терапевтических агентов включают антибиотик (например, азитромицин (ZITHROMAX®), амоксициллин и клавулановую кислоту (AUGMENTIN®), клоксациллин и диклокациллин, тикарциллин и клавулановую кислоту (TIMENTIN®), цефалексин, цефдинир, цефprozил, цефаклор, сульфаметоксазол и триметоприм (BACTRIM®), эритромицин/сульфизоксазол, эритромицин, кларитромицин, тетрациклин, доксициклин, миноциклин, тигециклин, ванкомицин, имипенем, мерипенем, Колистиметат/COLISTIN®, линезолид, ципрофлоксацин, левофлоксацин или их комбинации), препарат, разжижающий слизь (например, гипертонической солевой раствор или дорназа альфа (PULMOZYME®)), модулятор CFTR (например, ивакафтор (KALYDECO®), лумакафтор, лумакафтор/ивакафтор (ORKAMBI®), тезакафтор, ивакафтор (SYMDEKO®) или TRIKAFTA® (элексакафтор/ивакафтор/тезакафтор)), муколитик (например, ацетилцистеин, амброксол, бромгексин, карбоцистеин, эрдостеин, мецистеин и дорназа альфа), иммунодепрессант, изотонический раствор, гипертонический раствор или их комбинацию.

Например, любую из описанных в настоящем изобретении композиций (например, rAAV, фармацевтические композиции и/или усилители) можно вводить в сочетании с одним или несколькими иммунодепрессантами. Можно использовать любой подходящий иммунодепрессант. Например, неограничивающие примеры иммунодепрессантов включают кортикостероиды (например, ингаляционный кортикостероид (например, беклометазон (QVAR®), будесонид (PULMICORT®), будесонид/формотерол (SYMBICORT®), циклесонид (ALVESCO®), флутиказон (FLOVENT HFA®), флутиказона

пропионат (FLOVENT DISKUS®), флутиказона фуруат (ARNIVITY ELLIPTA®), флутиказона пропионат/сальметерол (ADVAIR®), флутиказона фуруат/умеклидиний/вилантерол (TRELEGY ELLIPTA®), мометазона фуруат (ASMANEX®) или мометазон/формотерол (DULERA®), предизон или метилпреднизон), поликлональные анти-лимфоцитарные антитела (например, анти-лимфоцитарный глобулин (ALG) и анти-тимоцитарный глобулин (ATG) антитела, которые могут быть, например, получены от лошади или кролика), моноклональные анти-лимфоцитарные антитела (например, анти-CD3 антитела (например, мурмомаб и алемтузумаб) или анти-CD20 антитела (например, ритуксимаб)), антагонисты рецепторов интерлейкина-2 (IL-2) (например, даклизумаб и базиликсимаб), ингибиторы кальциневрина (например, циклоспорин А и такролимус), клеточные ингибиторы цикла (например, азатиоприн, микофенолятмофетил (MMF) и микофеноловая кислота (MPA)), ингибиторы мишени рапамицина в клетках (mTOR) (например, сиролимус (рапамицин) и эверолимус), метотрексат, циклофосфамид, антрациклин (например, доксорубицин, идарубицин, акларубицин, даунорубицин, эпирубицин, валрубицин, митоксантрон или их комбинации), таксан (например, TAXOL® (паклитаксел)) и их комбинации (например, комбинация ингибитора кальциневрина, ингибитора клеточного цикла и кортикостероида).

В конкретных вариантах осуществления, любую из композиций, описанных в настоящем изобретении (например, rAAV, фармацевтические композиции и/или усилители), можно вводить в сочетании с одним или несколькими кортикостероидами (например, ингаляционный кортикостероид (например, беклометазон (QVAR®), будесонид (PULMICORT®), будесонид/формотерол (SYMBICORT®), циклесонид (ALVESCO®), флутиказон (FLOVENT HFA®), флутиказона пропионат (FLOVENT DISKUS®), флутиказона фуруат (ARNIVITY ELLIPTA®), флутиказона пропионат/сальметерол (ADVAIR®), флутиказона фуруат/умеклидиний/вилантерол (TRELEGY ELLIPTA®), мометазона фуруат (ASMANEX®) или мометазон/формотерол (DULERA®), предизон или метилпреднизон).

Иммунодепрессант (например, любой иммунодепрессант, описанный в настоящем изобретении) можно вводить путем ингаляции или системно (например, внутривенно или подкожно).

Описанные в настоящем изобретении композиции (например, rAAV, фармацевтические композиции и/или усилители) можно вводить млекопитающему отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями. Как отмечалось выше, относительные пропорции активного ингредиента и носителя определяются растворимостью и химической природой соединения, выбранным путем введения и стандартной фармацевтической практикой.

Дозировка настоящих композиций будет варьироваться в зависимости от формы введения, конкретного выбранного соединения и физиологических характеристик конкретного пациента, подвергаемого лечению. Желательно использовать самую низкую

эффективную концентрацию вируса, чтобы снизить риск нежелательных эффектов, таких как токсичность.

Усилители

Описанные в настоящем изобретении гAAV, содержащие AV.TL65 капсидные белки, можно использовать в комбинации с усилителями трансдукции AAV для достижения значительного увеличения трансдукции и/или экспрессии трансгенов. Можно использовать любой подходящий усилитель. Например, в патенте США № 7,749,491, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки, описаны подходящие усилители. Усилитель может быть агентом, модулирующим протеасомы. Агентом, модулирующим протеасомы, может быть антрациклин (например, доксорубин, идарубин, акларубин, даунорубин, эпирубин, вальрубин или митоксантрон), ингибитор протеасомы (например, бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб), в трипептидилальдегид (например, N-ацетил-1-лейцил-1-лейцил-1-норлейцин (LLnL)) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, усилителем является доксорубин. В других вариантах осуществления, усилителем является идарубин.

гAAV и усилители могут контактировать с клеткой или вводиться субъекту в одной и той же композиции или в разных композициях (например, фармацевтических композициях). Контакт или введение гAAV и усилителей может быть последовательным (например, гAAV, затем усилители, или наоборот) или одновременным.

ПРИМЕРЫ

Описание будет более полно понято при обращении к следующим примерам. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и объем данной заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1: Доставка AAV-CFTR к бронхиальным эпителиальным клеткам пациентов с муковисцидозом увеличивает функциональное восстановление проводимости хлорида

Муковисцидоз (CF) является опасным для жизни аутосомно-рецессивным заболеванием, вызванным мутациями в гене, кодирующем муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR), канал, по которому ионы хлора и бикарбоната проходят через мембраны эпителиальных клеток. Нарушение функции CFTR приводит к воспалению дыхательных путей и прогрессирующему бронхоэктазу. Из-за моногенной этиологии CF и различных мутаций CFTR в популяции пациентов, генная терапия потенциально обеспечивает универсальное лекарство от CF. Стандарт лечения CF в настоящее время пытается модулировать активность дефектного CFTR с помощью модуляторов, например, лумакафлора/VX-809 (корректора каналов), ивакафлора/VX-770 (усилителя каналов) ORKAMBI® (комбинации препаратов) или TRIKAFTA®

(элексакафтора/ивакафтора/тезакафтора). Хотя эти подходы многообещающие, они ограничены своей специфичностью только для подмножеств известных мутаций CFTR.

Создан новый вектор AAV с участием капсида, который очень эффективен при трансдукции эпителия дыхательных путей человека в апикальной мембране. В частности, использован AV.TL65-SP183-CFTRΔR для доставки минигена CFTR с частично удаленным R-доменом и двойного репортерного вектора AV.TL65Luciferase-mCherry для экспрессии люциферазы и флуоресцентного белка mCherry. Вектор rAAV AV.TL65-SP183-CFTRΔR включает полинуклеотид, содержащий: 5' AAV ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 15, энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO: 14 (который может включать 5' сайт EcoRI и 3' сайт XhoI, как в SEQ ID NO: 1), промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, 5'-UTR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3, миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 4, 3' UTR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, s-pA, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6, и 3' AAV ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 16. Например, упакованный полинуклеотид может содержать последовательность SEQ ID NO: 17. Также использованы небольшие молекулы усилителей (ингибиторы протеасом) для значительного усиления рекомбинантной трансдукции AAV за счет стимуляции эндосомного процессинга и переноса вирусного трансгена в ядро. Было показано, что сочетание AV.TL65Luciferase-mCherry с доксорубицином или идарубицином обеспечивает не токсичное усиление экспрессии люциферазы более чем в 600 раз на поверхности границы раздела водной и воздушной сред (ALI) культур бронхиального эпителия человека (HBE) от 5 отдельных CF (гомозиготный dF508)/dF508 CFTR) и без CF доноров, по сравнению с AV.TL65Luciferase-mCherry без ингибитора протеасом. В другом эксперименте, доксорубицин и идарубицин+AV.TL65-gLuc-mCherry улучшают трансдукцию по сравнению с AAV без ингибитора протеасом более чем в 200 раз (фиг. 1А, пунктирная линия). Доксорубицин, добавленный к AV.TL65-gLuc-mCherry, но не идарубицин, имеет активность LDH (токсичность) менее 150% по сравнению с AAV без ингибитора протеасом (фиг. 1В; пунктирная линия). Прирост эффективности трансдукции в клетках 0 пассажа (P0) более чем в 200 раз больше при использовании доксорубицина и идарубицина с LDH <1,5x от исходного уровня для доксорубицина и >1,5x от исходного уровня для идарубицина.

Также было показано, что AV.TL65-SP183-CFTRΔR в сочетании с доксорубицином или идарубицином дает среднюю коррекцию стимулированного форсколином, опосредованного CFTR транспорта хлорида в культурах ALI HBE от 6 отдельных доноров с CF, которая составляет по меньшей мере 104% от этого показателя для 6 отдельных доноров, не имеющих CF. Кроме того, было показано, что такая комплементация стимулированного форсколином тока в четыре раза больше, чем у стандартных лекарственных препаратов, люмакафтора и ивакафтора, в культурах ALI HBE из двух отдельных донорских линий клеток HBE CF. Таким образом, разработан способ увеличения экспрессии CFTR с использованием вирусного вектора AAV для коррекции

TCTGTGCTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTCC
GGAAAATATTCACCACCATCTCATTCTGCATTGTTCTGCG
CATGGCGGTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAACA
TGGTATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAAAATACAGGATT
TCTTACAAAAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACTT
AACGACTACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTT
CTGGGAGGAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAA
ACAAAACAATAACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGA
CAGCCTCTTCTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTG
TCCTGAAAGATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTT
GTTGGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCA
CTTCTAATGATGATTATGGGAGA ACTGGAGCCTTCAGAGG
GTAAAATTAAGCACAGTGAAGAATTTCACTTCTGTTCTCA
GTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATC
ATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCG
TCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTT
TGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAAT
CACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCA
AGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACT
CTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAAT
ATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAA ACT
AGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAG
CTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATTT
TTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGAC
TTTAGCTCAAACTCATGGGATGTGATTCTTTTCGACCAAT
TTAGTGCAGAAAGAAGAAATTCAATCCTAACTGAGACCTT
ACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGG
ACAGAAACAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAG
TTTGGGGAAAAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCA
ACTCTACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCCTGAA
CCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTAC
CGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCC
CCTCAGGCAA ACTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAA
GGTTATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAA
TTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATAT

GGAGAGCATACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCT
TCGATATATACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAA
TTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTTCT
TTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAG
ACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATG
CAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTAC
ATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGAT
TCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCACAGT
GTCGAAAATTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTC
AAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTG
GGATTCTTAATAGATTCTCCAAGATATAGCAATTTTGGA
TGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGT
TATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGCAGTTTT
ACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGTGCCAGTGATAGTG
GCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCCCTCCAACCTCACA
GCAACTCAAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAAT
TTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACA
CTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTT
CCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTG
TACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAA
TGATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCA
TTTTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTA
TCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTG
GGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGA
TCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAG
AAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAACAAGAATG
GCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGT
GAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGAC
TGTCAAAGATCTCACAGCAAATACACAGAAGGTGGAAA
TGCCATATTAGAGAACATTTCCCTTCTCAATAAGTCCTGGC
CAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAAGTGGATCAGGGAAG
AGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTTGAGACTACTGAACACTGA
AGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATA
ACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATAACCAC
AGAAAGTATTTATTTTTCTGGAACATTTAGAAAAACTT

		GGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAA AGTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACA GTTTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGC TGTGTCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGG CTAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGA TGAACCCAGTGCTCATTGGATCCAGTAACATACCAAATA ATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAG TAATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATG CCAACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCA GTACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCT CTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTC TTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCCC AGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGC AAGATACAAGGCTTTAG
5	3'-UTR	AGAGCAGCATAAATGTTGACATGGGACATTTGCTCATGGA ATTGG
6	s-pA	AATAAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTT TTTGTGTGTA
7	F5 энхансер, Tg83 промотор, 5'-UTR, hCFTRΔR	GAATTCGTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTG GGCATGTCTGGGCATGTCGGGCATTCTGGGCGTCTGGGCA TGTCTGGGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTGACGTGC ACGCGTGGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTATATAAGC AGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAGCCCGAGAG ACCATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCT CCAAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACCAATTTTGAGGAA AGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCAGACATATACCA AATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAAT TGGAAAGAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAA ATCCTAAACTCATTAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTCTGG AGATTTATGTTCTATGGAATCTTTTTATATTTAGGGGAAGT CACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATA GCTTCCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCG CGATTTATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTG AGGACACTGCTCCTACACCAGCCATTTTTGGCCTTCATC ACATTGGAATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGAT

TTATAAGAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGAT
AAAATAAGTATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACA
ACCTGAACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTT
CGTGTGGATCGTCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGG
CTAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGAC
TTGGTTTCCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGCTA
GGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGG
AAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATCG
AGAACATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAG
CAATGGAAAAAATGATTGAAAACCTAAGACAAACAGAAC
TGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACTTCAA
TAGCTCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGT
TATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCT
CCGGAAAATATTCACCACCATCTCATTCTGCATTGTTCTGC
GCATGGCGGTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAAC
ATGGTATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAAAATACAGGAT
TTCTTACAAAAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACT
TAACGACTACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCT
TCTGGGAGGAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAA
AACAAAACAATAACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATG
ACAGCCTCTTCTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCT
GTCCTGAAAGATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAG
TTGTTGGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTT
CACTTCTAATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGA
GGGTAAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTTCACTTCTGTTCT
CAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATA
TCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAG
CGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAA
GTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGG
AATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTA
GCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAG
ACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGA
AATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAA
ACTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGA
AAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTA

TTTTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCA
GACTTTAGCTCAAAACTCATGGGATGTGATTCTTTTCGACC
AATTTAGTGCAGAAAGAAGAAATTCAATCCTAACTGAGA
CCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCC
TGGACAGAAACAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGA
GAGTTTGGGGAAAAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCA
ATCAACTCTACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCC
TGAACCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACAT
TCACCGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACT
GGCCCCTCAGGCCAACTTGACTGAACTGGATATATATTCA
AGAAGGTTATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAA
GAAATTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTTGATG
ATATGGAGAGCATAACCAGCAGTGACTACATGGAACACAT
ACCTTCGATATATTAAGTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTG
CTAATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTG
CTTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTT
CAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGC
TATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGT
TTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTAT
GGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATC
ACAGTGTCGAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTG
TTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGC
AGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCAAAGATATAGCAATT
TTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCA
GTTGTTATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTGCGCA
GTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGTGCCAGTGA
TAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCTCCAAACC
TCACAGCAACTCAAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGT
CCAATTTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTAT
GGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAAC
TCTGTTCCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGG
TTCTTGTACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAA
TAGAAATGATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTC
ATTTCCATTTTAAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTT
GGTATTATCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACAT

		<p>TGCAGTGGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTT GATGCGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATG CCAACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAC AAGAATGGCCAACCTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATT CACACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCC AAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAAATACACAGAAG GTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCCCTTCTCAATAAG TCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAAGTGGATC AGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGAGACTACTG AACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGG GATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAG TGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTTAG AAAAAAGTGGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGA AATATGGAAAGTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTG ATAGAACAGTTTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTTGTGG ATGGGGGCTGTGTCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGAT GTGCTTGGCTAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTG CTGCTTGATGAACCCAGTGCTCATTTGGATCCAGTAACAT ACCAAATAATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTTGCTG ATTGCACAGTAATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAAT GCTGGAATGCCAACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAA AGTGCGGCAGTACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGA GAGGAGCCTCTTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGG GTGAAGCTCTTTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGT CTAAGCCCCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAG AAGAGGTGCAAGATACAAGGCTTTAG</p>
8	F5 энхансер, Tg83 промотор, 5'-UTR, hCFTRΔR, 3'- UTR	<p>GAATTCGTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTG GGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATTCTGGGCGTCTGGGCA TGTCTGGGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTGACGTGC ACGCGTGGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTATATAAGC AGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAGCCCGAGAG ACCATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCT CCAAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACCAATTTTGAGGAA AGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCAGACATATACCA AATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAT</p>

TGGAAAGAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAA
ATCCTAAACTCATTAAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTCTGG
AGATTTATGTTCTATGGAATCTTTTTATATTTAGGGGAAGT
CACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATA
GCTTCCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCG
CGATTTATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTG
AGGACACTGCTCCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATC
ACATTGGAATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGAT
TTATAAGAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGAT
AAAATAAGTATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACA
ACCTGAACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTT
CGTGTGGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGG
CTAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGAC
TTGGTTTCCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGCTA
GGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGG
AAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATCG
AGAACATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAG
CAATGGAAAAAATGATTGAAAACCTAAGACAAACAGAAC
TGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACTTCAA
TAGCTCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTT
TATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCT
CCGGAAAATATTCACCACCATCTCATTCTGCATTGTTCTGC
GCATGGCGGTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAAC
ATGGTATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAATAACAGGAT
TTCTTACAAAAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACT
TAACGACTACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCT
TCTGGGAGGAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAA
AACAAAACAATAACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATG
ACAGCCTCTTCTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCT
GTCCTGAAAGATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAG
TTGTTGGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTT
CACTTCTAATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGA
GGGTAAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTTCACTTCTGTTCT
CAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATA
TCATCTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAG

CGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAA
GTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGG
AATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTA
GCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAG
ACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGA
AATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAA
ACTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGA
AAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTA
TTTTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCA
GACTTTAGCTCAAACTCATGGGATGTGATTCTTTTCGACC
AATTTAGTGCAGAAAGAAGAAATTC AATCCTAACTGAGA
CCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCC
TGGACAGAAACAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGA
GAGTTTGGGGAAAAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCA
ATCAACTCTACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCC
TGAACCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACAT
TCACCGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACT
GGCCCCTCAGGCAAACCTGACTGAACTGGATATATATTCA
AGAAGGTTATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAA
GAAATTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATG
ATATGGAGAGCATAACCAGCAGTGACTACATGGAACACAT
ACCTTCGATATATTA CTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTG
CTAATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTG
CTTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTT
CAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGC
TATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGT
TTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTAT
GGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATC
ACAGTGTCGAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTG
TTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGC
AGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATAGCAATT
TTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCA
GTTGTTATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTGCGCA
GTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGTGCCAGTGA
TAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCTCCAAACC

TCACAGCAACTCAAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGT
CCAATTTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTAT
GGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAAC
TCTGTTCCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGG
TTCTTGTACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAA
TAGAAATGATTTTTGTTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTC
ATTTCCATTTTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTT
GGTATTATCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACAT
TGCAGTGGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTT
GATGCGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATG
CCAACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAC
AAGAATGGCCAACCTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATT
CACACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCC
AAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAATACACAGAAG
GTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCTTCTCAATAAG
TCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAACTGGATC
AGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGAGACTACTG
AACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGG
GATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAG
TGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTTAG
AAAAA ACTTGGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGA
AATATGGAAAGTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTG
ATAGAACAGTTTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTTGTGG
ATGGGGGCTGTGTCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGAT
GTGCTTGGCTAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTG
CTGCTTGATGAACCCAGTGCTCATTGGATCCAGTAACAT
ACCAAATAATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTGCTG
ATTGCACAGTAATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAAT
GCTGGAATGCCAACAAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAA
AGTGCGGCAGTACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGA
GAGGAGCCTCTTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGG
GTGAAGCTCTTTCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGT
CTAAGCCCCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAG
AAGAGGTGCAAGATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAA
TGTTGACATGGGACATTTGCTCATGGAATTGG

9	5' AAV ITR	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAG TGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT
10	3' AAV ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGG GCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA
11	5' AAV ITR до 3' ITR	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAG TGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCAGATCTGAATTC GTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATG TCTGGGCATGTCTGGGCATTCTGGGCGTCTGGGCATGTCTG GGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTGACGTGCACGCGT GGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTATATAAGCAGAGCT CGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAGCCCGAGAGACCATG CAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAAAC TTTTTTTCAGCTGGACCAGACCAATTTTGAGGAAAGGATA CAGACAGCGCCTGGAATTGTCAGACATATAACCAAATCCCT TCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATTGGAAA GAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTA AACTCATTAAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTTCTGGAGATTT ATGTTCTATGGAATCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCA AAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTC CTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATT TATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGAC ACTGCTCCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTG GAATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAA GAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATA AGTATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGA ACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGTGTG GATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATC TGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTT CCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGA

ATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGGAAGATC
AGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATCGAGAAC
ATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAATG
GAAAAAATGATTGAAAACCTTAAGACAAACAGAACTGAAA
CTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACTTCAATAGCT
CAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTTTATCT
GTGCTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTCCGGA
AAATATTCACCACCATCTCATTCTGCATTGTTCTGCGCATG
GCGGTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAACATGGT
ATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAAAATACAGGATTTCTT
ACAAAAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACTTAAC
GACTACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTG
GGAGGAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAAACA
AAACAATAACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAG
CCTCTTCTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCT
GAAAGATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTT
GGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTT
CTAATGATGATTATGGGAGAAGCTGGAGCCTTCAGAGGGT
AAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTTCAATTCTGTTCTCAGT
TTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCAT
CTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTC
ATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTT
GCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATC
ACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCA
AGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACT
CTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAAT
ATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAAC
AGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAG
CTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATTT
TTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGAC
TTTAGCTCAAAAACATGGGATGTGATTCTTTTCGACCAAT
TTAGTGCAGAAAGAAGAAATTC AATCCTAACTGAGACCTT
ACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGG
ACAGAAACAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAG
TTTGGGGAAAAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCA

ACTCTACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCCTGAA
CCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTAC
CGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCC
CCTCAGGCAAACCTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAA
GGTTATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAA
TTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATAT
GGAGAGCATACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCT
TCGATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAA
TTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTTCT
TTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAG
ACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATG
CAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTAC
ATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGAT
TCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCACAGT
GTCGAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTC
AAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTG
GGATTCTTAATAGATTCTCCAAGATATAGCAATTTTGGA
TGACCTTCTGCCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGT
TATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGCAGTTTT
ACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGTGCCAGTGATAGTG
GCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCCCTCCAAACCTCACA
GCAACTCAAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAAT
TTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACA
CTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTT
CCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTG
TACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAA
TGATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCA
TTTTAACAAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTA
TCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTG
GGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGA
TCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAG
AAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAACAAGAATG
GCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGT
GAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGAC
TGTCAAAGATCTCACAGCAAATAACACAGAAGGTGGAAA

		<p>TGCCATATTAGAGAACATTTTCCTTCTCAATAAGTCCTGGC CAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAAGTGGATCAGGGAAG AGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGAGACTACTGAACACTGA AGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATA ACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATAACCAC AGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAACTT GGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAA AGTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACA GTTTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGC TGTGTCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGG CTAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGA TGAACCCAGTGCTCATTGATCCAGTAACATAACCAAATA ATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAG TAATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATG CCAACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCA GTACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCT CTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTC TTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCCC AGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGC AAGATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAATGTTGACAT GGGACATTTGCTCATGGAATTGGCAGGCCTAATAAAGAG CTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTA CTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA</p>
12	pAV-F5tg83- hCFTR-dR бектор	<p>TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAG TGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCAGATCTGAATTC GTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATG TCTGGGCATGTCTGGGCATTCTGGGCGTCTGGGCATGTCTG GGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTGACGTGCACGCGT GGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTATATAAGCAGAGCT CGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAGCCCGAGAGACCATG</p>

CAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAAAC
TTTTTTTCAGCTGGACCAGACCAATTTTGAGGAAAGGATA
CAGACAGCGCCTGGAATTGTCAGACATATACCAAATCCCT
TCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATTGGAAA
GAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTA
AACTCATTAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTTCTGGAGATT
ATGTTCTATGGAATCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCA
AAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTC
CTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATT
TATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGAC
ACTGCTCCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTG
GAATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAA
GAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATA
AGTATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGA
ACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGTGTG
GATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATC
TGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTT
CCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGA
ATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGGAAGATC
AGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATCGAGAAC
ATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAATG
GAAAAAATGATTGAAAACCTTAAGACAAACAGAACTGAAA
CTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACTTCAATAGCT
CAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTTTATCT
GTGCTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTCCGGA
AAATATTCACCACCATCTCATTCTGCATTGTTCTGCGCATG
GCGGTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAACATGGT
ATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAATAACAGGATTTCTT
ACAAAAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACTTAAC
GACTACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTG
GGAGGAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAAACA
AAACAATAACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAG
CCTCTTCTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCT
GAAAGATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTT
GGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTT

CTAATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGT
AAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTTCAATTCTGTTCTCAGT
TTTCCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCAT
CTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTC
ATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTT
GCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATC
ACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCA
AGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACT
CTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAAT
ATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAA
AGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAG
CTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATTT
TTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGAC
TTTAGCTCAAACTCATGGGATGTGATTCTTTCGACCAAT
TTAGTGCAGAAAGAAGAAATTC AATCCTAACTGAGACCTT
ACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGG
ACAGAAACAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAG
TTTGGGGAAAAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCA
ACTCTACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCCTGAA
CCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTAC
CGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCC
CCTCAGGCAAACCTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAA
GGTTATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAA
TTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATAT
GGAGAGCATACCAGCAGTACTACATGGAACACATACCT
TCGATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAA
TTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTTCT
TTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAG
ACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATG
CAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTAC
ATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGAT
TCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCACAGT
GTCGAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTC
AAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTG
GGATTCTTAATAGATTCTCCAAGATATAGCAATTTTGGGA

TGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGT
TATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTGCGCAGTTTT
ACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGTGCCAGTGATAGTG
GCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCCCTCCAAACCTCACA
GCAACTCAAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAAT
TTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACA
CTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTT
CCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTG
TACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAA
TGATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCA
TTTTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTA
TCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTG
GGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGA
TCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAG
AAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAACAAGAATG
GCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGT
GAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGAC
TGTCAAAGATCTCACAGCAAATACACAGAAGGTGGAAA
TGCCATATTAGAGAACATTTCCCTTCTCAATAAGTCCTGGC
CAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAAGTGGATCAGGGAAG
AGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTTGAGACTACTGAACACTGA
AGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATA
ACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATAACCAC
AGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAACTT
GGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAA
AGTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACA
GTTTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGC
TGTGTCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGG
CTAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGA
TGAACCCAGTGCTCATTGATCCAGTAACATAACCAAATA
ATTAGAAGAAGTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAG
TAATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATG
CCAACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAAGTGCGGCA
GTACGATTCCATCCAGAAACTGCTGAACGAGAGGAGCCT
CTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTC

TTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCCC
AGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGC
AAGATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAATGTTGACAT
GGGACATTTGCTCATGGAATTGGCAGGCCTAATAAAGAG
CTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTA
CTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC
GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCG
AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCCCCCCCCC
CCCCCCTGCAGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC
GCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGTAGCCTGAATGG
CGAATGGCGCGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTT
GCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCCTCCCTTC
CTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCGCCGTC AAGCTCTAA
ATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACG
GCACCTCGACCCCAAAA AACTTGATTAGGGTGATGGTTCA
CGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTT
TGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTT
CAA ACTGGAACA AACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTT
TTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTA
AAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTA
ACAAAATATTAACGTTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTC
TCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTG
CACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGC
CAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGAC
GGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCG
TCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATA
CGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTC
TTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGA
ACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA
TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAA
TATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTG
TCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTGCTTCCTGTTT

TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTG
AAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGG
ATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGA
AGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA
TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC
AACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGC
ATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATG
AGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCG
GAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG
GGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCT
GAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT
GCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC
GGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG
ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGC
GCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCT
GGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCAC
TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTA
CACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG
ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGG
TAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
ATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAA
GATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGT
GAGTTTTCGTTCCTACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGA
TCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATC
TGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTG
GTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA
AGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTG
TCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA
CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGT
TACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTAC
CGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA
GCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAG
CTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
GCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAG

		AAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAAC AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTG AGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCT ATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTG GCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTT ATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGT GAGCTGATAACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCA GCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC GCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATG CAGCTGGGCTGCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
13	AV.TL65 капсидный белок	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKD DSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYD RQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ AKKRVLEPFGLVEEAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDS KPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLG DNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP YNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSH WSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTI ANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLP QYGYATLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY NFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQ FNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVS AFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMI FNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQM ATNNQSSTTAPTTGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAK IPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDV PVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYN DPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL
14	F5 энхансер	GTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATG TCTGGGCATGTCTGGGCATTCTGGGCGTCTGGGCATGTCTG GGCATGTCTGGGCAT
15	5' AAV ITR (flop)	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC CCGGGCAAAGCCCGGGCGTCTGGGCGACCTTTGGTCGCCC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGC

		CAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT
16	3' AAV ITR (flop)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
17	5' AAV ITR (flop) до 3' AAV ITR (flop)	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC CCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGC CAACTCCATCACTAGGGGTTTCCTCAGATCTGAATTCGTGG TGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTG GGCATGTCGGGCATTCTGGGCGTCTGGGCATGTCTGGGCA TGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTGACGTGCACGCGTGGGC GGAGCCATCACGCAGGTTGCTATATAAGCAGAGCTCGTTT AGTGAACCGTCAGAGTCGAGCCCCGAGAGACCATGCAGAG GTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAACTTTTT TTCAGCTGGACCAGACCAATTTTGAGGAAAGGATACAGA CAGCGCCTGGAATTGTCAGACATATAACCAAATCCCTTCTG TTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATTGGAAAGAGA ATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACT CATTAAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTTCTGGAGATTTATGT TCTATGGAATCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGC AGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCTAT GACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATC TAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACT GCTCCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGA ATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAAGA AGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATAAG TATTGGACAACCTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAAC AAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGTGTGGA TCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATCTG GGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTTCC TGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGAAT GATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGGAAGATCAG TGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATCGAGAACATC CAATCTGTAAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAATGGAA

AAAATGATTGAAAACCTTAAGACAAACAGAACTGAAACTG
ACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACTTCAATAGCTCAG
CCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTTTATCTGTGC
TTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTCCGGAAAAT
ATTCACCACCATCTCATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGG
TCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGA
CTCTCTTGGAGCAATAAACAAAATACAGGATTTCTTACAA
AAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACT
ACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAG
GAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAAACAAAAC
AATAACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCT
TCTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAA
GATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCG
GTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTCTAA
TGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAA
TTAAGCACAGTGGAAGAATTTCACTTCTGTTCTCAGTTTTCC
TGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTG
GTGTTTCCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAA
AGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGA
GAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACT
GAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGAGC
AGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACTCTCCTT
TTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAATATTTGA
AAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAACCTAGGATT
TTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAGCTGACA
AAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATTTTTATGG
GACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGC
TCAAAACTCATGGGATGTGATTCTTTTCGACCAATTTAGTG
CAGAAAGAAGAAATTCAATCCTAACTGAGACCTTACACC
GTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGA
AACAAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGG
GGAAAAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCT
ACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCTCCTGAACCTG
ATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGA
AAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCT

CAGGCAAACCTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGT
TATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTA
ACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATATGGA
GAGCATAACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTTCG
ATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAATTT
GGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTTCTTTG
GTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAGACA
AAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATGCAG
TGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTACATT
TACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGATTCT
TCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCACAGTGTC
GAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTCAA
GCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTGGG
ATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATAGCAATTTTGGATG
ACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTA
TTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGCAGTTTTAC
AACCTACATCTTTGTTGCAACAGTGCCAGTGATAGTGGC
TTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCTCCAAACCTCACAGC
AACTCAAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTT
CACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTT
CGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCC
ACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTA
CCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATG
ATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATT
TTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATC
CTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTGGG
CTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGATC
TGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAGAA
GGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAACAAGAATGGC
CAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGTGA
AGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTG
TCAAAGATCTCACAGCAAATAACACAGAAGGTGGAAATG
CCATATTAGAGAACATTTCTTCTCAATAAGTCCTGGCCA
GAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAAGTGGATCAGGGAAGAG
TACTTTGTTATCAGCTTTTTTTGAGACTACTGAACACTGAAG

		<p>GAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATAAC TTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATACCACA GAAAGTATTTATTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAACTTG GATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAAA GTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGT TTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGCTG TGTCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCT AGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGATG AACCCAGTGCTCATTGGATCCAGTAACATACCAAATAAT TAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTA ATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCC ACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCAGT ACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCTT CCGGCAAGCCATCAGCCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTCTTT CCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCCCAG ATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAA GATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAATGTTGACATGG GACATTTGCTCATGGAATTGGCAGGCCTAATAAAGAGCTC AGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTA GAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG CCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC</p>
18	pAV-F5tg83-hCFTR-dR (flopp ITR) вектор	<p>CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC CCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGC CAACTCCATCACTAGGGGTTTCCTCAGATCTGAATTCGTGG TGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTG GGCATGTCCGGCATTTCTGGGCGTCTGGGCATGTCTGGGCA TGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTGACGTGCACGCGTGGGC GGAGCCATCACGCAGGTTGCTATATAAGCAGAGCTCGTTT AGTGAACCGTCAGAGTCGAGCCCGAGAGACCATGCAGAG GTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAACTTTTT TTCAGCTGGACCAGACCAATTTGAGGAAAGGATACAGA CAGCGCCTGGAATTGTCAGACATATAACCAAATCCCTTCTG</p>

TTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATTGGAAAGAGA
ATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACT
CATTAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGT
TCTATGGAATCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGC
AGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCTAT
GACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATC
TAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACT
GCTCCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGA
ATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAAGA
AGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATAAG
TATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAAC
AAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGTGTGGA
TCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATCTG
GGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTTCC
TGATAGTCCTTGCCCTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGAAT
GATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGGAAGATCAG
TGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATCGAGAACATC
CAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAATGGAA
AAAATGATTGAAAACCTTAAGACAAACAGAACTGAAACTG
ACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACTTCAATAGCTCAG
CCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTTTATCTGTGC
TTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTCCGGAAAAT
ATTCACCACCATCTCATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGG
TCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGA
CTCTCTTGGAGCAATAAACAATAACAGGATTTCTTACAA
AAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACT
ACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAG
GAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAAACAAAAC
AATAACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCT
TCTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAA
GATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCG
GTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTCTAA
TGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAA
TTAAGCACAGTGGAAGAATTCATTCTGTTCTCAGTTTTCC
TGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTG

GTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAA
AGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGA
GAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACT
GAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGAGC
AGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACTCTCCTT
TTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAATATTTGA
AAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAAGTAGGATT
TTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAGCTGACA
AAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATTTTTATGG
GACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGC
TCAAAACTCATGGGATGTGATTCTTTTCGACCAATTTAGTG
CAGAAAGAAGAAATTCAATCCTAACTGAGACCTTACACC
GTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGA
AACAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGG
GGAAAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCT
ACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCCTGAACCTG
ATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGA
AAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCT
CAGGCAAACCTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGT
TATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTA
ACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATATGGA
GAGCATAACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTTCG
ATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAATTT
GGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTTCTTTG
GTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAGACA
AAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATGCAG
TGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTACATT
TACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGATTCT
TCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCACAGTGTC
GAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTCAA
GCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTGGG
ATTCTTAATAGATTCTCAAAGATATAGCAATTTTGGATG
ACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTA
TTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGCAGTTTTAC
AACCTACATCTTTGTTGCAACAGTGCCAGTGATAGTGGC

TTTTATTATGTTGAGAGCATATTCCTCCAAACCTCACAGC
AACTCAAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTT
CACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTT
CGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCC
ACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTA
CCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATG
ATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATT
TTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATC
CTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTGGG
CTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGATC
TGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAGAA
GGTAAACCTACCAAGTCAACCAACCATAACAAGAATGGC
CAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGTGA
AGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTG
TCAAAGATCTCACAGCAAATACACAGAAGGTGGAAATG
CCATATTAGAGAACATTTCTTCTCAATAAGTCCTGGCCA
GAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAACTGGATCAGGGAAGAG
TACTTTGTTATCAGCTTTTTTTGAGACTACTGAACACTGAAG
GAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATAAC
TTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATACCACA
GAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAACTTG
GATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAAA
GTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGT
TTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGCTG
TGTCCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCT
AGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGATG
AACCCAGTGCTCATTGGATCCAGTAACATACCAAATAAT
TAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTA
ATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCC
ACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCAGT
ACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCTT
CCGGCAAGCCATCAGCCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTCTTT
CCCCACCGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCCCAG
ATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAA
GATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAATGTTGACATGG

GACATTTGCTCATGGAATTGGCAGGCCTAATAAAGAGCTC
AGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTACT
GAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG
CCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGA
GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCCCCCCCCCCCCCCC
CCCTGCAGCCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGG
ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGG
TGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCT
AGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCA
CGTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCT
CCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACC
CCAAAAA ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCC
ATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAG
TCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAA
CAACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAA
GGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGC
TGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATATT
AACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCA
TCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGC ACTCTCAGT
ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGAC
ACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCT
GCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCC
GGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGA
AACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTT
ATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCA
GGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT
GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATG
AGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAA
GGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTAT
TCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCCTGTTTTTGCTCACCC
AGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTT
GGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAG
CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTT

CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGG
TATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCG
CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA
CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTA
AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAC
ACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGA
AGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGT
AACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC
ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCA
ATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTAC
TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGA
GGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTT
CCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGA
TGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGG
AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAG
ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCT
CATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG
ATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTT
CCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATC
TTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC
AAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCC
GGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGC
TTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGT
AGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCACC
GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCT
GCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACT
CAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCT
GAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAA
CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTG
AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG
GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCAC
GAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT
CCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTT

	<p>GTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC CTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCT GTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCG CTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGA GCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTC TCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGGCTGCAGGG GGGGGGGGGGGGGGGG</p>
--	---

Пример 2: Повторное дозирование AV.TL65 в легкие хорька вызывает ответ антител, который снижает трансдукцию в зависимости от возраста

Повторное введение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) может потребоваться для лечения муковисцидоза (CF) легких с использованием генной терапии. Однако мало что известно об иммунных ответах легких, опосредованных rAAV. Здесь мы демонстрируем, что хорек является подходящим видом для доклинического тестирования AV.TL65 на доставку CFTR в легкие и характеристики ответов нейтрализующих антител (NAb). AV.TL65-hCFTRΔR эффективно трансдуцируется культурами эпителия дыхательных путей как человека, так и хорька, и комплементирует CFTR Cl⁻ токи в культурах дыхательных путей при CF. Доставка AV.TL65-hCFTRΔR в легкие новорожденного и молодого хорька дает hCFTR иPHK на уровнях в 200-300% больше, чем эндогенный fCFTR. Одна доза (AV.TL65-Gluc) или повторное дозирование (AV.TL65-fCFTRΔR, затем AV.TL65-Gluc) AV.TL65 проводят новорожденным и молодым хорькам. Повторное введение значительно снижает экспрессию трансгена (в 11 раз) и увеличивает количество NAb в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) у молодых, но не у новорожденных хорьков, несмотря на почти равные ответы NAb в плазме в обеих возрастных группах. Примечательно, что обе возрастные группы продемонстрировали снижение в BALF анти-капсидного связывания антител IgG, IgM и IgA после повторного дозирования. Уникальным для молодых хорьков было подавление анти-капсидного связывания IgM в плазме после введения второго вектора. Таким образом, зависящее от возраста созревание иммунной системы и переключение изотипа могут влиять на развитие высокоаффинных легочных NAb после повторного введения дозы AV.TL65 и могут давать путь для подавления нейтрализующих ответов AAV в легких.

Приведенные выше результаты объясняются более подробно ниже.

Полученные результаты

Хорек является подходящим доклиническим видом для оценки генной терапии легких с применением AV.TL65.

Чтобы оценить, способен ли вариант капсида AV.TL65 (AV2.5T) дополнять функцию CFTR в дыхательных путях, тестируют способность вируса AV.TL65-SP183-hCFTRΔR корректировать CFTR-опосредованный ток Cl⁻ в культурах CF ALI человека после апикальной инфекции. Поскольку ранее было показано, что rAAV1 является одним

из наиболее эффективных серотипов для апикальной трансдукции культур ALI человека, также псевдопакетируют тот же вирусный геном AV2-F5tg83-hCFTRΔR в капсид AAV1 и проводят сравнительный анализ с AV.TL65. Это сравнение демонстрирует, что апикальная инфекция вирусом AV.TL65-SP183-hCFTRΔR вызывает более высокие уровни CFTR-опосредованного тока Cl⁻ (фиг. 3A) и иРНК CFTR (фиг. 3B), чем после инфицирования вирусом rAAV1, несущим тот же геном (AV1.SP183-hCFTRΔR).

Для оценки способности AV.TL65 также трансдуцировать эпителий дыхательных путей хорька, сначала проводят анализы трансдукции *in vitro* в хорошо дифференцированных культурах трахеобронхиальных ALI, полученных от людей и хорьков, с использованием репортерного вектора секретированной *gaussia* люциферазы (gLuc), AV.TL65-SP183gLuc. (Фиг. 3C). Апикальное инфицирование этих культур AV.TL65-SP183gLuc не демонстрирует значительных отличий в уровнях экспрессии трансгена gLuc между двумя видами. Для подтверждения тропизма AV.TL65 для легких хорьков *in vivo*, оценивают эффективность трансдукции AV.TL65-SP183-hCFTRΔR у новорожденных и молодых хорьков после интратрахеальной доставки. В этих исследованиях, экспрессия иРНК hCFTRΔR, полученной из трансгена, относят к иРНК эндогенного fCFTR в качестве показателя (т.е. отношения копий иРНК hCFTRΔR/fCFTR) эффективности трансдукции. Используя этот показатель, экспрессия иРНК hCFTRΔR в легких в 2-3 раза выше, чем иРНК эндогенного fCFTR как у новорожденных, так и у молодых хорьков (фиг. 3D). Наоборот, экспрессия иРНК hCFTRΔR в трахее ниже, чем иРНК эндогенного fCFTR у новорожденных и почти эквивалентна у молодых животных. Низкая неонатальная и высоко вариабельная ювенильная трансдукция трахеи с помощью AV.TL65 потенциально связана со способом доставки, который использует хирургическое вмешательство для введения вируса в середину трахеи. В целом, эти исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что хорьки являются подходящим видом для изучения иммунологических ответов легких на инфекцию AV.TL65.

Предыдущее воздействие AV.TL65 на легкие молодых, но не новорожденных, хорьков нарушает трансдукцию при повторном введении.

Используют два вектора rAAV (AV.TL65-SP183-fCFTRΔR и AV.TL65-SP183-gLuc) для оценки возможности повторного введения AV.TL65 в легкое хорька. AV.TL65-SP183-fCFTRΔR выбирают для первой вирусной инфекции, поскольку этот вектор не должен вызывать иммунный ответ на трансген (т.е. CFTR хорька или fCFTR). Для второй вирусной инфекции, необходим надежный репортер, который позволил бы проводить временной и количественный анализ экспрессии трансгена, и поэтому выбирают секретированный репортерный вектор gLuc, AV.TL65-SP183-gLuc. Хорьков в группах с однократной дозой инфицируют только вектором AV.TL65-SP183-gLuc, а в группе с повторной дозой сначала инфицируют AV.TL65-SP183-fCFTRΔR, а затем AV.TL65-SP183-gLuc. Сначала оценивают повторное дозирование у более молодых животных (фиг. 9). Эти исследования начинают на новорожденных хорьках, инфицируя группу повторной дозы в возрасте 1 недели AV.TL65-SP183-fCFTRΔR, а затем через три недели инфицируя

группы повторной и однократной (наивной) дозы вирусом AV.TL65-SP183-gLuc (фиг. 4А). Активность люциферазы контролируют в образцах крови в течение 14 дней после инфицирования AV.TL65-SP183-gLuc и в BALF по окончании эксперимента. Результаты этого исследования показали, что активность gLuc в плазме достигает пика через 5 дней после инфицирования и остается стабильной до 14 дней в обеих группах дозирования (фиг. 4В). Также нет значительной разницы в уровне активности gLuc в плазме между двумя группами дозирования. Аналогичным образом, активность gLuc в BALF через 14 дней после инфицирования также существенно не различается между двумя группами дозирования (фиг. 4С). Как в плазме, так и в BALF активность gLuc значительно выше фоновых уровней в наивных (неинфицированных) контролях (фиг. 4В и 4С).

Это исследование на новорожденных хорьках демонстрирует возможность повторного введения AV.TL65 без значительного снижения трансдукции в легкие; однако остается возможность, что недоразвитая иммунная система новорожденных хорьков может вызвать толеризованное иммунологическое состояние против капсида AAV. По этим причинам, повторяют эксперименты на молодых хорьках, иницируя первую инфекцию AV.TL65-SP183-fCFTRΔR для группы повторной дозы в возрасте 1 месяца, что приблизительно соответствует 1-2-летнему ребенку, с последующей доставкой репортерного вектора gLuc (AV.TL65-SP183-gLuc) в группы как однократной, так и многократной дозы через 4 недели (фиг. 5А). Результаты этого второго исследования демонстрируют максимальную активность gLuc в плазме через 5 дней после инфицирования в обеих группах, однако группа с повторной дозой имеет более низкую (от 15 до 34 раз) активность gLuc в плазме во всех тестируемых временных точках. В отличие от стабильной экспрессии gLuc в плазме в группах новорожденных с однократной и многократной дозой (фиг. 4В), наблюдают постепенное снижение активности gLuc в плазме в обеих группах молодых особей с более резкой тенденцией у животных, получавших повторные дозы. (Фиг. 5В). Аналогичным образом, активность gLuc в BALF была также значительно ниже (в 11 раз) в группе молодых особей, получавших повторную дозу (фиг. 5С). В совокупности эти исследования показали возможность ответа NAb против капсида AAV у молодых, но не у новорожденных хорьков.

Повторное введение AV.TL65 вызывает более высокий ответ NAb в BALF и плазме.

Учитывая сниженную эффективность трансдукции AV.TL65 в легких молодых хорьков, ранее подвергавшихся воздействию этого вируса, была сделана попытка оценить NAb в BALF и плазме тестируемых животных. Титры анти-AV.TL65 NAb определяют как IC₅₀ для ингибирования трансдукции AV.TL65-SP183-fLuc в клетках A594, клеточной линии дыхательных путей человека. Согласно с аналогичными уровнями экспрессии трансгена у новорожденных хорьков с однократным и многократным введением доз, титры NAb в BALF существенно не различаются для двух условий дозирования (фиг. 6А). Напротив, титры NAb в BALF молодых хорьков значительно выше при повторной дозе по

сравнению с группой, получавшей однократную дозу (фиг. 6B). Более того, абсолютные титры NAb в экспериментах с более старыми животными в группах как однократной, так и повторной дозы выше (в 3-5 раз), чем в новорожденных тестируемых группах, что свидетельствует о более развитом иммунном ответе у более старших хорьков.

Аналогичные анализы образцов плазмы показывают отсутствие ранее существовавших NAb в контрольной группе, ранее не получавшей лечения (фиг. 6C и 6D), и в тестируемых группах до заражения AV.TL65. В обеих возрастных группах животные, получавшие однократную и повторную дозу, демонстрируют постепенное времязависимое увеличение титров NAb в плазме после заражения, и молодые хорьки, получавшие повторную дозу, вырабатывают несколько более высокие титры NAb в плазме (в 2-2,8 раза), чем новорожденные хорьки. Молодые хорьки также быстрее вырабатывают NAb в плазме после однократного инфицирования с появлением через 5 дней после заражения по сравнению с 10 днями у новорожденных хорьков. Уровень NAb в плазме в группе повторной дозы также значительно выше, чем в группах однократной дозы для обоих возрастов, за исключением 14-дневной временной точки после заражения у молодых хорьков.

Разработка анализа на основе ELISA для количественного определения изотипов анти-AV.TL65капсидных антител

Выведенный из библиотеки капсидного шаффлинга AAV2/AAV5, VP2 и наиболее распространенные VP3 капсидные белки AV.TL65 получают из AAV5 с единственной мутацией A581T в VP1. VP1 AV.TL65 является гибридом капсидов AAV2 и AAV5 с N-концевой уникальной последовательностью (VP1u) из 1-131 аминокислотных остатков VP1 AAV2, следующих за 128-724 аминокислотными остатками капсида AAV5, несущего мутацию A581T. VP1u AAV содержит каталитический домен фосфолипазы A2 (PLA2), который, как полагают, имеет решающее значение для выхода вириона из эндосомы. Для оценки капсид-специфических иммуноглобулинов AV.TL65 в плазме и BALF (IgG, IgM и IgA) хорьков, инфицированных AV.TL65, разработан анализ ELISA с использованием вирусных частиц AAV в качестве покрывающего антигена. Для проверки способа используют плазму, собранную у 1-месячного хорька, у которого вирус AV.TL65 доставлен в легкие четыре раза с интервалом 1-2 месяца. При использовании частиц AAV5 в качестве покрывающего антигена, дифференциальное связывание IgG между наивной плазмой и плазмой с иммунитетом к AV.TL65 наблюдается, начиная с разведения 1:50, и при разведении 1:1250 связывание наивной плазмы отсутствует, в то время как плазма с иммунитетом к AV.TL65 остается высоким (фиг. 7A). Наоборот, когда AAV2 используют в качестве покрывающих антигенов, различия в связывании IgG в плазме между иммунной плазмой и исходной плазмой нет при всех разведениях, и чувствительность определения IgG намного ниже, чем AAV5 (фиг. 7B). Эти данные свидетельствуют о том, что поверхностные антигенные эпитопы AV.TL65 демонстрируют иммуногенность, аналогичную капсиду AAV5, и по этим причинам решено использовать AAV5 в качестве покрывающего антигена для классификации изотипов антикапсидных

антител в BALF и плазме тестируемых животных.

Затем этот способ ELISA используют для классификации изотипов антикапсидных антител (IgG, IgM и IgA) в BALF и плазме тестируемых животных (фиг. 7 и 8). В целом, новорожденные и молодые хорьки вызывают аналогичные AAV5-реактивные ответы IgG в плазме как в группах однократного, так и при повторного введения, но титры выше после повторного инфицирования (фиг. 8A и 8D). Наоборот, ответы IgM (фиг. 8B и 8E) и IgA (фиг. 8C и 8F) в плазме AAV5-реактивного типа показывают отличия от ответа IgG в зависимости от возраста животного и схемы дозирования. Например, уровни связывающегося с капсидом IgM в плазме подавляются только у молодых животных из группы, получавшей повторную дозу (фиг. 8B и 8E), тогда как уровни связывающегося с капсидом IgA подавлялись в обеих возрастных группах после повторного введения. Кроме того, новорожденные животные первоначально вырабатывают значительный антикапсидный ответ IgA после второго воздействия вируса, который со временем уменьшается, в то время как у молодых животных этот ответ отсутствует (фиг. 8C и 8F). Эти открытия предполагают, что зависимые от возраста различия в переключении изотипов антител могут зависеть от предшествующего воздействия AV.TL65. Вопреки ожиданиям, AAV5-реактивные IgG, IgM и IgA в BALF были значительно выше в группе однократной дозы по сравнению с группой повторной дозы как для новорожденных, так и для молодых животных (фиг. 9). Кроме того, абсолютный уровень капсид-связывающих IgG, IgM и IgA в целом был одинаковым для обеих возрастных групп и условий дозирования, несмотря на более высокие уровни NAb в BALF молодых животных, которые дважды подвергались воздействию вируса (фиг. 6A и 6B).

Материалы и методы

Получение рекомбинантных вирусных векторов AV.TL65

pAV.TL65repсар (Excoffon et al., 2009, *выше*) является хелперную плазмиду AAV, используемую для генерации капсида AV.TL65 для продуцирования AV1-SP183-hCFTRΔR и AV.TL65-SP183-hCFTRΔR, AV.TL65-SP183-fCFTRΔR, AV.TL65-SP183-fLuc, AV.TL65-SP183-gLuc. Провирусные плазмиды rAAV, используемые для упаковки, представляют собой pAV2.F5tg83-hCFTRΔR и pAV2.F5tg83-fCFTRΔR, а также pAV2-F5tg83fLuc (репортер люциферазы светляка) и pAV2-F5tg83gLuc (репортер люциферазы *gaussia*). Векторы AV.TL65 продуцируют в Vector Core of Children's Hospital of Philadelphia (CHOP) с использованием способа трансфекции тройной плазмидой. Коротко, AAV помощник pAV.TL65repсар и pAd помощник аденовируса трансфицируют в клетки HEK293 вместе с одним из провирусных векторов AAV. Вектор rAAV, полученный из трансфицированных клеток HEK293, очищают в градиентах плотности CsCl. Титры определяют количественной полимеразной цепной реакцией в реальном времени (qPCR) с использованием праймеров и зондов, специфичных для трансгенов, и чистоту исходных векторов оценивают с помощью SDS-PAGE после окрашивания серебром.

Оценка in vitro вектора AV.TL65 в эпителии дыхательных путей человека и хорька

Чтобы оценить, будет ли хорек подходящим видом для анализа AV.TL65,

первоначально проводят эксперименты по трансдукции *in vitro* на хорошо дифференцированных культурах трахеобронхиального ALI, полученных от людей и хорьков. Репортерный вектор, AV.TL65-SP183gLuc, инокулируют апикально на культуры ALI эпителия дыхательных путей человека (n=6 трансвелов от двух доноров) и хорька (n=6 трансвелов от двух доноров) при MOI (множественности инфекции) 10000 DRP (резистентных к ДНКазам частиц)/клетку. Во время периода инфицирования в культуральную среду добавляют доксорубин в конечной концентрации 4 мкМ, и относительные единицы люминесценции (RLU) активности люциферазы *gaussia* измеряют после 5-дневного заражения в соответствии с инструкциями производителя для набора Renilla Luciferase activity assay kit (Promega), который разработан для измерения люциферазы *Gaussia* и люциферазы *Renilla*. Два не инфицированных трансвела выбирают в качестве контроля.

Сравнение in vitro токов, опосредованных CFTR, после инфицирования эпителия дыхательных путей человека с CF вирусами AV1-SP183-hCFTRΔR и AV.TL65-SP183-hCFTRΔR

Эффективность AV.TL65-SP183-hCFTRΔR и AV1-SP183-hCFTRΔR по экспрессии hCFTRΔR и комплементации функции CFTR оценивают на поляризованных культурах ALI человека, полученных из проксимальных дыхательных путей пациентов с CF (F508del/F508del). Каждый вектор апикально применяют к культурам ALI (n=4 трансвелов от двух доноров) при MOI 100000 DRP/клетку в присутствии доксорубина (2,5 мкМ) и LLnL (20 мкМ). Показано, что эти два агента, модулирующие протеасомы, усиливают трансдукцию несколькими серотипами AAV. На 12-день после инфекции, CFTR-опосредованные Cl⁻ токи измеряют в камерах Уссинга, как описано выше, чтобы определить изменение тока короткого замыкания (ΔI_{sc}) после стимуляции сAMP (IBMX/форсколин) и CFTR ингибирования (GlyH101). Не инфицированные культуры ALI (n=4 трансвелов от двух доноров) используют в качестве базового контроля. После измерения ΔI_{sc} , две вставки из каждой группы вирусной инфекции объединяют и лизируют для тотальной РНК с использованием набора RNeasy® Plus Mini kit (Qiagene). После преобразования иРНК в кДНК полученную из вектора иРНК hCFTRΔR количественно оценивают с помощью TaqMan® PCR и нормализуют по иРНК GAPDH человека.

Анализ трансдукции AV.TL65 в легких новорожденных и молодых хорьков

Трехдневным новорожденным хорькам (n=3) или месячным молодым хорькам (n=3) интратрахеально вводят 4×10^{10} DRP на грамм массы тела смешанного вируса AV.TL65-SP183-hCFTRΔR с доксорубином (конечная концентрация 250 мкМ). Хорькам в группе имитации инфекции (n=3) прививают только Dox в PBS (250 мкМ). Через 11 дней после инфицирования животных умерщвляют, ткани трахеи и легких собирают отдельно, быстро замораживают и измельчают в порошок для экстракции общей РНК. Полученную из вектора иРНК трансгена hCFTRΔR и эндогенного fCFTR количественно определяют с помощью TaqMan®, и число копий hCFTRΔR и fCFTRΔR нормализуют до GAPDH, и

затем выражают как отношение hCFTRΔR/fCFTR.

Введение AV.TL65-SP183-fCFTRΔR и/или AV.TL65-SP183-gLuc хорькам для изучения гуморального ответа

Оценивают повторное введение векторов AV.TL65 новорожденным и молодым хорькам, используя следующий дизайн эксперимента. Новорожденные хорьки: репортерный вектор AV.TL65-SP183-gLuc вводят интратрахеально 4-недельным хорькам, которые являются либо наивными к капсиду AV.TL65, либо ранее инфицированы AV.TL65-SP183-fCFTRΔR в возрасте 1 недели. Молодые хорьки: репортерный вектор AV.TL65-SP183-gLuc вводят интратрахеально 8-недельным хорькам, которые являются либо наивными к капсиду AV.TL65, либо ранее инфицированы AV.TL65-SP183-fCFTRΔR в возрасте 4 недель. Для каждой дозы, животное получает инокулят, содержащий вектор AV.TL65-SP183gLuc или AV.TL65-SP183-fCFTRΔR (1×10^{13} DRP/кг) и доксорубин (конечная концентрация 200 мкМ). Хирургическую интратрахеальную инъекцию делают новорожденным хорькам в возрасте 1 недели с введением 150 мкл инокулята в наборы под анестезией смесью изофлуорана и кислорода. Для других возрастов, вирус вводят интратрахеально с помощью аэрозольного распылителя MicroSprayer® под анестезией путем подкожной инъекции смеси кетамина и ксилазина. Объем инокулята вектор/доксорубин для аэрозолизации нормализуют по массе тела хорька (5 мл/кг).

Сбор крови и жидкости бронхоальвеолярного лаважа для измерения активности люциферазы Gaussia

Плазму собирают в гепаринизированные пробирки от анестезированных хорьков через 0, 5, 10 и 14 дней после доставки репортерного вектора AV.TL65-SP183-gLuc. Животных умерщвляют EUTHASOL® (Virbac AN Inc) и собирают жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BALF) из кассеты трахеи/легких путем закапывания 5 мл PBS на 300 грамм веса тела. Активность gLuc в плазме и BALF измеряют сразу после сбора образца.

Анализы нейтрализации антител с использованием плазмы и BALF

Анализы микронеutralизации проводят с использованием модификаций ранее описанного способа (Wu et al. Front Immunol. 8:1649, 2017). Титр NAb в плазме и BALF количественно определяют как снижение экспрессии репортерного гена после инфицирования клеток A549 вирусом AV.TL65-SP183-fLuc, инкубированных с серийно разведенной плазмой или BALF перед инфицированием. Коротко, все образцы плазмы хорьков инактивируют нагреванием (56°C, 30 мин). Пятикратные серийные разведения плазмы (начиная с 1:50 и заканчивая 1:156250) инкубируют с AV.TL65-SP183-fLuc в общем объеме 100 мкл. Для BALF применяют те же условия, но серийное разведение начинается с 1:5 и заканчивается 1:3125. Эти смеси инкубируют при 37°C в течение 1 часа для облегчения связывания и нейтрализации антител, а затем наносят на монослой клеток A549 в 48-луночных планшетах (1×10^5 /лунку, MOI=5000 DRP/клетку) в двух экземплярах для каждого разведения. После инкубации клеток в течение 1 часа при 37°C/5% CO₂ с вирусной смесью, в лунки добавляют DMEM, содержащую 2% фетальную бычью

сыворотку, и инкубируют в течение дополнительных 24 часов. Затем измеряют активность люциферазы светляка в клеточных лизатах с помощью набора Firefly Luciferase Assay Kit (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Каждый раз при проведении этого анализа, клетки A549, инфицированные только AV.TL65-SP183-fLuc, служат эталонным контролем 100% трансдукции. Титр нейтрализации каждой пробы плазмы или BALF рассчитывают как половину максимальной ингибирующей концентрации (IC50).

ELISA измерения капсид-связывающих IgG, IgM и IgA в плазме и BALF

Процедуру ELISA используют для улавливания и количественного определения общих капсид-связывающих IgG, IgM и IgA в плазме и BALF. Коротко, rAAV5 в карбонатном буфере связывают с 96-луночными планшетами для ELISA в течение ночи при 4°C (1×10^9 DRP/лунку). Тестируемые образцы плазмы (разведенные до 1:2000 для IgG и IgM и 1:20 для IgA) и не разбавленные образцы BALF наносят в каждую лунку и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки в PBS-T (0,05% Tween-20), добавляют разведенные HRP-конъюгированные вторые антитела и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре. Вторые антитела, конъюгированные с HRP, включают анти-хорьковый IgG курицы (Gallus Immunotech или Abscam) и анти-хорьковый IgM или IgA козы (Life-Bio Inc). Затем продукт реакции HRP определяют количественно по оптической плотности на планшетном ридере.

Статистический анализ

Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения \pm CO, и для анализа данных используют Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Статистическую значимость анализируют с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки (*P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001, ****P <0,0001).

Заявление об этических принципах при уходе за животными

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с протоколами, утвержденными Institutional Animal Care and Use Committees of the University of Iowa.

Все публикации, патенты и заявки на патенты включены в настоящее описание посредством ссылки. Хотя в вышеприведенном описании это изобретение было описано в отношении некоторых предпочтительных вариантов его осуществления, и многие детали были изложены в целях иллюстрации, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты осуществления и что некоторые детали в настоящем изобретении могут быть значительно изменены без отступления от основных принципов изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ экспрессии трансгена в клетке, включающий контакт клетки с (i) рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (rAAV), содержащим капсидный белок AV.TL65 или его вариант, и полинуклеотид, содержащий трансген; и (ii) усилителем трансдукции AAV, тем самым экспрессируя трансген в клетке.
2. Способ по п.1, в котором усилителем является агент, модулирующий протеасомы.
3. Способ по п.2, в котором агентом, модулирующим протеасомы, является антрациклин, ингибитор протеасом, трипептидилальдегид или их комбинация.
4. Способ по п.3, в котором антрациклин включает доксорубицин, идарубицин, акларубицин, даунорубицин, эпирубицин, валрубицин, митоксантрон или их комбинацию.
5. Способ по п.4, в котором антрациклином является доксорубицин, идарубицин или их комбинация.
6. Способ по п.3, в котором ингибитор протеасом включает бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб.
7. Способ по п.3, в котором трипептидилальдегидом является N-ацетил-1-лейцил-1-лейцил-1-норлейцин (LLnL).
8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором клетка контактирует последовательно с rAAV и усилителем.
9. Способ по любому из пп. 1-7, в котором клетка контактирует одновременно с rAAV и усилителем.
10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором контакт клетки с rAAV и усилителем приводит к увеличению экспрессии трансгена по сравнению с контактом клетки только с rAAV.
11. Способ по п.10, в котором увеличение экспрессии составляет приблизительно 100%, приблизительно 200%, приблизительно 300%, приблизительно 400%, приблизительно 500%, приблизительно 600% или больше.
12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором контакт включает введение субъекту rAAV и усилителя.
13. Способ лечения нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту (i) рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего капсидный белок AV.TL65 и полинуклеотид, содержащий терапевтический трансген; и (ii) усилителя трансдукции AAV, где введение приводит к экспрессии трансгена в клетках субъекта.
14. Способ по п.12 или 13, в котором введение осуществляют путем ингаляции, распыления, аэролизации, интраназально, интратрахеально, внутрибронхиально, перорально, внутривенно, подкожно и/или внутримышечно.
15. Способ по п.14, в котором введение осуществляют путем ингаляции, распыления, аэролизации, интраназально, интратрахеально и/или внутрибронхиально.
16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором клеткой является эпителиальная

клетка дыхательных путей.

17. Способ по п.16, в котором эпителиальной клеткой дыхательных путей является эпителиальная клетка легкого.

18. Способ по любому из пп. 13-17, в котором нарушением является муковисцидоз.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором трансгеном является CFTR или его производное.

20. Способ по п.19, в котором производным CFTR является трансген CFTR Δ R.

21. Способ по любому из пп. 1-20, в котором капсидный белок AV.TL65 содержит аминокислотную последовательность

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYL
GPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSEF
GGNLGRAVFQAKKRVLPEFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPRKRRKARTEEDSKPSTSSDA
EAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTW
MGDRVVTKSTRTWLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSH
WSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQ
LPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGN
NFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYAN
TYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNL
QGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNN
QSSTTAPTGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHP
PPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTN
YNDPQFVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:13).

22. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) rAAV, содержащий капсидный белок AV.TL65, и полинуклеотид, содержащий трансген; и (ii) усилитель трансдукции AAV.

23. Фармацевтическая композиция по п.22, в которой усилителем является агент, модулирующий протеасомы.

24. Фармацевтическая композиция по п.23, в которой агентом, модулирующим протеасомы, является антрациклин, ингибитор протеасом, трипептидилальдегид или их комбинация.

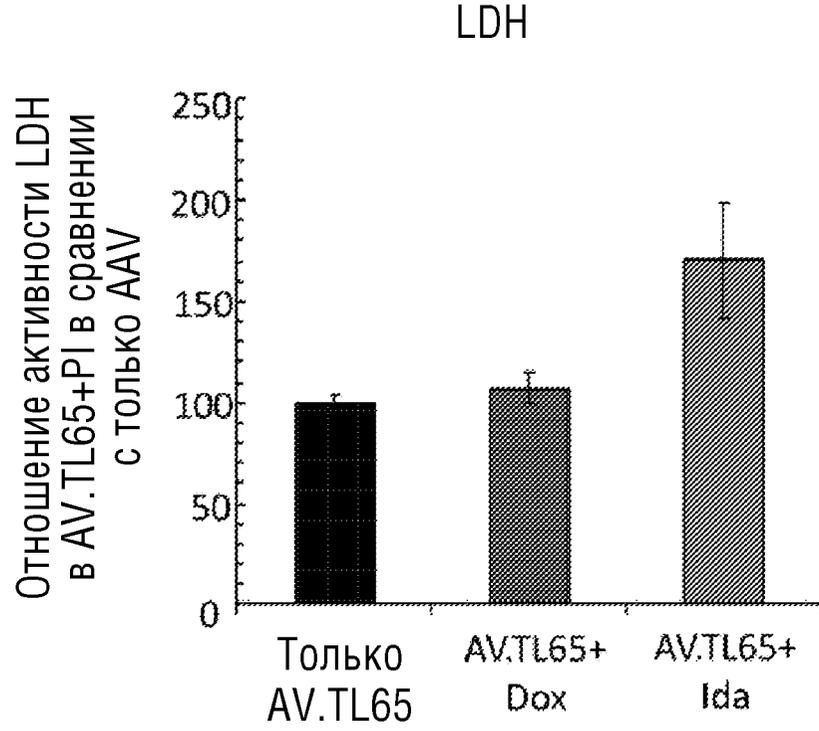
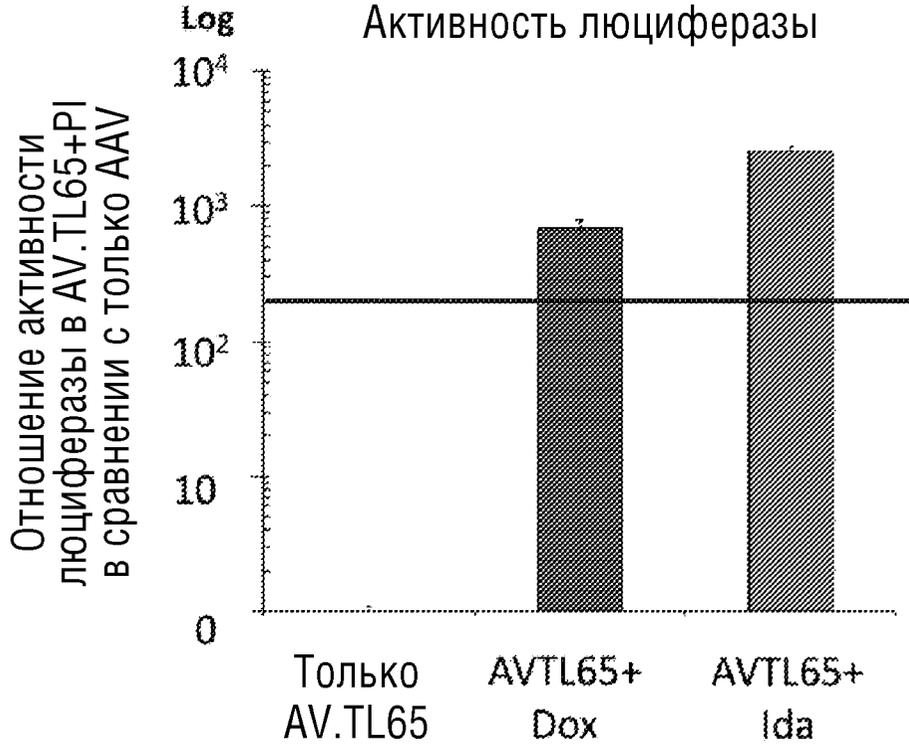
25. Фармацевтическая композиция по п.24, в которой антрациклин включает доксорубин, идарубин, акларубин, даунорубин, эпирубин, валрубин, митоксантрон или их комбинацию.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, в которой антрациклином является доксорубин, идарубин или их комбинация.

27. Фармацевтическая композиция по п.24, в которой ингибитор протеасом включает бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб.

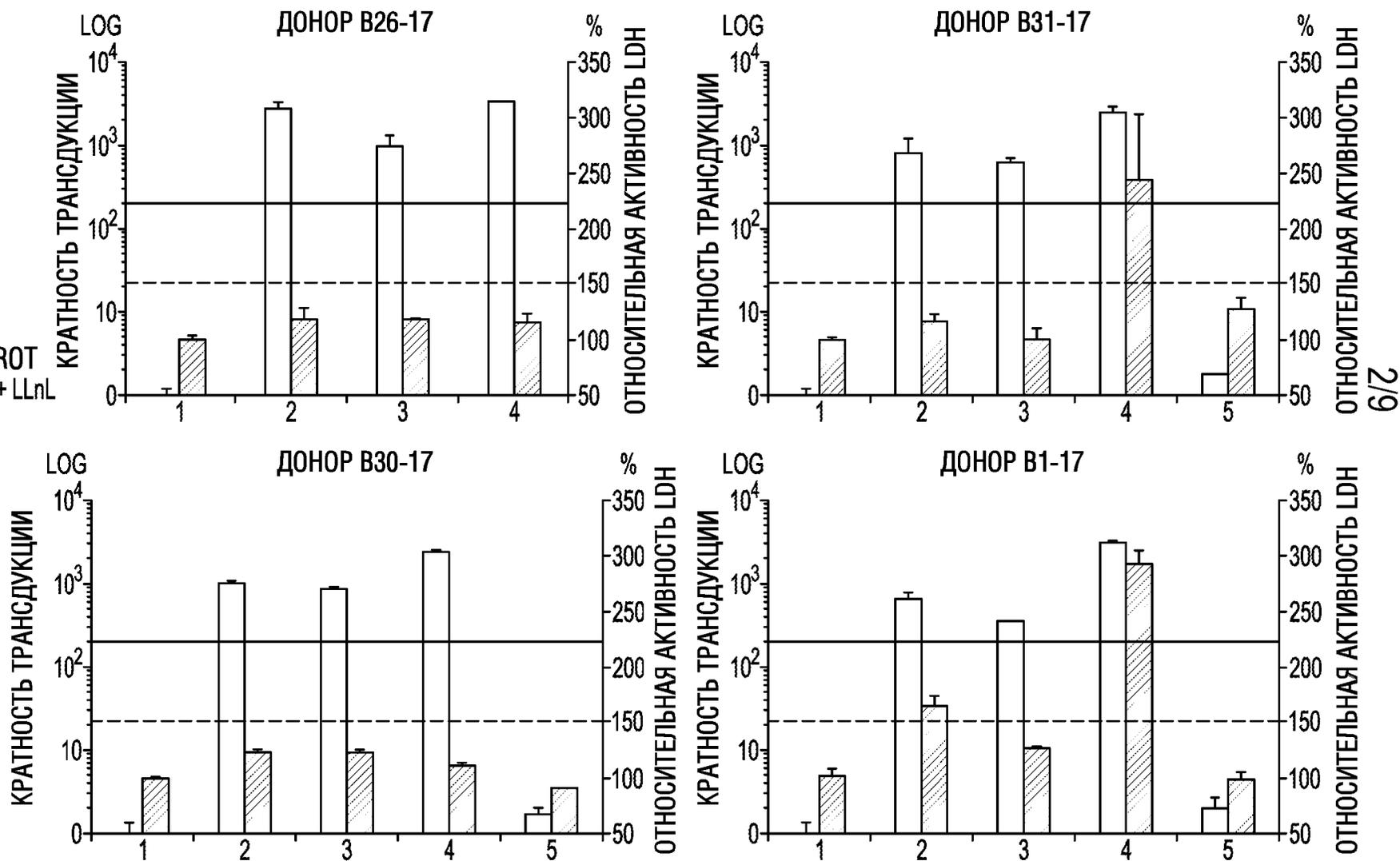
28. Фармацевтическая композиция по п.24, в которой трипептидилальдегидом является N-ацетил-1-лейцил-1-лейцил-1-норлейцин (LLnL).

ФИГ.1

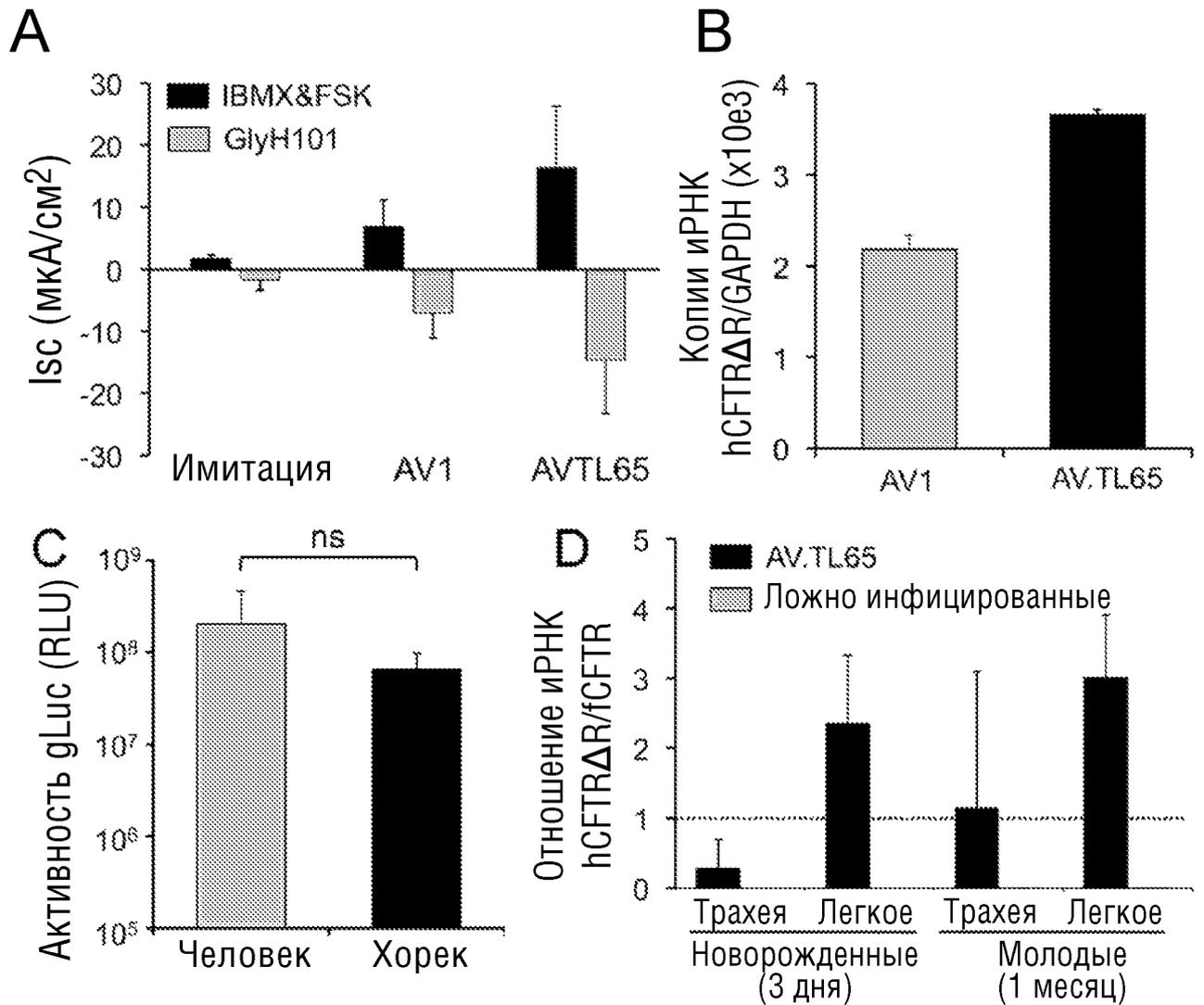


ФИГ.2

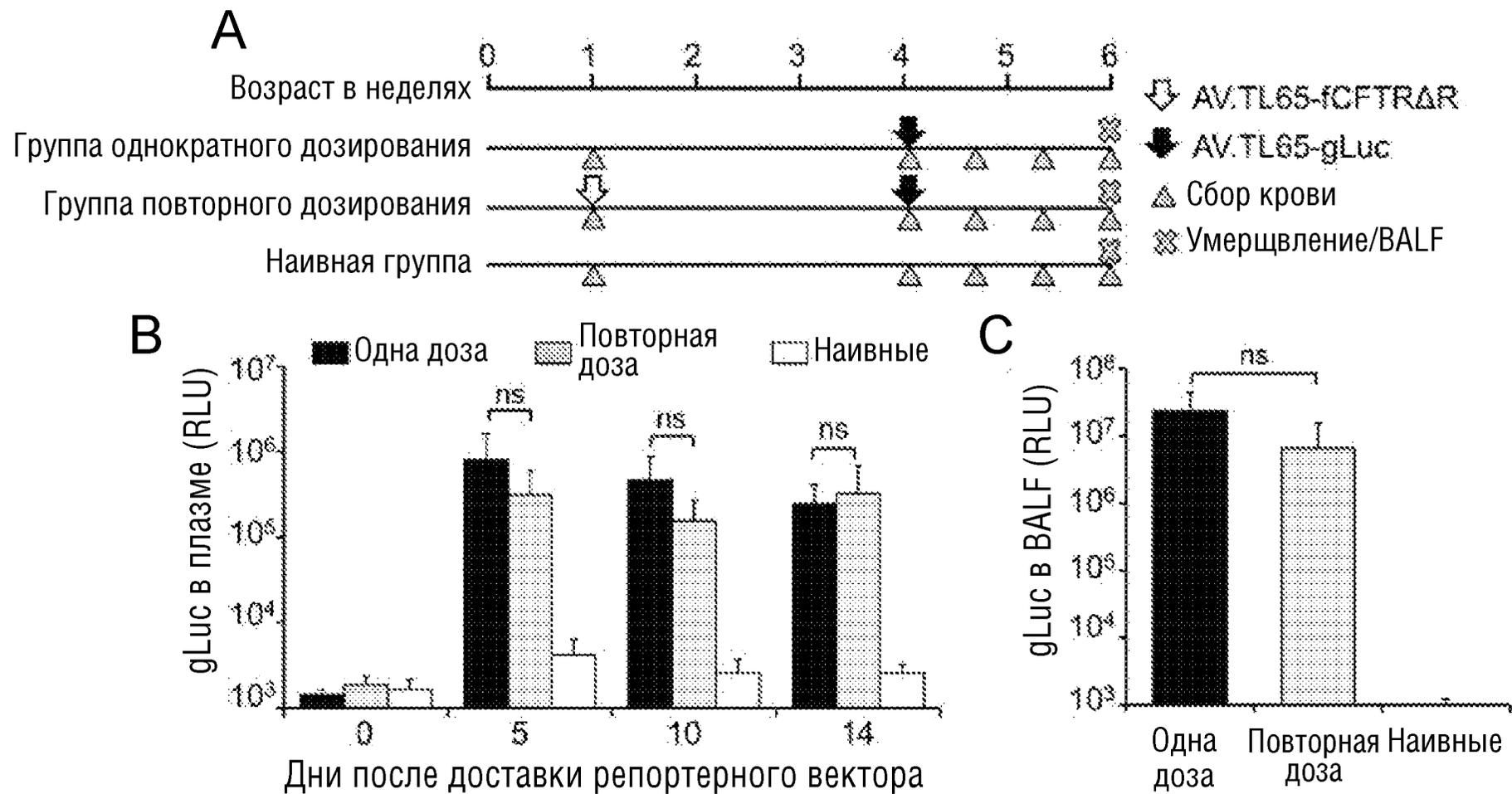
1. Без AV/Без PROT
2. AV.TL65 + Dox + LLnL
3. AV.TL65 + Dox
4. AV.TL65 + Ida
5. AV.TL65 + LLnL



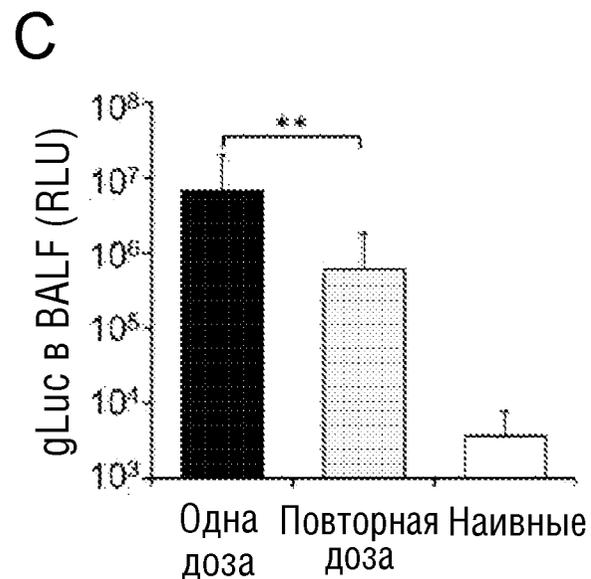
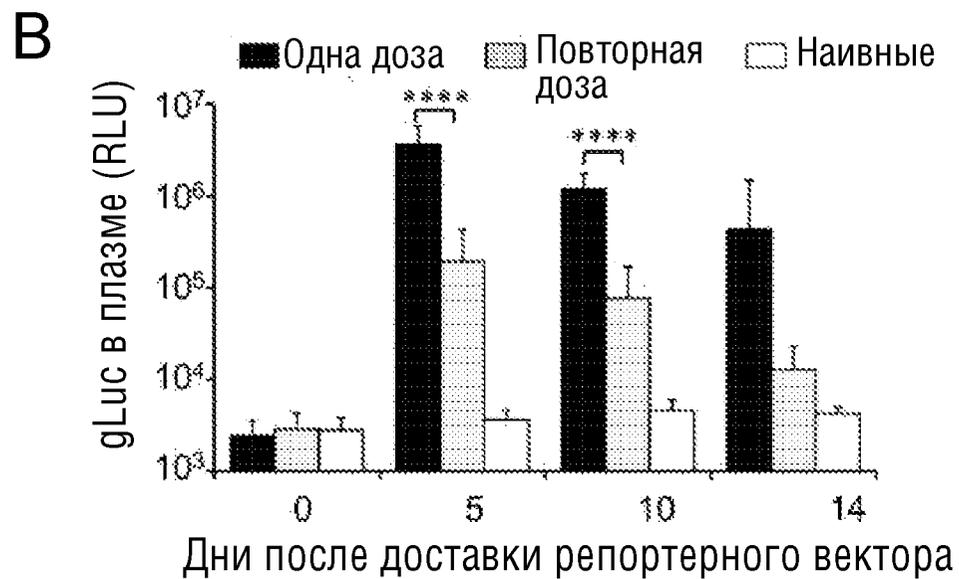
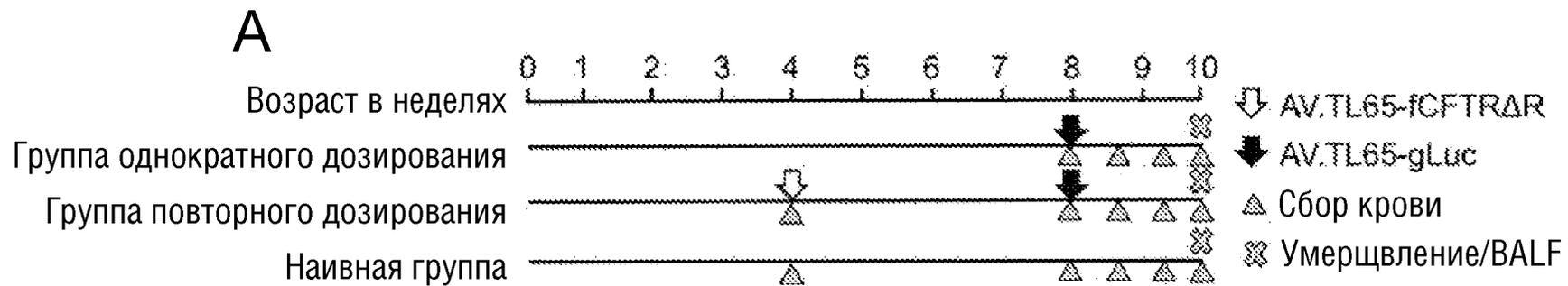
ФИГ.3



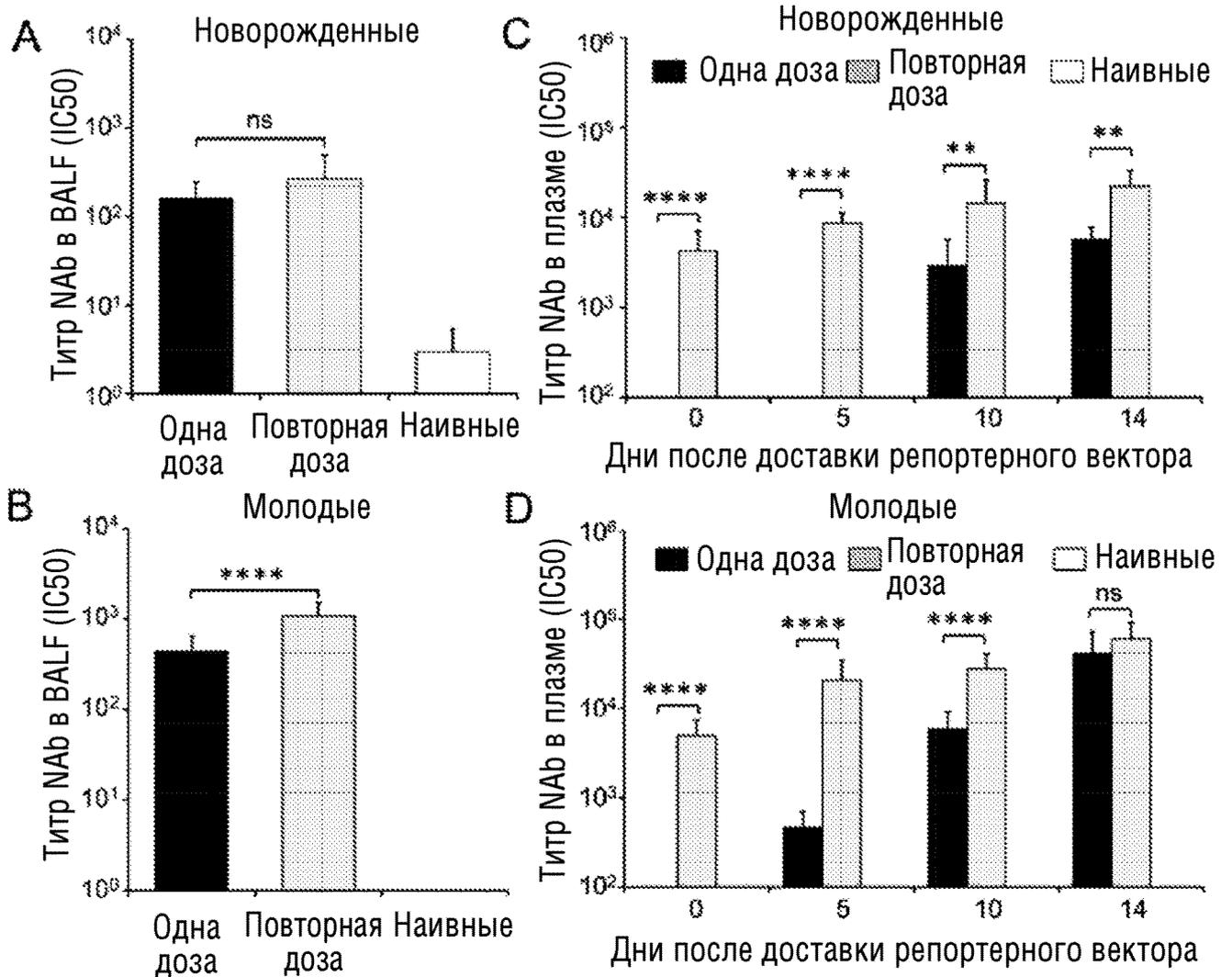
ФИГ.4



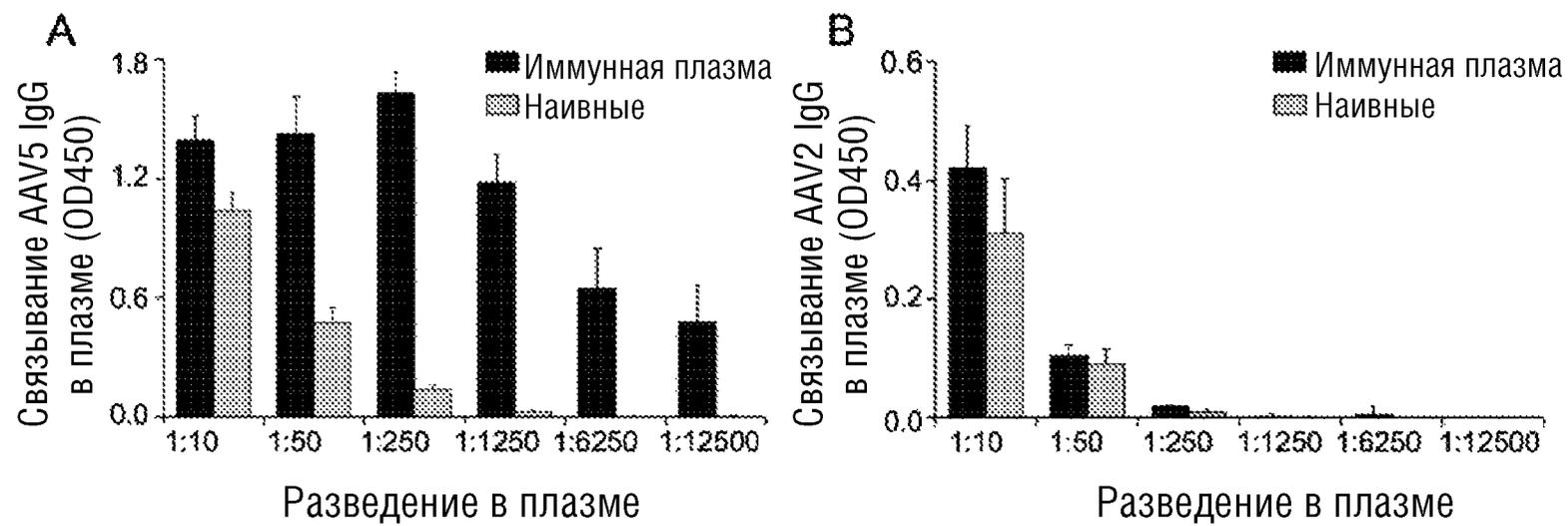
ФИГ.5



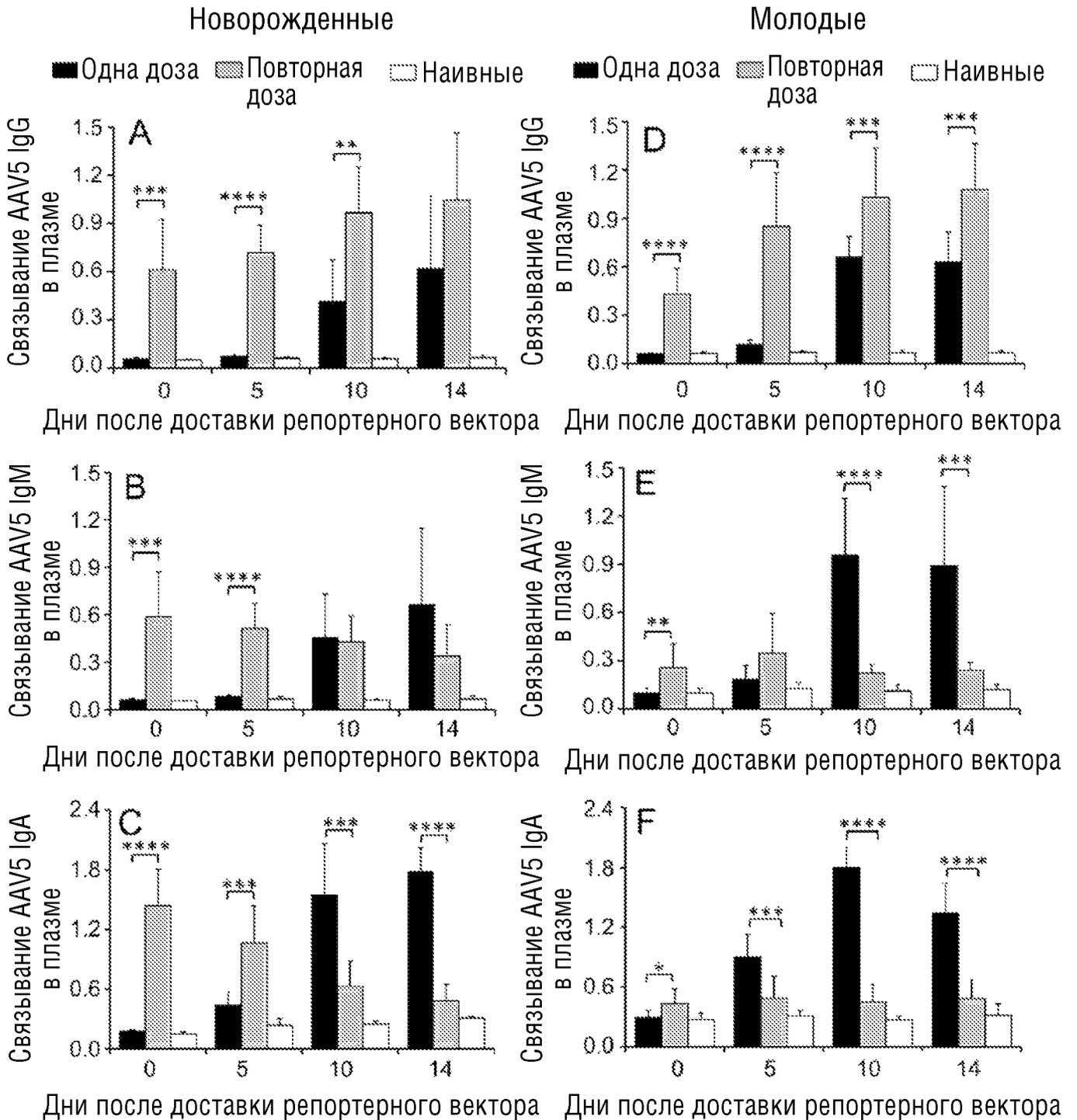
ФИГ.6



ФИГ.7



ФИГ.8



ФИГ.9

