

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192956** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.22

(22) Дата подачи заявки
2020.04.28

(51) Int. Cl. **A61K 35/761** (2015.01)
A61K 39/23 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/015 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/35 (2006.01)

(54) НОВЫЕ КАПСИДЫ AAV И КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ

(31) **62/840,184; 62/913,314; 62/924,095**

(32) **2019.04.29; 2019.10.10; 2019.10.21**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/030281**

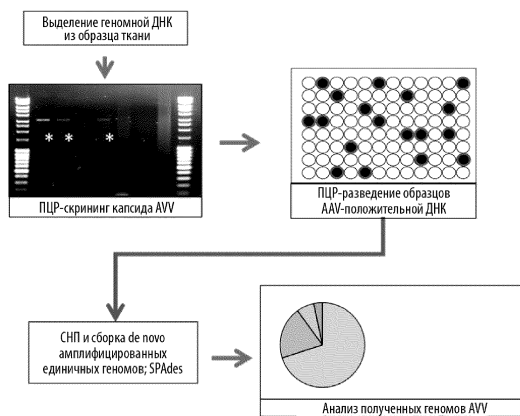
(87) **WO 2020/223236 2020.11.05**

(71) Заявитель:
**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)**

(72) Изобретатель:
**Намбиар Калиани, Уилсон Джеймс М.
(US)**

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

(57) В изобретении предложены новые капсиды AAV и гAAV, содержащий их. В одном варианте реализации изобретения векторы, использующие новый капсид AAV, демонстрируют повышенную трансдукцию выбранной ткани-мишени по сравнению с AAV предшествующего уровня техники.



A1

202192956

202192956

A1

**НОВЫЕ КАПСИДЫ AAV И КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ
УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Аденоассоциированные вирусы (AAV) имеют большие перспективы в генной терапии человека и широко используются для воздействия на печень, мышцы, сердце, головной мозг, глаза, почки и другие ткани в различных исследованиях благодаря их способности обеспечивать долгосрочную экспрессию генов и отсутствию патогенности. AAV принадлежат к семейству парвовирусов, и каждый содержит одноцепочечную ДНК, фланкированную двумя инвертированными концевыми повторами. Сообщалось о десятках встречающихся в природе капсидов AAV; их уникальные капсидные структуры позволяют им распознавать и трансдуцировать различные типы клеток и органов.

С момента начала первого испытания в 1981 г. в клинических испытаниях генной терапии на основе векторов AAV не сообщалось о какой-либо токсичности, связанной с векторами. Постоянно накапливающиеся сообщения о безопасности векторов AAV в клинических испытаниях в сочетании с продемонстрированной эффективностью показывают, что AAV является многообещающей платформой для доставки генов. Еще одна привлекательная особенность заключается в том, что AAV относительно легко манипулировать, поскольку они представляют собой одноцепочечный ДНК-вирус с небольшим геномом (~ 4,7 п.о.) и простыми генетическими компонентами - инвертированными концевыми повторами (ИКП) вместе с генами Rep и Cap. В векторах AAV требуются только ИКП и белок капсида AAV, при этом ИКП служат в качестве сигналов репликации и упаковки для производства вектора, а белки капсида не только образуют капсид для размещения ДНК-генома вектора, но и определяют тропизм ткани для доставки генома вектора в клетки-мишени и ткани-мишени.

AAV являются одними из наиболее эффективных векторов-кандидатов для генной терапии из-за их низкой иммуногенности и непатогенности. Однако, несмотря на возможность эффективного переноса генов, использование векторов AAV в настоящее время в клинической практике может иметь препятствия из-за ранее существовавшего иммунитета к вирусу и ограниченного тропизма тканей. Необходимы новые и более эффективные векторы AAV.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе, в одном варианте реализации изобретения предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), имеющий капсид AAV, содержащий белок капсида, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (AAVrh.92), SEQ ID NO: 4 (AAVrh.93) или SEQ ID NO: 6 (AAVrh.91.93), а в капсиде упакован геном вектора, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность. В определенных вариантах реализации изобретения rAAV имеет капсид, содержащий белки капсида, полученные в результате экспрессии последовательности капсида AAV SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5, или последовательности, разделяющей по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5, а в капсиде упакован геном вектора, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен rAAV, причем капсид AAV содержит белки капсида AAV, содержащие: (1) гетерогенную популяцию белков vp1, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 в SEQ ID NO: 2, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 1, или белков vp1, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 из SEQ ID NO: 2; гетерогенную популяцию белков vp2, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 412 нуклеотида по 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, или белков vp2, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2; гетерогенную популяцию белков vp3, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 589 нуклеотида по 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, или белков vp3, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 589 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 2; и/или (2) гетерогенную популяцию белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, гетерогенную популяцию белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 2, и гетерогенную популяцию белков vp3, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 2 и, необязательно, дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие

дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен rAAV, причем капсид AAV содержит белки капсида AAV, содержащие: (1) гетерогенную популяцию белков vp1, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 728 в SEQ ID NO: 4, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 3, или белков vp1, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 3, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 728 из SEQ ID NO: 4; гетерогенную популяцию белков vp2, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 412 нуклеотида по 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, или белков vp2, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4; гетерогенную популяцию белков vp3, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 595 нуклеотида по 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, или белков vp3, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 595 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты из SEQ ID NO: 4; и/или (2) гетерогенную популяцию белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, гетерогенную популяцию белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728 аминокислоты из SEQ ID NO: 4, и гетерогенную популяцию белков vp3, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 4 и, необязательно, дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен rAAV, причем капсид AAV содержит белки капсида AAV, содержащие: (1) гетерогенную популяцию белков vp1, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 в SEQ ID NO: 6, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 5, или белков vp1, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 5, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 в SEQ ID NO: 6; гетерогенную популяцию белков vp2, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 412 нуклеотида по 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, или белков vp2, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 738 аминокислоты из SEQ ID NO: 6; гетерогенную популяцию белков vp3, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 607 нуклеотида по 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, или белков vp3, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 607 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 6; и/или (2) гетерогенную популяцию белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, гетерогенную популяцию белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 6, и гетерогенную популяцию белков vp3, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 6 и, необязательно, дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты.

В данном документе, в другом варианте реализации изобретения предложена композиция, содержащая по меньшей мере rAAV и физиологически совместимый

носитель, буфер, адъювант и/или разбавитель. В определенных вариантах реализации изобретения композиция составлена для интратекальной доставки, и геном вектора содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую генный продукт для доставки в центральную нервную систему. В еще одном варианте реализации изобретения композиция составлена для внутривенной доставки, интраназальной и/или внутримышечной доставки.

В определенных вариантах реализации изобретения предложена система, пригодная для получения гAAV. Система содержит: (а) нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4 или 6; (б) молекулу нуклеиновой кислоты, подходящую для упаковки в капсид AAV, причем молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ИКП) AAV и нуклеотидную последовательность, не относящуюся к AAV, кодирующую генный продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетку-хозяина; и (в) достаточные функции гер и хелперные функции AAV, позволяющие упаковывать молекулу нуклеиновой кислоты в капсид гAAV.

В определенных вариантах реализации изобретения предложен способ получения гAAV, содержащего капсид AAV. Способ включает этапы культивирования клетки-хозяина, содержащей: а) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок капсида AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4 или 6; (б) функциональный ген гер; (в) миниген, содержащий 5' ИКП AAV, 3' ИКП AAV и трансген; и (г) достаточные хелперные функции, позволяющие упаковывать миниген в капсид AAV.

В еще одном варианте реализации изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая гAAV, кассету экспрессии или молекулу нуклеиновой кислоты, описанные в данном документе.

В определенных вариантах реализации изобретения предложен способ доставки трансгена в клетку. Способ включает этап контактирования клетки с гAAV, описанным в данном документе, причем гAAV содержит трансген.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 изображена схема рабочего процесса для AAV-SGA. Геномную ДНК выделяли из образцов ткани макаки-резуса и проверяли на наличие генов капсида AAV. AAV-положительную ДНК разводили до конечной точки и подвергали еще одному циклу ПЦР. Согласно распределению Пуассона, разведение ДНК, которое дает продукты ПЦР не более чем в 30% лунок, в 80% случаев содержит одну амплифицируемую матрицу ДНК на положительную ПЦР. Положительные ампликоны секвенировали с использованием платформ для секвенирования парных прочтений Illumina MiSeq 2×150 или 2×250, и полученные прочтения были собраны de novo с использованием ассемблера SPAdes.

На Фиг. 2 изображена диаграмма, показывающая филогенез соседних последовательностей ДНК генома новых природных изолятов AAV и репрезентативных

контрольных клад.

На Фиг. 3А - Фиг. 3D изображено выравнивание нуклеотидных последовательностей для капсидов AAVrh.92 (SEQ ID NO: 1), AAVrh.93 (SEQ ID NO: 3), AAVrh91.93 (SEQ ID NO: 5) и AAV7 (SEQ ID NO: 7).

На Фиг. 4А и Фиг. 4В изображено выравнивание аминокислотных последовательностей для AAVrh.92 (SEQ ID NO: 2), AAVrh.93 (SEQ ID NO: 4), AAVrh91.93 (SEQ ID NO: 6) и AAV7 (SEQ ID NO: 8).

На Фиг. 5А - Фиг. 5D изображено биораспределение трансгена eGFP в тканях мыши через 14 дней после инъекции. (Фиг. 5А и Фиг. 5В) Мышам C57BL/6 ВВ вводили дозу 1×10^{12} ГК на мышь капсида AAV, содержащего трансген CB7.CI.eGFP.WPRE.RBG ($n=5$). (Фиг. 5С и Фиг. 5D) Мышам C57BL/6 интрацеребровентрикулярно (ИЦВ) вводили дозу 1×10^{11} ГК на мышь различных капсидов AAV (векторы филогенетической ветви А в дозе $6,9 \times 10^{10}$ ГК/мышь), содержащих трансген CB7.CI.eGFP.WPRE.RBG ($n=5$). Величины выражены как среднее $\pm$ SD; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

На Фиг. 6А и Фиг. 6В изображен анализ экспрессии LacZ в мышцах после ВМ доставки векторов AAV. Мышам вводили 3×10^9 ГК векторов, имеющих различные капсиды и экспрессирующих LacZ под воздействием промотора ЦМВ. На 20 день мышечную ткань собирали и оценивали экспрессию трансгена с помощью окрашивания X-gal.

На Фиг. 7 изображены уровни mAb в сыворотке после ВМ доставки различных векторов AAV. Мышам В6 вводили 1×10^{11} ГК векторов, экспрессирующих антитело 3D6 под воздействием промотора tMCK.

На Фиг. 8 изображены выходы (относительно AAV8) для векторов, экспрессирующих трансгены 3D6 или LacZ.

На Фиг. 9 изображены экспериментальные дизайны для объединенных исследований штрих-кодированных векторов в НЧП (данные, изображенные на Фиг. 10А - Фиг. 10С). Пять новых капсидов и пять контролей (AAVrh.90, AAVrh9.1, AAVrh.92, AAVrh.93, AAVrh.91.93, AAV8, AAV6.2, AAVrh32.33, AAV7 и AAV9) были упакованы с модифицированным АТГ-истощенным трансгеном GFP с уникальными штрих-кодами размером 6 пар оснований. Векторы объединяли в равных количествах и вводили ВВ или ИЦ макакам cynomolgus (общие дозы: 2×10^{13} ГК/кг ВВ и 3×10^{13} ГК ИЦ). Животное, получившее ВВ инъекцию, было серонегативным в отношении AAV6, AAV8 и AAVrh32.33 на исходном уровне и имело титры нейтрализующих антител против AAV7 и AAV9 1:5 и 1:10, соответственно.

На Фиг. 10А - Фиг. 10С изображены графики, показывающие анализ экспрессии РНК штрих-кодированных капсидов после ВВ доставки (Фиг. 10А и Фиг. 10В) и ИЦ доставки (Фиг. 10С). ВВ введение - общая доза 2×10^{13} ГК/кг, вскрытие на 30-й день (у этого животного были низкие уровни AAV7 и AAV9 Nab на исходном уровне). ИЦ введение - 3×10^{13} ГК/животное, вскрытие на 30 день. Частоты штрих-кода в РНК каждого образца ткани были нормализованы к частотам в инъекцируемом исходном материале, так что каждый штрих-код имел эквивалентное представление (10%) в смесях. Исходные

количества десяти векторов находились в диапазоне от 8,5 до 12%. Величины выражены как среднее $\pm$ SEM, $**p < 0,001$.

На Фиг. 11 изображена гистограмма, показывающая титры мелкомасштабных препаратов различных капсидов AAV, использованных в исследовании штрих-кода НЧП. Каждая точка представляет собой отдельный небольшой препарат.

На Фиг. 12А и Фиг. 12В изображены эффекты направленной экспрессии *Luc* в эндотелиальных клетках головного мозга на трансдукцию *RNP.V* у мышей BALB/C Rag^{-/-}. (Фиг. 12А) План эксперимента - мышам вводили (1×10^{12} ГК/мышь) AAVrh.92, содержащий трансгены, для экспрессии *Luc* или *Luc*с1, а затем на 7 день вводили AAV9 или AAV9RNP.V, экспрессирующие eGFP. (Фиг. 12В) Обнаружение eGFP для оценки доставки трансгена в ткань головного мозга.

На Фиг. 13 изображен гистологический анализ головного мозга мыши, показывающий трансдукцию AAVrh92.CB7.CI.eGFP.WPRE.RBG в сосудистой сети через 14 дней после ВВ инъекции, 1×10^{12} ГК на мышь C57BL/6. Темное окрашивание: анти-GFP; Масштабные полосы: 100 мкм.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Генетическая изменчивость AAV у их природных хозяев-млекопитающих была исследована с помощью амплификации единичного генома AAV, методики, используемой для точного выделения отдельных геномов AAV из популяции вируса (Фиг. 1). В данном документе описывается выделение новых последовательностей AAV из тканей макаки-резус, которые можно разделить на различные клады. Мы оценили биологические свойства векторов AAV, выделенных из природных изолятов, у мышей после внутривенной (ВВ) и интрацеребровентрикулярной (ИЦВ) доставки, а также у НЧП после ВВ и интрацестерной (ИЦ) доставки. Результаты идентифицировали как специфические для клады, так и вариабельные паттерны трансдукции новых вариантов AAV по сравнению с их прототипными контрольными членами клады.

В данном документе предложен вектор рекомбинантного AAV, имеющий капсид AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh91.93 и нуклеиновую кислоту, кодирующую трансген под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют его экспрессию после доставки субъекту. Предложены композиции, содержащие эти векторы. Описанные в данном документе способы относятся к использованию rAAV для нацеливания на представляющие интерес ткани для лечения различных состояний.

Примечательно, что AAVrh.92 показал высокие уровни трансдукции в CD31-положительных эндотелиальных клетках сосудов головного мозга после ВВ введения. Мощная трансдукция этого типа клеток имеет потенциал для лечения различных невровакулярных заболеваний. В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен вектор, содержащий капсид AAVrh.92, хорошо подходящий для доставки в нервно-сосудистую сеть. В определенных вариантах реализации изобретения желательна интратекальная доставка, включая, например, доставку в головной мозг посредством ИЦ доставки. В определенных вариантах

реализации изобретения векторы, содержащие капсид, описанный в данном документе, хорошо подходят для доставки в сердце (гладкие мышцы). В определенных вариантах реализации изобретения векторы, содержащие капсид, описанный в данном документе, хорошо подходят для доставки в скелетные (поперечно-полосатые) мышцы. Векторы могут быть доставлены системно или нацелены с помощью пути введения, подходящего для нацеливания на эти ткани.

Если не указано иное, технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой принадлежит это изобретение, и ссылку на опубликованные тексты, которые предоставляют специалисту в данной области общее руководство для многих терминов, используемых в данной заявке. Следующие определения приведены только для ясности и не предназначены для ограничения заявленного изобретения. Используемые в данном документе термины в единственном числе относятся к одному или более, например, «клетка-хозяин» понимается как представляющая одну или более клеток-хозяев. Таким образом, термины в единственном числе, «один или более» и «по меньшей мере один» используются в данном документе взаимозаменяемо. Используемый в данном документе термин «около» означает отклонение в 10% от приведенной ссылки, если не указано иное. Хотя различные варианты реализации изобретения в описании представлены с использованием терминологии «содержащий», при других обстоятельствах релевантный вариант реализации изобретения также предназначен для интерпретации и описания с использованием терминологии «состоящий из» или «состоящий по существу из».

Что касается нижеследующего описания, предполагается, что каждая из описанных в данном документе композиций, в другом варианте реализации изобретения, пригодна в способах по данному изобретению. Кроме того, также предполагается, что каждая из композиций, описанных в данном документе как пригодная в способах, в другом варианте реализации изобретения сама является вариантом реализации изобретения.

«Рекомбинантный AAV» или «гAAV» представляет собой устойчивую к ДНКазе вирусную частицу, содержащую два элемента - капсид AAV и геном вектора, содержащий по меньшей мере последовательности, не кодирующие AAV, упакованные в капсид AAV. Если не указано иное, этот термин может использоваться взаимозаменяемо с фразой «вектор гAAV». гAAV представляет собой «вирус с дефектом репликации» или «вирусный вектор», поскольку он не имеет какого-либо функционального гена гер AAV или функционального гена сар AAV и не может генерировать потомство. В определенных вариантах реализации изобретения единственными последовательностями AAV являются последовательности инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV, как правило, расположенные на крайних 5'- и 3'-концах геном вектора, чтобы можно было упаковать ген и регуляторные последовательности, расположенные между ИКП, внутрь капсида AAV.

Используемый в данном документе термин «геном вектора» относится к

нуклеотидной последовательности, упакованной внутри капсида гAAV, который образует вирусную частицу. Такая нуклеотидная последовательность содержит последовательности инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV. В приведенных в данном документе примерах геном вектора содержит, как минимум, от 5' до 3', 5' ИКП AAV, кодирующую последовательность(и) и 3' ИКП AAV. В определенных вариантах реализации изобретения ИКП происходят из AAV2; может быть выбран источник AAV, отличный от капсида, или могут быть выбраны другие полноразмерные ИКП. В определенных вариантах реализации изобретения ИКП происходят из того же источника AAV, что и AAV, который обеспечивает функцию гер во время продуцирования или транскомплементации AAV. Кроме того, могут использоваться другие ИКП. Кроме того, геном вектора содержит регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию генных продуктов. Подходящие компоненты генома вектора обсуждаются более подробно в данном документе. Геном вектора иногда именуется в данном документе «минигеном».

Термин «кассета экспрессии» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательности трангена и его регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер, полиА), причем эта кассета может быть упакована в капсид вирусного вектора (*например*, вирусную частицу). Как правило, такая кассета экспрессии для создания вирусного вектора содержит последовательности трангена, фланкированные сигналами упаковки вирусного генома и другими последовательностями контроля экспрессии, такими как описанные в данном документе. Например, для вирусного вектора AAV сигналы упаковки представляют собой 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) и 3' ИКП. В определенных вариантах реализации изобретения термин «транген» может использоваться взаимозаменяемо с «кассетой экспрессии». В других вариантах реализации изобретения термин «транген» относится исключительно к кодирующим последовательностям для выбранного гена.

гAAV состоит из капсида AAV и генома вектора. Капсид AAV представляет собой совокупность гетерогенной популяции vp1, гетерогенной популяции vp2 и гетерогенной популяции белков vp3. Используемый в данном документе термин «гетерогенный» или любые его грамматические вариации для обозначения белков капсида vp относятся к популяции, состоящей из элементов, которые не являются одинаковыми, например, имеющей мономеры (белки) vp1, vp2 или vp3 с различными модифицированными аминокислотными последовательностями.

Используемый в данном документе термин «гетерогенная популяция» в отношении белков vp1, vp2 и vp3 (в альтернативном варианте именуемых изоформами) относится к различиям в аминокислотной последовательности белков vp1, vp2 и vp3 внутри капсида. Капсид AAV содержит субпопуляции в белках vp1, белках vp2 и белках vp3, которые имеют модификации по сравнению с предсказанными аминокислотными остатками. Эти субпопуляции включают, как минимум, определенные остатки дезамидированного аспарагина (N или Asn). Например, определенные субпопуляции содержат по меньшей

мере одно, два, три или четыре положения сильно дезамидированного аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин и, необязательно, дополнительно содержат другие дезамидированные аминокислоты, при этом дезамидирование приводит к замене аминокислоты и другим необязательным модификациям.

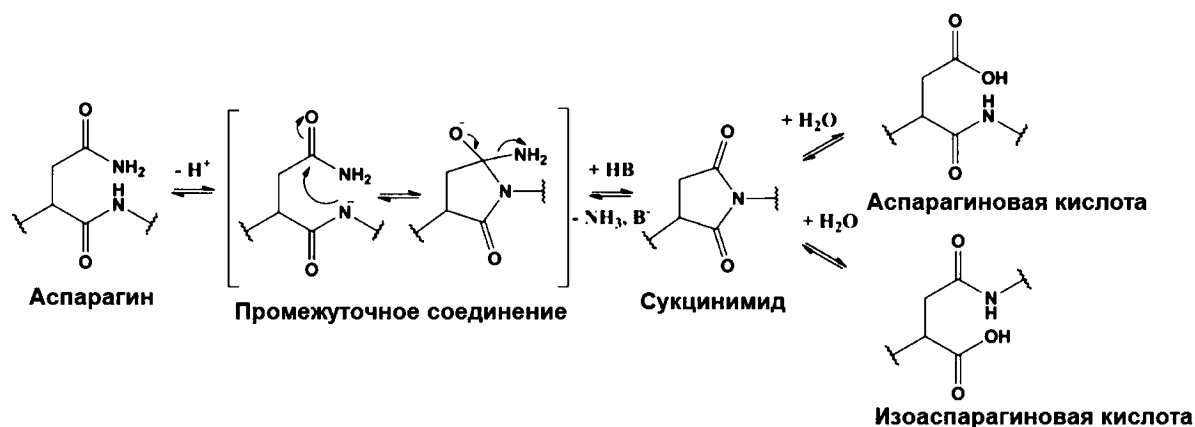
Используемый в данном документе термин «субпопуляция» белков νp относится к группе белков νp , которая имеет по меньшей мере одну определенную общую характеристику и которая состоит по меньшей мере из от одного члена группы до менее чем всех членов контрольной группы, если не указано иное. Например, «субпопуляция» белков $\nu p1$ может состоять по меньшей мере из одного (1) белка $\nu p1$ и менее чем всех белков $\nu p1$ в собранном капсиде AAV, если не указано иное. «Субпопуляция» белков $\nu p3$ может составлять от одного (1) белка $\nu p3$ до менее чем всех белков $\nu p3$ в собранном капсиде AAV, если не указано иное. Например, белки $\nu p1$ могут представлять собой субпопуляцию белков νp ; Белки $\nu p2$ могут представлять собой отдельную субпопуляцию белков νp , а $\nu p3$ представляют собой еще одну субпопуляцию белков νp в собранном капсиде AAV. В другом примере белки $\nu p1$, $\nu p2$ и $\nu p3$ могут содержать субпопуляции, имеющие различные модификации, например, по меньшей мере, один, два, три или четыре сильно дезамидированных аспарагина, например, в парах аспарагин-глицин.

Если не указано иное, под сильно дезамидированным понимается по меньшей мере 45% дезамидированного, по меньшей мере 50% дезамидированного, по меньшей мере 60% дезамидированного, по меньшей мере 65% дезамидированного, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или до около 100% дезамидированного в указанном положении аминокислоты по сравнению с указанным положением аминокислоты в предсказанной аминокислотной последовательности. Такие проценты могут быть определены с использованием методов 2D-гель, масс-спектрометрии или других подходящих методик.

Не желая привязываться к теории, считается, что дезамидирование по меньшей мере сильно дезамидированных остатков в белках νp капсида AAV является в основном неферментативным по своей природе, поскольку вызвано функциональными группами в белке капсида, которые дезамидируют выбранные аспарагины, и в меньшей степени - остатки глутамина. Эффективная сборка капсида большинства дезамидированных белков $\nu p1$ указывает на то, что либо эти события происходят после сборки капсида, либо что дезамидирование отдельных мономеров ($\nu p1$, $\nu p2$ или $\nu p3$) хорошо переносится структурно и не влияет в значительной степени на динамику сборки. Обширное дезамидирование в VP1-уникальной (VP1-у) области (~ак 1-137), как правило, считающееся локализованным внутри до проникновения в клетку, предполагает, что дезамидирование VP может происходить до сборки капсида.

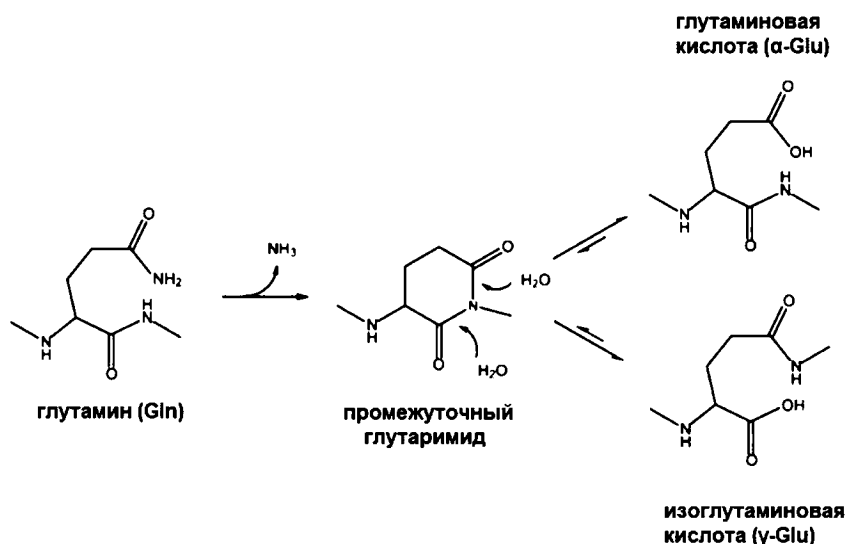
Не желая привязываться к теории, дезамидирование N может происходить через атом азота основной цепи его C-концевого остатка, который проводит нуклеофильную атаку на атом углерода амидной группы боковой цепи Asn. Полагают, что образуется

промежуточный сукцинимидный остаток с замкнутым кольцом. Остаток сукцинимиды затем проводит быстрый гидролиз с образованием конечного продукта - аспарагиновой кислоты (Asp) или изоаспарагиновой кислоты (IsoAsp). Следовательно, в определенных вариантах реализации изобретения деаминация аспарагина (N или Asn) приводит к Asp или IsoAsp, которые могут взаимно превращаться через промежуточное соединение сукцинимиды, например, как проиллюстрировано ниже.



Как предусмотрено в данном документе, каждый деаминированный N в VP1, VP2 или VP3 может независимо представлять собой аспарагиновую кислоту (Asp), изоаспарагиновую кислоту (isoAsp), аспартат и/или взаимопревращающуюся смесь Asp и isoAsp или их комбинации. Может присутствовать любое подходящее соотношение α - и изоаспарагиновой кислоты. Например, в определенных вариантах реализации изобретения соотношение аспарагиновой кислоты к изоаспарагиновой кислоте может составлять от 10:1 до 1:10, около 50:50 аспарагиновой кислоты:изоаспарагиновой кислоты или около 1:3 аспарагиновой кислоты:изоаспарагиновой кислоты, или представлять собой другое выбранное соотношение.

В определенных вариантах реализации изобретения один или более глутаминов (Q) могут деаминироваться до глутаминовой кислоты (Glu), то есть α -глутаминовой кислоты, γ -глутаминовой кислоты (Glu) или смеси α - и γ -глутаминовой кислоты, которые могут взаимно превращаться через обычный промежуточный глутаримид. Может присутствовать любое подходящее соотношение α - и γ -глутаминовой кислоты. Например, в определенных вариантах реализации изобретения соотношение α к γ может составлять от 10:1 до 1:10, около 50:50 α : γ или около 1:3 α : γ , или представлять собой другое выбранное соотношение.



Таким образом, внутри капсида гAAV гAAV содержит субпопуляции белков vp1, vp2 и/или vp3 с дезамидированными аминокислотами, включая, как минимум, одну субпопуляцию, содержащую по меньшей мере один сильно дезамидированный аспарагин. Кроме того, другие модификации могут включать изомеризацию, в частности, по выбранным положениям остатков аспарагиновой кислоты (D или Asp). В других вариантах реализации изобретения модификации могут включать амидирование в положении Asp.

В определенных вариантах реализации изобретения капсид AAV содержит субпопуляции vp1, vp2 и vp3, имеющие по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 до по меньшей мере около 25 дезамидированных положений в аминокислотных остатках, из которых по меньшей мере от 1 до 10%, от по меньшей мере 10 до 25%, от по меньшей мере 25 до 50%, от по меньшей мере 50 до 70%, от по меньшей мере 70 до 100%, от по меньшей мере 75 до 100%, от по меньшей мере 80 до 100% или от по меньшей мере 90 до 100% дезамидированы по сравнению с кодированной аминокислотной последовательностью белков vp. Большинство из них могут представлять собой остатки N. Однако остатки Q также могут быть дезамидированы.

Используемый в данном документе термин «кодированная аминокислотная последовательность» относится к аминокислоте, которая предсказывается на основе трансляции известного кодона ДНК указанной нуклеотидной последовательности, транслируемой в аминокислоту. В следующей Таблице приведены кодоны ДНК и двадцать общих аминокислот, обозначенных как однобуквенным кодом (ОБК), так и трехбуквенным кодом (ЗБК).

Аминокислота	ОБК	З БК	Кодоны ДНК
Изолейцин	I	Ile	ATT, ATC, ATA
Лейцин	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG

Валин	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
Фенилаланин	F	Phe	TTT, TTC
Метионин	M	Met	ATG
Цистеин	C	Cys	TGT, TGC
Аланин	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
Глицин	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
Пролин	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
Треонин	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
Серин	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Тирозин	Y	Tyr	TAT, TAC
Триптофан	W	Trp	TGG
Глутамин	Q	Gln	CAA, CAG
Аспарагин	N	Asn	AAT, AAC
Гистидин	H	His	CAT, CAC
Глутаминовая кислота	E	Glu	GAA, GAG
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GAT, GAC
Лизин	K	Lys	AAA, AAG
Аргинин	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Стоп-кодона	Стоп		TAA, TAG, TGA

В определенных вариантах реализации изобретения гAAV имеет капсид AAV, содержащий белки vp1, vp2 и vp3, субпопуляции которых содержат комбинации из двух, трех, четырех, пяти или более дезамидированных остатков в положениях, приведенных в Таблицах, представленных в данном документе и включенных в данный документ посредством ссылки.

Дезамидирование в гAAV может быть определено с помощью 2D гель-электрофореза и/или масс-спектрометрии, и/или методик моделирования белков. Хроматография в реальном времени может быть выполнена с использованием колонки Acclaim PepMap и системы Thermo UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific), соединенной с Q Exactive HF с источником NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Данные МС получают с использованием зависящего от данных метода топ-20 для Q Exactive HF, динамически выбирая наиболее распространенные еще не секвенированные ионы-предшественники из обзорных сканирований (200-2000 m/z). Секвенирование выполняется посредством фрагментации столкновительной диссоциации с более высокой

энергией (HCD) с целевым значением ионов $1e5$, определенным с помощью прогнозирующего автоматического управления усилением, а выделение предшественников выполнялось с окном 4 m/z . Обзорные сканирования были получены с разрешением 120000 при m/z 200. Разрешение для спектров HCD может быть установлено на 30000 при m/z 200 с максимальным временем инъекции ионов 50 мс и нормализованной энергией столкновения 30. Уровень KV S-линзы может быть установлен на 50, чтобы обеспечить оптимальную передачу m/z области, занятой пептидами из гидролизата. Ионы-предшественники могут быть исключены с одним, неназначенным или шестью и более высокими зарядовыми состояниями из выбора фрагментации. Для анализа полученных данных может использоваться программное обеспечение BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific). Для картирования пептидов поиск выполняется с использованием базы данных FASTA с однократной записью белков с карбамидометилированием, установленным как фиксированная модификация; и окислением, дезамидированием и фосфорилированием, установленными как переменные модификации, точностью определения массы 10 ч/млн, высокой протеазной специфичностью и уровнем достоверности 0,8 для спектров MS/MS. Примеры подходящих протеаз могут включать, например, трипсин или химотрипсин. Масс-спектрометрическая идентификация дезамидированных пептидов относительно проста, поскольку дезамидирование добавляет к массе интактной молекулы +0,984 Да (разница масс между группами -ОН и -NH₂). Процент дезамидирования конкретного пептида определяется площадью дезамидированного пептида, деленной на сумму площадей дезамидированного и нативного пептидов. Принимая во внимание количество возможных сайтов дезамидирования, изобарные частицы, которые дезамидированы в разных сайтах, могут совместно мигрировать в одном пике. Следовательно, фрагментные ионы, происходящие из пептидов с множественными потенциальными сайтами дезамидирования, могут использоваться для определения местоположения или дифференциации множества сайтов дезамидирования. В этих случаях относительные интенсивности в пределах наблюдаемых изотопных структур могут использоваться для конкретного определения относительного содержания различных изомеров дезамидированного пептида. Этот метод предполагает, что эффективность фрагментации для всех изомерных частиц одинакова и не зависит от места дезамидирования. Специалисту в данной области техники будет понятно, что можно использовать ряд вариаций этих иллюстративных способов. Например, подходящие масс-спектрометры могут включать, *например*, квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр (QTOF), такой как Waters Xevo или Agilent 6530, или прибор для орбитальной ловушки, такой как Orbitrap Fusion или Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Подходящие системы жидкостной хроматографии включают, *например*, систему Acquity UPLC от Waters или системы Agilent (серии 1100 или 1200). Подходящее программное обеспечение для анализа данных может включать, *например*, MassLynx (Waters), Pinpoint and Petfinder (Thermo Fisher Scientific), Mascot (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Другие методы

могут быть описаны, например, в X. Jin et al, *Hu Gene Therapy Methods*, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267, опубликованном онлайн 16 июня 2017 г.

Помимо дезамидирования, могут происходить другие модификации, не приводящие к превращению одной аминокислоты в другой аминокислотный остаток. Такие модификации могут включать ацетилированные остатки, изомеризацию, фосфорилирование или окисление.

Модуляция дезамидирования. В определенных вариантах реализации изобретения AAV модифицирован для замены глицина в паре аспарагин-глицин, чтобы уменьшить дезамидирование. В других вариантах реализации изобретения аспарагин заменен на другую аминокислоту, например, глутамин, который дезамидируется с более медленной скоростью; или на аминокислоту, в которой отсутствуют амидные группы (например, глутамин и аспарагин содержат амидные группы); и/или на аминокислоту, в которой отсутствуют аминокислотные группы (например, лизин, аргинин и гистидин содержат аминокислотные группы). В контексте данного документа аминокислоты, не содержащие боковых амидных или аминокислотных групп, относятся, например, к глицину, аланину, валину, лейцину, изолейцину, серину, треонину, цистину, фенилаланину, тирозину или триптофану и/или пролину. Модификации, такие как описанные, могут присутствовать в одной, двух или трех парах аспарагин-глицин, обнаруженных в кодированной аминокислотной последовательности AAV. В определенных вариантах реализации изобретения такие модификации не происходят во всех четырех парах аспарагин-глицин. Таким образом, предложен способ уменьшения дезамидирования AAV и/или сконструированные варианты AAV, имеющие более низкие скорости дезамидирования. В дополнительном или альтернативном варианте одна или более других амидных аминокислот могут быть заменены на неамидную аминокислоту для уменьшения дезамидирования AAV. В определенных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе капсид мутантного AAV содержит мутацию в паре аспарагин-глицин, так что глицин заменяется на аланин или серин. Капсид мутантного AAV может содержать один, два или три мутанта, при этом эталонный AAV изначально содержит четыре пары N-G. В определенных вариантах реализации изобретения капсид AAV может содержать один, два, три или четыре таких мутанта, при этом эталонный AAV изначально содержит пять пар N-G. В определенных вариантах реализации изобретения капсид мутантного AAV содержит только одну мутацию в паре N-G. В определенных вариантах реализации изобретения капсид мутантного AAV содержит мутации в двух разных парах N-G. В определенных вариантах реализации изобретения капсид мутантного AAV содержит мутацию в двух разных парах N-G, которые расположены в структурно разных местах капсида AAV. В определенных вариантах реализации изобретения мутация не находится в VP1-уникальной области. В определенных вариантах реализации изобретения мутация находится в VP1-уникальной области. Необязательно, капсид мутантного AAV не содержит модификаций в парах N-G, но содержит мутации для минимизации или устранения дезамидирования в одном или более аспарагинах или глутaminaх, расположенных вне пары N-G.

В определенных вариантах реализации изобретения предложен способ повышения эффективности вектора гAAV, который включает конструирование капсида AAV, которое устраняет одну или более N-G в капсиде AAV дикого типа. В определенных вариантах реализации изобретения кодирующая последовательность для «G» в «N-G» сконструирована для кодирования другой аминокислоты. В определенных нижеприведенных примерах «S» или «A» являются замещенными. Однако могут быть выбраны другие подходящие кодирующие аминокислотные последовательности.

Эти аминокислотные модификации могут быть выполнены традиционными методиками генной инженерии. Например, может быть сконструирована нуклеотидная последовательность, содержащая модифицированные кодоны *vr* AAV, в которой от одного до трех кодонов, кодирующих глицин в парах аспарагин-глицин, модифицированы для кодирования аминокислоты, отличной от глицина. В определенных вариантах реализации изобретения может быть сконструирована нуклеотидная последовательность, содержащая модифицированные кодоны аспарагина, в от одной до трех парах аспарагин-глицин, так что модифицированный кодон кодирует аминокислоту, отличную от аспарагина. Каждый модифицированный кодон может кодировать другую аминокислоту. В альтернативном варианте один или более измененных кодонов могут кодировать одну и ту же аминокислоту. В определенных вариантах реализации изобретения эти модифицированные нуклеотидные последовательности AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93 могут использоваться для создания мутантного гAAV, имеющего капсид с более низким дезамидированием, чем у нативного капсида AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93. Такой мутантный гAAV может иметь пониженную иммуногенность и/или повышать стабильность при хранении, особенно при хранении в форме суспензии.

В данном документе также предложены нуклеотидные последовательности, кодирующие капсиды AAV, имеющие пониженное дезамидирование. В компетенции специалиста в данной области техники находится разработка последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих этот капсид AAV, включая ДНК (геномную или кДНК) или РНК (*например*, мРНК). Такие нуклеотидные последовательности могут быть оптимизированы по кодонам для экспрессии в выбранной системе (т.е. типе клеток) и могут быть созданы различными способами. Эта оптимизация может быть выполнена с использованием методов, доступных онлайн (*например*, GeneArt), опубликованных методов или компании, которая предоставляет услуги по оптимизации кодонов, *например*, DNA2.0 (Menlo Park, CA). Один метод оптимизации кодонов описан, *например*, в международной патентной публикации № WO 2015/012924, которая целиком включена в данный документ посредством ссылки. *См. также, например*, публикацию патента США № 2014/0032186 и публикацию патента США № 2006/0136184. Соответственно, вся длина открытой рамки считывания (ORF) для продукта модифицирована. Однако в некоторых вариантах реализации изобретения может быть изменен только фрагмент ORF. Используя один из этих методов, можно применить частоты к любой данной полипептидной последовательности и получить фрагмент нуклеиновой кислоты кодирующей области с

оптимизированными кодонами, которая кодирует полипептид. Доступен ряд вариантов для выполнения фактических изменений кодонов или для синтеза кодирующих областей с оптимизированными кодонами, разработанных, как описано в данном документе. Такие модификации или синтез могут быть выполнены с использованием стандартных и рутинных молекулярно-биологических манипуляций, хорошо известных рядовым специалистам в данной области техники. В одном подходе серию комплементарных олигонуклеотидных пар, каждая из которых имеет длину 80-90 нуклеотидов и охватывает длину целевой последовательности, синтезируют стандартными способами. Эти олигонуклеотидные пары синтезируются таким образом, что при отжиге они образуют двухцепочечные фрагменты из 80-90 пар оснований, содержащие когезионные концы, *например*, каждый олигонуклеотид в паре синтезируется с удлинением на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более оснований за пределами области, комплементарной другому олигонуклеотиду в паре. Одноцепочечные концы каждой пары олигонуклеотидов предназначены для отжига с одноцепочечным концом другой пары олигонуклеотидов. Олигонуклеотидные пары подвергаются отжигу, и около пяти-шести из этих двухцепочечных фрагментов затем подвергаются совместному отжигу через когезионные одноцепочечные концы, а затем они совместно лигируются и клонируются в стандартный бактериальный клонирующий вектор, например, вектор TOPO®, доступный от Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния. Затем конструктор секвенируется стандартными методами. Приготавливают несколько из этих конструкторов, состоящих из 5-6 фрагментов из 80-90 пар оснований, лигированных вместе, *т.е.* фрагментов из около 500 пар оснований, так что вся целевая последовательность представлена серией плазмидных конструкторов. Затем вставки этих плазмид разрезают соответствующими рестрикционными ферментами и лигируют вместе с образованием конечного конструктора. Затем конечный конструктор клонируют в стандартный бактериальный клонирующий вектор и секвенируют. Дополнительные методы будут очевидны для квалифицированного специалиста. Кроме того, синтез генов легко доступен коммерчески.

В определенных вариантах реализации изобретения предложены капсиды AAV, которые имеют гетерогенную популяцию изоформ капсида AAV (то есть VP1, VP2, VP3), которые содержат множество сильно дезамидированных положений «N-G». В определенных вариантах реализации изобретения сильно дезамидированные положения находятся в положениях, указанных ниже, со ссылкой на предсказанную полноразмерную аминокислотную последовательность VP1. В других вариантах реализации изобретения ген капсида модифицирован таким образом, что указанная «N-G» удаляется, а мутантная «N-G» конструируется в другое положение.

Используемые в данном документе термины «клетка-мишень» и «ткань-мишень» могут относиться к любой клетке или ткани, которые предназначены для трансдукции рассматриваемым вектором AAV. Термин может относиться к любому одному или более из мышц, печени, легких, эпителия дыхательных путей, центральной нервной системы, нейронов, глаза (глазных клеток) или сердца. В одном варианте реализации изобретения

ткань-мишень представляет собой печень. В другом варианте реализации изобретения ткань-мишень представляет собой сердце. В другом варианте реализации изобретения ткань-мишень представляет собой мозг. В другом варианте реализации изобретения ткань-мишень представляет собой мышцы.

Используемый в данном документе термин «млекопитающий субъект» или «субъект» включает любого млекопитающего, нуждающегося в описанных в данном документе способах лечения или профилактики, включая, в частности, людей. Другие млекопитающие, нуждающиеся в таком лечении или профилактике, включают собак, кошек или других домашних животных, лошадей, домашний скот, лабораторных животных, включая нечеловеческих приматов и т.д. Субъект может представлять собой мужскую или женскую особь.

Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» может относиться к линии упаковывающих клеток, в которой rAAV продуцируется из плазмиды. В альтернативном варианте термин «клетка-хозяин» может относиться к клетке-мишени, в которой необходима экспрессия трансгена.

А. Капсид AAV

В данном документе предложены новые белки капсида AAV, имеющие последовательности vp1, указанные в перечне последовательности: AAVrh.92 (SEQ ID NO:2), AAVrh.93 (SEQ ID NO:4) или AAVrh.91.93 (SEQ ID NO:6). Капсид AAV состоит из трех перекрывающихся кодирующих последовательностей, которые различаются по длине из-за использования альтернативного стартового кодона. Эти переменные белки именуются VP1, VP2 и VP3, причем VP1 является самым длинным, а VP3 является самым коротким. Частица AAV состоит из всех трех белков капсида в соотношении ~ 1:1:10 (VP1:VP2:VP3). VP3, который содержится в VP1 и VP2 на N-конце, представляет собой основной структурный компонент, из которого строится частица. Для обозначения белка капсида могут использоваться несколько различных систем нумерации. В контексте данного документа, для удобства последовательности AAV обозначаются с использованием нумерации VP1, которая начинается с ак 1 для первого остатка VP1. Однако описанные в данном документе белки капсида включают VP1, VP2 и VP3 (используемые в данном документе взаимозаменяемо с vp1, vp2 и vp3). Нумерация переменных белков капсида следующая:

Нуклеотиды (нт)

AAVrh.92: vp1 - нт от 1 до 2199; vp2 - нт от 412 до 2199; vp3 - нт от 589 до 2199 в SEQ ID NO: 1;

AAVrh.93: vp1 - нт от 1 до 2184; vp2 - нт от 412 до 2184; vp3 - нт от 595 до 2184 в SEQ ID NO: 3;

AAVrh.91.93: vp1 - нт от 1 до 2199; vp2 - нт от 412 до 2199; vp3 - нт от 607 до 2199 в SEQ ID NO: 5.

Выравнивание капсидов, описанных в данном документе, вместе с AAV7 (SEQ ID NO: 7) изображено на Фиг. 3А - Фиг. 3Д.

Аминокислоты (ак)

AAVrh.92: vp1 - ак от 1 до 733; vp2 - ак от 138 до 733; vp3 - ак от 197 до 733 в SEQ ID NO: 2;

AAVrh.93: vp1 - ак от 1 до 728; vp2 - ак от 138 до 728; vp3 - ак от 199 до 728 в SEQ ID NO: 4;

AAVrh.91.93: vp1 - ак от 1 до 733; vp2 - ак от 138 до 733; vp3 - ак от 203 до 733 в SEQ ID NO: 6.

Выравнивание капсидов, описанных в данном документе, вместе с AAV7 (SEQ ID NO: 8) изображено на Фиг. 4А - Фиг. 4В.

В данный документ включены гAAV, содержащие по меньшей мере один из vp1, vp2 и vp3 любого из AAVrh.92 (SEQ ID NO: 2), AAVrh.93 (SEQ ID NO: 4) или AAVrh.91.93 (SEQ ID NO: 6). В данном документе также предложены гAAV, содержащие капсиды AAV, кодируемые по меньшей мере одним из vp1, vp2 и vp3 любого из AAVrh.92 (SEQ ID NO: 1), AAVrh.93 (SEQ ID NO: 3) или AAVrh.91.93 (SEQ ID NO: 6). В определенных вариантах реализации изобретения vp1, vp2 и/или vp3 представляют собой полноразмерный белок капсида AAVrh.92 (SEQ ID NO: 2), AAVrh.93 (SEQ ID NO: 4) или AAVrh.91.93 (SEQ ID NO: 6). В других вариантах реализации изобретения vp1, vp2 и/или vp3 имеют усечение на N-конце и/или на C-конце (например, усечение(я) от около 1 до около 10 аминокислот).

В одном варианте реализации изобретения предложена композиция, которая содержит смешанную популяцию рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), причем каждый из указанных гAAV содержит: (а) капсид AAV, содержащий около 60 белков капсида, состоящих из белков vp1, белков vp2 и белков vp3, причем белки vp1, vp2 и vp3 представляют собой: гетерогенную популяцию белков vp1, которые продуцируются из нуклеотидной последовательности, кодирующей выбранную аминокислотную последовательность vp1 AAV, гетерогенную популяцию белков vp2, которые продуцируются из нуклеотидной последовательности, кодирующей выбранную аминокислотную последовательность vp2 AAV, гетерогенную популяцию белков vp3, которая продуцируется из нуклеотидной последовательности, кодирующей выбранную аминокислотную последовательность vp3 AAV, причем: белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в капсиде AAV, и необязательно дополнительно включают субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, при этом дезамидирование приводит к замене аминокислот; и (б) геном вектора в капсиде AAV, причем геном вектора содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и нуклеотидную последовательность, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетку-хозяина.

В определенных вариантах реализации изобретения дезамидированные аспарагины

дезамидированы до аспарагиновой кислоты, изоаспарагиновой кислоты, взаимопревращающейся пары аспарагиновой кислоты/изоаспарагиновой кислоты или их комбинаций. В определенных вариантах реализации изобретения капсид дополнительно содержит дезамидированный глутамин(ы), который дезаминирован до (α)-глутаминовой кислоты, γ -глутаминовой кислоты, взаимопревращающейся пары (α)-глутаминовой кислоты/ γ -глутаминовой кислоты или их комбинаций.

В определенных вариантах реализации изобретения предложен новый выделенный капсид AAVrh.92. Нуклеотидная последовательность, кодирующая капсид AAVrh.92, представлена в SEQ ID NO: 1, а кодирующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 2. В данном документе предложен гAAV, содержащий по меньшей мере один из vp1, vp2 и vp3 AAVrh.92 (SEQ ID NO: 2). В данном документе также предложен гAAV, содержащий капсид AAV, кодируемый по меньшей мере одним из vp1, vp2 и vp3 AAVrh.92 (SEQ ID NO: 1).

В дополнительном аспекте предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV), который содержит: (А) капсид AAVrh.92, содержащий один или более из: (1) белков капсида AAVrh.92, содержащих: гетерогенную популяцию белков vp1 AAVrh.92, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 в SEQ ID NO: 2, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 1, или белков vp1, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 из SEQ ID NO: 2, гетерогенную популяцию белков vp2 AAVrh.92, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 412 нуклеотида по 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, или белков vp2, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 2, гетерогенную популяцию белков vp3 AAVrh.92, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 589 нуклеотида по 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, или белков vp3, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 589 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 2; и/или (2) гетерогенной популяции

белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, гетерогенной популяции белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 1, и гетерогенной популяции белков vp3, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 2, и, необязательно, дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты; и (Б) геном вектора в капсиде AAVrh.92, причем геном вектора содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и нуклеотидную последовательность, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетку-хозяина.

В определенных вариантах реализации изобретения капсид AAVrh.92 содержит: гетерогенную популяцию белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, гетерогенную популяцию белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2.

В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая белок vp1 капсида AAVrh.92, представлена в SEQ ID NO: 1. В других вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность, идентичная на от 70% до 99,9% SEQ ID NO: 1, может быть выбрана для экспрессии белков капсида AAVrh.92. В других определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на от 99% до 99,9% SEQ ID NO: 1. Однако для использования в производстве капсидов гAAV могут быть выбраны другие нуклеотидные последовательности, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность, по меньшей мере на от 70% до 99,9% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует SEQ ID NO: 2. В определенных

вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность, по меньшей мере на от 70% до 99,9% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную от около 412 нт до около 2199 нт SEQ ID NO: 1, которая кодирует белок капсида vp2 (от около 138 ак до 733 ак) в SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность от около 589 нт до около 2199 нт в SEQ ID NO: 1 или последовательность, по меньшей мере на от 70% до 99,9% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную от около 589 нт до около 2199 нт SEQ ID NO: 1, которая кодирует белок капсида vp3 (от около 197 ак до 733 ак) в SEQ ID NO: 2.

Изобретение также охватывает нуклеотидные последовательности, кодирующие мутантный AAVrh.92, в которых один или более остатков были изменены для уменьшения дезамидирования, или другие модификации, идентифицированные в данном документе. Такие нуклеотидные последовательности могут использоваться для получения капсидов мутантного gAAVrh.92.

В определенных вариантах реализации изобретения предложен новый выделенный капсид AAVrh.93. Нуклеотидная последовательность, кодирующая AAV, представлена в SEQ ID NO: 3, а кодирующая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 4. В данный документ предложен gAAV, содержащий по меньшей мере один из vp1, vp2 и vp3 AAVrh.93 (SEQ ID NO: 4). В данном документе также предложен gAAV, содержащий капсид AAV, кодируемый по меньшей мере одним из vp1, vp2 и vp3 AAVrh.93 (SEQ ID NO: 3).

В дополнительном аспекте предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (gAAV), который содержит: (A) капсид AAVrh.93, содержащий один или более из: (1) белков капсида AAVrh.93, содержащих: гетерогенную популяцию белков vp1 AAVrh.93, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 728 в SEQ ID NO: 4, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 3, или белков vp1, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 3, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 728 из SEQ ID NO: 4, гетерогенную популяцию белков vp2 AAVrh.93, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, или белков vp2, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей

мере от 412 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728 аминокислоты из SEQ ID NO: 4, гетерогенную популяцию белков vp3 AAVrh.93, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 595 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, или белков vp3, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 595 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты из SEQ ID NO: 4; и/или (2) гетерогенной популяции белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, гетерогенной популяции белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728 аминокислоты из SEQ ID NO: 4, и гетерогенной популяции белков vp3, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 4, и, необязательно, дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты; и (Б) геном вектора в капсиде AAVrh.93, причем геном вектора содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и нуклеотидную последовательность, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетку-хозяина.

В определенных вариантах реализации изобретения капсид AAVrh.93 содержит: гетерогенную популяцию белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, гетерогенную популяцию белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4.

В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая белок vp1 капсида AAVrh.93, представлена в SEQ ID NO: 3. В других вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность, на от 70% до 99,9% идентичная SEQ ID NO: 3, может быть выбрана для экспрессии белков

капсида AAVrh.93. В других определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность по меньшей мере на около 75% идентична, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на от 99% до 99,9% идентична SEQ ID NO: 3. Однако для использования в производстве капсидов гAAV могут быть выбраны другие нуклеотидные последовательности, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность, по меньшей мере на от 70% до 99,9% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 3, которая кодирует SEQ ID NO: 4. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность, по меньшей мере на от 70% до 99,9% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную от около 412 нт до около 2184 нт SEQ ID NO: 3, которая кодирует белок капсида vp2 (от около 138 ак до 728 ак) в SEQ ID NO: 4. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность от около 595 нт до около 2184 нт в SEQ ID NO: 3 или последовательность по меньшей мере на от 70% до 99,9%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную от около 595 нт до около 2184 нт в SEQ ID NO: 3, которая кодирует белок капсида vp3 (от около 199 ак до 728 ак) в SEQ ID NO: 4.

Изобретение также охватывает нуклеотидные последовательности, кодирующие мутантный AAVrh.93, в которых один или более остатков были изменены для уменьшения дезамидирования, или другие модификации, идентифицированные в данном документе. Такие нуклеотидные последовательности могут использоваться для получения капсидов мутантного гAAVrh.93.

В определенных вариантах реализации изобретения предложен новый капсид AAVrh.91.93. Нуклеотидная последовательность, кодирующая AAV, представлена в SEQ ID NO: 5, а кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 6. В данном документе предложен гAAV, содержащий по меньшей мере один из vp1, vp2 и vp3 AAVrh.91.93 (SEQ ID NO: 6). В данном документе также предложен гAAV, содержащий капсид AAV, кодируемый по меньшей мере одним из vp1, vp2 и vp3 AAVrh.91.93 (SEQ ID NO: 5).

В дополнительном аспекте предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV), который содержит: (А) капсид AAVrh.91.93, содержащий один или более из: (1) белков капсида AAVrh.91.93, содержащих: гетерогенную популяцию белков vp1

AAVrh.91.93, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 в SEQ ID NO: 6, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 5, или белков vp1, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 5, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 в SEQ ID NO: 6, гетерогенную популяцию белков vp2 AAVrh.91.93, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 412 нуклеотида по 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, или белков vp2, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 6, гетерогенную популяцию белков vp3 AAVrh.91.93, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 607 нуклеотида по 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, или белков vp3, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 607 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 6; и/или (2) гетерогенной популяции белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, гетерогенной популяции белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 5, и гетерогенную популяцию белков vp3, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 6, и, необязательно, дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты; и (Б) геном вектора в капсиде AAVrh.91.93, причем геном вектора содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и нуклеотидную последовательность, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетку-хозяина.

В определенных вариантах реализации изобретения капсид AAVrh.91.93 содержит: гетерогенную популяцию белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, гетерогенную популяцию белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6.

В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая белок vp1 капсида AAVrh.91.93, представлена в SEQ ID NO: 5. В других вариантах реализации изобретения для экспрессии белков капсида AAVrh.91.93 может быть выбрана нуклеотидная последовательность, на от 70% до 99,9% идентичная SEQ ID NO: 5. В определенных других вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность по меньшей мере на около 75% идентична, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на от 99% до 99,9% идентична SEQ ID NO: 5. Однако для использования в производстве капсидов gAAV могут быть выбраны другие нуклеотидные последовательности, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, по меньшей мере на от 70% до 99,9% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 5, которая кодирует SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, по меньшей мере на от 70% до 99,9% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную от около 412 нт до около 2199 нт в SEQ ID NO: 5, которая кодирует белок капсида vp2 (от около 138 ак до 733 ак) в SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность от около 607 нт до около 2199 нт в SEQ ID NO: 5 или последовательность по меньшей мере на от 70% до 99,9%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную от около 607 нт до около 2199 нт в SEQ ID NO: 5, которая кодирует белок капсида vp3 (от около 203 ак до 733 ак) в SEQ ID NO: 6.

Изобретение также охватывает нуклеотидные последовательности, кодирующие мутантный AAVrh.91.93, в которых один или более остатков были изменены для уменьшения дезамидирования, или другие модификации, идентифицированные в данном

документе. Такие нуклеотидные последовательности могут использоваться для получения капсидов мутантного rAAVrh.91.93.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, имеющая последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 2 с модификацией (например, деамидированной аминокислотой), описанной в данном документе. В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, имеющая последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 3, которая кодирует аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 4 с модификацией (например, деамидированной аминокислотой), описанной в данном документе. В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, имеющая последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 5, которая кодирует аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 6 с модификацией (например, деамидированной аминокислотой), описанной в данном документе. В определенных вариантах реализации изобретения предложена плазида, имеющая нуклеотидную последовательность, описанную в данном документе.

Термин «существенная гомология» или «существенное сходство» применительно к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует нуклеотидная последовательность, по меньшей мере на от около 95 до 99% идентичная выровненным последовательностям. Предпочтительно гомология охватывает полноразмерную последовательность или ее открытую рамку считывания, или другой подходящий фрагмент, который имеет длину по меньшей мере 15 нуклеотидов. В данном документе описаны примеры подходящих фрагментов.

Термин «процент (%) идентичности», «идентичность последовательностей», «процент идентичности последовательностей» или «процент идентичный» в контексте нуклеотидных последовательностей относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании на соответствие. Для сравнения идентичности последовательностей может быть необходима вся длина генома, вся длина кодирующей последовательности гена, или длина фрагмента из по меньшей мере от около

500 до 5000 нуклеотидов. Однако также может быть необходима идентичность среди более мелких фрагментов, *например*, по меньшей мере около девяти нуклеотидов, как правило, по меньшей мере от около 20 до 24 нуклеотидов, по меньшей мере от около 28 до 32 нуклеотидов, по меньшей мере около 36 или более нуклеотидов.

Процент идентичности может быть легко определен для аминокислотных последовательностей по всей длине белка, полипептида, около 32 аминокислот, около 330 аминокислот или их пептидного фрагмента или соответствующих последовательностей, кодирующих нуклеотидную последовательность. Подходящий аминокислотный фрагмент может иметь длину по меньшей мере около 8 аминокислот и до около 700 аминокислот. Как правило, когда речь идет об «идентичности», «гомологии» или «схождении» между двумя разными последовательностями, «идентичность», «гомология» или «сходство» определяется в отношении «выровненных» последовательностей. «Выровненные» последовательности или «выравнивания» относятся к множественным нуклеотидным последовательностям или белковым (аминокислотным) последовательностям, часто содержащим поправки на отсутствующие или дополнительные основания, или аминокислоты по сравнению с эталонной последовательностью.

Идентичность может быть определена путем подготовки выравнивания последовательностей и использования множества алгоритмов и/или компьютерных программ, известных в данной области техники или коммерчески доступных [*например*, BLAST, ExPASy, ClustalO, FASTA; используя, *например*, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритм Смита-Ватермана]. Выравнивание выполняется с использованием любой из множества общедоступных или коммерчески доступных Программ множественного выравнивания последовательностей. Для аминокислотных последовательностей доступны программы выравнивания последовательностей, например, программы «Clustal Omega», «Clustal X», «MAP», «PIMA», «MSA», «BLOCKMAKER», «MEME» и «Match-Box». Как правило, любая из этих программ используется с настройками по умолчанию, хотя специалист в данной области техники может изменить эти настройки по мере необходимости. В альтернативном варианте специалист в данной области техники может использовать другой алгоритм или компьютерную программу, которая обеспечивает по меньшей мере уровень идентичности или выравнивания, который обеспечивается упомянутыми алгоритмами и программами. См., *например*, J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13):2682-2690 (1999).

Для нуклеотидных последовательностей также доступны программы множественного выравнивания последовательностей. Примеры таких программ включают «Clustal Omega», «Clustal W», «CAP Sequence Assembly», «BLAST», «MAP» и «MEME», которые доступны через веб-серверы в Интернете. Другие источники таких программ известны специалистам в данной области техники. В альтернативном варианте также используются утилиты Vector NTI. Также существует ряд алгоритмов, известных в данной области техники, которые могут использоваться для измерения идентичности

нуклеотидных последовательностей, включая алгоритмы, содержащиеся в программах, описанных выше. В качестве другого примера полинуклеотидные последовательности можно сравнить с помощью Fasta™, программы в GCG версии 6.1. Fasta™ обеспечивает выравнивание и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между запросной и поисковой последовательностями. Например, процент идентичности последовательностей между нуклеотидными последовательностями может быть определен с помощью Fasta™ с его параметрами по умолчанию (размер слова 6 и фактор NORAM для скоринговой матрицы), как предусмотрено в GCG версии 6.1, включенном в данный документ посредством ссылки.

Б. Композиции и векторы rAAV

В другом аспекте данного документа предложены молекулы, которые используют описанные в данном документе последовательности капсида AAV, включая их фрагменты, для продуцирования вирусных векторов, пригодных для доставки гетерологичного гена или других нуклеотидных последовательностей в клетку-мишень. В одном варианте реализации изобретения векторы, используемые в композициях и способах, описанных в данном документе, содержат, как минимум, последовательности, кодирующие выбранный капсид AAV, описанный в данном документе, например, капсид AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93 или его фрагмент. В другом варианте реализации изобретения пригодные векторы содержат, как минимум, последовательности, кодирующие белок гер выбранного серотипа AAV или его фрагмент. Необязательно, такие векторы могут содержать как белки сар AAV, так и белки гер AAV. В векторах, в которых предусмотрены как гер AAV, так и сар AAV, обе последовательности гер AAV и сар AAV могут происходить от одного серотипа, например, все происходят от AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93. В альтернативном варианте могут использоваться векторы, в которых последовательности гер взяты из AAV, который отличается от AAV дикого типа, обеспечивающего последовательности сар. В одном варианте реализации изобретения последовательности гер и сар экспрессируются из разных источников (например, отдельных векторов или клетки-хозяина и вектора). В другом варианте реализации изобретения эти последовательности гер сливаются в рамку с последовательностями сар другого серотипа AAV с образованием химерного вектора AAV, такого как AAV2/8, описанного в патенте США № 7282199, который включен в данный документ посредством ссылки. Необязательно, векторы дополнительно содержат миниген, содержащий выбранный трансген, фланкированный 5'-ИПК AAV и 3'-ИПК AAV. В другом варианте реализации изобретения AAV представляет собой самокомплементарный AAV (sc-AAV) (см. US 2012/0141422, который включен в данный документ посредством ссылки). Самокомплементарные векторы упаковывают геном с инвертированным повтором, который может складываться в дцДНК без необходимости синтеза ДНК или спаривания оснований между множественными геномами вектора. Поскольку у scAAV нет необходимости преобразовывать геном одноцепочечной ДНК (оцДНК) в двухцепочечную ДНК (дцДНК) перед экспрессией, они являются более эффективными

векторами. Однако компромиссом для этой эффективности является потеря половины кодирующей способности вектора. scAAV пригодны для небольших генов, кодирующих белок (до ~55 кДа), и любой доступной в настоящее время терапии на основе РНК.

В данном документе возможно использование псевдотипных векторов, в которых капсид одного AAV заменен гетерологичным белком капсида. В иллюстративных целях в примерах, описанных ниже, используются векторы AAV, использующие капсид AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93, описанный в данном документе, с ИКП AAV2. См. Mussolino et al., процитированный выше. Если не указано иное, ИКП AAV и другие выбранные компоненты AAV, описанные в данном документе, могут быть индивидуально выбраны из любого серотипа AAV, включая, без ограничения, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или другие известные и неизвестные серотипы AAV. В одном желательном варианте реализации изобретения используется ИКП AAV серотипа 2. Однако могут быть выбраны ИКП из других подходящих серотипов. Эти ИКП или другие компоненты AAV могут быть легко выделены с использованием методик, доступных специалистам в данной области техники, из серотипа AAV. Такой AAV может быть выделен или получен из академических, коммерческих или общедоступных источников (например, из Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния). В альтернативном варианте, последовательности AAV могут быть получены синтетическими или другими подходящими способами со ссылкой на опубликованные последовательности, такие как доступные в литературе или в базах данных, таких как, например, GenBank, PubMed и т.п.

Описанный в данном документе гAAV также содержит геном вектора. Геном вектора состоит, как минимум, из нуклеотидной последовательности, не относящейся к AAV, или гетерологичной нуклеотидной последовательности (трансгена), описанной ниже, и ее регуляторных последовательностей, а также 5' и 3' инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV. Именно этот миниген упаковывается в белок капсида и доставляется в выбранную клетку-мишень.

Трансген представляет собой нуклеотидную последовательность, гетерологичную векторным последовательностям, фланкирующим трансген, который кодирует полипептид, белок или другой представляющий интерес продукт. Кодирующая нуклеотидная последовательность функционально связана с регуляторными компонентами способом, который обеспечивает транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию трансгена в клетке-мишени. Гетерологичная нуклеотидная последовательность (трансген) может быть получена из любого организма. AAV может содержать один или более трансгенов.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен вектор AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93, который содержит трансген, содержащий последовательность, кодирующую эритропоэтин (ЭПО). В определенных вариантах реализации изобретения трансген кодирует собачий или кошачий ген ЭПО. Такие рекомбинантные векторы подходят, например, для использования в схеме лечения

хронического заболевания почек и других состояний у субъекта, характеризующихся уменьшением количества циркулирующих эритроцитов.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен вектор AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93, который содержит трансген, содержащий последовательность, кодирующую антитело- против фактора роста нервов (ФРН). В определенных вариантах реализации изобретения трансген кодирует анти-ФРН антитело собаки или кошки. Такие рекомбинантные векторы подходят, например, для использования в схеме лечения боли при остеоартрите у субъекта.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен вектор AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93, который содержит трансген, содержащий последовательность, кодирующую антитело- против фактора роста нервов (ФРН). В определенных вариантах реализации изобретения трансген кодирует анти-ФРН антитело собаки или кошки. Такие рекомбинантные векторы подходят, например, для использования в схеме лечения боли при остеоартрите у субъекта.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен вектор AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93, который содержит трансген, содержащий последовательность, кодирующую глюкагоноподобный пептид 1 (ГПП-1). В определенных вариантах реализации изобретения трансген кодирует собачий или кошачий ГПП-1. Такие рекомбинантные векторы подходят, например, для использования в схеме лечения диабета типа 2 у субъекта.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен вектор AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93, который содержит трансген, содержащий последовательность, кодирующую глюкагоноподобный пептид 1 (ГПП-1). В определенных вариантах реализации изобретения трансген кодирует собачий или кошачий ГПП-1. Такие рекомбинантные векторы подходят, например, для использования в схеме лечения диабета типа 2 у субъекта.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен вектор AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93, который содержит трансген, содержащий последовательность, кодирующую инсулин. В определенных вариантах реализации изобретения трансген кодирует собачий или кошачий инсулин. Такие рекомбинантные векторы подходят, например, для использования в схеме лечения диабета типа 1 или диабета типа 2 у субъекта.

В данном документе, в определенных вариантах реализации изобретения предложен вектор AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93, который содержит трансген, содержащий последовательность, кодирующую антагонист IgE, ИЛ-32 или субъединицу альфа рецептора интерлейкина-4 (ИЛ-4R α) рецепторов ИЛ-4/ИЛ-13, включая, например, антитела и слитые белки рецептора IgG. В определенных вариантах реализации изобретения трансген кодирует антагонист субъединицы IgE, ИЛ-32 или ИЛ-4R α собаки или кошки. Такие рекомбинантные векторы подходят, например, для использования в схеме лечения атопического дерматита у субъекта.

Композиция трансгенной последовательности будет зависеть от использования полученного вектора. Например, один тип трансгенной последовательности содержит репортерную последовательность, которая при экспрессии дает обнаруживаемый сигнал. Такие репортерные последовательности включают, без ограничения, последовательности ДНК, кодирующие β -лактамазу, β -галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный GFP (EGFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), люциферазу, мембраносвязанные белки, включая, например, CD2, CD4, CD8, белок гемагглютинин гриппа и другие, хорошо известные в данной области техники, к которым существуют или могут быть получены традиционными способами антитела с высоким сродством, направленные на них, и слитые белки, содержащие мембраносвязанный белок, соответствующим образом слитый с доменом антигенной метки из, среди прочего, гемагглютинина или Мус.

Эти кодирующие последовательности, когда они связаны с регуляторными элементами, которые управляют их экспрессией, обеспечивают сигналы, обнаруживаемые традиционными средствами, включая ферментные, радиографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы, анализы сортировки флуоресцентных активирующих клеток и иммунологические анализы, включая ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (РИА) и иммуногистохимию. Например, если маркерной последовательностью является ген LacZ, присутствие вектора, несущего сигнал, обнаруживают с помощью анализов на активность бета-галактозидазы. Если трансген представляет собой зеленый флуоресцентный белок или люциферазу, вектор, несущий сигнал, можно измерить визуально по цвету или световому излучению в люминометре.

Однако желательно, чтобы трансген представлял собой немаркерную последовательность, кодирующую продукт, который используется в биологии и медицине, такой как белки, пептиды, РНК, ферменты, доминантно-отрицательные мутанты или каталитические РНК. Желательные молекулы РНК включают тРНК, дцРНК, рибосомную РНК, каталитические РНК, миРНК, малую шпилечную РНК, РНК транс-сплайсинга и антисмысловые РНК. Одним из примеров пригодной последовательности РНК является последовательность, которая ингибирует или подавляет экспрессию нацеленной нуклеотидной последовательности у животного, подвергнутого лечению. Как правило, подходящие последовательности-мишени включают онкологические мишени и вирусные заболевания. Для примеров таких мишеней см. онкологические мишени и вирусы, указанные ниже в разделе, касающемся иммуногенов.

Трансген может использоваться для исправления или ослабления недостатков генов, которые могут включать недостатки, при которых нормальные гены экспрессируются на уровне ниже нормального, или недостатки, при которых продукт функционального гена не экспрессируется. В альтернативном варианте трансген может обеспечивать клетку продуктом, который не экспрессируется в нативном виде в клетках этого типа или в хозяине. Предпочтительный тип трансгенной последовательности

кодирует терапевтический белок или полипептид, который экспрессируется в клетке-хозяине. Изобретение также включает использование множества трансгенов. В определенных ситуациях может использоваться другой трансген для кодирования каждой субъединицы белка или для кодирования разных пептидов или белков. Это желательно, когда размер ДНК, кодирующей субъединицу белка, велик, *например*, для иммуноглобулина, тромбоцитарного фактора роста или белка дистрофина. Чтобы клетка вырабатывала мультисубъединичный белок, клетку инфицируют рекомбинантным вирусом, содержащим каждую из различных субъединиц. В альтернативном варианте разные субъединицы белка могут кодироваться одним и тем же трансгеном. В этом случае единственный трансген содержит ДНК, кодирующую каждую из субъединиц, причем ДНК для каждой субъединицы разделена внутренним сайтом входа в рибосомы (IRES). Это желательно, когда размер ДНК, кодирующей каждую из субъединиц, невелик, *например*, общий размер ДНК, кодирующей субъединицы, и IRES, составляет менее пяти килобаз. В альтернативном к IRES варианту ДНК может быть разделена последовательностями, кодирующими пептид 2A, который саморасщепляется в результате посттрансляционного события. См., *например*, M.L. Donnelly, et al, J. Gen. Virol., 78(Pt 1):13-21 (Jan 1997); Furler, S., et al, Gene Ther., 8(11):864-873 (June 2001); Klump H., et al., Gene Ther., 8(10):811-817 (May 2001). Этот пептид 2A значительно меньше, чем IRES, что делает его подходящим для использования, когда ограничивающим фактором является пространство. Чаще, когда трансген является большим, состоит из мульти-субъединиц или два трансгена доставляются совместно, совместно вводят гAAV, несущие целевой трансген(ы) или субъединицы, чтобы позволить им конкатамеризоваться *in vivo* с образованием единичного геном вектора. В таком варианте реализации изобретения первый AAV может нести кассету экспрессии, которая экспрессирует единичный трансген, а второй AAV может нести кассету экспрессии, которая экспрессирует другой трансген для совместной экспрессии в клетке-хозяине. Однако выбранный трансген может кодировать любой биологически активный продукт или другой продукт, *например*, продукт, необходимый для исследования.

Примеры подходящих трансгенов или генных продуктов включают те, которые связаны с семейной гиперхолестеринемией, мышечной дистрофией, кистозным фиброзом и редкими или орфанными заболеваниями. Примеры такого редкого заболевания могут включать спинальную мышечную атрофию (СМА), болезнь Хантингтона, синдром Ретта (*например*, метил-СрG-связывающий белок 2 (MeCP2); UniProtKB - P51608), боковой амиотрофический склероз (БАС), мышечную дистрофию Дюшенна, атаксию Фридрикса (*например*, фратаксин), АТХN2, связанный со спиноцеребеллярной атаксией 2 типа (SCA2)/БАС; TDP-43, связанный с БАС, програнулин (ПРГН) (связанный с церебральными дегенерациями, не связанными с болезнью Альцгеймера, включая лобно-височную деменцию (ЛВД), прогрессирующую нелегкую афазию (ПНДА) и семантическую деменцию) и другие. См., *например*, www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php; rarediseases.info.nih.gov/diseases.

Полезные терапевтические продукты, кодируемые трансеном, включают гормоны и факторы роста и дифференциации, включая, без ограничения, инсулин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид 1 (ГПП-1), гормон роста (ГР), паратиреоидный гормон (ПТГ), фактор высвобождения гормона роста (ФВГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), хорионический гонадотропин человека (чХГ), фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиопоэтины, ангиостатин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), эритропоэтин (ЭПО), фактор роста соединительной ткани (ФРСТ), основной фактор роста фибробластов (оФРФ), кислотный фактор роста фибробластов (кФРФ), эпидермальный фактор роста (ЭФР), трансформирующий фактор роста α (ТФР α), фактор роста тромбоцитов (ФРТ), факторы роста инсулина I и II (ФРИ-I и ФРИ-II), любой из суперсемейства трансформирующих факторов роста β , включая ТФР β , активины, ингибины или любой из КМБ 1-15 костных морфогенных белков (КМБ), любой из семейства факторов дифференцировки херегулина/нейрегулина/ARIA/neu (ФД), фактор роста нервов (ФРН), нейротрофический фактор головного мозга (НФГМ), нейротрофины НТ-3 и НТ-4/5, цилиарный нейротрофический фактор (ЦНТФ), нейротрофический фактор, полученный из линии глиальных клеток (ГНФ), нейрурин, агрин, любой из семейства семафоринов/коллапсинов, нетрин-1 и нетрин-2, фактор роста гепатоцитов (ФРГ), эфрины, ноггин, sonic hedgehog и тирозингидроксилаза.

Другие полезные трансгенные продукты включают белки, которые регулируют иммунную систему, включая, без ограничений, цитокины и лимфокины, такие как тромбопоэтин (ТПО), интерлейкины (ИЛ), от ИЛ-1 до ИЛ-25 (включая, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12 и ИЛ-18), моноцитарный хемоаттрактантный белок, фактор ингибирования лейкемии, фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов-макрофагов, лиганд Fas, факторы некроза опухоли α и β , интерфероны α , β и γ , фактор стволовых клеток, лиганд flk-2/flt3. В изобретении также могут использоваться генные продукты, продуцируемые иммунной системой. К ним относятся, без ограничений, иммуноглобулины IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, химерные иммуноглобулины, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, рецепторы Т-клеток, химерные рецепторы Т-клеток, одноцепочечные рецепторы Т-клеток, молекулы МНС класса I и класса II, а также сконструированные иммуноглобулины и молекулы ГКГ. Пригодные генные продукты также включают регуляторные белки системы комплемента, такие как регуляторные белки системы комплемента, белок мембранного кофактора (МКБ), фактор ускорения распада (ФУР), CR1, CF2 и CD59.

Другие пригодные генные продукты включают любой из рецепторов гормонов, факторов роста, цитокинов, лимфокинов, регуляторных белков и белков иммунной системы. Изобретение охватывает рецепторы для регуляции холестерина, включая рецептор липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), рецептор липопротеинов высокой плотности (ЛПВ), рецептор липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП) и фагоцитарный рецептор. Изобретение также охватывает генные продукты, такие как

члены суперсемейства рецепторов стероидных гормонов, включая рецепторы глюкокортикоидов и рецепторы эстрогенов, рецепторы витамина D и другие ядерные рецепторы. Кроме того, пригодные генные продукты включают факторы транскрипции, такие как *jun*, *fos*, *max*, *mad*, фактор сывороточного ответа (ФСО), AP-1, AP2, *myb*, *MyoD* и миогенин, белки, содержащие ETS-бокс, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, белки, связывающие CCAAT-бокс, фактор регуляции интерферона (ФРИ-1), опухолевый белок Вильмса, ETS-связывающий белок, STAT, белки, связывающие GATA-бокс, например, GATA-3, и семейство белков крылатой спирали из семейства forkhead.

Другие пригодные генные продукты включают карбамоилсинтетазу I, орнитинтранскарбамилазу, аргиносукцинатсинтетазу, аргиносукцинатлиазу, аргиназу, фумарилацетатгидролазу, фенилаланингидроксилазу, альфа-1-антитрипсин, глюкозо-6-фосфатазу, порфобилиногендезаминазу, фактор VIII, фактор IX, цистатионин-бета-синтазу, декарбоксилазу кетокислоты с разветвленной цепью, альбумин, изовалерил-КоА-дегидрогеназу, пропионил-КоА-карбоксилазу, метилмалонил-КоА-мутазу, глутарил-КоА-дегидрогеназу, инсулин, бета-глюкозидазу, пируваткарбоксилат, печеночную фосфорилазу, киназу фосфорилазы, глициндекарбоксилазу, белок H, белок T, последовательность трансмембранного регулятора кистозного фиброза (ТРКФ) и последовательность дистрофина или ее функциональный фрагмент. Другие пригодные генные продукты включают ферменты, которые могут быть полезны в заместительной ферментной терапии, которая полезна при различных состояниях, возникающих в результате недостаточной активности фермента. Например, ферменты, содержащие маннозо-6-фосфат, могут использоваться в терапии лизосомных болезней накопления (например, подходящий ген включает ген, который кодирует β -глюкуронидазу (GUSB)). В другом примере генный продукт представляет собой убиквитин протеинлигазу E3A (UBE3A). Также пригодные генные продукты включают член A1 семейства УДФ-глюкуронозилтрансфераз 1 (UGT1A1).

Другие пригодные генные продукты включают неприродные полипептиды, такие как химерные или гибридные полипептиды, имеющие неприродную аминокислотную последовательность, содержащую вставки, делеции или аминокислотные замены. Например, одноцепочечные сконструированные иммуноглобулины могут быть пригодны для некоторых пациентов с ослабленным иммунитетом. Другие типы неприродных генных последовательностей включают антисмысловые молекулы и каталитические нуклеиновые кислоты, такие как рибозимы, которые можно использовать для снижения сверхэкспрессии мишени.

Снижение и/или модуляция экспрессии гена особенно желательны для лечения гиперпролиферативных состояний, характеризующихся гиперпролиферирующими клетками, например, рака и псориаза. Полипептиды-мишени включают те полипептиды, которые продуцируются исключительно или на более высоких уровнях в гиперпролиферативных клетках по сравнению с нормальными клетками. Антигены-

мишени включают полипептиды, кодируемые онкогенами, такими как *myb*, *myc*, *fun*, и ген транслокации *bcr/abl*, *ras*, *src*, *P53*, *neu*, *trk* и РЭФР. В дополнение к онкогенным продуктам в качестве антигенов-мишеней полипептиды-мишени для противоракового лечения и режимов защиты включают переменные области антител, продуцируемых В-клеточными лимфомами, и переменные области Т-клеточных рецепторов Т-клеточных лимфом, которые в некоторых вариантах реализации изобретения также используются в качестве антигенов-мишеней при аутоиммунном заболевании. Другие ассоциированные с опухолью полипептиды могут использоваться в качестве полипептидов-мишеней, таких как полипептиды, которые обнаруживаются в более высоких уровнях в опухолевых клетках, включая полипептид, распознаваемый моноклональным антителом 17-1А, и полипептиды, связывающие фолат.

Другие подходящие терапевтические полипептиды и белки включают те, которые могут быть пригодны для лечения индивидуумов, страдающих аутоиммунными заболеваниями и расстройствами, путем обеспечения широкого защитного иммунного ответа против мишеней, которые связаны с аутоиммунитетом, включая клеточные рецепторы и клетки, которые продуцируют самонаправленные антитела. Аутоиммунные заболевания, опосредованные Т-клетками, включают ревматоидный артрит (РА), рассеянный склероз (РС), синдром Шегрена, саркоидоз, инсулинозависимый сахарный диабет (ИЗСД), аутоиммунный тиреоидит, реактивный артрит, анкилозирующий спондилит, склеродермию, полимиозит, дерматомиозит, псориаз, васкулит, гранулематоз Вегенера, болезнь Крона и язвенный колит. Каждое из этих заболеваний характеризуется рецепторами Т-клеток (ТКР), которые связываются с эндогенными антигенами и инициируют воспалительный каскад, связанный с аутоиммунными заболеваниями.

Другие пригодные генные продукты включают те, которые используются для лечения гемофилии, включая гемофилию В (включая фактор IX) и гемофилию А (включая фактор VIII и его варианты, такие как легкая цепь и тяжелая цепь гетеродимера и В-удаленный домен; патент США № 6200560 и патент США № 6221349). В некоторых вариантах реализации изобретения миниген содержит первые 57 пар оснований тяжелой цепи фактора VIII, которая кодирует сигнальную последовательность из 10 аминокислот, а также последовательность полиаденилирования гормона роста человека (чГР). В альтернативных вариантах реализации изобретения миниген дополнительно содержит домены A1 и A2, а также 5 аминокислот от N-конца В-домена и/или 85 аминокислот на С-конце В-домена, а также домены A3, C1 и C2. В других вариантах реализации изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь фактора VIII, представлены в единичном минигене, разделенном 42 нуклеиновыми кислотами, кодирующими 14 аминокислот домена В [патент США № 6200560].

Дополнительные иллюстративные гены, которые могут доставляться посредством гААV, включают, без ограничения, глюкозо-6-фосфатазу, связанную с заболеванием накопления гликогена или дефицитом типа 1А (GSD1), фосфоенолпируват-

карбоксикиназу (ФЕПМК), связанную с дефицитом ФЕПМК; циклин-зависимую киназу 5 (CDKL5), также известную как серин/треониновая киназа 9 (STK9), связанную с припадками и тяжелыми нарушениями развития нервной системы; галактозо-1-фосфатуридилтрансферазу, связанную с галактоземией; фенилаланингидроксилазу (ФАГ), связанную с фенилкетонурией (ФКУ); генные продукты, связанные с первичной гипероксалурией типа 1, включая гидроксикислотную оксидазу 1 (GO/HAO1) и AGXT, альфа-кетокислотную дегидрогеназу с разветвленной цепью, включая BCKDH, BCKDH-E2, BAKDH-E1a и BAKDH-E1b, связанную с болезнью мочи с запахом кленового сиропа; фумарилацетоацетатгидролазу, связанную с тирозинемией 1 типа; метилмалонил-КоА-мутазу, связанную с метилмалоновой ацидезией; ацил-КоА-дегидрогеназу со средней длиной цепи, связанную с дефицитом ацил-КоА со средней длиной цепи; орнитин-транскарбамилазу (ОТК), связанную с дефицитом орнитин-транскарбамилазы; синтетазу аргининоянтарной кислоты (ASS1), связанную с цитруллинемией; дефицит лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ); аметилмалоновую ацидезию (ММА); NPC1, связанный с болезнью Ниманна-Пика типа C1; пропионовую ацидезию (ПА); TTR, связанный с наследственным амилоидозом, связанный с транстиретином (TTR); белок рецептора липопротеинов низкой плотности (РЛНП), связанный с семейной гиперхолестеринемией (СГ), вариант РЛНП, такой как описанный в WO 2015/164778; PCSK9; белки ApoE и ApoC, связанные с деменцией; УДФ-глюкуронозилтрансферазу, ассоциированную с болезнью Криглера-Наджара; аденозиндезаминазу, связанную с тяжелым комбинированным иммунодефицитным заболеванием; гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу, связанную с подагрой и синдромом Леша-Нааяна; биотимидазу, связанную с дефицитом биотимидазы; альфа-галактозидазу A (a-Gal A), связанную с болезнью Фабри; бета-галактозидазу (GLB1), связанную с ганглиозидозом GM1; ATR7B, связанный с болезнью Вильсона; бета-глюкоцереброзидазу, связанную с болезнью Гоше 2 и 3 типа; белок пероксисомной мембраны 70 кДа, связанный с синдромом Зеллвегера; арилсульфатазу A (ARSA), связанную с метакроматической лейкодистрофией, фермент галактоцереброзидазы (GALC), связанный с болезнью Краббе, альфа-глюкозидазу (GAA), связанную с болезнью Помпе; ген сфингомиелиназы (SMPD1), ассоциированный с болезнью Нимана-Пика типа A; аргининосукцинатсинтазу, связанную с цитруллинемией типа II у взрослых (CTLN2); карбамоилфосфатсинтазу 1 (CPS1), связанную с нарушениями цикла мочевины; белок выживания моторного нейрона (SMN), связанный со спинальной мышечной атрофией; церамидазу, связанную с липогранулематозом Фарбера; b-гексозаминидазу, связанную с ганглиозидозом GM2 и болезнями Тея-Сакса и Сандхоффа; аспартилглюкозаминидазу, связанную с аспартил-глюкозаминурией; α-фукозидазу, связанную с фукозидозом; альфа-маннозидазу, связанную с альфа-маннозидозом; порфобилиногендеаминазу, связанную с острой перемежающейся порфирией (ОПП); альфа-1-антитрипсин для лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (эмфиземы); эритропоэтин для лечения анемии, вызванной талассемией или почечной недостаточностью; фактор роста эндотелия сосудов,

ангиопоэтин-1 и фактор роста фибробластов для лечения ишемических заболеваний; тромбомодулин и ингибитор пути тканевого фактора для лечения закупоренных кровеносных сосудов, например, при атеросклерозе, тромбозе или эмболиях; декарбоксилазу ароматических аминокислот (AADC) и тирозингидроксилазу (TH) для лечения болезни Паркинсона; бета-адренергический рецептор, анτισмысловый к фосфоламбану или его мутантную форму, аденозинтрифосфатазу-2 сарко(эндо)плазматического ретикулума (SERCA2) и сердечную аденилатциклазу для лечения застойной сердечной недостаточности; ген-супрессор опухоли, такой как p53, для лечения различных видов рака; цитокин, такой как один из различных интерлейкинов, для лечения воспалительных и иммунных нарушений и рака; дистрофин или минидистрофин и утрофин или миниутрофин для лечения мышечных дистрофий; и инсулин или ГПП-1 для лечения диабета.

В альтернативном или дополнительном варианте, векторы по изобретению могут содержать последовательности AAV по изобретению и трансген, кодирующий пептид, полипептид или белок, который индуцирует иммунный ответ на выбранный иммуноген. Например, иммуногены могут быть выбраны из множества семейств вирусов. Примеры целевых семейств вирусов, против которых был бы желателен иммунный ответ, включают семейство пикорнавирусов, которое включает роды риновирусов, которые являются причиной около 50% случаев простуды; роды энтеровирусов, которые включают полиовирусы, вирусы Коксаки, эховирусы и энтеровирусы человека, такие как вирус гепатита А; и роды аптовиров, которые вызывают ящур, в первую очередь у нечеловеческих животных. В семействе пикорнавирусов антигены-мишени включают VP1, VP2, VP3, VP4 и VPG. Другое семейство вирусов включает семейство кальцивирусов, которое включает группу вирусов Норуолк, которые являются важным возбудителем эпидемического гастроэнтерита. Еще одним семейством вирусов, желательным для использования при нацеливании на антигены для индукции иммунных ответов у людей и нечеловеческих животных, является семейство тогавирусов, которое включает роды альфавирусов, которые включают вирусы Синдбис, вирус Росс-Ривер и венесуэльский, восточный и западный энцефалит лошадей, и рубивирус, в том числе вирус краснухи. Семейство *flaviviridae* включает вирусы денге, желтой лихорадки, японского энцефалита, энцефалита Сент-Луиса и клещевого энцефалита. Другие антигены-мишени могут быть получены из семейства гепатита С или коронавируса, которое включает ряд вирусов, не относящихся к человеку, таких как вирус инфекционного бронхита (домашней птицы), вирус, передаваемый через желудочно-кишечный тракт свиней (свиньи), вирус гемагглютинирующего энцефаломиеелита свиней (свиньи), вирус инфекционного перитонита кошачьих (кошки), кишечный коронавирус кошек (кошка), коронавирус собак (собака) и респираторный коронавирус человека, которые могут вызывать простуду и/или гепатит, не относящийся к типам А, В или С. В семействе коронавирусов антигены-мишени включают гликопротеин Е1 (также именуемый М или матриксным белком), Е2 (также именуемый S или спайковым белком),

ЕЗ (также именуемый НЕ или гемагглютинин-элитерозой) (присутствует не во всех коронавирусах) или N (нуклеокапсид). Другие антигены могут быть нацелены против семейства рабдовирусов, которое включает род везикуловирусов (например, вирус везикулярного стоматита) и род лиссавирусов (например, бешенство). В семействе рабдовирусов подходящие антигены могут происходить из G-белка или N-белка. Семейство *filoviridae*, которое включает вирусы геморрагической лихорадки, такие как вирус Марбург и Эбола, может быть подходящим источником антигенов. Семейство парамиксовирусов включает вирус парагриппа типа 1, вирус парагриппа типа 3, вирус парагриппа крупного рогатого скота типа 3, рубулавирус (вирус паротита, вирус парагриппа типа 2, вирус парагриппа типа 4, вирус болезни Ньюкасла (цыпльята), чуму крупного рогатого скота, морбилливирус, который включает корь и чумку собак, и пневмовирус, который включает респираторно-синцитиальный вирус. Вирус гриппа относится к семейству ортомиксовирусов и является подходящим источником антигена (например, белка НА, белка N1). Семейство буньявирусов включает роды буньявирусов (калифорнийский энцефалит, Ла-Кросс), флебовирусов (лихорадка Рифт-Валли), хантавирусов (пуремала - вирус гемахагиновой лихорадки), найровирусов (болезнь овец Найроби) и различные необозначенные буньявирусы. Семейство аренавирусов является источником антигенов против ЛХМ и вируса лихорадки Ласса. Семейство реовирусов включает роды реовирусов, ротавирусов (вызывающих острый гастроэнтерит у детей), орбивирусов и культивируемых (колорадскую клещевую лихорадку, лебомбо (людей), конский энцефалез, синий язык).

Семейство ретровирусов включает подсемейство *oncorivirinal*, которое включает такие заболевания человека и животных, как вирус лейкемии кошек, ТЛВЧ I и ТЛВЧ II, *lentivirinal* (который включает вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус иммунодефицита обезьян (ВИО), вирус иммунодефицита кошек (ВИК), вирус инфекционной анемии лошадей) и *spumavirinal*. Между ВИЧ и ВИО описано много подходящих антигенов, которые можно легко выбрать. Примеры подходящих антигенов ВИЧ и ВИО включают, без ограничения, белки gag, pol, Vif, Vpr, VPR, Env, Tat и Rev, а также их различные фрагменты. Кроме того, описаны различные модификации этих антигенов. Подходящие антигены для этой цели известны специалистам в данной области техники. Например, среди других белков, можно выбрать последовательность, кодирующую gag, pol, Vif и Vpr, Env, Tat и Rev. См., например, модифицированный белок gag, который описан в патенте США US 5972596. См. также белки ВИЧ и ВИО, описанные в D.H. Barouch et al, J. Virol., 75(5):2462-2467 (March 2001) и R.R. Amara, et al, Science, 292:69-74 (6 April 2001). Эти белки или их субъединицы могут быть доставлены по отдельности или в комбинации через отдельные векторы или из одного вектора.

Семейство паповавирусов включает подсемейства полиомавирусов (вирусы ВК и JC) и подсемейства папилломавирусов (связанные с раком или злокачественным прогрессированием папилломы). Семейство аденовирусов включает вирусы (EX, AD7, ARD, O.B.), которые вызывают респираторные заболевания и/или энтерит. Семейство

парвовирусов: парвовирус кошек (энтерит кошек), вирус панлейкопении кошек, парвовирус собак и парвовирус свиней. Семейство герпесвирусов включает подсемейство *alphaherpesvirinae*, которое включает вирусы рода симплекс (HSV1, HSV2), варицелловирус (псевдобешенство, ветряная оспа) и подсемейство *betaherpesvirinae*, которое включает роды цитомегаловирусов (HCMV, муромегаловирус), и подсемейство *gammaherpesvirinae*, которое включает роды лимфокриптовирусов, EBV (лимфома Беркитса), инфекционный ринотрахеит, вирус болезни Марека и радиовирус. Семейство поксвирусов включает подсемейство *chordoroxvirinae*, которое включает роды ортопоксвирусов (вариола (натуральная оспа) и вакциния (коровья оспа)), парапоксвирусов, авипоксвирусов, каприпоксвирусов, лепорипоксвирусов, супоксвирусов и подсемейство *entomoroxvirinae*. Семейство гепаднавирусов включает вирус гепатита В. Одним из неклассифицированных вирусов, который может быть подходящим источником антигенов, является вирус гепатита дельта. Другие источники вирусов могут включать вирус инфекционной бурсальной болезни птиц и вирус респираторного и репродуктивного синдрома свиней. Семейство альфавирусов включает вирус артериита лошадей и различные вирусы энцефалита.

Данное изобретение может также охватывать иммуногены, полезные для иммунизации человека или нечеловеческого животного против других патогенов, включая бактерии, грибы, паразитические микроорганизмы или многоклеточные паразиты, которые инфицируют человека и нечеловеческих позвоночных, или против раковых клеток или опухолевых клеток. Примеры бактериальных патогенов включают патогенные грамположительные кокки, включая пневмококки; стафилококки; и стрептококки. Патогенные грамотрицательные кокки включают менингококк и гонококк. Патогенные кишечные грамотрицательные палочки включают энтеробактерии; псевдомонады, ацинетобактерии и эйкенеллы; мелиоидоз; сальмонеллу; шигеллу; гемофильную палочку; моракселлу; *H. ducreyi* (вызывающий шанкроид); бруцеллу; *Francisella tularensis* (вызывающий туляремию); иерсинию (пастереллу); *Streptobacillus moniliformis* и *Spirillum*; грамположительные бациллы включают *Listeria monocytogenes*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Коринебактерии дифтерии* (дифтерии); холеру; *B. anthracis* (сибирскую язву); донованоз (паховую гранулему); и бартонеллез. Заболевания, вызываемые патогенными анаэробными бактериями, включают столбняк; ботулизм; другие клостридии; туберкулез; проказу; и другие микобактерии. Патогенные спирохетальные заболевания включают сифилис; трепонематозы: фрамбезию, пинту и эндемический сифилис; и лептоспироз. Другие инфекции, вызываемые бактериями высших патогенов и патогенными грибами, включают актиномикоз; нокардиоз; криптококкоз, бластомикоз, гистоплазмоз и кокцидиоидомикоз; кандидоз, аспергиллез и мукормикоз; споротрихоз; паракокцидиоидомикоз, петриеллидиоз, торулопсоз, мицетому и хромомикоз; и дерматофитии. Риккетсиозные инфекции включают сыпной тиф, пятнистую лихорадку Скалистых гор, Ку-лихорадку и риккетсиоз. Примеры микоплазм и хламидийных инфекций включают: *Mycoplasma pneumoniae*; венерическую лимфогранулему; орнитоз; и

перинатальные хламидийные инфекции. Патогенные эукариоты включают патогенных простейших и гельминтов, а вызываемые ими инфекции включают: амебиаз; малярию; лейшманиоз; трипаносомоз; токсоплазмоз; *Pneumocystis carinii*; *Trichans*; *Toxoplasma gondii*; бабезиоз; лямблиоз; трихинеллез; филяриоз; шистосомоз; нематоды; трематоды или сосальщики; и цестодные (ленточные) инфекции.

Многие из этих организмов и/или продуцируемых ими токсинов были идентифицированы Центрами по контролю за заболеваниями [(ЦКЗ), Департамент здравоохранения и социальных служб, США] как агенты, которые могут быть использованы при биологических атаках. Например, некоторые из этих биологических агентов включают *Bacillus anthracis* (сибирскую язву), *Clostridium botulinum* и его токсин (ботулизм), *Yersinia pestis* (чума), натуральную оспу (оспу), *Francisella tularensis* (туляремию) и вирусную геморрагическую лихорадку, все из которых в настоящее время классифицируются как агенты категории А; *Coxiella burnetii* (Ку-лихорадку); виды *Brucella* (бруцеллез), *Burkholderia mallei* (сип), *Ricinus communis* и его токсин (токсин рицина), *Clostridium perfringens* и его токсин (эпсилон-токсин), виды *Staphylococcus* и их токсины (энтеротоксин В), все из которых в настоящее время классифицируются как агенты категории В; и вирус Нипан и хантавирусы, которые в настоящее время классифицируются как агенты категории С. Кроме того, другие организмы, которые классифицируются таким же образом или классифицируются иным образом, могут быть идентифицированы и/или использованы для такой цели в будущем. Легко понять, что вирусные векторы и другие конструкции, описанные в данном документе, пригодны для доставки антигенов от этих организмов, вирусов, их токсинов или других побочных продуктов, что будет предотвращать и/или лечить инфекцию или другие неблагоприятные реакции с этими биологическими агентами.

Введение векторов по изобретению для доставки иммуногенов против варибельной области Т-клеток вызывает иммунный ответ, включая ЦТЛ, для устранения этих Т-клеток. При ревматоидном артрите (РА) охарактеризовано несколько специфических варибельных областей рецепторов Т-клеток (РТК), которые вовлечены в заболевание. Эти РТК включают V-3, V-14, V-17 и V α -17. Таким образом, доставка нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один из этих полипептидов, вызовет иммунный ответ, который будет нацеливаться на Т-клетки, участвующие в РА. При рассеянном склерозе (РС) охарактеризовано несколько специфических варибельных областей РТК, которые вовлечены в заболевание. Эти РТК включают V-7 и V α -10. Таким образом, доставка нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один из этих полипептидов, вызовет иммунный ответ, который будет нацеливаться на Т-клетки, участвующие в РС. При склеродермии охарактеризовано несколько специфических варибельных областей РТК, которые вовлечены в заболевание. Эти РТК включают V-6, V-8, V-14 и V α -16, V α -3C, V α -7, V α -14, V α -15, V α -16, V α -28 и V α -12. Таким образом, доставка нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один из этих полипептидов, вызовет иммунный ответ,

который будет нацеливаться на Т-клетки, участвующие в склеродермии.

В одном варианте реализации изобретения трансген выбирают для обеспечения оптогенетической терапии. В оптогенетической терапии искусственные фоторецепторы конструируются путем доставки генов по активируемому светом каналам или насосам к выжившим типам клеток в оставшемся контуре сетчатки. Это особенно полезно для пациентов, которые потеряли значительную часть функции фоторецепторов, но чьи биполярные клеточные цепи к ганглиозным клеткам и зрительному нерву остаются нетронутыми. В одном варианте реализации изобретения гетерологичная нуклеотидная последовательность (трансген) представляет собой опсин. Последовательность опсина может быть получена из любого подходящего одно- или многоклеточного организма, включая человека, водоросли и бактерии. В одном варианте реализации изобретения опсин представляет собой родопсин, фотоопсин, опсин с длинной/средней длиной волны (красный/зеленый) или опсин с короткой длиной волны (синий). В другом варианте реализации изобретения опсин представляет собой канальный родопсин и галородопсин.

В другом варианте реализации изобретения трансген выбирают для использования в терапии по увеличению гена, то есть для предоставления замещающей копии гена, который отсутствует или является дефектным. В этом варианте реализации изобретения трансген может быть легко выбран специалистом в данной области техники для обеспечения необходимого замещающего гена. В одном варианте реализации изобретения отсутствующий/дефектный ген связан с глазным заболеванием. В другом варианте реализации изобретения трансген представляет собой NYX, GRM6, TRPM1L или GPR179, а глазное заболевание представляет собой врожденную стационарную ночную слепоту. См., например, Zeitz et al, *Am J Hum Genet.* 2013-15, 1092 or 67-75 Epub 2012 Dec 13, которые включены в данный документ посредством ссылки. В другом варианте реализации изобретения трансген представляет собой регулятор GTPase X-хромосомного пигментного ретинита (RPGR).

В другом варианте реализации изобретения трансген выбирают для использования в терапии подавления генов, т.е. экспрессия одного или более нативных генов прерывается или подавляется на уровне транскрипции или трансляции. Это может быть достигнуто с использованием короткой шпилечной РНК (кшРНК) или других методик, хорошо известных в данной области техники. См., например, Sun et al, *Int J Cancer.* 2010 Feb 1;126(3):764-74 и O'Reilly M, et al. *Am J Hum Genet.* 2007 Jul;81(1):127-35, которые включены в данный документ посредством ссылки. В этом варианте реализации изобретения трансген может быть легко выбран специалистом в данной области техники на основе гена, который желательно заглушить.

В другом варианте реализации изобретения трансген включает более одного трансгена. Это может быть выполнено с использованием единичного вектора, несущего две или более гетерологичных последовательностей, или с использованием двух или более AAV, каждый из которых несет одну или более гетерологичных последовательностей. В одном варианте реализации изобретения AAV используется для

совместной терапии генного подавления (или нокдауна) и увеличения гена. При совместной терапии «нокдауна»/«увеличения» дефектная копия интересующего гена заглушается и предоставляется немутантная копия. В одном варианте реализации изобретения это достигается с использованием двух или более векторов, вводимых совместно. См. Millington-Ward et al., *Molecular Therapy*, April 2011, 19 (4): 642-649, который включен в данный документ посредством ссылки. Трансгены могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники на основании желаемого результата.

В другом варианте реализации изобретения трансген выбирают для использования в терапии генной коррекции. Это может быть достигнуто с использованием, например, двухцепочечного разрыва ДНК, индуцированного нуклеазой цинкового пальца (ZFN), в сочетании с экзогенным донорным субстратом ДНК. См., например, Ellis et al, *Gene Therapy* (ePub January 2012) 20:35-42, который включен в данный документ посредством ссылки. Трансгены могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники на основании желаемого результата.

В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе капсиды могут быть использованы в двойной векторной системе CRISPR-Cas, описанной в предварительных патентных заявках США №№ 61/153470, 62/183825, 62/254225 и 62/287511, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Капсиды также пригодны для доставки эндонуклеаз или других мегануклеаз.

В другом варианте реализации изобретения трансгены, используемые в данном документе, включают репортерные последовательности, которые при экспрессии продуцируют обнаруживаемый сигнал. Такие репортерные последовательности включают, без ограничения, последовательности ДНК, кодирующие β -лактамазу, β -галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок (RFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), люциферазу, мембраносвязанные белки, включая, например, CD2, CD4, CD8, белок гемагглютинаина гриппа и другие, хорошо известные в данной области техники, к которым существуют или могут быть получены традиционными способами антитела с высоким сродством, направленные на них, и слитые белки, содержащие мембраносвязанный белок, соответствующим образом слитый с доменом антигенной метки из, среди прочего, гемагглютинаина или Мус.

Эти кодирующие последовательности, когда они связаны с регуляторными элементами, которые управляют их экспрессией, обеспечивают сигналы, обнаруживаемые традиционными средствами, включая ферментные, радиографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы, анализы сортировки флуоресцентных активирующих клеток и иммунологические анализы, включая ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (РИА) и иммуногистохимию. Например, если маркерной последовательностью является ген LacZ, присутствие вектора, несущего сигнал, обнаруживают с помощью анализов на активность бета-галактозидазы. Если трансген представляет собой зеленый флуоресцентный белок

или люциферазу, вектор, несущий сигнал, можно измерить визуально по цвету или световому излучению в люминометре.

Желательно, чтобы трансген кодировал продукт, который может использоваться в биологии и медицине, такой как белки, пептиды, РНК, ферменты или каталитические РНК. Желательные молекулы РНК включают кшРНК, тРНК, дцРНК, рибосомную РНК, каталитические РНК и антисмысловые РНК. Одним из примеров пригодной последовательности РНК является последовательность, которая подавляет экспрессию целевой нуклеотидной последовательности у животного, подвергнутого лечению.

Регуляторные последовательности включают традиционные контрольные элементы, которые функционально связаны с трансгеном таким образом, который позволяет его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной вектором или инфицированной вирусом, продуцируемым, как описано в данном документе. В контексте данного документа «функционально связанные» последовательности включают как последовательности контроля экспрессии, которые примыкают к представляющему интерес гену, так и последовательности контроля экспрессии, которые действуют в *транс* или на расстоянии, чтобы контролировать интересующий ген.

Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации и терминации транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы обработки РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (*т.е.* консенсусная последовательность Козака); последовательности, повышающие стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. Большое количество последовательностей контроля экспрессии, включая промоторы, известно в данной области техники и может быть использовано.

Регуляторные последовательности, используемые в конструктах, представленных в данном документе, также могут содержать интрон, расположенный желательно между последовательностью промотора/энхансера и геном. Одна целевая последовательность интрона получена от SV-40 и представляет собой донор/акцептор сплайсинга мини-интрона на 100 пар оснований, именуемого SD-SA. Другая подходящая последовательность включает посттранскрипционный элемент вируса гепатита сурка. (См., например, L. Wang and I. Verma, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96:3906-3910). Сигналы полиА могут быть получены от многих подходящих видов, включая, без ограничения, SV-40, человека и быков.

Другим регуляторным компонентом гAAV, используемым в описанных в данном документе способах, является внутренний сайт входа в рибосомы (IRES). Последовательность IRES или другие подходящие системы могут использоваться для получения более чем одного полипептида из транскрипта единичного гена. IRES (или

другая подходящая последовательность) используется для получения белка, который содержит более одной полипептидной цепи, или для экспрессии двух разных белков из одной клетки или внутри нее. Примером IRES является внутренняя последовательность входа в рибосому полиовируса, которая поддерживает экспрессию трансгена в фоторецепторах, ПЭС и ганглиозных клетках. Предпочтительно IRES расположен в положении 3' к трансгену в векторе gAAV.

В одном варианте реализации изобретения AAV содержит промотор (или функциональный фрагмент промотора). Выбор промотора, который будет использоваться в gAAV, может быть сделан из широкого числа конститутивных или индуцибельных промоторов, которые могут экспрессировать выбранный трансген в целевой клетке-мишени. В одном варианте реализации изобретения клетка-мишень представляет собой клетки глаза. Промотор может быть получен от любого вида, включая человека. В одном варианте реализации изобретения желательно, чтобы промотор был «клеточно-специфичным». Термин «клеточно-специфичный» означает, что конкретный промотор, выбранный для рекомбинантного вектора, может направлять экспрессию выбранного трансгена в конкретной клеточной ткани. В одном варианте реализации изобретения промотор специфичен для экспрессии трансгена в мышечных клетках. В другом варианте реализации изобретения промотор специфичен для экспрессии в легких. В другом варианте реализации изобретения промотор специфичен для экспрессии трансгена в клетках печени. В другом варианте реализации изобретения промотор специфичен для экспрессии трансгена в эпителии дыхательных путей. В другом варианте реализации изобретения промотор специфичен для экспрессии трансгена в нейронах. В другом варианте реализации изобретения промотор специфичен для экспрессии трансгена в сердце.

Кассета экспрессии, как правило, содержит промоторную последовательность как часть последовательностей контроля экспрессии, *например*, расположенную между выбранной последовательностью 5' ИКП и кодирующей последовательностью конструкта иммуноглобулина. В одном варианте реализации изобретения желательна экспрессия в печени. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения используют промотор, специфичный для печени. В описанных в данном документе векторах могут использоваться тканеспецифические промоторы, конститутивные промоторы, регулируемые промоторы [см., *например*, WO 2011/126808 и WO 2013/04943] или промотор, реагирующий на физиологические сигналы. В другом варианте реализации изобретения желательна экспрессия в мышцах. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения используется промотор, специфичный для мышц. В одном варианте реализации изобретения промотор представляет собой промотор на основе мышечной креатинкиназы (MCK), такой как промоторы dMCK (509 пар оснований) или tMCK (720 пар оснований) (см., *например*, Wang et al, Gene Ther. 2008 Nov;15(22):1489-99. doi: 10.1038/gt.2008.104. Epub 2008 Dec 19, который включен в данный документ посредством ссылки). Другим подходящим промотором является промотор SPc5-12 (см.

Rasowo et al, European Scientific Journal, June 2014 edition vol.10, No.18, который включен в данный документ посредством ссылки). В одном варианте реализации изобретения промотор представляет собой промотор ЦМВ. В другом варианте реализации изобретения промотор представляет собой промотор ТСГ. В другом варианте реализации изобретения используются промоторы СВ7 или СAG. СВ7 представляет собой промотор куриного β -актина с элементами энхансера цитомегаловируса. В альтернативном варианте могут использоваться другие промоторы, специфичные для печени [см., например, базу данных промоторов генов, специфичных для печени, Cold Spring Harbor, rulai.schl.edu/LSPD, альфа-1 антитрипсин (A1AT); человеческий альбумин Miyatake et al., J. Virol., 71: 5124-32 (1997), humAlb; и сердцевинный промотор вируса гепатита В, Sandig et al., Gene Ther., 3: 1002-9 (1996)]. Минимальный энхансер/промотор TTR, промотор альфа-антитрипсина, LSP (845 нуклеотидов) 25 (требуется scAAV без интронов).

Промотор(ы) может быть выбран из различных источников, например, раннего энхансера/промотора цитомегаловируса человека (ЦМВ), раннего энхансера/промотора SV40, промотора полиовируса JC, основного белка миелина (ОБМ) или глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ), вируса простого герпеса (ВПГ-1), промотора, связанного с латентностью (ЛСП), вируса саркомы Рауса (ВСП), промотора длинного концевой повтора (ДКП), нейрон-специфического промотора (НСП), промотора тромбоцитарного фактора роста (ПТФР), hSYN, промотора меланин-концентрирующего гормона (МКГ), СВА, промотора матриксного металлопротеина (МПП) и промотора куриного бета-актина.

Кассета экспрессии может содержать по меньшей мере один энхансер, т.е., энхансер ЦМВ. Другие энхансерные элементы могут включать, например, энхансер аполипопротеина, энхансер рыбок данио, энхансерный элемент ГФКБ и специфичные для головного мозга энхансеры, такие как описанные в WO 2013/155522, посттранскрипционный регуляторный элемент после гепатита сурка. В дополнительном или альтернативном варианте может быть выбран другой промотор, например, промотор гибридного цитомегаловируса человека (ЧЦИВ)-немедленно ранний (НР)-промотор ПТФР или другие элементы промотора - энхансера. Другие используемые в данном документе энхансерные последовательности включают энхансер межфоторецепторного ретинол-связывающего белка (IRBP) (Nicoud 2007, J. Gene Med. 2007 Dec; 9 (12): 1015-23), немедленно ранний энхансер цитомегаловируса, энхансер, полученный из гена иммуноглобулина или энхансера SV40, цис-действующий элемент, идентифицированный в проксимальном промоторе мышцы и т.д.

Дополнительно к промотору кассета экспрессии и/или вектор могут включать другие соответствующие последовательности инициации и терминирования транскрипции, и энхансерные последовательности; эффективные сигналы обработки РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака);

последовательности, повышающие стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. Известно множество подходящих полиА. В одном примере полиА представляет собой бета-глобин кролика, такой как сигнал полиаденилирования бета-глобина кролика (127 п.о.) (GenBank № V00882.1). В других вариантах реализации изобретения выбран сигнал полиА SV40. Могут быть выбраны и другие подходящие последовательности полиА. В определенных вариантах реализации изобретения включен интрон. Одним из подходящих интронов является интрон куриного бета-актина. В одном варианте реализации изобретения длина интрона составляет 875 п.о. (GenBank № X00182.1). В другом варианте реализации изобретения используется химерный интрон, доступный от Promega. Однако могут быть выбраны другие подходящие интроны. В одном варианте реализации изобретения включены спейсеры, так что геном вектора имеет приблизительно такой же размер, что и геном нативного вектора AAV (например, между 4,1 и 5,2 т.п.н.). В одном варианте реализации изобретения включены спейсеры, так что размер генома вектора составляет около 4,7 т.п.н. См. Wu et al, Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging, Mol Ther. 22010 или 181 80-86, который включен в данный документ посредством ссылки.

Выбор этих и других распространенных векторных и регуляторных элементов является общепринятым и доступно множество таких последовательностей. См., например, Sambrook et al, и ссылки, процитированные в нем, например, страницы 3.18-3.26 и 16.17-16.27 и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989. Конечно, не все векторы и последовательности контроля экспрессии будут одинаково хорошо функционировать для экспрессии всех трансгенов, описанных в данном документе. Однако специалист в данной области техники может выбрать среди этих и других последовательностей контроля экспрессии, не выходя за рамки данного изобретения.

В определенных вариантах реализации изобретения кассета экспрессии содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень микроРНК, которая представляет собой последовательность-мишень miR-183. В определенных вариантах реализации изобретения геном вектора или кассета экспрессии содержит последовательность-мишень miR-183, которая включает AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (SEQ ID NO: 13), в которой последовательность, комплементарная затравочной последовательности miR-183, подчеркнута. В определенных вариантах реализации изобретения геном вектора или кассета экспрессии содержат более одной копии (например, две или три копии) последовательности, которая на 100% комплементарна затравочной последовательности miR-183. В определенных вариантах реализации изобретения последовательность-мишень miR-183 имеет длину от около 7 нуклеотидов до около 28 нуклеотидов и включает по меньшей мере одну область, которая по меньшей мере на 100% комплементарна затравочной последовательности miR-183. В определенных вариантах реализации изобретения последовательность-мишень miR-183 содержит последовательность с частичной комплементарностью SEQ ID NO: 13 и, таким образом, при выравнивании с

SEQ ID NO: 13 существует одно или более несовпадений. В определенных вариантах реализации изобретения последовательность-мишень miR-183 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 несовпадений при выравнивании с SEQ ID NO: 13, в которой несовпадения могут быть несмежными. В определенных вариантах реализации изобретения последовательность-мишень miR-183 содержит область 100% комплементарности, которая также составляет по меньшей мере 30% длины последовательности-мишени miR-183. В определенных вариантах реализации изобретения область 100% комплементарности содержит последовательность со 100% комплементарностью к затравочной последовательности miR-183. В определенных вариантах реализации изобретения оставшая часть последовательности-мишени miR-183 имеет по меньшей мере от около 80% до около 99% комплементарности с miR-183. В определенных вариантах реализации изобретения кассета экспрессии или геном вектора включает последовательность-мишень miR-183, которая содержит усеченную SEQ ID NO: 13, т.е. последовательность, в которой отсутствует по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов на одном или обоих концах 5' или 3' SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах реализации изобретения кассета экспрессии или геном вектора содержит трансген и одну последовательность-мишень miR-183. В других вариантах реализации изобретения кассета экспрессии или геном вектора содержит по меньшей мере две, три или четыре последовательности-мишени miR-183.

В определенных вариантах реализации изобретения кассета экспрессии содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень микроРНК, которая представляет собой последовательность-мишень miR-182. В определенных вариантах реализации изобретения геном вектора или кассета экспрессии содержит последовательность-мишень miR-182, которая включает AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (SEQ ID NO: 14). В определенных вариантах реализации изобретения геном вектора или кассета экспрессии содержат более одной копии (например, две или три копии) последовательности, которая на 100% комплементарна затравочной последовательности miR-182. В определенных вариантах реализации изобретения последовательность-мишень miR-182 имеет длину от около 7 нуклеотидов до около 28 нуклеотидов и включает по меньшей мере одну область, которая по меньшей мере на 100% комплементарна затравочной последовательности miR-182. В определенных вариантах реализации изобретения целевая последовательность miR-182 содержит последовательность с частичной комплементарностью SEQ ID NO: 14 и, таким образом, при выравнивании с SEQ ID NO: 14 существует одно или более несовпадений. В определенных вариантах реализации изобретения целевая последовательность miR-183 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 несовпадений при выравнивании с SEQ ID NO: 14, в которой несовпадения могут быть несмежными. В определенных вариантах реализации изобретения последовательность-мишень miR-182 содержит область 100% комплементарности, которая также составляет по меньшей мере 30% длины

последовательности-мишени miR-182. В определенных вариантах реализации изобретения область 100% комплементарности содержит последовательность со 100% комплементарностью к затравочной последовательности miR-182. В определенных вариантах реализации изобретения оставшая часть последовательности-мишени miR-182 имеет по меньшей мере от около 80% до около 99% комплементарности с miR-182. В определенных вариантах реализации изобретения кассета экспрессии или геном вектора включает последовательность-мишень miR-182, которая содержит усеченную SEQ ID NO: 14, т.е. последовательность, в которой отсутствует по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов на одном или обоих концах 5' или 3' SEQ ID NO: 14. В определенных вариантах реализации изобретения кассета экспрессии или геном вектора содержит трансген и одну последовательность-мишень miR-182. В других вариантах реализации изобретения кассета экспрессии или геном вектора содержит по меньшей мере две, три или четыре последовательности-мишени miR-182.

Термин «тандемные повторы» используется в данном документе для обозначения присутствия двух или более последовательных последовательностей-мишеней микроРНК. Эти последовательности-мишени микроРНК могут быть непрерывными, т.е. располагаться непосредственно одна за другой, так что 3' конец одной находится непосредственно перед 5' концом следующей без промежуточных последовательностей, или наоборот. В другом варианте реализации изобретения две или более последовательностей-мишеней микроРНК разделены короткой спейсерной последовательностью.

Используемый в данном документе термин «спейсер» представляет собой любую выбранную нуклеотидную последовательность, например, длиной 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которая расположена между двумя или более последовательными последовательностями-мишенями микроРНК. В определенных вариантах реализации изобретения спейсер имеет длину от 1 до 8 нуклеотидов, длину от 2 до 7 нуклеотидов, длину от 3 до 6 нуклеотидов, длину в четыре нуклеотида, длину от 4 до 9 нуклеотидов, от 3 до 7 нуклеотидов или длину большей величины. Соответственно, спейсер представляет собой некодирующую последовательность. В определенных вариантах реализации изобретения спейсер может состоять из четырех (4) нуклеотидов. В определенных вариантах реализации изобретения спейсер представляет собой GGAT. В определенных вариантах реализации изобретения спейсер представляет собой (6) нуклеотидов. В определенных вариантах реализации изобретения спейсер представляет собой CACGTG или GCATGC.

В определенных вариантах реализации изобретения тандемные повторы содержат два, три, четыре или более одинаковых последовательностей-мишеней микроРНК. В определенных вариантах реализации изобретения тандемные повторы содержат по меньшей мере две разные последовательности-мишени микроРНК, по меньшей мере три разные последовательности-мишени микроРНК или по меньшей мере четыре разные последовательности-мишени микроРНК и т.д. В определенных вариантах реализации

изобретения тандемные повторы могут содержать две или три одинаковых последовательностей-мишеней микроРНК и четвертую последовательность-мишень микроРНК, которая отличается.

В определенных вариантах реализации изобретения в кассете экспрессии может быть по меньшей мере два разных набора тандемных повторов. Например, 3' НТО может содержать тандемный повтор непосредственно после трансгена, последовательностей НТО, и два или более тандемных повторов ближе к 3' концу НТО. В другом примере 5' НТО может содержать одну, две или более последовательностей-мишеней микроРНК. В другом примере 3' может содержать тандемные повторы, а 5' НТО может содержать по меньшей мере одну последовательность-мишень микроРНК.

В определенных вариантах реализации изобретения кассета экспрессии содержит два, три, четыре или более тандемных повторов, которые начинаются в пределах от около 0 до 20 нуклеотидов стоп-кодона трансгена. В других вариантах реализации изобретения кассета экспрессии содержит тандемные повторы микроРНК по меньшей мере от 100 до около 4000 нуклеотидов из стоп-кодона трансгена.

См. РСТ/US19/67872, поданную 20 декабря 2019 г., которая включена в данный документ посредством ссылки и испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/783956, поданной 21 декабря 2018 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

В другом варианте реализации изобретения предложен способ создания рекомбинантного аденоассоциированного вируса. Подходящий рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV) получают путем культивирования клетки-хозяина, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанный в данном документе белок капсида AAV или его фрагмент; функциональный ген гер; миниген, состоящий, как минимум, из инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV и гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую целевой трансген; и достаточные хелперные функции, позволяющие упаковывать миниген в белок капсида AAV. Компоненты, необходимые для культивирования в клетке-хозяине для упаковки минигена AAV в капсид AAV, могут быть предоставлены клетке-хозяину в *транс*. В альтернативном варианте любой один или более требуемых компонентов (например, миниген, последовательности гер, последовательности сар и/или хелперные функции) могут быть обеспечены стабильной клеткой-хозяином, которая была сконструирована с использованием способов, известных специалистам в данной области техники, так, чтобы содержать один или более требуемых компонентов.

В данном документе также предложены клетки-хозяева, трансфицированные AAV, описанным в данном документе. Наиболее подходяще, такая стабильная клетка-хозяин будет содержать требуемый компонент(ы) под контролем индуцибельного промотора. Однако требуемый компонент(ы) может находиться под контролем конститутивного промотора. Примеры подходящих индуцибельных и конститутивных промоторов представлены в данном документе при нижеследующем обсуждении регуляторных

элементов, подходящих для использования с трансгеном. В еще одном альтернативном варианте выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный компонент(ы) под контролем конститутивного промотора и другой выбранный компонент(ы) под контролем одного или более индуцибельных промоторов. Например, может быть получена стабильная клетка-хозяин, происходящая из клеток 293 (которые содержат хелперные функции E1 под контролем конститутивного промотора), но которая содержит белки гер и/или сар под контролем индуцибельных промоторов. Другие стабильные клетки-хозяева могут быть созданы специалистом в данной области техники. В другом варианте реализации изобретения клетка-хозяин содержит молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе.

Миниген, последовательности гер, последовательности сар и хелперные функции, необходимые для получения rAAV, описанного в данном документе, могут быть доставлены в упаковывающую клетку-хозяин в форме любого генетического элемента, который переносит последовательности, переносимые на нем. Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, включая описанные в данном документе. Способы, используемые для конструирования любого варианта реализации данного изобретения, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методы. См., например, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Аналогично, хорошо известны способы получения вирионов rAAV, и выбор подходящего способа не является ограничением данного изобретения. См., например, среди прочего, K. Fisher et al, 1993 *J. Virol.*, 70:520-532 и патент US 5478745. Эти публикации включены в данный документ посредством ссылки.

В данном документе также предложены плазмиды для использования в получении описанных в данном документе векторов. Такие плазмиды описаны в разделе «Примеры».

В. Фармацевтические композиции и введение

В одном варианте реализации изобретения рекомбинантный AAV, содержащий целевой трансген и промотор для использования в клетках-мишенях, как это подробно описано выше, необязательно оценивается традиционными способами на предмет загрязнения, а затем формулируется в фармацевтическую композицию, предназначенную для введения субъекту, нуждающемуся в этом. Такой состав включает использование фармацевтически и/или физиологически приемлемого наполнителя или носителя, такого как забуференный физиологический раствор или другие буферы, например, ГЭПЭС, для поддержания pH на соответствующих физиологических уровнях, и, необязательно, других лекарственных средств, фармацевтических агентов, стабилизирующих агентов, буферов, носителей, адъювантов, разбавителей и т.д. Для инъекции носитель, как правило, представляет собой жидкость. Примеры физиологически приемлемых носителей включают стерильную апиrogenную воду и стерильный апиrogenный фосфатно-солевой буфер. Множество таких известных носителей предоставлено в публикации патента США

№ 7629322, включенной в данный документ посредством ссылки. В одном варианте реализации изобретения носитель представляет собой изотонический раствор хлорида натрия. В другом варианте реализации изобретения носитель представляет собой сбалансированный солевой раствор. В одном варианте реализации изобретения носитель включает Твин. Если вирус должен храниться в течение длительного времени, он может быть заморожен в присутствии глицерина или Твин 20. В другом варианте реализации изобретения фармацевтически приемлемый носитель содержит поверхностно-активное вещество, такое как перфтороктан (жидкость Perfluoron). Вектор составляется в буфере/носителе, подходящем для инфузии человеческим субъектам. Буфер/носитель должен содержать компонент, который предотвращает прилипание гAAV к инфузионной трубке, но не влияет на активность связывания гAAV *in vivo*.

В определенных вариантах реализации способов, описанных в данном документе, описанная выше фармацевтическая композиция вводится субъекту внутримышечно (ВМ). В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция вводится внутривенно (ВВ). В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция вводится путем интрацеребровентрикулярной (ИЦВ) инъекции. В других вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция вводится путем интрацистерной (ИЦ) инъекции. Другие формы введения, которые могут быть полезны в описанных в данном документе способах, включают, но не ограничиваются ими, прямую доставку в целевой орган (например, глаз), включая субретинальную или интравитреальную доставку, пероральный, ингаляционный, интраназальный, интратрахеальный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный и другие парентеральные пути введения. При необходимости способы введения можно комбинировать.

Используемые в данном документе термины «интратекальная доставка» или «интратекальное введение» относятся к пути введения посредством инъекции в позвоночный канал, более конкретно в субарахноидальное пространство, так что она достигает спинномозговой жидкости (СМЖ). Интратекальная доставка может включать люмбальную пункцию, интравентрикулярную (включая интрацеребровентрикулярную (ИЦВ)), субокципитальную/интрацистермальную и/или С1-2 пункцию. Например, материал может быть введен для распространения по субарахноидальному пространству с помощью люмбальной пункции. В другом примере инъекция может производиться в большую цистерну.

Используемые в данном документе термины «интрацистерральная доставка» или «интрацистермальное введение» относятся к способу введения непосредственно в спинномозговую жидкость большой цистерны (*cerebellomedullaris*), более конкретно, через субокципитальную пункцию, или путем прямой инъекции в большую цистерну, или через трубку с постоянным расположением.

Композиция может быть доставлена в объеме от около 0,1 мкл до около 10 мл, включая все числа в диапазоне, в зависимости от размера обрабатываемой области,

используемого титра вируса, пути введения и целевого эффекта от способа. В одном варианте реализации изобретения объем составляет около 50 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 70 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 100 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 125 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 150 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 175 мкл. В еще одном варианте реализации изобретения объем составляет около 200 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 250 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 300 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 450 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 500 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 600 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 750 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 850 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 1000 мкл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 1,5 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 2 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 2,5 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 3 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 3,5 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 4 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 5 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 5,5 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 6 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 6,5 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 7 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 8 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 8,5 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 9 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 9,5 мл. В другом варианте реализации изобретения объем составляет около 10 мл.

Эффективная концентрация рекомбинантного аденоассоциированного вируса, несущего нуклеотидную последовательность, кодирующую целевой трансген под контролем регуляторных последовательностей, находится в целевом диапазоне от около 10^7 до 10^{14} геномов вектора на миллилитр (гв/мл) (также именуемых геномными копиями/мл (ГК/мл)). В одном варианте реализации изобретения геном вектора гAAV измеряют с помощью ПЦР в реальном времени. В другом варианте реализации изобретения геномы вектора гAAV измеряют с помощью цифровой ПЦР. См., Lock et al, Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14, который включен в данный документе посредством ссылки. В другом варианте реализации изобретения инфекционные единицы

гААV измеряют, как описано в S.K. McLaughlin et al, 1988 J. Virol., 62:1963, который включен в данный документе посредством ссылки.

Концентрация предпочтительно составляет от около $1,5 \times 10^9$ гв/мл до около $1,5 \times 10^{13}$ гв/мл и более предпочтительно от около $1,5 \times 10^9$ гв/мл до около $1,5 \times 10^{11}$ гв/мл. В одном варианте реализации изобретения эффективная концентрация составляет около $1,4 \times 10^8$ гв/мл. В одном варианте реализации изобретения эффективная концентрация составляет около $3,5 \times 10^{10}$ гв/мл. В другом варианте реализации изобретения эффективная концентрация составляет около $5,6 \times 10^{11}$ гв/мл. В другом варианте реализации изобретения эффективная концентрация составляет около $5,3 \times 10^{12}$ гв/мл. В еще одном варианте реализации изобретения эффективная концентрация составляет около $1,5 \times 10^{12}$ гв/мл. В другом варианте реализации изобретения эффективная концентрация составляет около $1,5 \times 10^{13}$ гв/мл. Все описанные в данном документе диапазоны включают конечные точки.

В одном варианте реализации изобретения дозировка составляет от около $1,5 \times 10^9$ гв/мл от массы тела до около $1,5 \times 10^{13}$ гв/мл и более предпочтительно от около $1,5 \times 10^9$ гв/мл до около $1,5 \times 10^{11}$ гв/мл. В одном варианте реализации изобретения дозировка составляет около $1,4 \times 10^8$ гв/мл. В одном варианте реализации изобретения дозировка составляет около $3,5 \times 10^{10}$ гв/мл. В другом варианте реализации изобретения дозировка составляет около $5,6 \times 10^{11}$ гв/мл. В другом варианте реализации изобретения дозировка составляет около $5,3 \times 10^{12}$ гв/мл. В еще одном варианте реализации изобретения дозировка составляет около $1,5 \times 10^{12}$ гв/мл. В другом варианте реализации изобретения дозировка составляет около $1,5 \times 10^{13}$ гв/мл. В другом варианте реализации изобретения дозировка составляет около $3,0 \times 10^{13}$ гв/мл. В другом варианте реализации изобретения дозировка составляет около $1,0 \times 10^{14}$ гв/мл. Все описанные в данном документе диапазоны включают конечные точки.

В одном варианте реализации изобретения эффективная дозировка (общее количество доставленных геномных копий) составляет от около 10^7 до 10^{13} геномов вектора. В одном варианте реализации изобретения общая дозировка составляет около 10^8 геномных копий. В одном варианте реализации изобретения общая дозировка составляет около 10^9 геномных копий. В одном варианте реализации изобретения общая дозировка составляет около 10^{10} геномных копий. В одном варианте реализации изобретения общая дозировка составляет около 10^{11} геномных копий. В одном варианте реализации изобретения общая дозировка составляет около 10^{12} геномных копий. В одном варианте реализации изобретения общая дозировка составляет около 10^{13} геномных копий. В одном варианте реализации изобретения общая дозировка составляет около 10^{14} геномных копий. В одном варианте реализации изобретения общая дозировка составляет около 10^{15} геномных копий.

Желательно использовать самую низкую эффективную концентрацию вируса, чтобы снизить риск нежелательных эффектов, таких как токсичность. Другие дозировки и объемы введения в этих диапазонах могут быть выбраны лечащим врачом с учетом

физического состояния субъекта, предпочтительно человека, подвергаемого лечению, возраста субъекта, конкретного расстройства и степени, в которой это расстройство, если оно прогрессивное, развивается. Например, для внутривенной доставки могут потребоваться дозы порядка $1,5 \times 10^{13}$ гв/кг.

Г. Способы

В другом аспекте предложен способ трансдукции ткани-мишени. В одном варианте реализации изобретения способ включает введение AAV, имеющего капсид AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93, описанный в данном документе. Как показано в приведенных ниже примерах, изобретатели показали, что AAV, именуемый AAVrh.92, эффективно трансдуцирует ЦНС (мозг). Таким образом, в данном документе предложен способ трансдукции головного мозга, включающий введение гAAV, имеющего капсид AAVrh.92. В одном варианте реализации изобретения используется внутривенное введение. В другом варианте реализации изобретения используется ИЦВ введение. В еще одном варианте реализации изобретения используется ИЦ введение.

В данном документе также предложен способ доставки трансгена в клетки мозга. Способ включает контактирование клетки с гAAV, имеющим капсид AAVrh.92, причем указанный гAAV содержит трансген. В другом аспекте предусмотрено использование гAAV, имеющего капсид AAVrh.92, для доставки трансгена в мозг. В одном варианте реализации изобретения гAAV доставляется с использованием ИЦ доставки.

Аmplификация единичного генома

Геномы AAV традиционно выделяют из цельной геномной ДНК млекопитающих с использованием способов, основанных на ПЦР: праймеры используются для обнаружения консервативных областей, фланкирующих большую часть разнообразного гена VP1 (капсида). Затем продукты ПЦР клонируют в основную цепь плазмиды, и отдельные клоны секвенируют с использованием метода Сэнгера. Традиционные способы выделения вирусов на основе ПЦР и молекулярного клонирования эффективны для извлечения новых геномов AAV, но на извлеченные геномы могут влиять ПЦР-опосредованная рекомбинация и ошибки полимеразы. Кроме того, доступные в настоящее время технологии секвенирования нового поколения позволили секвенировать вирусные геномы с беспрецедентной точностью по сравнению с ранее используемой технологией Сэнгера. В данном документе предложен новый высокопроизводительный метод ПЦР и секвенирования нового поколения для точного выделения индивидуальных геномов AAV из вирусной популяции. Этот метод, амплификация единичного генома AAV (AAV-SGA), может использоваться для улучшения знаний о разнообразии AAV у млекопитающих-хозяев. Более того, это позволило идентифицировать новые капсиды для использования в качестве векторов для генной терапии.

AAV-SGA был проверен и оптимизирован для эффективного извлечения отдельных последовательностей AAV из образцов, содержащих популяцию геномов. Эта методика ранее использовалась для выделения единичных геномов ВИЧ и ВГС из человеческих и нечеловеческих приматов-хозяев. Образцы геномной ДНК,

положительные по результатам скрининга на AAV с помощью ПЦР с обнаружением капсида, разводят по конечной точке. Разведение, при котором ПЦР-амплификация дает менее 30% положительных реакций в соответствии с распределением Пуассона с достоверностью 80%, содержит единичный амплифицируемый геном AAV. Эта процедура позволяет проводить ПЦР-амплификацию вирусных геномов с уменьшенной вероятностью ПЦР-опосредованной рекомбинации, вызванной переключением матрицы полимеразы. ПЦР-ампликоны AAV-SGA секвенируют с использованием платформы Illumina MiSeq и секвенирования парных прочтений 2X150 или 2X250. Этот способ обеспечивает точную сборку *de novo* полноразмерных последовательностей VP1 AAV, не беспокоясь о сходимости прочтений секвенирования из одного образца, содержащего несколько вирусов, которые имеют области высокой гомологии.

Методика AAV-SGA оказалась успешной для выделения множества новых последовательностей капсида AAV из тканей макаки-резус. Примечательно, что множество вирусов AAV из разных клад были идентифицированы из единичных образцов; это демонстрирует, что популяция AAV может существовать в тканях хозяина. Например, капсиды со сходной последовательностью с кладами D, E и удаленными «краевыми» вирусами были выделены из единственного образца ткани печени.

В то время как SGA ранее применялся для выделения других вирусов, применение для обнаружения AAV является новым. Подход решает проблемы переключения матрицы и ошибки полимеразы, которые могут привести к недействительным последовательностям генома AAV. Кроме того, качество выделенного генома становится очевидным, когда одна и та же последовательность повторно извлекается из того же образца-хозяина, что и отдельные изоляты.

Следующие ниже примеры представлены для иллюстрации различных вариантов реализации данного изобретения. Примеры никоим образом не предназначены для ограничения изобретения.

Д. Примеры

Пример 1: Материалы и методы

Обнаружение и выделение последовательностей AAV

Источники тканей нечеловеческих приматов

Макаки-резус из колонии Пенсильванского университета были выведены в неволе и имели китайское или индийское происхождение. Образцы ткани печени макак-резус были любезно предоставлены Программой генной терапии и лабораторией Тимоти Х. Лукаса, Университет Пенсильвании.

Выделение нового AAV

Геномную ДНК экстрагировали (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN) и анализировали на присутствие ДНК AAV с использованием стратегии ПЦР для амплификации полноразмерного фрагмента *Cap* размером 3,1 п.о. из образцов ткани печени НЧП. Для амплификации полноразмерных ампликонов *Cap* AAV использовали 5'-праймер в пределах консервативной области гена *Rep* AAV (AV1NS, 5'-

GCTGCGTCAACTGGACCAATGAGAAC-3') (SEQ ID NO: 9) в комбинации с 3'-праймером, расположенным в консервативной области после гена Rep AAV (AV2CAS, 5'-CGCAGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA-3') (SEQ ID NO: 10). ДНК-полимераза Q5 High-Fidelity Hot Start (New England Biolabs) была использована для амплификации ДНК AAV с использованием следующих условий цикла: 98°C в течение 30 с; 98°C в течение 10 с, 59°C в течение 10 с, 72°C в течение 93 с, 50 циклов; и удлинение при 72°C в течение 120 с.

Образцы матричной геномной ДНК, которые давали положительную реакцию ПЦР, подвергали амплификации единичного генома AAV (AAV-SGA). Геномную ДНК разводили по конечной точке в 96-луночных планшетах, так что менее 29 реакций ПЦР с использованием праймеров, упомянутых выше, из 96 давали продукт амплификации. Согласно распределению Пуассона, разведение ДНК, которое дает продукты ПЦР не более чем в 30% лунок, содержит одну амплифицируемую матрицу ДНК на положительную ПЦР в 80% случаев. Ампликоны ДНК AAV из положительных реакций ПЦР секвенировали с использованием платформ для секвенирования парных прочтений Illumina MiSeq 2×150 или 2×250, и полученные прочтения были собраны de novo с использованием ассемблера SPAdes ([cab.spbu.ru/software/spades /](http://cab.spbu.ru/software/spades/)). Анализ последовательностей выполняли с использованием NCBI BLASTn ([blast.ncbi.nlm.nih.gov /](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)) и программного обеспечения Vector NTI AlignX (Thermo Fisher).

Получение вектора с использованием новых капсидов AAV

ДНК-последовательности гена капсида AAV из представляющих интерес продуктов ПЦР были клонированы и амплифицированы TOPO (Invitrogen). Амплифицированные гены капсида были дополнительно клонированы в основную цепь трансплазмиды AAV, содержащей ген Rep AAV2 и другие связанные с ним плазмидные элементы.

Векторы AAV получали и титровали с помощью Penn Vector Core, как описано ранее (см., например, Lock, M., et al. (2010) Hum. Gene Ther. 21:1259-71). Клетки HEK293 подвергали тройной трансфекции, затем собирали супернатант клеточной культуры, концентрировали и очищали градиентом йодиксанола. Очищенные векторы титровали с помощью цифровой ПЦР в каплях с использованием праймеров, нацеленных на последовательность полиА бета-глобина кролика, как описано ранее (см., например, Lock, M., et al. (2014) Hum. Gene Ther. Methods 25:115-125).

Характеристика новых капсидов AAV у грызунов in vivo

Животные

Все протоколы для животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Пенсильванского университета. Мыши C56BL/6J были приобретены в Jackson Laboratory. Для экспериментов с репортерным геном GFP взрослым самцам (в возрасте 6-8 недель) вводили инъекции. Животных содержали в стандартных клетках, от двух до пяти животных в клетке. Клетки, бутылки с водой и подложки для подстилки автоклавировали в барьерном помещении, а клетки меняли один

раз в неделю. Поддерживался автоматически контролируемый 12-часовой цикл света или темноты. Каждый темный период начинался в 19:00 (± 30 мин). Корм для облученных лабораторных грызунов давали в неограниченном количестве.

Испытуемые объекты и дизайн исследования

Мыши получали 1×10^{12} ГК на мышь каждого вектора в 0,1 мл внутривенно (ВВ) через боковую хвостовую вену, или мышам вводили интрацеребровентрикулярно (ИЦВ) в боковой желудочек мозга дозу 1×10^{11} ГК в 5 мкл на мышь. В каждой группе дозировку получали от трех или пяти мышей.

Мышей умерщвляли ингаляцией CO_2 через 14 дней после инъекции. Ткани собирали, мгновенно замораживали на сухом льду для анализа биораспределения или фиксировали погружением в 10%-ный нейтральный формалин, криоконсервировали в сахарозе, замораживали в ОКТ и делали срезы с помощью криостата для прямого наблюдения GFP. Ткани, используемые для анализа трансдукции эндотелиальных клеток, после вскрытия заливали парафином.

Биораспределение вектора

Геномную ДНК из ткани экстрагировали с помощью QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), а геномы вектора AAV количественно оценивали с помощью ПЦР в реальном времени с использованием реагентов Taqman (Applied Biosystems, Life Technologies) с праймерами/зондами, нацеленными на последовательность EGFP векторов.

Визуализация репортерных генов

Для наблюдения прямой флуоресценции GFP образцы тканей фиксировали в формалине в течение около 24 часов, кратковременно промывали в ФСБ, последовательно уравнивали 15%-ной и 30%-ной сахарозой в ФСБ до достижения максимальной плотности, а затем замораживали в среде для заливки ОСТ для приготовления препарата криосрезов. Срезы помещали во Fluoromount G, содержащий ДАПИ (Electron Microscopy Sciences, Хатфилд, Пенсильвания) в качестве контрастного красителя для ядер.

Иммуногистохимия GFP была проведена на образцах тканей, залитых парафином. Срезы депарафинизировали этанолом и ксилолом, кипятили в течение 6 минут в 10 мМ цитратном буфере (pH 6,0) для извлечения антигена, обрабатывали последовательно 2%-ным H_2O_2 в течение 15 минут, реагентами, блокирующими авидин/биотин (Vector Laboratories), каждым в течение 15 минут, и блокирующим буфером (1%-ной ослиной сывороткой в ФСБ+0,2%-ным тритоном) в течение 10 мин. После этого следовала инкубация с первичными антителами в течение 1 часа и биотинилированными вторичными антителами в блокирующем буфере в течение 45 минут (Jackson Immunoresearch). Использовали первичные антитела, маркер эндотелиальных клеток куриного анти-GFP (Abcam ab13970) и кроличьего анти-CD31 (Abcam ab28364). Набор Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) использовали в соответствии с инструкциями производителя с ДАБ в качестве субстрата для визуализации связанных антител в виде коричневого осадка.

Для иммунофлуоресценции парафиновые срезы депарафинизировали и

блокировали после извлечения антигена с помощью 1%-ной ослиной сыворотки в ФСБ+0,2%-ного тритона в течение 15 минут с последующей последовательной инкубацией с первичными (1 час) и вторичными флуоресцентно-мечеными антителами (45 минут, Jackson ImmunoResearch), разведенными в блокирующем буфере. Используемые антитела представляли собой куриные анти-GFP (Abcam ab13970), кроличьи анти-CD31 (Abcam ab28364) и мышьиные анти-NF-200 (клон RT97, Millipore CBL212). Первичные антитела смешивали вместе, и антитела GFP и NF-200 обнаруживали с помощью вторичных антител, меченных FITC и TRITC, соответственно. Сигнал кроличьего анти-CD31 антитела усиливали с помощью набора VectaFluor™ Excel Amplified DyLight® 488 Anti-Rabbit IgG в соответствии с протоколом производителя (Vector Labs). Изображения флуоресцентной и светлопольной микроскопии были получены с помощью микроскопа Nikon Eclipse TiE.

Оценка трансдукции векторных штрихкодированных трансгенов в нечеловеческих приматах

Испытуемые объекты и дизайн исследования

Пять новых капсидов и пять контрольных капсидов (AAVrh90, AAVrh91, AAVrh92, AAVrh93, AAVrh91.93, AAV8, AAV6.2, AAVrh32.33, AAV7 и AAV9) были использованы для упаковки модифицированных АТГ-истощенных самокомплементарных трансгенов eGFP (dGFP). Каждый уникальный препарат капсида содержал трансген dGFP с соответствующим уникальным штрих-кодом из 6 пар оснований к последовательности полиаденилирования генома вектора. Трансген содержал промотор CB8 и последовательность полиаденилирования SV40 (AAVsc.CB8.dGFP.barcode.SV40). Векторы AAV получали и титровали с помощью Penn Vector Core, как описано ранее (см., например, Lock, M., et al. (2010) Hum. Gene Ther. 21:1259-71). Клетки HEK293 подвергали тройной трансфекции, затем собирали супернатант клеточной культуры, концентрировали и очищали градиентом йодиксанола. Очищенные векторы титровали с помощью цифровой капельной ПЦР с использованием праймеров, нацеленных на последовательность полиА SV40, как описано ранее (см., например, Lock, M., et al. (2014) Hum. Gene Ther. Methods 25:115-25).

Десять очищенных векторов объединяли в равных количествах геномных копий для инъекции двум отдельным животным: общие введенные дозы составляли: 2e13 ГК/кг посредством ВВ доставки и 3e13 ГК/животное посредством ИЦ доставки в интратекальное пространство. Животных умерщвляли через 30 дней после инъекции, и все ткани собирали в RNeasy (QIAGEN) для последующего анализа экспрессии трансгенной РНК.

Животные

Все процедуры для животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Пенсильванского университета. Макаки *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) были подарены Bristol Myers Squibb (США). Животных содержали в учреждении Международной программы исследований нечеловеческих приматов,

аккредитованном Ассоциацией по оценке и аккредитации лабораторных животных в Детской больнице Филадельфии (Филадельфия, Пенсильвания), в отжимных клетках из нержавеющей стали. Животные получали разнообразные добавки, такие как угощения, зрительные и слуховые стимулы, манипуляторы и социальные взаимодействия.

Для ИЦ исследования использовали 10-летнего самца весом 8 кг. Для ВВ исследования использовали 6-летнего самца весом 6,98 кг. Это животное было проверено на наличие нейтрализующих AAV антител, и на исходном уровне оно было серонегативным по AAV6, AAV8 и AAVrh32.33. На исходном уровне титры нейтрализующих антител против AAV7 и AAV9 у этого животного составляли 1:5 и 1:10, соответственно.

Процедура проведения ИЦ инъекции

Анестезированную макаку помещали на рентгеновский стол в положении лежа на боку с наклоненной вперед головой. Применяли асептическую технику для продвижения спинномозговой иглы Quincke 21G - 27G, размером от 1 до 1,5 дюймов (Becton Dickinson, Франклин Лэйкс, Нью-Джерси, США) в подзатылочное пространство до тех пор, пока не наблюдалось течение спинномозговой жидкости. Для анализа исходного уровня собирали 1 мл СМЖ. Правильное расположение иглы было проверено рентгеноскопией (ОЕС 9800 C-arm; GE Healthcare, Литтл Чалфонт, Великобритания), чтобы избежать потенциального повреждения ствола мозга. После сбора СМЖ удлинитель доступа Люэра или набор удлинителей Т-порта с малым отверстием подсоединяли к спинномозговой игле для облегчения дозирования контрастной среды йогексола 180 мг/мл (GE Healthcare, Литтл Чалфонт, Великобритания). После проверки размещения иглы шприц, содержащий испытуемый объект (объем, эквивалентный 1 мл, плюс объем шприца и мертвое пространство линкера), соединяли с гибким линкером и вводили в течение 30 ± 5 с. Иглу удаляли, и к месту прокола прикладывали прямое давление.

Процедура проведения ВВ инъекции

Макаке вводили 10 мл испытуемого препарата вектора в периферическую вену со скоростью 1 мл/мин с помощью инфузионного насоса (Harvard Apparatus, Холлистон, Массачусетс).

Анализ экспрессии трансгена

РНК цельной ткани экстрагировали из всех тканей, обработанных RNALater, с использованием TRIzol в соответствии со спецификациями производителя (Life Technologies). Экстрагированную РНК обрабатывали ДНКазой 1 в соответствии с протоколом производителя (Roche, Базель, Швейцария). РНК очищали с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Синтез кДНК с помощью обратной транскрипции кДНК выполняли с помощью набора Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies). Праймеры, нацеленные на области, фланкирующие уникальный штрих-код длиной 6 пар оснований, использовали для ПЦР-амплификации ампликона на 117 пар оснований (прямой праймер: GGCGAACAGCGGACACCGATATGAA (SEQ ID NO: 11), обратный праймер:

GGCTCTCGTCGCGTGAGAATGAGAA (SEQ ID NO: 12)), а ДНК-полимеразу Q5 High-Fidelity Hot Start (New England Biolabs) использовали для проведения реакций с использованием следующих условий цикла: 98°C в течение 30 с; 98°C в течение 10 с, 72°C в течение 17 с, 25 циклов; и удлинение при 72°C в течение 120 с. Ампликоны секвенировали с помощью платформы для секвенирования MiSeq Standard 2×150 п.о. (Illumina).

Считывание штрих-кода анализировалось с помощью программы fastq-join из пакета Expression Analysis (github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils), cutadapt (cutadapt.readthedocs.io/en/stable/), пакета инструментов fastx (hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) и R версии 3.3.1 (cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.3.1/). Данные подсчета экспрессии штрих-кода из образцов ткани были нормализованы к количеству штрих-кода из секвенированного инъецированного векторного материала для каждого животного, и пропорции штрих-кода из каждого образца ткани были нанесены на график с использованием GraphPad Prism версии 7.04.

Пример 2: AAV-SGA

Аденоассоциированные вирусы (AAV) представляют собой парвовирусы с одноцепочечной ДНК, которые являются непатогенными и слабо иммуногенными, что делает их эффективными кандидатами в качестве векторов для генной терапии. С момента открытия первого поколения AAV (AAV1-6) наша лаборатория возглавила усилия по выделению большого количества вирусов от различных видов высших приматов. Это второе поколение AAV, идентифицированных в данном документе, было выделено с использованием методик на основе объемной ПЦР с помощью праймеров против консервативных областей, которые были специфичны для геномов AAV, происходящих от приматов. Используя AAV-SGA, мы исследовали генетические вариации AAV у их природных млекопитающих-хозяев (Фиг. 1).

AAV-SGA представляет собой мощную методику, которую можно использовать для выделения отдельных вирусных геномов из смешанной популяции с высокой точностью. В этом исследовании мы использовали AAV-SGA для идентификации новых геномов AAV из образцов ткани макаки-резус. Новые вирусные изоляты были генетически разнообразны и могут быть разделены на клады D, E и кладу Fringe (Фиг. 2). Наши исследования на мышах показали, что новые капсиды демонстрируют паттерны трансдукции, специфичные для филогенетической клады.

Пример 3: Оценка трансдукции новых природных изолятов AAV у нечеловеческих приматов с использованием системы трансгенных штрих-кодов

Было показано, что векторы аденоассоциированного вируса (AAV) являются безопасными и эффективными носителями для переноса генов в клинических применениях, но им может препятствовать уже существующий иммунитет к вирусу, и они могут иметь ограниченный тканевый тропизм. Мы продемонстрировали, что метод штрих-кодирования трансгенов эффективен для сравнения трансдукции различных тканей

у одного животного одновременно несколькими серотипами AAV. Этот метод уменьшает количество используемых животных и предотвращает иммунные реакции, связанные с чужеродными трансгенами. Соответственно, новые капсиды и соответствующие им контрольные прототипы членов клады (AAV6.2, AAV7, AAV8, AAVrh32.33 и AAV9) были преобразованы в векторы, содержащие модифицированный трансген eGFP и уникальные штрих-коды из шести пар оснований к сигналу полиА расшифровки (Фиг. 9). Трансген был модифицирован путем делеции мотивов последовательности ATG для предотвращения трансляции полипептида и последующего иммунного ответа на чужеродный белок. Векторы объединяли в равных количествах и вводили ВВ или ИЦ макакам *супомологус* (общие дозы: 2×10^{13} ГК/кг ВВ и 3×10^{13} ГК ИЦ) для оценки паттернов системной трансдукции новых капсидов и трансдукции новых капсидов в центральную нервную систему. Животное, получившее ВВ инъекцию, было серонегативным в отношении AAV6, AAV8 и AAVrh32.33 на исходном уровне и имело титры нейтрализующих антител против AAV7 и AAV9 1:5 и 1:10, соответственно.

Вектор AAVrh92 с CB7.CI.eGFP.WPRE.RBG показал трансдукцию сосудистой сети головного мозга через 14 дней после ВВ инъекции мышам (Фиг. 13). Оценка выходов из мелкомасштабных препаратов новых и контрольных капсидов показала, что AAVrh.92 и AAVrh.93 показали сопоставимые выходы с другими ранее идентифицированными капсидами, включая AAV8 (Фиг. 11).

Пример 4: Нацеленная экспрессия генов *Ly6* в эндотелиальных клетках головного мозга

AAVrh.92 использовали для доставки генов *Ly6a* и *Ly6cl* к гематоэнцефалическому барьеру (ГЭБ) у мышей BALB/c Rag-/- (Фиг. 12A). Было показано, что продукт гена *Ly6a* связывается с доставленным ВВ AAV.PHP.B и облегчает его перенос через ГЭБ у *c57BL/6*, но не у мышей BALB/c (см. Hordeaux, J., et al., *Molecular Therapy*, 2019, 27:912-21). Мы стремились использовать свойства AAVrh.92 нацеливания на эндотелий для доставки генов *Ly6a* к ГЭБ у *Ly6a*-дефицитных мышей BALB/c Rag-/- с последующей доставкой AAV.PHP.B, несущего трансген eGFP, с целью повторения возможности его пересечения ГЭБ. Результаты показали адекватную трансдукцию AAVrh92.*Ly6a* в головном мозге мышей с помощью анализа биораспределения генома вектора. Однако экспрессия *Ly6a* не приводила к усиленному пересечению AAV.PHP.B ГЭБ или последующей трансдукции паренхимы головного мозга (Фиг. 12B). Не было разницы в трансдукции AAV9 или AAVPHP.B после введения *Ly6a* в ГЭБ у мышей BALB/c Rag-/- посредством доставки AAVrh92.

(Произвольный текст списка последовательностей)

Следующая информация предоставляется для последовательностей, содержащих произвольный текст под числовым идентификатором <223>.

SEQ ID NO	Произвольный текст под <223>
5	<223> синтетический гибрид AAVrh.91 и AAVrh.93

	<220> <221> КП <222> (1)..(2202)
6	<223> синтетический конструкт
9	<223> последовательность праймера
10	<223> последовательность праймера
11	<223> последовательность праймера
12	<223> последовательность праймера
13	<223> последовательность-мишень микроРНК
14	<223> последовательность-мишень микроРНК

Все документы, цитируемые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки. Предварительная заявка на патент США № 62/924095, поданная 21 октября 2019 г., предварительная заявка на патент США № 62/913314, поданная 10 октября 2019 г., и предварительная заявка на патент США № 62/840184, поданная 29 апреля 2019 г., целиком включены посредством ссылки вместе с перечнями последовательностей в них. Перечень последовательностей, представленный в данном документе, с наименованием «19-8901PCT3_ST25.txt», а также последовательности и текст в ней включены посредством ссылки. Хотя изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты реализации изобретения, следует понимать, что могут быть выполнены модификации без отступления от сущности изобретения. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), имеющий капсид AAV, содержащий белок капсида, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (AAVrh.92), SEQ ID NO: 4 (AAVrh.93) или SEQ ID NO: 6 (AAVrh.91.93), и в указанном капсиде упакован геном вектора, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность.

2. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), имеющий капсид, содержащий белки капсида, полученные в результате экспрессии последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5 капсида AAV, или последовательности, разделяющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5, и в указанном капсиде упакован геном вектора, содержащий гетерологичную нуклеотидную последовательность.

3. rAAV по п. 1 или 2, отличающийся тем, что белок капсида кодируется SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

4. rAAV по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащий 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) AAV и 3' ИКП AAV и гетерологичную нуклеотидную последовательность, функционально связанную с регуляторными последовательностями, которые направляют экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной нуклеотидной последовательностью, в клетку-мишень.

5. rAAV по п. 4, отличающийся тем, что последовательности ИКП AAV происходят из AAV, отличного от AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93.

6. rAAV по п. 5, отличающийся тем, что последовательности ИКП происходят от AAV2.

7. rAAV по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что капсид AAV содержит белки капсида AAV, содержащие:

(1) гетерогенную популяцию белков vp1, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 в SEQ ID NO: 2, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 1, или белков vp1, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 из SEQ ID NO: 2,

гетерогенную популяцию белков vp2, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, или белков vp2, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере

от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 2,

гетерогенную популяцию белков vp3, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 589 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, или белков vp3, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 589 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 2; и/или

(2) гетерогенную популяцию белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, гетерогенную популяцию белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, и гетерогенную популяцию белков vp3, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 197 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 2, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 2 и, необязательно, дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты.

8. rAAV по п. 7, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белки, представляет собой SEQ ID NO: 1 или последовательность от по меньшей мере 80% до по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

9. rAAV по п. 7 или 8, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1.

10. rAAV по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что капсид AAV содержит белки капсида AAV, содержащие:

(1) гетерогенную популяцию белков vp1, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 728 в SEQ ID NO: 4, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 3, или белков vp1, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 3, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 728 из SEQ ID NO: 4,

гетерогенную популяцию белков vp2, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728

аминокислоты в SEQ ID NO: 4, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, или белков vp2, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728 аминокислоты из SEQ ID NO: 4,

гетерогенную популяцию белков vp3, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 595 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, или белков vp3, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 595 нуклеотида до 2184 нуклеотида в SEQ ID NO: 3, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты из SEQ ID NO: 4; и/или

(2) гетерогенную популяцию белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, гетерогенную популяцию белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, и гетерогенную популяцию белков vp3, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 199 аминокислоты до 728 аминокислоты в SEQ ID NO: 4, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 4 и, необязательно, дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты.

11. rAAV по п. 10, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белки, представляет собой SEQ ID NO: 3 или последовательность от по меньшей мере 80% до по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 3, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

12. rAAV по п. 10 или 11, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3.

13. rAAV по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что капсид AAV содержит белки капсида AAV, содержащие:

(1) гетерогенную популяцию белков vp1, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 в SEQ ID NO: 6, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 5, или белков vp1, полученных из нуклеотидной последовательности, по

меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 5, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 733 из SEQ ID NO: 6,

гетерогенную популяцию белков vp2, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, или белков vp2, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 412 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 738 аминокислоты из SEQ ID NO: 6,

гетерогенную популяцию белков vp3, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из нуклеотидной последовательности, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере от 607 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, или белков vp3, полученных из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере от 607 нуклеотида до 2199 нуклеотида в SEQ ID NO: 5, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты из SEQ ID NO: 6; и/или

(2) гетерогенную популяцию белков vp1, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, гетерогенную популяцию белков vp2, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере от 138 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, и гетерогенную популяцию белков vp3, которая является продуктом нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере от 203 аминокислоты до 733 аминокислоты в SEQ ID NO: 6, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 6 и, необязательно, дополнительно содержат субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты.

14. rAAV по п. 13, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белки, представляет собой SEQ ID NO: 1 или последовательность от по меньшей мере 80% до по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 5, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

15. rAAV по п. 13 или 14, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 5.

16. rAAV по любому из пп. 7-15, отличающийся тем, что последовательности ИКП

AAV представляют собой 5' ИКП и 3' ИКП от AAV, отличного от AAVrh.92, AAVrh.93 или, AAVrh.91.93.

17. rAAV по п. 16, отличающийся тем, что последовательности ИКП происходят от AAV2.

18. Композиция, содержащая по меньшей мере rAAV по любому из пп. 1-17 и физиологически совместимый носитель, буфер, адъювант и/или разбавитель.

19. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что композиция составлена для интратекальной доставки, и геном вектора содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую генный продукт для доставки в центральную нервную систему.

20. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что композиция составлена для внутривенной доставки.

21. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что композиция составлена для интраназальной или внутримышечной доставки.

22. rAAV по любому из пп. 1-17 для доставки целевого генного продукта субъекту, нуждающемуся в этом.

23. Применение rAAV по любому из пп. 1-17 или композиции по любому из пп. 18-21 для доставки целевого генного продукта субъекту, нуждающемуся в этом.

24. Система получения rAAV, пригодная для получения rAAV по любому из пп. 1-11, которая содержит:

(а) нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4 или 6;

(б) молекулу нуклеиновой кислоты, подходящую для упаковки в капсид AAV, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ИКП) AAV и последовательность нуклеиновой кислоты, не относящуюся к AAV, кодирующую генный продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетку-хозяина; и

(в) достаточные функции гер и хелперные функции AAV, позволяющие упаковывать молекулу нуклеиновой кислоты в капсид rAAV.

25. Система по п. 24, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность (а) содержит (а) по меньшей мере SEQ ID NO: 1 или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (б) по меньшей мере SEQ ID NO: 3 или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 3, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; или (в) по меньшей мере SEQ ID NO: 5 или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 5, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

26. Система по любому из пп. 24 или 25, отличающаяся тем, что культура клеток содержит клетки 293 почки эмбриона человека.

27. Система по любому из пп. 24-26, отличающаяся тем, что гер AAV происходит от AAV, отличного от AAVrh.92, AAVrh.93 или AAVrh.91.93.

28. Система по п. 27, отличающаяся тем, что гер AAV происходит от AAV2.

29. Способ получения гAAV, включающий этапы культивирования клетки-хозяина, содержащей: а) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок капсида AAV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4 или 6; (б) функциональный ген гер; (в) миниген, содержащий 5' ИКП AAV, 3' ИКП AAV и трансген; и (г) достаточные хелперные функции, позволяющие упаковывать миниген в капсид AAV.

30. Клетка-хозяин, трансдуцированная гAAV по любому из пп. 1-17.

31. Способ доставки трансгена в клетку, включающий этап контактирования клетки с гAAV по любому из пп. 1-17, при этом указанный гAAV содержит трансген.

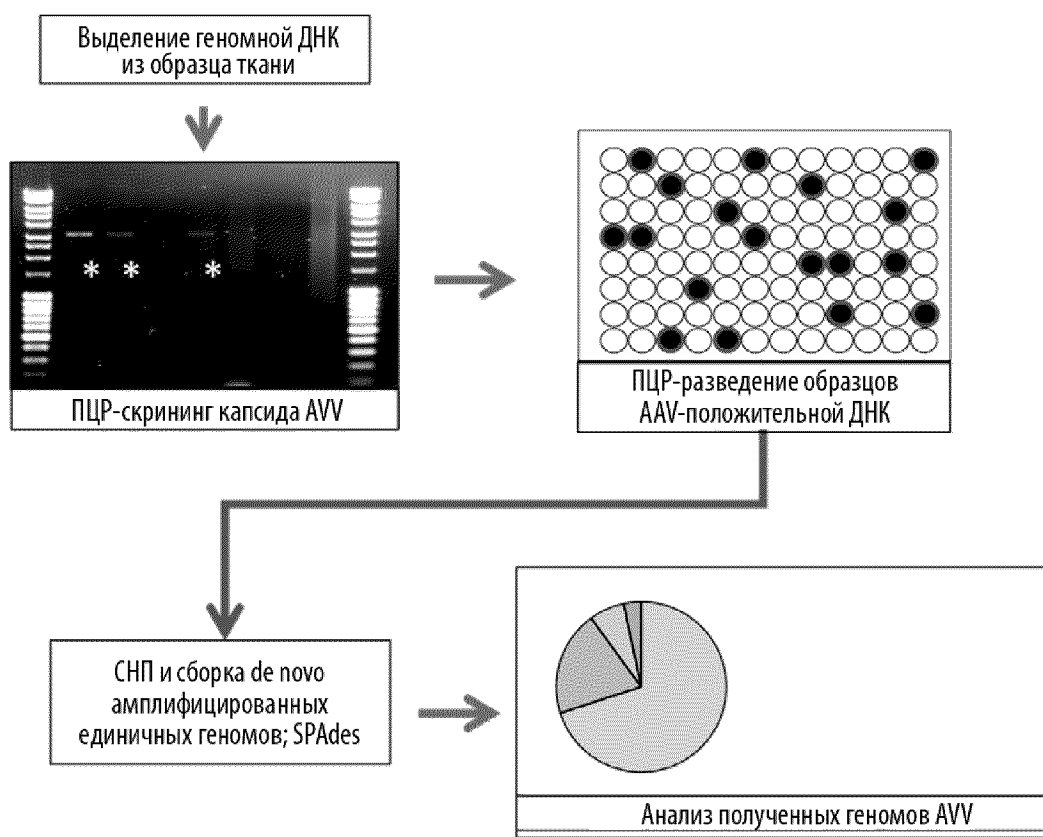
32. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок капсида AAV, причем нуклеотидная последовательность содержит (а) по меньшей мере SEQ ID NO: 1 или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (б) по меньшей мере SEQ ID NO: 3 или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 3, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; или (в) по меньшей мере SEQ ID NO: 5 или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 5, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

33. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 31, отличающаяся тем, что указанная молекула представляет собой плазмиду.

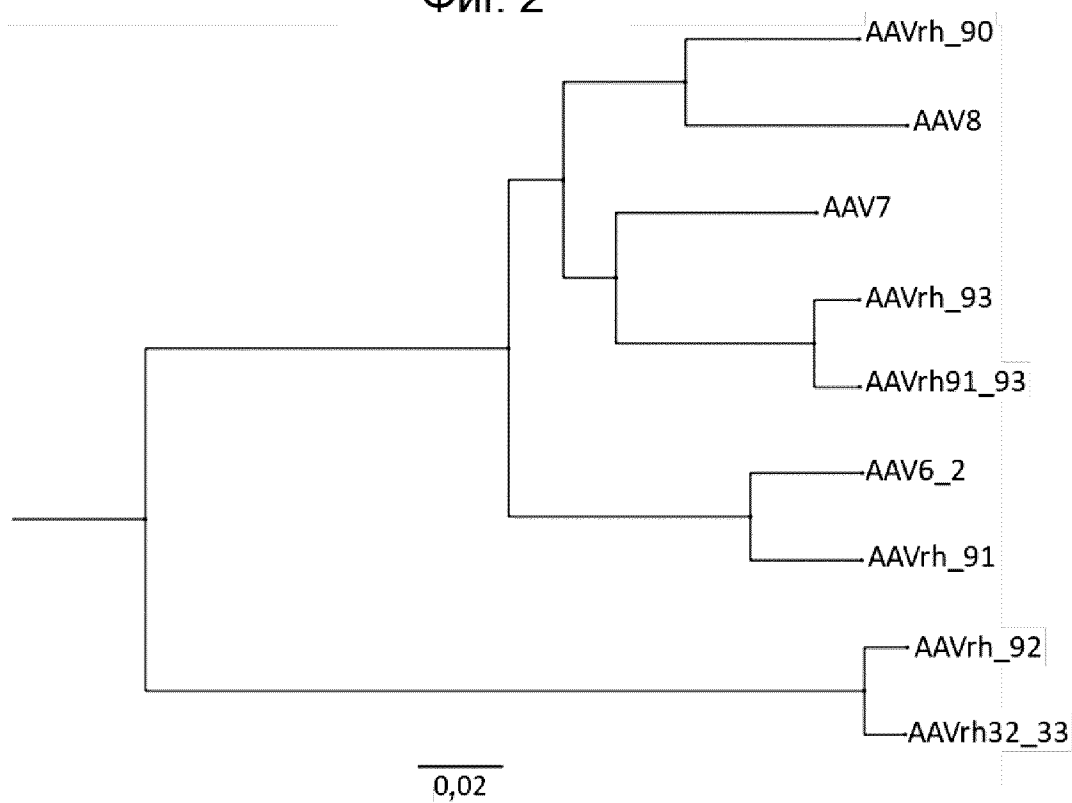
34. Клетка-хозяин, трансфицированная молекулой нуклеиновой кислоты по п. 31 или 32.

По доверенности

Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3А

начало vp1

Фиг. 3А

AAVrh92	atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaaacctctctgagggcatttcgc	60	
AAV7	atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaaacctctctgagggcatttcgc	60	
AAVrh93	atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaaacctctctgagggcatttcgc	60	
AAVrh91.93	atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaaacctctctgagggcatttcgc	60	

AAVrh92	gagtgggtgggaacctgaaacctggagcccccgaagcccaaggccaaaccagcagaagcaggac	120	
AAV7	gagtgggtgggaacctgaaacctggagcccccgaagcccaaggccaaaccagcagaagcaggac	120	
AAVrh93	gagtgggtgggaacctgaaacctggagcccccgaagcccaaggccaaaccagcagaagcaggac	120	
AAVrh91.93	gagtgggtgggaacctgaaacctggagcccccgaagcccaaggccaaaccagcagaagcaggac	120	

AAVrh92	gacggccggggtctgggtgcttccctggctacaagtaacctcggaacctttcaacggactcgac	180	
AAV7	gacggccggggtctgggtgcttccctggctacaagtaacctcggaacctttcaacggactcgac	180	
AAVrh93	gacggccggggtctgggtgcttccctggctacaagtaacctcggaacctttcaacggactcgac	180	
AAVrh91.93	gacggccggggtctgggtgcttccctggctacaagtaacctcggaacctttcaacggactcgac	180	

AAVrh92	aagggggagcccgctcaacgcggcggaacgcgcgcgcgcctcgagcagcaaaaggcctacgac	240	
AAV7	aagggggagcccgctcaacgcggcggaacgcgcgcgcgcctcgagcagcaaaaggcctacgac	240	
AAVrh93	aagggggagcccgctcaacgcggcggaacgcgcgcgcgcctcgagcagcaaaaggcctacgac	240	
AAVrh91.93	aagggggagcccgctcaacgcggcggaacgcgcgcgcgcctcgagcagcaaaaggcctacgac	240	

AAVrh92	cagcagctcaaaagcgggtgacaatccgtacctgcgggtataaaccacgcgcgcgcagttt	300	
AAV7	cagcagctcaaaagcgggtgacaatccgtacctgcgggtataaaccacgcgcgcgcagttt	300	
AAVrh93	cagcagctcaaaagcgggtgacaatccgtacctgcgggtataaaccacgcgcgcgcagttt	300	
AAVrh91.93	cagcagctcaaaagcgggtgacaatccgtacctgcgggtataaaccacgcgcgcgcagttt	300	

AAVrh92	caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagttctccag	360	
AAV7	caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagttctccag	360	
AAVrh93	caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagttctccag	360	
AAVrh91.93	caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagttctccag	360	

AAVrh92	gccaaagaagcgggtactcgaaacctctgggcctgggttgagaagggtgctaaagaaggctcct	420	
AAV7	gccaaagaagcgggtactcgaaacctctgggcctgggttgagaagggtgctaaagaaggctcct	420	
AAVrh93	gccaaagaagcgggtactcgaaacctctgggcctgggttgagaagggtgctaaagaaggctcct	420	
AAVrh91.93	gccaaagaagcgggtactcgaaacctctgggcctgggttgagaagggtgctaaagaaggctcct	420	

AAVrh92	ggaaagaagagacccgttagagtcacccacaag-----agccagactcctcctcgggaatc	474	
AAV7	ggaaagaagagacccgttagagtcacccacaag-----agccagactcctcctcgggaatc	480	
AAVrh93	ggaaagaagagacccgttagac-----tctccagactcctcctcgggaatc	465	
AAVrh91.93	ggaaagaagacgtccggtagagtcagtcgccccaa---gaaccagactcctcctcgggcatt	477	
	* ***** * ** ***** ** ***** ** * * *		
AAVrh92	ggcaaaaaaggcaaacaccagcccaaaaaagagactcaactttgaagaggacactggagcc	534	
AAV7	ggcaagaagaggccagcagcccgccagaaagagactcaattttcggtcagactggcgactca	540	
AAVrh93	ggcaagaagaggccagcagcccgccgaaaaaagagctcaactttgggcagactggcgactca	525	
AAVrh91.93	ggcaaatcagggccagcagcccgcccaaaaaagagactcaattttcggtcagactggcgactca	537	

AAVrh92	ggagacgggacc-----cctgaaggatcagataccagcgcca---tgtcttca	579	
AAV7	gagtcagtcctccgaacctcaacctctcgaggaacctccagcagcgccctctagtgtggga	600	
AAVrh93	gagtcagtcctccgaacctcaacctctctccagaacctccagcagcgccctctagtgtggga	585	
AAVrh91.93	gagtcagtcctccgaacctcaacctctcgaggaacctccagaaaccccgctgctgtggga	597	
	* * ** * * * * *		
AAVrh92	 начало vp3	gacattgaaatgcgtgcagcaccggcggaatgcgtgtcgatggcgggacaagggtccgac	639
AAV7	tctggtacagtggctgcaggcggtggcgccaccatggcagacaataacgaagggtgcgcac	660	
AAVrh93	tctggtacagtggctgcaggcagtggtggcgccaccatggcagacaataacgaagggtgcgcac	645	
AAVrh91.93	cctaactacaatggcttcagggcggtggcgccaccatggcagacaataacgaagggtgcgcac	657	
	* * * * * * * * *		

начало vp2

Фиг. 3В

AAVrh92	ggagtgggtaaatgcctcgggtgatttggcattgcgattccacctggctgagggcaaggtc	699
AAV7	ggagtgggtaaatgcctcaggaaatttggcattgcgattccacatggctgggagacagagtc	720
AAVrh93	ggagtgggtaaatgcctcaggaaatttggcattgcgattccacatggctgggagacagagtc	705
AAVrh91.93	ggagtgggtaaatgcctcaggaaatttggcattgcgattccacatggctgggagacagagtc	717
	***** ** ***** ** *	
AAVrh92	acaacaacctcgaccagaacctgggtcttggccacctacaacaacctgtacctggg	759
AAV7	attaccaccagcaacctggaacctgggacctgcccacctacaacaacctctacaaagcaa	780
AAVrh93	atcaccaccagcaacctggaacctgggacctgcccacctacaacaacctctacaaagcaa	765
AAVrh91.93	atcaccaccagcaacctggaacctgggacctctacctacaacaacctctacaaagcaa	777
	* ** ** ** ** ** ***** * * * ***** ** *	
AAVrh92	ctcggaacaac-----atcaaacagcaaacacctacaacggattctccaccccc	807
AAV7	atctccagtgaaactgcaggtagtagcaaacagcaaacacctacttgggtacagcaacccc	840
AAVrh93	atctccagtcag---agcggggctacaaacagcaaacacctctcttgggtacagcaacccc	822
AAVrh91.93	atctccagtcgcttcaacggggggcagtagaagcaaacacctacttgggtacagcaacccc	837
	* * * ***** ** * * * * * *	
AAVrh92	tggggatactttgactttaacagattccactgtcaactctccacacgtgactggcagaaga	867
AAV7	tgggggtatcttgactttaacagattccactgcccactctctccacacgtgactggcagcga	900
AAVrh93	tgggggtatcttgactttaacagattccactgcccactctctccacacgtgactggcagcga	882
AAVrh91.93	tgggggtatcttgactttaacagattccactgcccactctctccacacgtgactggcagcga	897
	***** ** ***** ***** ***** ***** **	
AAVrh92	ctcatcaacaacaactggggactacgacccaaaagccatgcccgttaaaatcttcaatctc	927
AAV7	ctcatcaacaacaactggggattccgggccaaagaagctgcccgttcaagctcttcaacatc	960
AAVrh93	ctcatcaacaacaactggggattccgggccaaagaagctgcccgttcaagctcttcaacatc	942
AAVrh91.93	ctcatcaacaacaactggggattccgggccaaagaagctgcccgttcaagctcttcaacatc	957
	***** * * * * * * * * * * * *	
AAVrh92	caagttaaagaggttcacaaagctogaacggggagagtaacggttcggttaataaaccttaccago	987
AAV7	caagttcaagaggttcacaaagctogaacggggagagtaacggttcggttaataaaccttaccago	1020
AAVrh93	caagttcaagaggttcacaaagctogaacggggagagtaacggttcggttaataaaccttaccago	1002
AAVrh91.93	caagttcaagaggttcacaaagctogaacggggagagtaacggttcggttaataaaccttaccago	1017
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * *	
AAVrh92	acgggttcagatattttggggactcgtcgttatgagctcccgtaogtgatggagctggacaa	1047
AAV7	acgattcaggtattttcgggactcgggaataaccagctgcggtacgctcctcggctctcggcac	1080
AAVrh93	acgattcaggtattttcgggactcgggagtaaccagctgcggtacgctcctcggctctcggcac	1062
AAVrh91.93	acgattcaggtattttcgggactcgggagtaaccagctgcggtacgctcctcggctctcggcac	1077
	** * * * * * * * * * * * * * * * *	
AAVrh92	gaggggagcctgcctcctttcccaaatgaagctctttatggtgcctcaatatggctactgt	1107
AAV7	cagggctgcctgcctccttcccggtccggagcgtcttcatgattcctcagtaacggctacotg	1140
AAVrh93	cagggctgcctcctccttcccggtccggagcgtcttcatgattcctcagtaacggctacotg	1122
AAVrh91.93	cagggctgcctcctccttcccggtccggagcgtcttcatgattcctcagtaacggctacotg	1137
	*** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
AAVrh92	ggcatcgtgactggcgagaatcagaaccagacggacagaaaatgccttctactgcctggag	1167
AAV7	actctcaacaatggca-----gtcagttctgtgggaagttcctccttctactgcctggag	1194
AAVrh93	acgctcaacaacggta-----gtcagttctgtgggtcgttcttcttctactgcctggaa	1176
AAVrh91.93	acgctcaacaacggta-----gtcagttctgtgggtcgttcttcttctactgcctggaa	1191
	** * * * * * * * * * * * * * * * *	
AAVrh92	tattttccttcacaaatggtgagaactggcaacaactttgaaatgggttacaaactttgag	1227
AAV7	tacttccctctcagatggtgagaacgggcaacaactttgagttcagctacagcttggag	1254
AAVrh93	tatttccctctcacaatggtgagaacgggcaacaactttgaaatcagttacacactttgag	1236
AAVrh91.93	tatttccctctcacaatggtgagaacgggcaacaactttgaaatcagttacacactttgag	1251
	** * * * * * * * * * * * * * * * *	
AAVrh92	aaggtgccttccactcaatgtatgctcaacagccagagcctggacagactgatgaatccc	1287
AAV7	gaagtgcttccactcagctacgacacagccagagcctggacagcctgatgaatccc	1314
AAVrh93	gatgtgccttccactcagctacgacagcctggacagcctggacagcctgatgaatccc	1296
AAVrh91.93	gatgtgccttccactcagctacgacagcctggacagcctggacagcctgatgaatccc	1311
	* **** * * * * * * * * * * * * * * *	

Фиг. 3С

AAVrh92	ctcctggaccagtaacotgtggcaottacagtogactaacotctggagggactotgaatcaa	1347
AAV7	ctcatcgaccagtaacttgtactaacotggccagaacacagagtaaacccaggaggacagct	1374
AAVrh93	cttatcgaccagtatctgtactaacotggccggaccacagagcaccacggg-----t	1347
AAVrh91.93	cttatcgaccagtatctgtactaacotggccggaccacagagcaccacggg-----t ** * ***** ** *	1362
AAVrh92	ggcaatgcagcaaccacatttggaaaaaatcaggagtgaggactttgccttttacagaaa	1407
AAV7	ggcaatcgggaaactgcagttttaccaggggcgcttcaactatggccgaacaagcaag	1434
AAVrh93	tcaccagagagagctgcagtttcatcaggctgggcccacactatggccgagcaatcaag	1407
AAVrh91.93	tcaccagagagagctgcagtttcatcaggctgggcccacactatggccgagcaatcaag ** * **** *	1422
AAVrh92	aactggctgcctgggcttgggttaagcagcagagattctcaaaagactgccagtcaaaa	1467
AAV7	aattgggttacctggacotttgccttcgggcaacaagagttctcaaaacgctggatcaaaa	1494
AAVrh93	aactgggttacctggcttgccttcgggcaacaagcgttttcaaggtgctggatcagaac	1467
AAVrh91.93	aactgggttacctggcttgccttcgggcaacaagcgttttcaaggtgctggatcagaac ** *** * ***** ** *	1482
AAVrh92	tacaagattcctgcacggggggcgacgctctgttaaagtatgacacccactatacctta	1527
AAV7	aacaacagcaacttt-----gcttggactggtgccacaaatatcacttg	1539
AAVrh93	gccaaacagcaacttt-----gcttggactggtgccactaaatatcacttg	1512
AAVrh91.93	gccaaacagcaacttt-----gcttggactggtgccactaaatatcacttg *** * * **** *	1527
AAVrh92	aacaacgggtggagcaacatcgccggggaactccaatggccacagccggacottcggt	1587
AAV7	aacggcagaaactggttggtaaatccggcgctgcctatggcaactcacaaggacgacgag	1599
AAVrh93	aatggcggttaactctctgaccaatccgggagttcccatggcaacacacaaggacgacgag	1572
AAVrh91.93	aatggcggttaactctctgaccaatccgggagttcccatggcaacacacaaggacgacgag ** * **** *	1587
AAVrh92	gggga---cttcagtaacggccagcttatattcctggacatctgttacccggaataca	1644
AAV7	gacogctttttcccatccagcggagtcctgatttttggaaaaactggg----gcaactaac	1656
AAVrh93	gacaggttttttcccatccagcggggtgctggtttttggcaagacggga---gcggccaac	1629
AAVrh91.93	gacaggttttttcccatccagcggggtgctggtttttggcaagacggga---gcggccaac * ** ** * * * *	1644
AAVrh92	acaacttcagccacaacatctgttgtttacatcagaagaagaattgctgccaccaaccca	1704
AAV7	aaaactacatttggaaaaatgtgttaatgacaaatgaagaagaattcgtcctactaatcct	1716
AAVrh93	aaaacaaagctggaaaaatgttctgatgacaaacgaagaagaattcaaaactaccaacccg	1689
AAVrh91.93	aaaacaaagctggaaaaatgttctgatgacaaacgaagaagaattcaaaactaccaacccg * *** * * **** *	1704
AAVrh92	agagacacggacatgttttggccagattgctgcacataatcagaatgctacaactgctccc	1764
AAV7	gtagccacgggaagaatacgggatagtcagcagcaacttacaaagcgggctaactgcagcc	1776
AAVrh93	gtggctacagaagaatatggcggtgtttccagcaatttgcaggctgggactacaaaccca	1749
AAVrh91.93	gtggctacagaagaatatggcggtgtttccagcaatttgcaggctgggactacaaaccca * ** ** * * ** *	1764
AAVrh92	ataacccggcaacgtgactgctatgggagtgctgcctggcatggtgtggcaaaaacagagac	1824
AAV7	cagacacaagttgtcaacaaccaggggagccttaacctggcatggtctggcagaacccgggac	1836
AAVrh93	cagacactgactgttaacaaccagggggaccttaacctggcatggtgtggcagaacccgggac	1809
AAVrh91.93	cagacactgactgttaacaaccagggggaccttaacctggcatggtgtggcagaacccgggac ** ** * **** *	1824
AAVrh92	atttactaccaagggcaatttggggcaagatcccacaogcggaaggacattttcatcct	1884
AAV7	gtgtacctgcagggtcccatctggggcaagattcctcacacggatggcaactttcacccg	1896
AAVrh93	gtgtacctgcagggtcccatctggggcaaaattcctcacacgggaaggcaactttcacccg	1869
AAVrh91.93	gtgtacctgcagggtcccatctggggcaaaattcctcacacgggaaggcaactttcacccg * *** ** ** * * **** *	1884
AAVrh92	tcacogctgattggtgggttttggactgaacacacccgctcccagatattcatcaagaac	1944
AAV7	tctcctttgatggggggttttggacttaaacacacccgctcctcagatcctgatcaagaac	1956
AAVrh93	tctcctttgatgggtggattttggacttaaacacacccgctcctcagatcctaataaaaac	1929
AAVrh91.93	tctcctttgatgggtggattttggacttaaacacacccgctcctcagatcctaataaaaac ** ** * **** ** * **** *	1944

Фиг. 3D

AAVrh92	actcccgtacctgccaatcctgcgacaaccttcactgcagccagagtggactctttcatt	2004
AAV7	actcccgttcccgtctaatectccggaggtgtttactcctgccaagtttgcttcgttcac	2016
AAVrh93	acgcctgttccctgccaatcctccggaggtgtttactcctgccaagtttgcttcgttcac	1989
AAVrh91.93	acgcctgttccctgccaatcctccggaggtgtttactcctgccaagtttgcttcgttcac	2004
	** ** *	
AAVrh92	acacaatacagcaccggccaggtcgctgttcagattgaatgggaaattgaaaagggaacgc	2064
AAV7	acacagtacagcaccggacaagtcagcgtggaaatcgagtgggagctgcagaaggaaaac	2076
AAVrh93	acgcagtacagcaccggtcaggtcagcgtggaaatcgagtgggagctgcagaaggaaaac	2049
AAVrh91.93	acgcagtacagcaccggtcaggtcagcgtggaaatcgagtgggagctgcagaaggaaaac	2064
	** ** *	
AAVrh92	tccaaacgctggaatcctgaagtgcagtttacttcaaactatgggaaccagtccttctatg	2124
AAV7	agcaagcgctggaacccggagattcagtacacctccaactttgaaaagcagactggtgtg	2136
AAVrh93	agcaagcgctggaacccagagattcagtacacctccaactttgataaatctaataatgtg	2109
AAVrh91.93	agcaagcgctggaacccagagattcagtacacctccaactttgataaatctaataatgtg	2124
	*** *	
AAVrh92	ttgtgggctcctgatacaactgggaagtatacagagccgcggttattggctctcgttat	2184
AAV7	gactttgccgttgacagccagggtgtttactctgagcctcgccctattggcactcggttac	2196
AAVrh93	gactttgctgttaacaatgaaggtgtttactctgagcctcgccccattggcactcgctac	2169
AAVrh91.93	gactttgctgttaacaatgaaggtgtttactctgagcctcgccccattggcactcgctac	2184
	* *	
AAVrh92	ttgactaatcatttgtaa	2202
AAV7	ctcaccgtaatctgtaa	2214
AAVrh93	ctcaccgtaacctgtaa	2187
AAVrh91.93	ctcaccgtaacctgtaa	2202
	* *	

← С-конец vp1-vp3

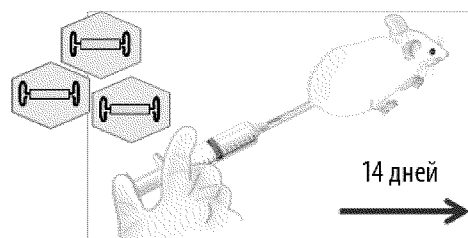
↓

[illegible]

Фиг. 4В

AAVrh92	KVPFHSMYAHSQSLDRLMNPILLQYLYLWHLQSTTSCGCTLNQCNAATTFCKIRSGDFAFYRK	469
AAV7	DVPFHSSYAHSQSLDRLMNPILLQYLYYLARTQSNPCCGTACNRELQFYQGGPSTMAEQAK	478
AAVrh93	DVPFHSSYAHSQSLDRLMNPILLQYLYYLARTQSTTGS---TRELQFHQAGPNTMAEQSK	469
AAVrh91.93	DVPFHSSYAHSQSLDRLMNPILLQYLYYLARTQSTTGS---TRELQFHQAGPNTMAEQSK ***** *****;*****; * * * * * : : * * *	474
AAVrh92	NWLPGPCVQKQQRFSKTASQNYKIPASGGDALLKYDTHYTLNNRWSNIAPGPPMATAGPSD	529
AAV7	NWLPGPCFRQQRVSKTLDQNNNSN-----FAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDE	533
AAVrh93	NWLPGPCFRQQRVSKVLDQANNSN-----FAWTAATKYHLNGRNSLTNPVPMATHKDE	524
AAVrh91.93	NWLPGPCFRQQRVSKVLDQANNSN-----FAWTAATKYHLNGRNSLTNPVPMATHKDE *****;***.***. * * : : * : * * * * * * * * * *	529
AAVrh92	GDFSNA--QLIFPGPSVTGNTTTSANNLLFTSEEBIAATNPRDMDFGQIADNNQNATTA	587
AAV7	DRFFPSSGVLIFFGKT--GATNETTLENVLMTNEEEIRPTNPVATEEYGVSSNLQAANTA	591
AAVrh93	DRFFPINCVLVFGKT--GAANKTTLENVLMTNEEEIKTTNPVATEEYGVSSNLQAGTTN	582
AAVrh91.93	DRFFPINGVLVFGKT--GAANKTTLENVLMTNEEEIKTTNPVATEEYGVSSNLQAGTTN * * * * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	587
AAVrh92	PITGNVTAMGVLPGMVWQNRDIYYQGPIWAKIPHADGCHFHPSPFLIGGFGLKHPPFPQILIK	647
AAV7	AQTQVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGPWIWAKIPHTDGNFHPSPFLMGGFGGLKHPPFPQILIK	651
AAVrh93	PQFLTVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGPWIWAKIPHTDGNFHPSPFLMGGFGGLKHPPFPQILIK	642
AAVrh91.93	PQFLTVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGPWIWAKIPHTDGNFHPSPFLMGGFGGLKHPPFPQILIK * * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	647
AAVrh92	NTPVPANPATTFTTAARVDSFITQYSTGQVAVQLEWEIEKERSKRWNPEVQFTSNYGNQSS	707
AAV7	NTPVPANPPEVFTPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNFEKQTG	711
AAVrh93	NTPVPANPPEVFTPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNFDKSN	702
AAVrh91.93	NTPVPANPPEVFTPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNFDKSN ***** * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	707
AAVrh92	MLWAPDTECKYTEPRVIGSKRYLTNHL	733
AAV7	VDFAVDSQGVYSEPRFIGTRYLTNHL	737
AAVrh93	VDFAVNNEGVYSEPRFIGTRYLTNHL	728
AAVrh91.93	VDFAVNNEGVYSEPRFIGTRYLTNHL : : * : * * * : * : * : * : * : * : * : *	733

Фиг. 5А

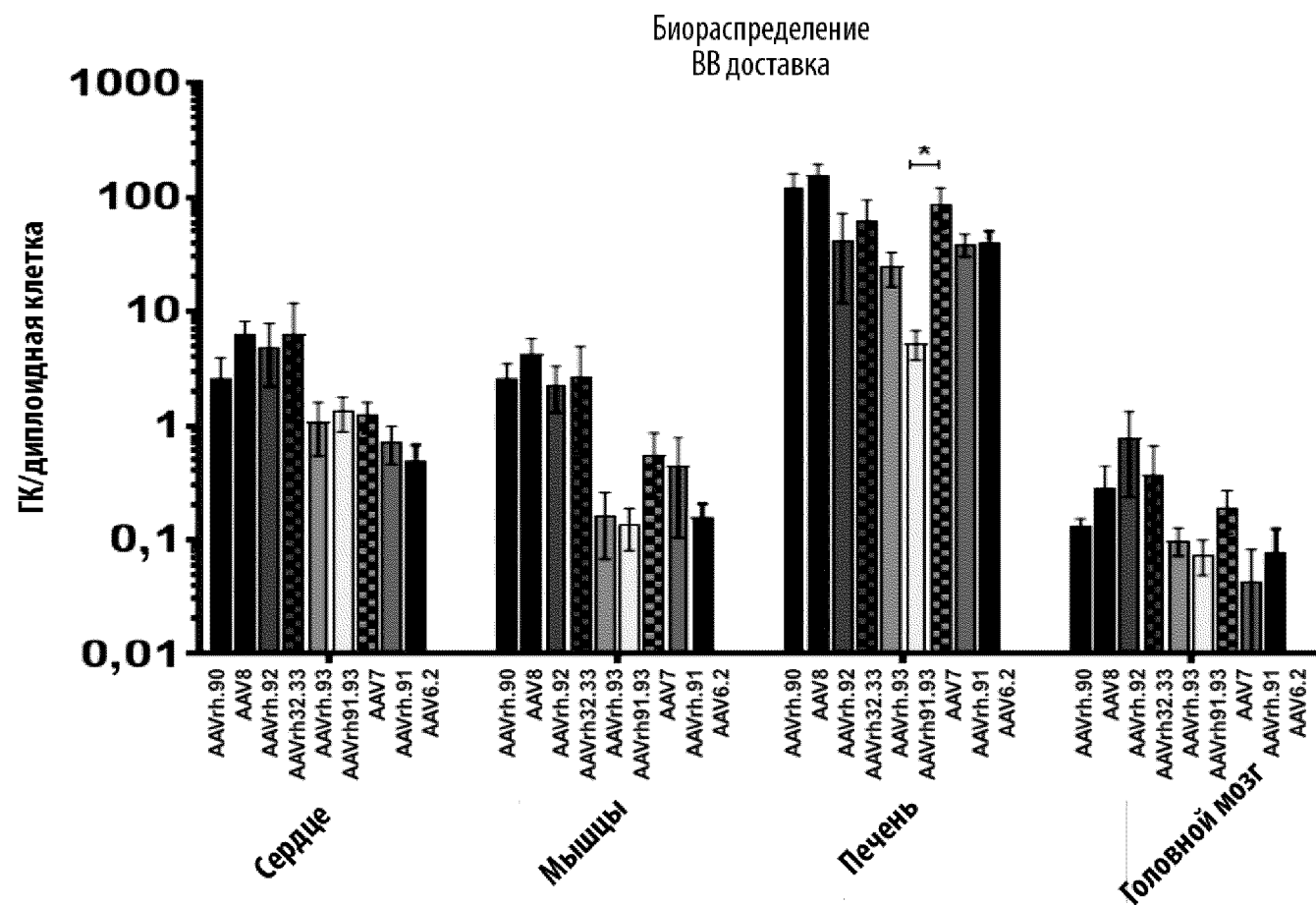


Вскрытие:
сердце, печень, мышцы, головной
мозг, спинной мозг

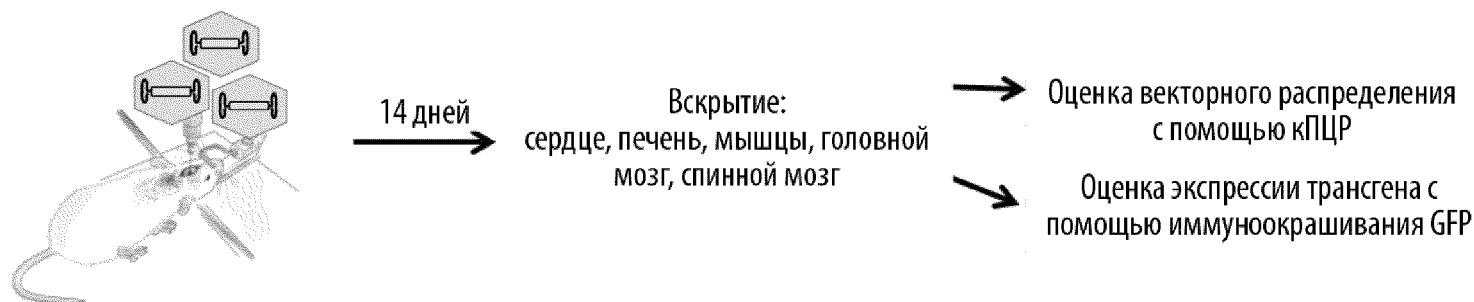
Оценка векторного распределения
с помощью кПЦР

Оценка экспрессии трансгена с помощью
иммуноокрашивания GFP

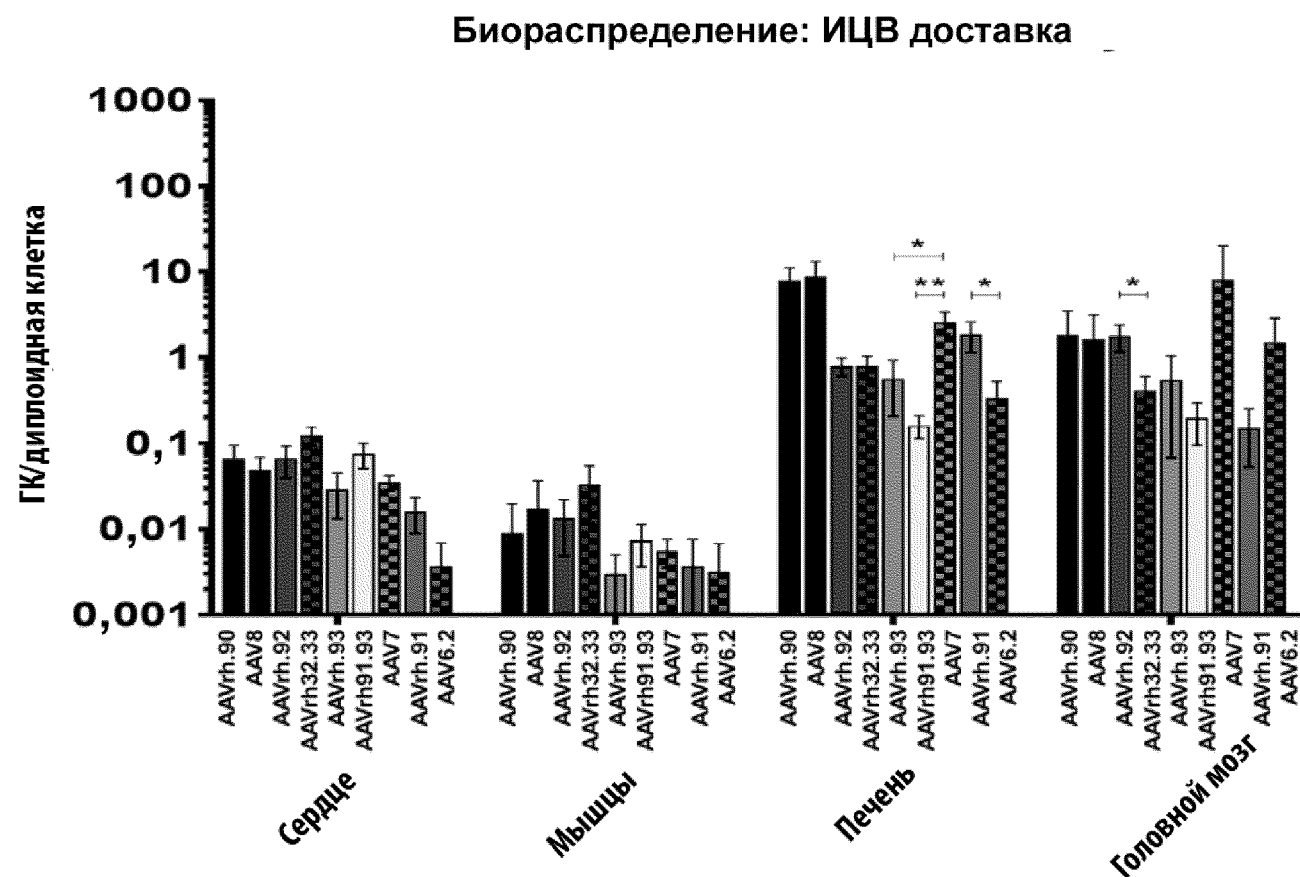
Фиг. 5В



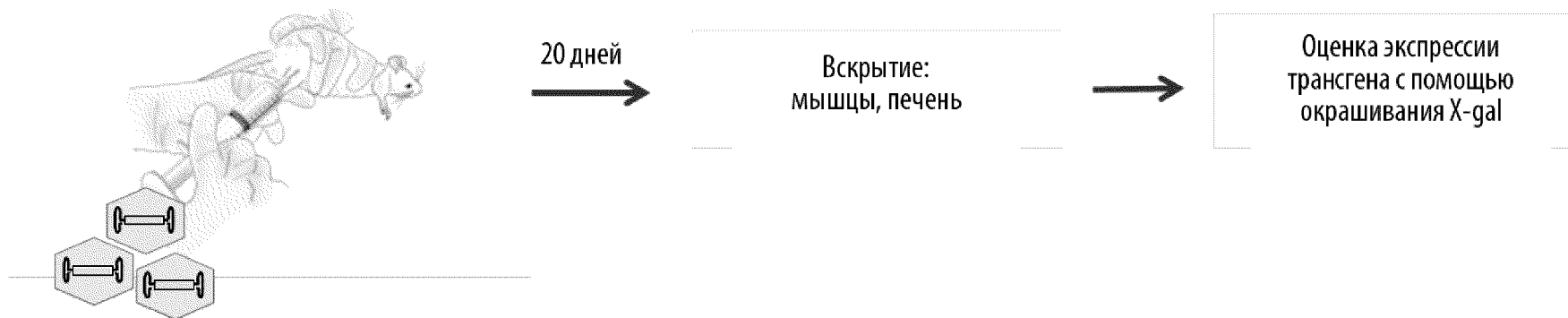
Фиг. 5C



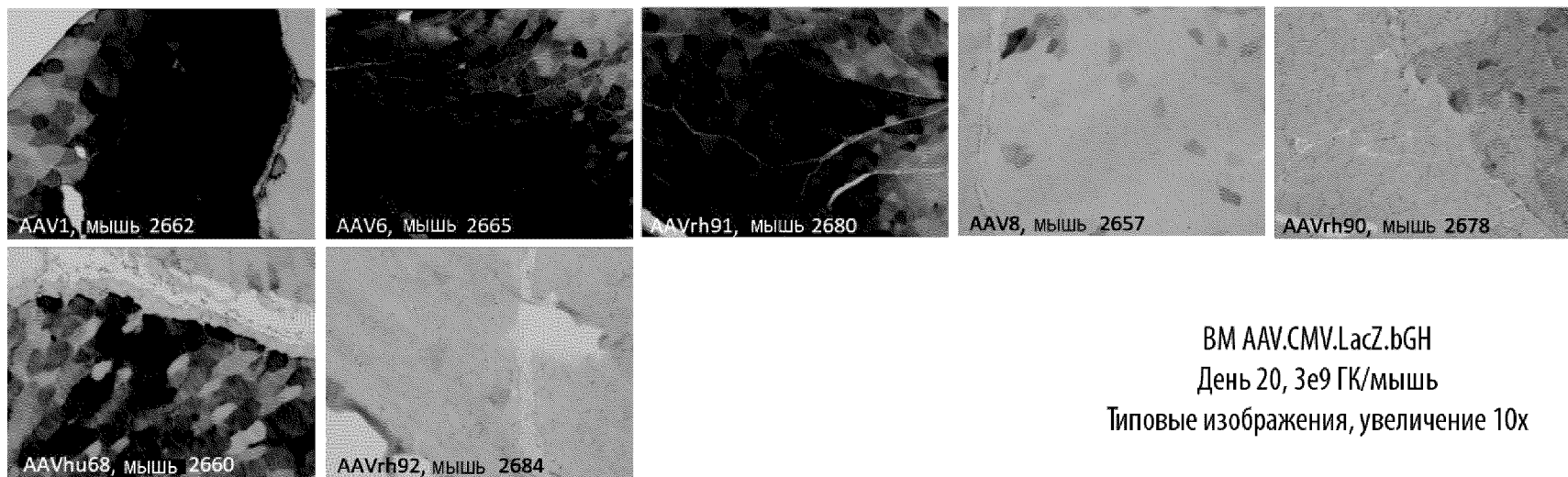
Фиг. 5D



Фиг. 6А

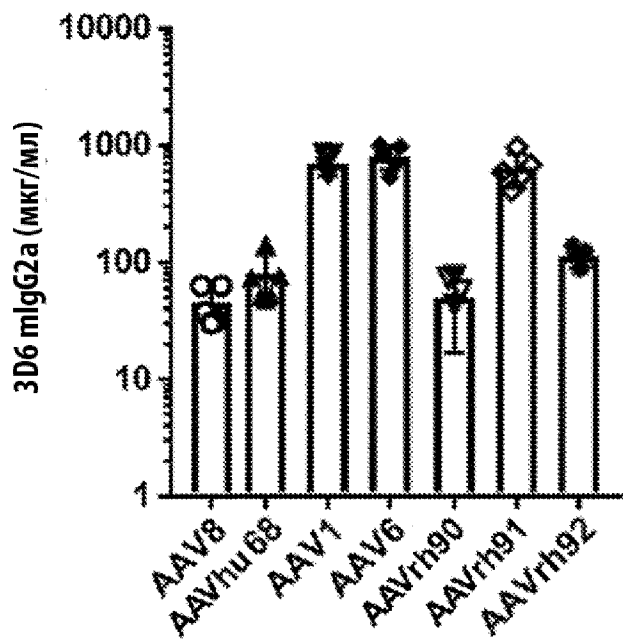


Фиг. 6В



Фиг. 7

W2998 Неделя 4

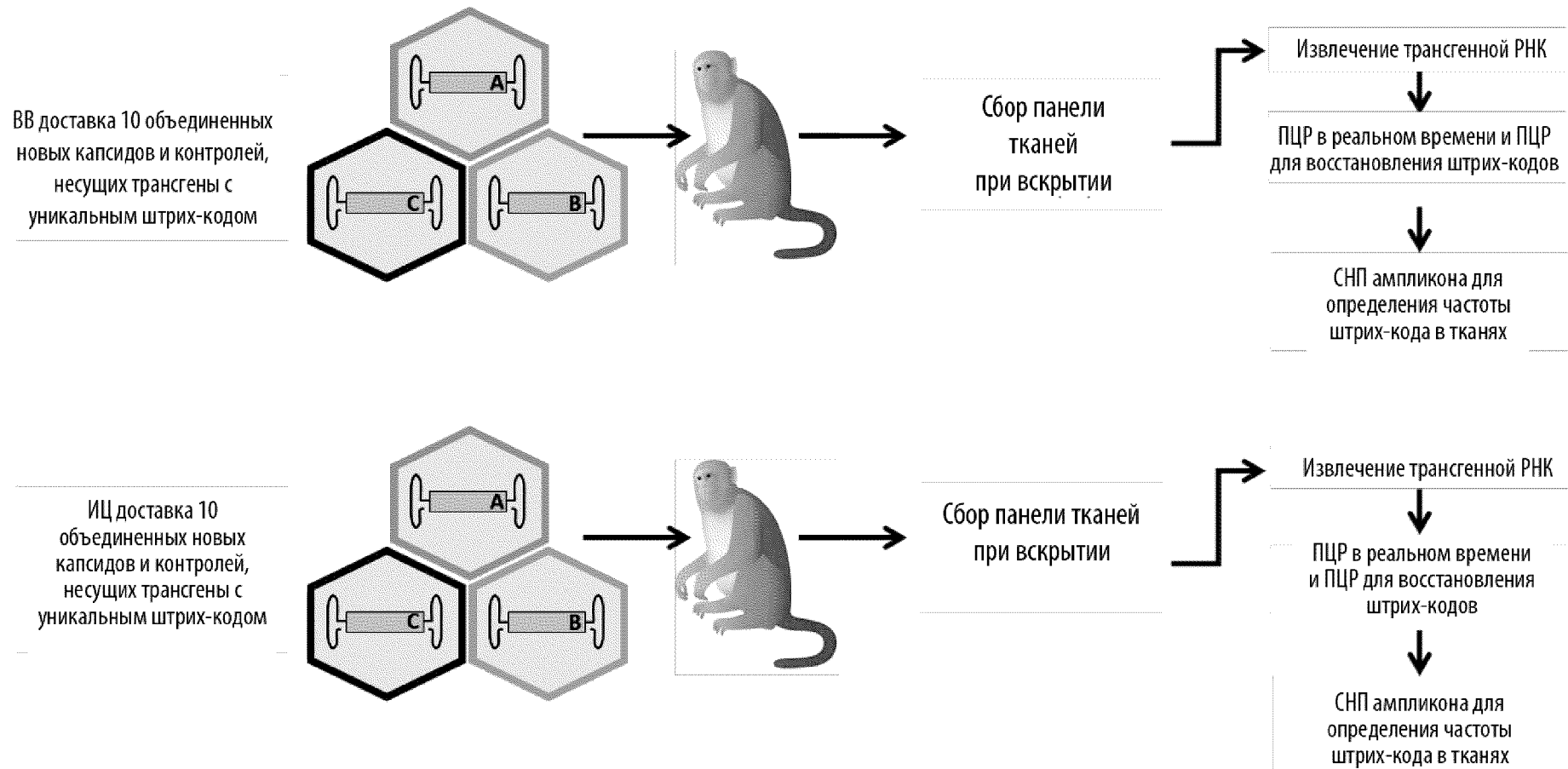


Трансген	3D6 (мышь mAb)
Промотор	tMCK (мышечно селективный)
Животное	мышь WT B6 (5/капсид)
Путь введения	BM
Доза	1e11 гк/мышь
Считывание	Сыворотка 3D6 (еженедельно)

Фиг. 8

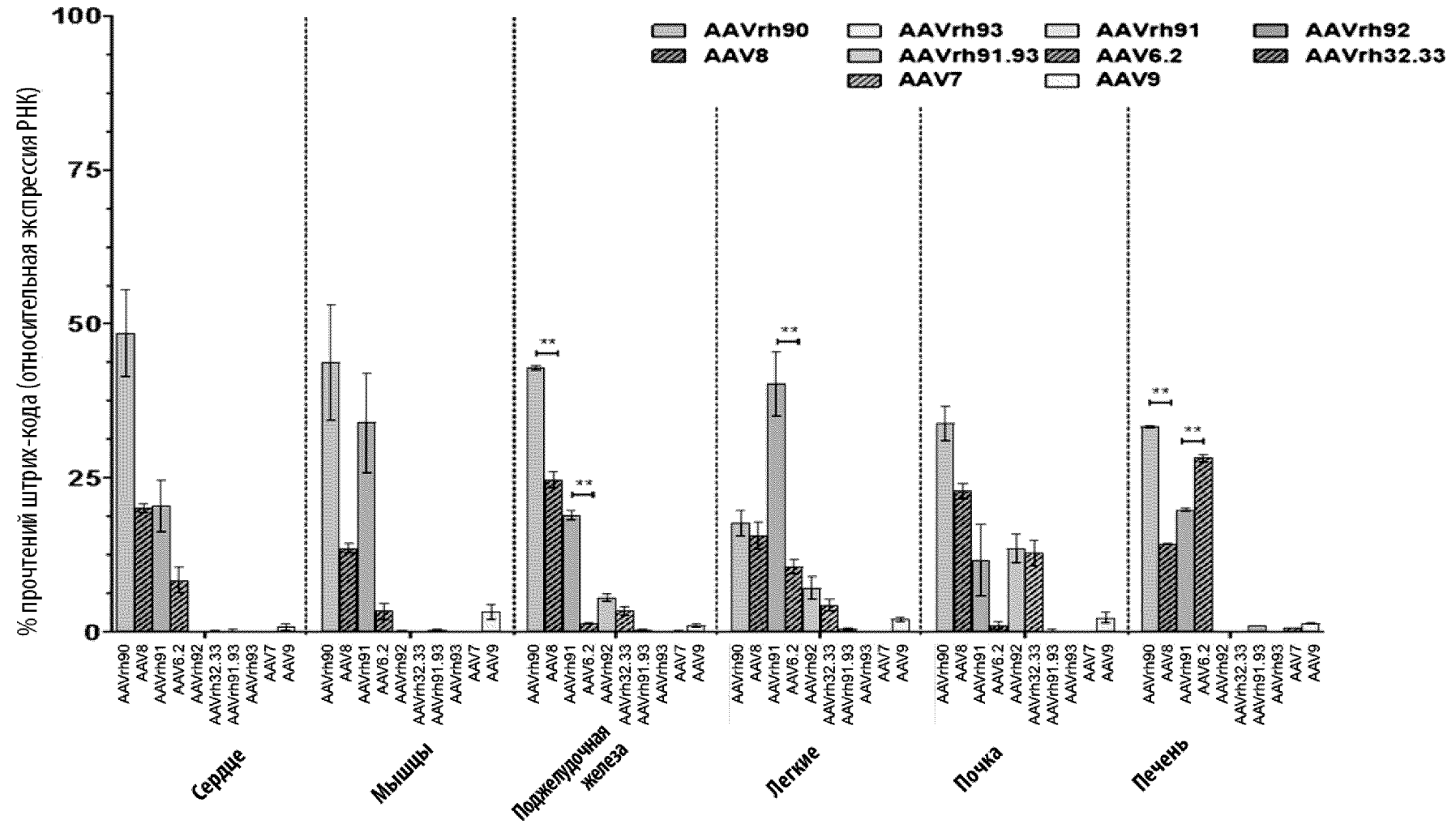
капсид	выход (% AAV8) (трансген mAb)	выход (% AAV8) (трансген LacZ)	Источник
AAV8	100%	100%	Природный изолят
AAVhu68	76%	89%	Природный изолят
AAV1	26%	28%	Природный изолят
AAV6	27%	28%	Природный изолят
AAVrh90	105%	118%	Природный изолят
AAVrh91	53%	74%	Природный изолят
AAVrh92	68%	102%	Природный изолят

Фиг. 9



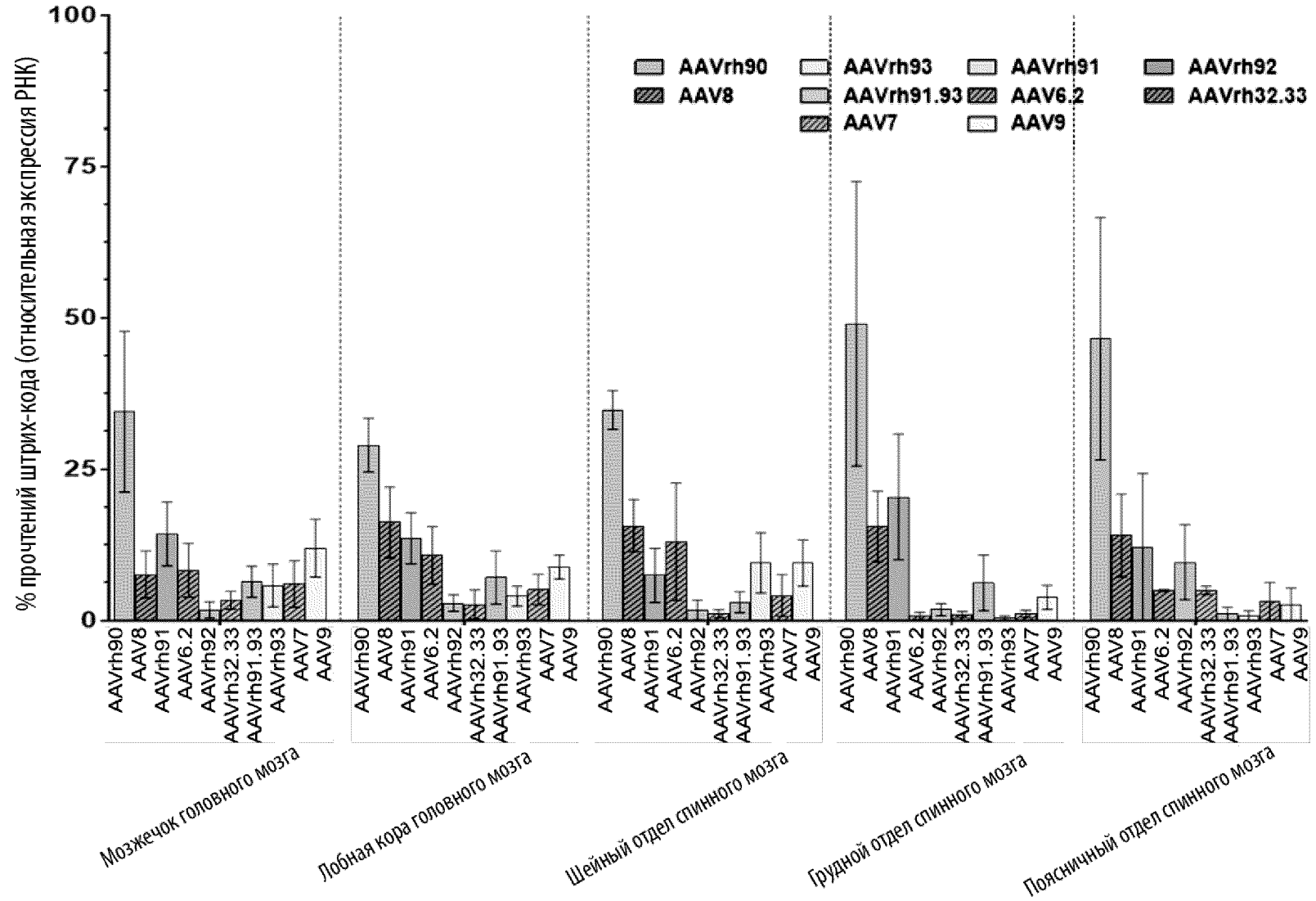
Фиг. 10А

Экспрессия штрихкодированного генома вектора в периферических тканях после ВВ доставки



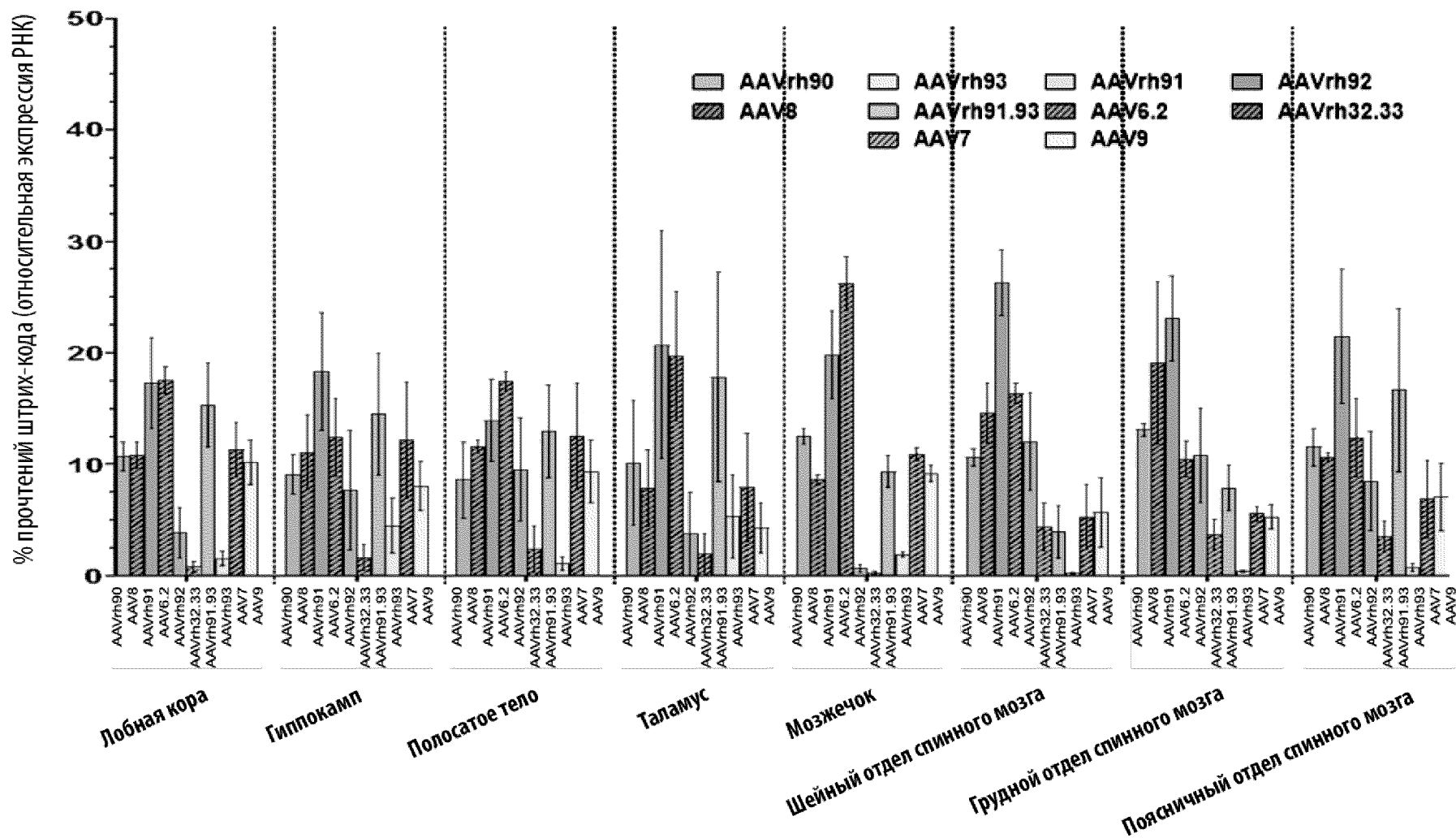
Фиг. 10В

Экспрессия штрихкодированного генома вектора в тканях ЦНС после ВВ доставки



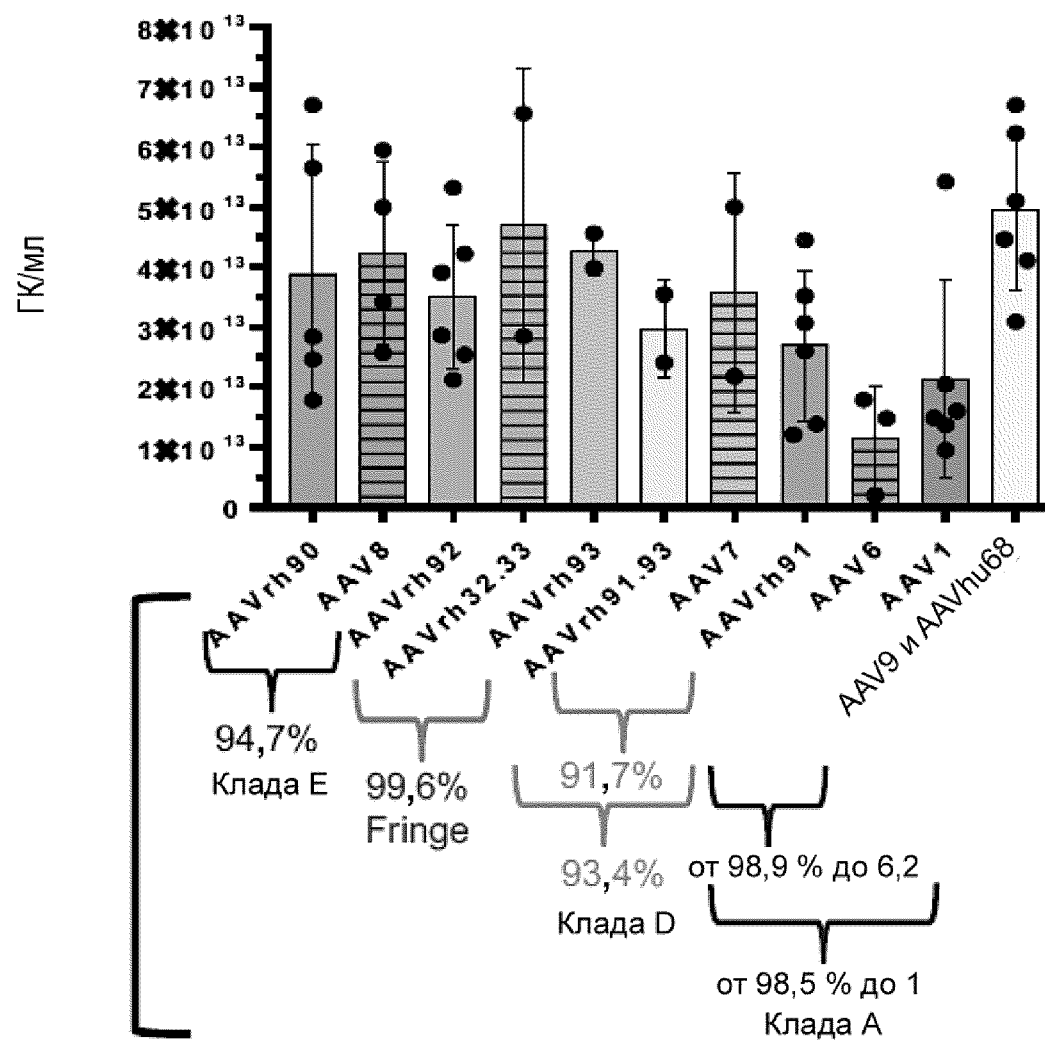
Фиг. 10С

Экспрессия штрихкодированного генома вектора в тканях ЦНС после ИЦ доставки

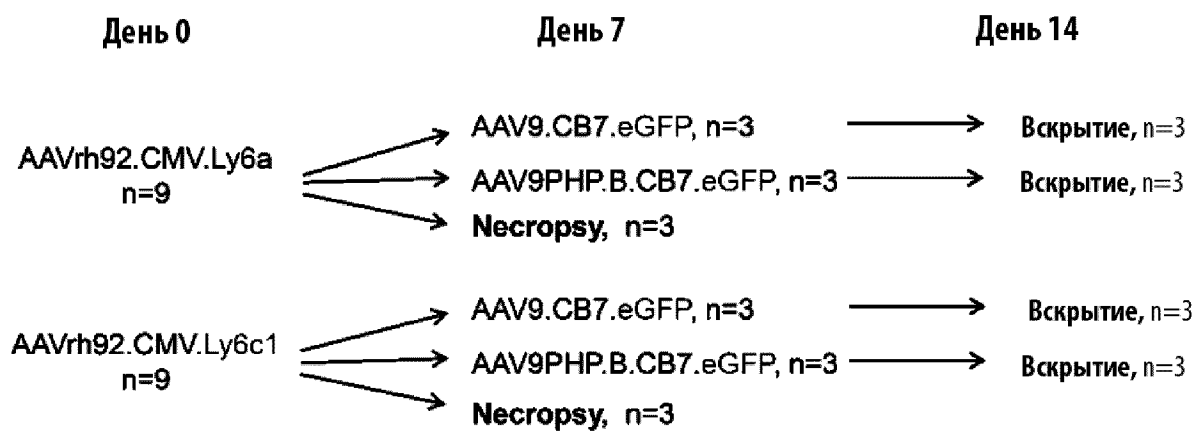


Фиг. 11

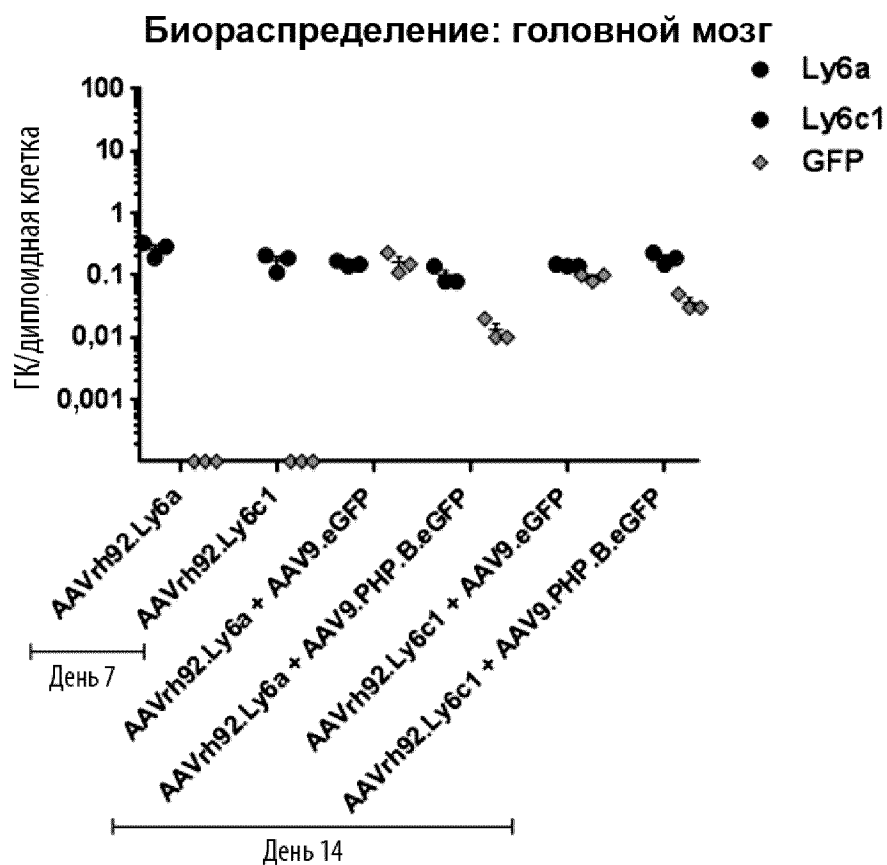
Титры для всех мелкомасштабных препаратов



Идентичность аминокислотных последовательностей между новыми капсидами и контролями



Фиг. 12В



Фиг. 13

