

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290202** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.09

(22) Дата подачи заявки
2020.07.02

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

**(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВЕКТОРЫ AD35 И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ**

(31) 62/869,907; 62/935,507; 63/009,385

(32) 2019.07.02; 2019.11.14; 2020.04.13

(33) US

(86) PCT/US2020/040756

(87) WO 2021/003432 2021.01.07

(71) Заявитель:

**ФРЕД ХАТЧИНСОН КЭНСЕР
РИСЕРЧ СЕНТЕР; ЮНИВЕРСИТИ
ОФ ВАШИНГТОН (US)**

(72) Изобретатель:

**Ким Ханс-Петер, Лайебер Андре, Ли
Чан, Ван Хуниджэ (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится, среди прочего, к хелпер-зависимым аденовирусным векторам серотипа 35 (Ad35). В различных вариантах осуществления хелпер-зависимые векторы Ad35 можно использовать для доставки терапевтической нагрузки нуждающемуся в этом субъекту. Типовые нагрузки могут кодировать белки-заместители, антитела, CAR, TCR, малые РНК и системы редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления хелпер-зависимый вектор Ad35 сконструирован для интеграции нагрузки в геном клетки-хозяина. Настоящее изобретение дополнительно включает способы генной терапии, которые включают введение хелпер-зависимого вектора Ad35 нуждающемуся в этом субъекту.

A1

202290202

202290202

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571612EA/042

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВЕКТОРЫ AD35 И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/869907, поданной 02 июля 2019 г., предварительной заявке США № 62/935507, поданной 14 ноября 2019 г., и предварительной заявке США № 63/009385, поданной 13 апреля 2020 г., описание каждой из которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ПОДДЕРЖКА

[0002] Данное изобретение было осуществлено при государственной поддержке по грантам №№ HL130040, HL141781 и CA204036, присужденным Национальными институтами здравоохранения. Правительство имеет определенные права на данное изобретение.

ИНФОРМАЦИЯ КАСАТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в данное описание посредством ссылки. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей, F053-0107PCT_ST25.txt. Текстовый файл имеет размер 945 Кбайт, был создан 2 июля 2020 г. и подается в электронном виде посредством EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Многие медицинские состояния вызваны генетической мутацией и/или поддаются лечению, по меньшей мере частично, с помощью генной терапии. Такие состояния включают, например, гемоглобинопатии, иммунодефициты и онкологические заболевания. Генетические расстройства, известные как гемоглобинопатии, являются одними из наиболее распространенных типов генетических расстройств по всему миру с существенно сниженным уровнем выживаемости среди пациентов, рожденных в слаборазвитых странах. Примеры гемоглобинопатий включают серповидноклеточную анемию и талассемию. Иммунодефициты могут быть первичными или вторичными. Всемирной организацией здоровья признаны более 80 первичных иммунодефицитных заболеваний. Необходимы профилактика и терапевтическое лечение медицинских состояний, вызываемых генетической мутацией и/или поддающихся лечению, по меньшей мере частично, с помощью генной терапии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Генная терапия позволяет лечить многие состояния, имеющие генетическую компоненту, включая, без ограничения, гемоглобинопатии, иммунодефициты и онкологические заболевания. Хотя молекулярная биология включает различные инструменты для генетической инженерии, применение этих инструментов в контексте генной терапии, например, *ex vivo* и *in vivo*, приводит к появлению новых возможностей и задач, связанных, по меньшей мере частично, с разработкой генетических конструкций для использования в векторах для генной терапии, а также разработкой самих векторов.

[0006] Настоящее изобретение включает, помимо прочего, аденовирусные векторы и аденовирусные геномы (например, «рекомбинантные» или «сконструированные» аденовирусные векторы и аденовирусные геномы) для экспрессии редакторов оснований в клетках-мишенях. Настоящее изобретение включает, помимо прочего, аденовирусные векторы и аденовирусные геномы для экспрессии системы CRISPR, содержащей фермент CRISPR, который представляет собой CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу, и/или гидовую РНК (гРНК), в клетках-мишенях, необязательно при этом экспрессия по меньшей мере одного компонента системы CRISPR является самоинактивирующейся. Настоящее изобретение включает, помимо прочего, аденовирусные векторы и аденовирусные геномы для экспрессии системы редактирования оснований, содержащей фермент редактирования оснований и/или гидовую РНК (гРНК), в клетках-мишенях, необязательно при этом экспрессия по меньшей мере одного компонента системы редактирования оснований является самоинактивирующейся. Настоящее изобретение включает, помимо прочего, аденовирусные векторы и аденовирусные геномы, которые содержат регуляторную последовательность, которая управляет экспрессией экспрессионного продукта (например, терапевтического экспрессионного продукта) в клетках-мишенях, причем регуляторная последовательность содержит сайт связывания миРНК или регуляторная последовательность содержит область контроля локуса (ОКЛ или LCR, от англ. «locus control region») β -глобина, такую как длинная LCR β -глобина. Настоящее изобретение включает, помимо прочего, комбинированные аденовирусные векторы и аденовирусные геномы, которые экспрессируют множество терапевтических экспрессионных продуктов в клетках-мишенях, например, терапевтических экспрессионных продуктов, которые вместе способствуют лечению заболевания или состояния. Настоящее изобретение включает, помимо прочего, аденовирусные векторы и аденовирусные геномы для интеграции в геном клетки-мишени нагрузки, содержащей длинную КОЛ β -глобина. Настоящее изобретение включает, помимо прочего, аденовирусные векторы и их аденовирусные геномы, которые обладают сниженной иммуногенностью по сравнению с некоторыми

существующими векторами (например, по сравнению с векторами Ad5). Настоящее изобретение включает, помимо прочего, аденовирусные векторы Ad35, аденовирусные геномы Ad35, аденовирусные векторы HDAd35, аденовирусные геномы HDAd35, поддерживающие векторы, поддерживающие геномы, хелперные векторы Ad35 и хелперные геномы Ad35, при этом векторы HDAd35 могут обладать сниженной иммуногенностью по сравнению с некоторыми существующими векторами (например, по сравнению с векторами Ad5 или векторами Ad5/35).

[0007] В настоящем изобретении описаны, помимо прочего, рекомбинантные векторы Ad35, нацеленные на CD46, для *in vivo* редактирования генов гемопоэтических стволовых клеток и связанные с этим усовершенствования генной терапии. В конкретных вариантах осуществления описанных конструкций векторов все белки получены из серотипа 35. В конкретных вариантах осуществления описанных в данном документе векторов Ad35 в векторе не остается никаких вирусных генов. В конкретных вариантах осуществления ИКП и последовательность упаковки получены из Ad35. В конкретных вариантах осуществления в векторе доставки Ad35 все кодирующие вирусный белок гены удалены и замещены компонентами, связанными с терапевтическим применением.

[0008] В конкретных вариантах осуществления вектор Ad35 является хелпер-зависимым, а в настоящем изобретении также предложены впервые сконструированные хелперные векторы Ad35. В конкретных вариантах осуществления предложены оптимизированные соотношения хелпер-зависимой и трансгенной плазмиды для получения Ad35.

[0009] Связанные усовершенствования генной терапии, описанные в настоящем изобретении, связаны с одним или более из: (i) новых мутаций белка головки Ad35, которые повышают связывание CD46; (ii) характеристик вектора, позволяющих проводить позитивный отбор *in vivo* модифицированных клеток; (iii) систем контроля микроРНК, которые модулируют экспрессию терапевтических белков с клинически релевантными временными окнами; (iv) использования плеч гомологии для облегчения нацеленной геномной вставки в определенных сайтах; (v) использования CRISPR для инактивации геномных супрессорных областей, что позволяет повысить экспрессию эндогенных генов; (vi) использования стратегий мобилизации для повышения доставки векторов Ad35 в целевые CD46-экспрессирующие клетки; (vii) использования областей контроля локуса в мини или длинной форме для повышения генной экспрессии; (viii) использования систем рекомбиназы для увеличения размера транспозонов, которые можно вставлять в системы транспозазы; (ix) доставки стероидов (например, глюкокортикоидов, дексаметазона) перед доставкой вектора; и (x) эритроцитов для создания и секреции терапевтических белков.

Каждое из этих связанных усовершенствований генной терапии можно реализовать на практике с описанными в данном документе векторами Ad35 и также можно использовать с другими системами векторной доставки. В качестве одного примера мутированные белки головки Ad35, которые повышают связывание CD46, можно использовать с лентивирусной или пенистой системой доставки.

[00010] Описанные в данном документе достижения также связаны с (i) технологией *in vivo* трансдукции/отбора ГСК в отношении SB100x-опосредованного добавления трансгенов с помощью векторов HDAd5/35++; (ii) повышением повторной активации HbF посредством одновременного нацеливания на эритроидный энхансер bcl11a (например, для снижения экспрессии BCL11A) и промоторные области HBG1/2 (для повышения экспрессии γ -глобина); (iii) *in vivo* геномной инженерией с использованием CRISPR; (iv) коррекцией талассемии; (v) комбинацией γ добавления и повторной активации генов (система SB100x); (vi) самоинактивацией CRISPR/Cas9; (vii) нацеленной интеграцией с использованием HDAd в качестве донорных векторов с самовысвобождающейся кассетой; (viii) *in vivo* генной терапией ГСК с использованием эритроидных клеток в качестве фабрики для выработки секретируемого терапевтического белка на высоком уровне; (ix) терапевтическими генными подходами для лечения рака (профилактически и терапевтически); и (x) векторами HDAd35++.

[0011] Определенные варианты осуществления относятся к мутированным белкам головки, которые повышают нацеленное связывание с CD46, позволяя осуществлять более нацеленную и специфическую доставку терапевтических генов.

[0012] Определенные варианты осуществления относятся к использованию плеч гомологии для облегчения нацеленной геномной вставки, которую можно использовать для обеспечения хромосомной интеграции в безопасные геномные участки, как правило, открытый хроматин, что делает возможной экспрессию трансгена на более высокий уровень. Как описано в данном документе, в конкретных вариантах осуществления хорошо работают 1,8 о. плечи гомологии, при этом нижней границей является 0,8. В случае плеч гомологии больше 1,8 о. на интеграцию может начинать влиять однонуклеотидный полиморфизм.

[0013] Определенные варианты осуществления относятся к схемам мобилизации для уменьшения необходимости в кондиционировании.

[0014] В конкретных вариантах осуществления предложена *in vivo* генная терапия Ad35 с (i) системой MGMT^{P140K}, которая позволяет повышать терапевтический эффект посредством краткосрочной обработки низкой дозой O⁶-бензилгуанина с бис-хлорэтилнитрозомочевинной, (ii) интеграционной машинерией на основе транспозазы

SB100X и (iii) микро-LCR-управляемым геном γ -глобина.

[0015] Конкретные варианты осуществления включают аденовирусный вектор Ad35 (HAd-comb), содержащий (i) кассету CRISPR/Cas9, нацеленную на сайт связывания BCL11A в пределах промоторов HBG1/2 для реверсии супрессии эндогенных генов, (ii) кассету гена γ -глобина, управляемого 5 т. о. мини-LCR β -глобина, и экспрессионную кассету EF1 α -MGMT^{P140K}, делающую возможным *in vivo* отбор трансдуцированных клеток, в которых две последние кассеты фланкируются сайтами FRT и транспозона.

[0016] В конкретных вариантах осуществления описаны подходы CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования генома во взрослых CD34+ клетках, направленные на повторную активацию экспрессии фетального γ -глобина в красных кровяных клетках. Поскольку модели, включающие эритроидную дифференцировку CD34+ клеток имеют ограничения по оценке повторной активации γ -глобина, использовали трансгенный в отношении локуса β -глобина человека, хелпер-зависимый нацеленный на CD46 человека аденовирусный вектор, экспрессирующий CRISPR/Cas9 (HAd-HBG-CRISPR), для разрушения области связывания репрессора в пределах промотора γ -глобина.

[0017] В конкретных вариантах осуществления предложена интегрирующаяся нацеленная на CD46 Ad35-векторная система: трансген, содержащий (i) область контроля локуса (LCR) β -глобина, управляющая экспрессией гена γ глобина, и (ii) EF1- α (конститутивный промотор), управляющий экспрессией кассеты MGMT^{P140K}, для положительного отбора *in vivo* генномодифицированных ГСК.

[0018] В конкретных вариантах осуществления предложена интегрирующаяся нацеленная на CD46 Ad35-векторная система: трансген, содержащий (i) 21,5 т. о. (в длину) область контроля локуса β -глобина человека (LCR (HS1-HS5)) и промотор β -глобина (1,6 т. о.), управляющий экспрессией гена γ глобина (необязательно включающий его 3' НТО), и (ii) EF1- α (конститутивный промотор), управляющий экспрессией кассеты MGMT^{P140K}, для положительного отбора *in vivo* генномодифицированных ГСК. Некоторые варианты осуществления могут дополнительно включать 3'HS1 (3'HS1 β -глобина человека; 3 т. о., например, когда 3'HS1 имеет последовательность позиций 5206867-5203839 хромосомы 11). В различных вариантах осуществления 3'HS1 имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную в SEQ ID NO: 287, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 287, например, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 287. В этих вариантах осуществления может использоваться гиперактивная транспозаза (например,

SB100X) в комбинации с системой рекомбиназы (например, Flp/Frt; Cre/Lox). Таким образом, в одном конкретном варианте осуществления Ad35-векторная система может содержать, например, мобильную трансгенную вставку, содержащую длинную область контроля локуса β -глобина человека (21,5 т. о.), промотор β -глобина человека (1,6 т. о.), ген γ глобина человека вместе с его 3' НТО (2,7 т. о.), 3' НТО β -глобина человека и 3'HS1 (3 т. о.). Мобильная трансгенная вставка может дополнительно содержать, например, EF1- α (конститутивный промотор), управляющий экспрессией MGMT^{P140K}. В различных вариантах осуществления Ad35-векторная система может содержать, например, мобильную трансгенную вставку размером 32,4 т. о.

[0019] В конкретных вариантах осуществления предложены системы регуляции микроРНК, которые активируются только при рекрутировании ГСКП в опухоль, для контроля экспрессии терапевтических трансгенов. Эти признаки изобретения продемонстрированы с анти-PDL1- γ 1 в качестве трансгена. Эти системы можно использовать для регуляции экспрессии терапевтического трансгена в контексте опухолевого микроокружения.

[0020] В различных вариантах осуществления системы контроля микроРНК могут относиться к способу или композиции, в которых экспрессия гена регулируется наличием сайтов микроРНК (например, последовательностей нуклеиновых кислот, с которыми может взаимодействовать микроРНК), пример которых приведен в примере 5. В конкретных вариантах осуществления системы контроля микроРНК регулировали экспрессию гена так, чтобы ген экспрессировался исключительно в клетках-мишенях, таких как ГСКП, например, опухоль-инфильтрирующих ГСКП. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота (например, терапевтический ген), кодирующая представляющие интерес белок или нуклеиновую кислоту (например, противораковый агент, такой как CAR, TCR, антитело и/или ингибитор контрольных точек, например, антитело к α PD-L1 (например, антитело к α PD-L1 γ 1), которое является ингибитором контрольных точек), содержит, связана с или функционально связана с сайтом микроРНК, множеством одинаковых сайтов микроРНК или множеством разных сайтов микроРНК. Хотя специалистам в данной области техники известны средства и технологии связывания сайта микроРНК с нуклеиновой кислотой или ее частью, имеющей последовательность, которая кодирует представляющий интерес ген, в данном документе приведены некоторые неограничивающие примеры. Например, представляющий интерес ген (например, последовательность, кодирующая антитело к α PD-L1 γ 1) может быть расположен в нуклеиновой кислоте так, чтобы экспрессия представляющего интерес гена регулировалась наличием одного или более сайтов микроРНК, которые подавляют экспрессию в клетках, которые не являются опухоль-инфильтрирующими клетками

лейкоцитов, но не подавляют экспрессию в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах. В определенных конкретных примерах представляющий интерес ген (например, последовательность, кодирующая антитело к α PD-L1 γ 1) может быть расположен в нуклеиновой кислоте так, чтобы экспрессия представляющего интерес гена регулировалась наличием одного или более сайтов микроРНК miR423-5p, которые подавляют экспрессию в клетках, которые не являются опухоль-инфильтрирующими клетками лейкоцитов, но не подавляют экспрессию в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах. В различных вариантах осуществления система контроля микроРНК может содержать нуклеиновую кислоту, которая содержит или в которой экспрессия представляющих интерес белка или нуклеиновой кислоты регулируется одним или более сайтами микроРНК, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтами микроРНК. В различных вариантах осуществления система контроля микроРНК может содержать нуклеиновую кислоту, которая содержит или в которой экспрессия представляющих интерес белка или нуклеиновой кислоты регулируется одним или более сайтами микроРНК miR423-5p, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтами микроРНК miR423-5p. В некоторых конкретных вариантах осуществления система контроля микроРНК может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело к α PD-L1 γ 1 и содержит или в которой экспрессия антитела к α PD-L1 γ 1 регулируется одним или более сайтами микроРНК miR423-5p, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтами микроРНК miR423-5p, например, сайтами микроРНК miR423-5p.

[0021] В настоящем изобретении описаны рекомбинантные векторы Ad35, нацеленные на CD46, для *in vivo* редактирования генов гемопоэтических стволовых клеток и связанные с этим усовершенствования генной терапии. В конкретных вариантах осуществления в векторе доставки Ad35 все кодирующие вирусный белок гены удалены и замещены компонентами, связанными с терапевтическим применением. Удаление всех генов, кодирующих вирусные белки, обеспечивает несущую емкость вектора 30 т. о., то есть существенно больше пространства, чем доступно с другими платформами доставки на основе вирусных векторов. В конкретных вариантах осуществления вектор Ad35 является хелпер-зависимым, а в настоящем изобретении также предложены впервые сконструированные хелперные векторы Ad35. Во избежание сомнений в контексте данного документа термин «редактирование генов» включает, без ограничения, любое применение вектора или агента для модификации последовательности нуклеиновой кислоты.

[0022] Дополнительно в данном документе предложены векторы, которые представляют собой или содержат предложенные в данном документе нуклеиновые

кислоты, включая, без ограничения, системы контроля микроРНК и другие нуклеиновые кислоты, содержащие сайты микроРНК (также называемой в данном документе миРНК) (также называемые в данном документе сайтами-мишенями), описанные в данном документе, и/или кодируют агент, описанный в данном документе, включая, без ограничения, антитело, такое как антитело к α PD-L1 (например, антитело к α PD-L1 γ 1). В любом из различных вариантов осуществления настоящего изобретения вектор может представлять собой вектор Ad5/35, необязательно при этом вектор Ad5/35 представляет собой хелпер-зависимый Ad5/35 (HAd5/35). В любом из различных вариантов осуществления настоящего изобретения вектор может представлять собой вектор Ad5/35 (например, вектор HAd5/35), включая предложенные в данном документе вариации (например, аминокислотные мутации), причем некоторые из этих векторов могут быть обозначены как Ad5/35++ (например, HAd5/35++). Во избежание сомнений, подразумевается, что специалисты в данной области техники поймут из настоящего изобретения, что любой вариант осуществления с использованием любого вектора, включая варианты осуществления, в которых указан вектор, отличный от Ad5/35 (например, отличный от Ad5/35++ или отличный от HAd5/35++), следует, в частности, понимать как описывающий, помимо таких векторов, которые указаны в соответствующем тексте, вектор, который представляет собой вектор Ad5/35 (включая, например, любой из векторов HAd5/35, Ad5/35++ и HAd5/35++).

[0023] В любом из различных вариантов осуществления настоящего изобретения вектор может представлять собой вектор Ad35, необязательно при этом вектор Ad35 представляет собой HAd35. В любом из различных вариантов осуществления настоящего изобретения вектор может представлять собой вектор Ad35 (например, вектор HAd35), включая предложенные в данном документе вариации (например, аминокислотные мутации), причем некоторые из этих векторов могут быть обозначены как Ad35++ (например, HAd35++). Во избежание сомнений, подразумевается, что специалисты в данной области техники поймут из настоящего изобретения, что любой вариант осуществления с использованием любого вектора, включая варианты осуществления, в которых указан вектор, отличный от Ad35 (например, отличный от Ad35++ или отличный от HAd35++), следует, в частности, понимать как описывающий, помимо таких векторов, которые указаны в соответствующем тексте, вектор, который представляет собой вектор Ad35 (включая, например, любой из векторов HAd35, Ad35++ и HAd35++).

[0024] Как указано, описанные в данном документе векторы имеют множество применений, в том числе в лечении серповидноклеточной анемии, γ добавлении и

повторной активации гена глобина и нацеливании на множество сайтов-мишеней для γ повторной активации глобина. Кроме того, помимо фактора VIII (FVIII), применение описанных подходов можно использовать в случае других секретируемых белков, включая, например: (i) другие факторы коагуляции, в частности FXI, FVII, фактор фон Виллебранда (VWF) и редкие факторы свертывания крови (т. е. факторы I, II, V, X, XI или XIII); (ii) ферменты, которые в настоящее время используются для заместительной ферментной терапии (ЗФТ) для лизосомных болезней накопления (с использованием преимуществ механизма перекрестной коррекции), таких как болезнь Помпе (кислая альфа (α)-глюкозидаза), болезнь Гоше (глюкоцереброзидаза), болезнь Фабри (α -галактозидаза А) и мукополисахаридоз I типа (α -L-идуронидаза); (iii) иммунодефициты (например, ТКИД-АДА (аденозиндезаминаза)); (iv) сердечно-сосудистые заболевания, например, наследственный дефицит аполиipoproteина E и атеросклероз (ApoE); (v) вирусные инфекции посредством экспрессии вирусных рецепторов-ловушек (например, для растворимого CD4 ВИЧ или нейтрализующих антител широкого спектра действия (bNAbs)) для ВИЧ, хронические инфекции ВГС или ВГВ; (vi) рак (например, контролируемая экспрессия моноклональных антител (например, трастузумаба) или ингибиторов контрольных точек (например, aPDL1) или защиту ГСК с целью сделать возможными терапевтические дозы химиотерапии, и (vii) гены FANCA в случае анемии Фанкони; (viii) дефицит факторов коагуляции, необязательно выбранный из гемофилии А, гемофилии В или болезни фон Виллебранда, (ix) тромбоцитарное расстройство, (x) анемию, (xi) дефицит альфа-1 антитрипсина или (xii) иммунодефицит. Другие дополнительные применения более подробно описаны в другом месте данного документа.

[0025] Таким образом, в одном варианте осуществления предложен рекомбинантный аденовирусный вектор серотипа 35 (Ad35), нацеленный на CD46 для *in vivo* редактирования генов в гемопоэтических стволовых клетках.

[0026] Другой вариант осуществления представляет собой эритроцит, генетически модифицированный для экспрессии терапевтического белка. В качестве примера, в некоторых случаях терапевтический белок включает фактор коагуляции или белок, который блокирует или уменьшает вирусную инфекцию. Необязательно, эритроцит секретирует терапевтический белок.

[0027] Также предложены применения рекомбинантных векторов Ad35 или эритроцитов, описанных в данной документе. Эти применения включают повышение повторной активации HbF посредством одновременного нацеливания на эритроидный энхансер bcl11a и промоторные области HBG; для комбинации добавления гена γ -глобина и повторной активации эндогенного гена γ -глобина; для *in vivo* геномной инженерии с

использованием CRISPR; для обеспечения терапевтического гена; для лечения (i) гемоглобинопатии, (ii) анемии Фанкони, (iii) дефицита факторов коагуляции, необязательно выбранного из гемофилии А, гемофилии В или болезни фон Виллебранда, (iv) тромбоцитарного расстройства, (v) анемии, (vi) дефицита альфа-1 антитрипсина или (v) иммунодефицита; для лечения талассемии; для лечения рака, предотвращения или отсрочки повторного появления рака или предотвращения или отсрочки появления рака у носителей связанных в высоком риском мутаций зародышевой линии, необязательно при этом рак представляет собой рак молочной железы или рак яичника; для самоинактивации CRISPR/Cas9; и для нацеленной интеграции с использованием HDAd в качестве донорных векторов с самовысвобождающейся кассетой. Любые из этих применений могут, необязательно, включать мобилизацию, например, при этом мобилизация включает введение G α -бета, GM-CSF, S-CSF и/или AMD3100.

[0028] Еще одним вариантом применения является применение рекомбинантных векторов Ad35 или эритроцитов, описанных в данном документе, которое включает введение стероида (*например*, глюкокортикоида или дексаметазона), антагониста рецепторов IL-6 и/или антагониста рецепторов IL-1R субъекту, получающему вектор Ad35 и/или эритроцит.

[0029] Также предложены варианты применения с использованием любых из рекомбинантных векторов Ad35 или эритроцитов, описанных в данном документе, которое включает введение O⁶BG и TMZ (темозоломида) или BCNU (кармустина) субъекту, получающему вектор Ad35 и/или эритроцит. В качестве примера таких вариантов применения субъект получает O⁶BG и TMZ или BCNU в качестве лечения анапластической астроцитомы, рака молочной железы, колоректального рака, диффузной глиомы ствола головного мозга, саркомы Юинга, мультиформной глиобластомы (МГБ), злокачественной глиомы, меланомы, метастатической злокачественной меланомы, рака носоглотки или детского рака.

[0030] Другим вариантом осуществления является система получения рекомбинантного аденовирусного вектора серотипа 35 (Ad35), содержащая: рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и ПП рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, и рекомбинантный хелпер-зависимый донорный геном Ad35, содержащий: 5' ИКП Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

[0031] Также предложены варианты осуществления хелперного рекомбинантного аденовирусного вектора серотипа 35 (Ad35), которые содержат: стержень фибера Ad35; головку фибера Ad35; и геном Ad35, содержащий ПП рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35.

[0032] Также предложены варианты осуществления хелперного генома Ad35, которые содержат: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и ПП рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35.

[0033] Также предложены варианты осуществления рекомбинантного хелпер-зависимого донорного вектора Ad35, которые содержат: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую: 5' ИКП Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт, при этом геном не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вирусный структурный белок Ad35; и стержень фибера Ad35 и/или головку фибера Ad35.

[0034] Также предложены варианты осуществления рекомбинантного хелпер-зависимого донорного генома Ad35, которые содержат: 5' ИКП Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт, при этом донорный геном Ad35 не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экспрессионный продукт, кодируемый геномом Ad35 дикого типа.

[0035] Другим вариантом осуществления является способ получения рекомбинантного хелпер-зависимого донорного вектора Ad35, включающий выделение рекомбинантного хелпер-зависимого донорного вектора Ad35 из культуры клеток, причем клетки содержат: рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и ПП рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, и рекомбинантный хелпер-зависимый донорный геном Ad35, содержащий: 5' ИКП Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

[0036] Также предложена система получения рекомбинантного Ad35, содержащая: рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую головку фибера Ad35; и ПП рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' ИКП Ad35, и рекомбинантный донорный геном Ad35, содержащий: 5' ИКП Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

[0037] Другим вариантом осуществления является рекомбинантный хелперный вектор Ad35, содержащий: стержень фибера Ad35; головку фибера Ad35; и геном Ad35, содержащий ПП рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' ИКП Ad35.

[0038] Другим вариантом осуществления является рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и ПП в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' ИКП Ad35.

[0039] Другим вариантом осуществления является способ получения рекомбинантного хелпер-зависимого донорного вектора Ad35, включающий выделение рекомбинантного хелпер-зависимого донорного вектора Ad35 из культуры клеток, причем клетки содержат: рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и ПП рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' ИКП Ad35, и рекомбинантный донорный геном Ad35, содержащий: 5' ИКП Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

[0040] Другим вариантом осуществления является клетка, содержащая хелперный вектор, хелперный геном, донорный вектор или донорный геном, описанные в данном документе, необязательно при этом клетка представляет собой клетку НЕК293.

[0041] Другим вариантом осуществления является клетка, содержащая донорный геном любого из вариантов осуществления, описанных в данном документе, необязательно при этом клетка представляет собой эритроцит, необязательно при этом клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку, Т-клетку, В-клетку или миелоидную клетку, необязательно при этом клетка секретирует экспрессионный продукт.

[0042] Также предложен способ модификации клетки, включающий приведение

клетки в контакт с донорным вектором Ad35 в соответствии с любым из предложенных вариантов осуществления донорного вектора Ad35.

[0043] Также предложен способ модификации клетки субъекта, включающий введение субъекту донорного вектора Ad35 в соответствии с любым из вариантов осуществления донорного вектора Ad35, необязательно при этом способ не включает выделение клетки из организма субъекта.

[0044] Другим вариантом осуществления является способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту донорного вектора Ad35 в соответствии с любым из вариантов осуществления донорного вектора Ad35, необязательно при этом введение является внутривенным.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0045] В контексте данного документа форма единственного числа относится к одному или более чем одному (т. е. по меньшей мере одному) грамматическому объекту. В качестве примера, «элемент» описывает варианты осуществления конкретно одного элемента и варианты осуществления более чем одного элемента.

[0046] **Около:** В контексте данного документа термин «около», используемый в отношении значения, относится к значению, которое является сходным в контексте указанного значения. В общем случае специалистам в данной области техники, знакомым с контекстом, будет понятна соответствующая степень вариации, заключенная в термине «около» в этом контексте. Например, в некоторых вариантах осуществления термин «около» может охватывать диапазон значений, который находится в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее от указанного значения.

[0047] **Введение:** В контексте данного документа термин «введение», как правило, относится к введению композиции субъекту или системе для обеспечения доставки агента, который представляет собой композицию или включен нее.

[0048] **Адоптивная клеточная терапия:** В контексте данного документа термин «адоптивная клеточная терапия» или «АКТ» включает перенос клеток с терапевтической активностью в организм субъекта, например, субъекта, нуждающегося в лечении состояния, расстройства или заболевания. В некоторых вариантах осуществления АКТ включает перенос в организм субъекта клеток после *ex vivo* и/или *in vitro* конструирования и/или размножения клеток.

[0049] **Аффинность:** В контексте данного документа термин «аффинность» относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между конкретным связывающим агентом (например, вирусным вектором) и/или его связывающим

фрагментом с мишенью связывания (например, клеткой). Если не указано иное, в контексте данного документа термин «аффинность связывания» относится к 1:1 взаимодействию между связывающим агентом и мишенью связывания (например, вирусным вектором и клеткой-мишенью вирусного вектора). Специалистам в данной области техники известно, что изменение аффинности можно описать путем сравнения с эталоном (*например*, повышение или снижение по сравнению с эталоном) или можно описать численно. Аффинность можно измерить и/или выразить рядом способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, равновесную константу диссоциации (K_D) и/или равновесную константу ассоциации (K_A). K_D равна отношению k_{off}/k_{on} , тогда как K_A равна отношению k_{on}/k_{off} , где k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, вирусного вектора с клеткой-мишенью, а k_{off} относится к диссоциации, например, вирусного вектора от клетки-мишени. k_{on} и k_{off} можно определить методами, известными специалистам в данной области техники.

[0050] *Агент*: В контексте данного документа термин «агент» может относиться к любому химическому объекту, включая, без ограничения, любой один или более объектов из атома, молекулы, соединения, аминокислоты, полипептида, нуклеотида, нуклеиновой кислоты, белка, белкового комплекса, жидкости, раствора, сахара, полисахарида, липида или их комбинации или комплекса.

[0051] *Аллогенный*: В контексте данного документа термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от одного субъекта, который затем вносят в организм другого субъекта, например, к трансплантации аллогенных Т-клеток.

[0052] *Между или от*: В контексте данного документа термин «между» относится к значению, которое находится между указанными верхней и нижней или первой и второй границами, включая эти границы. Аналогично, термин «от», используемый в контексте диапазона значений, указывает, что данный диапазон включает содержимое, которое находится между указанными верхней и нижней или первой и второй границами, включая эти границы.

[0053] *Связывание*: В контексте данного документа термин «связывание» относится к нековалентной ассоциации между двумя или более агентами. «Прямое» связывание включает физический контакт между агентами не прямое связывание включает физическое взаимодействие за счет физического контакта с одним или более промежуточными агентами. Связывание между двумя или более агентами может происходить и/или быть оценено в разных контекстах, включая случаи, когда взаимодействующие агенты изучают в изоляции или в контексте более сложных систем (например, в ковалентной или иной ассоциации с агентами-носителями и/или в

биологической системе или клетке).

[0054] **Рак:** В контексте данного документа термин «рак» относится к состоянию, расстройству или заболеванию, при котором клетки демонстрируют относительно аномальный, неконтролируемый и/или автономный рост так, что они демонстрируют аномально повышенную скорость пролиферации и/или aberrантный фенотип роста, характеризующиеся значительной потерей контроля над клеточной пролиферацией. В некоторых вариантах осуществления рак может включать одну или более опухолей. В некоторых вариантах осуществления рак может представлять собой или содержать клетки, которые являются предраковыми (например, доброкачественными), злокачественными, предметастатическими, метастатическими и/или неметастатическими. В некоторых вариантах осуществления рак может представлять собой или включать солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак может представлять собой или включать гематологическую опухоль.

[0055] **Химерный антигенный рецептор:** В контексте данного документа термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» относится к сконструированному белку, который содержит (i) внеклеточный домен, который содержит фрагмент, связывающий антиген-мишень; (ii) трансмембранный домен; и (iii) внутриклеточный сигнальный домен, который посылает активирующие сигналы при стимуляции CAR за счет связывания внеклеточным связывающим фрагментом с антигеном-мишенью. Т-клетка, которая была генетически сконструирована для экспрессии химерного антигенного рецептора, может называться CAR Т-клеткой. Таким образом, например, когда определенные CAR экспрессируются Т-клеткой, связывание внеклеточного связывающего фрагмента CAR с антигеном-мишенью может активировать Т-клетку. CAR также известны как химерные Т-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы.

[0056] **Комбинированная терапия:** В контексте данного документа термин «комбинированная терапия» относится к введению субъекту двух или более агентов или применению двух или более схем так, чтобы два или более агента или две или более схемы вместе лечили состояние, расстройство или заболевание у субъекта. В некоторых вариантах осуществления два или более терапевтических агента или две или более схемы можно применять одновременно, последовательно или согласно перекрывающимся схемам дозирования. Специалистам в данной области техники известно, что комбинированная терапия включает, но не требует, чтобы два агента или две схемы применялись вместе в одной композиции или в одно время.

[0057] **Контроль экспрессии или активности:** В контексте данного документа первый элемент (например, белок, такой как фактор транскрипции, или

последовательность нуклеиновой кислоты, такая как промотор) «контролирует» или «регулирует» экспрессию второго элемента (например, белка или нуклеиновой кислоты, кодирующей агент, такой как белок), если экспрессия или активность второго элемента полностью или частично зависит от статуса (например, наличия, отсутствия, конформации, химической модификации, взаимодействия или другой активности) первого, по меньшей мере в одном варианте условий. Контроль экспрессии или активности может быть существенным контролем экспрессии или активности, например, в том, что изменение статуса первого элемента может, по меньшей мере в одном варианте условий, приводить к изменению экспрессии или активности второго элемента по меньшей мере на 10% (например, по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 100 раз) по сравнению с эталонным контролем.

[0058] **Соответствующий:** В контексте данного документа термин «соответствующий» может использоваться для обозначения позиции/идентичности структурного элемента в соединении или композиции посредством сравнения с соответствующими эталонными соединением или композицией. Например, в некоторых вариантах осуществления мономерный остаток в полимере (например, аминокислотный остаток в полипептиде или остаток нуклеиновой кислоты в полинуклеотиде) может быть идентифицирован как «соответствующий» остатку в соответствующем эталонном полимере. Например, специалистам в данной области техники известно, что остатки в предложенной полипептидной или полинуклеотидной последовательности часто обозначены (например, пронумерованы или помечены) в соответствии со схемой родственной эталонной последовательности (даже если, например, такое обозначение не отображает фактическую нумерацию предложенной последовательности). В качестве иллюстрации, если эталонная последовательность содержит конкретный аминокислотный мотив в позициях 100-110, а вторая родственная последовательность содержит тот же мотив в позициях 110-120, можно сказать, что позиции мотива второй родственной последовательности «соответствуют» позициям 100-110 эталонной последовательности. Специалистам в данной области техники известно, что соответствующие позиции можно легко идентифицировать, например, путем выравнивания последовательностей, и что такое выравнивание обычно осуществляется с помощью любого из ряда инструментов, стратегических подходов и/или алгоритмов, включая, без ограничения, программное обеспечение, такое как, например, BLAST, CS-BLAST, CUDASW++, DIAMOND, FASTA, GGSEARCH/GLSEARCH, Genoogle, HMMER, HHpred/HHsearch, IDF, Infernal, KLAST, USEARCH, parasail, PSI-BLAST, PSI-Search, ScalaBLAST, Sequilab, SAM, SSEARCH,

SWAPHI, SWAPHI-LS, SWIMM или SWIPE.

[0059] **Схема введения:** В контексте данного документа термин «схема введения» может относиться к совокупности одной или более одинаковых или разных единичных доз, вводимых субъекту, как правило, включающей множество единичных доз, введение каждой из которых отделено от введения остальных некоторым периодом времени. В различных вариантах осуществления одна или более, или все единичные дозы схемы введения могут быть одинаковыми или могут варьироваться (например, повышаться со временем, снижаться со временем или корректироваться в зависимости от субъекта и/или от решения врача). В различных вариантах осуществления один или более, или все периоды времени между каждой дозой могут быть одинаковыми или могут варьироваться (например, повышаться со временем, снижаться со временем или корректироваться в зависимости от субъекта и/или от решения врача). В некоторых вариантах осуществления заданный терапевтический агент имеет рекомендованную схему введения, которая может включать применение одной или более доз. Как правило, специалистам в данной области техники известна по меньшей мере одна рекомендованная схема введения имеющегося на рынке лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления схема введения коррелирует с необходимым или благоприятным результатом при введении в рамках релевантной популяции (т. е. представляет собой терапевтическую схему введения).

[0060] **Ниже и выше:** В контексте данного документа термин «ниже» означает, что первая область ДНК находится ближе по сравнению со второй областью ДНК к С-концу нуклеиновой кислоты, которая содержит первую область ДНК и вторую область ДНК. В контексте данного документа термин «выше» означает, что первая область ДНК находится ближе по сравнению со второй областью к N-концу нуклеиновой кислоты, которая содержит первую область ДНК и вторую область ДНК.

[0061] **Эффективное количество:** «Эффективное количество» представляет собой количество состава, необходимое для достижения желаемого физиологического изменения у субъекта. Эффективное количество часто вводят в целях исследования.

[0062] **Сконструированный:** В контексте данного документа термин «сконструированный» относится к аспекту, связанному с манипуляциями со стороны человека. Например, полинуклеотид считается «сконструированным», когда две или более последовательности, которые не связаны друг с другом в таком порядке в природе, были подвергнуты манипуляциям со стороны человека так, чтобы стать напрямую связанными друг с другом в сконструированном полинуклеотиде. Специалистам в данной области известно, что «сконструированная» нуклеиновая кислота или аминокислотная последовательность может представлять собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту

или аминокислотную последовательность и может называться «генетически сконструированной». В некоторых вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид содержит кодирующую последовательность и/или регуляторную последовательность, которая встречается в природе функционально связанной с первой последовательностью, но не встречается в природе функционально связанной со второй последовательностью, которая в сконструированном полинуклеотиде функционально связана со второй последовательностью за счет вмешательства человека. В некоторых вариантах осуществления клетка или организм считаются «сконструированными» или «генетически сконструированными», если с ними провели манипуляции таким образом, чтобы изменить их генетическую информацию (например, внести новый генетический материал, который ранее отсутствовал, например, путем трансформации, спаривания, соматической гибридизации, трансфекции, трансдукции или другого механизма, или изменить или удалить ранее присутствующий генетический материал, например, путем замены, делеции или спаривания). Как принято на практике и понятно специалистам в данной области техники, потомство или копии, идеальные или неидеальные, сконструированных полинуклеотида или клетки, как правило, также называют «сконструированными», даже если фактическим манипуляциям был подвергнут предшествующий объект.

[0063] **Экципиент:** В контексте данного документа термин «эксципиент» относится к нетерапевтическому агенту, который может быть включен в фармацевтическую композицию, например для обеспечения или достижения необходимой консистенции или стабилизирующего эффекта. В некоторых вариантах осуществления подходящие фармацевтические эксципиенты могут включать, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол, т. п.

[0064] **Экспрессия:** В контексте данного документа термин «экспрессия» относится индивидуально и/или в целом в одном или более биологическим процессам, которые приводят к выработке из последовательности нуклеиновой кислоты кодируемого агента, такого как белок. В частности, экспрессия включает любое из транскрипции и трансляции, или и то, и другое.

[0065] **Фланкировать:** В контексте данного документа первый элемент (например, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность), находящийся в непрерывной последовательности со вторым элементом и третьим элементом, «фланкируется» вторым элементом и третьим элементом, если он расположен

в непрерывной последовательности между вторым элементом и третьим элементом. Соответственно, в таком расположении второй элемент и третий элемент могут называться «фланкирующими» первый элемент. Фланкирующие элементы могут непосредственно примыкать к фланкируемому элементу или быть отделены от фланкируемого элемента одним или более релевантными звеньями. В различных примерах, в которых непрерывная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотную последовательность, а релевантные звенья представляют собой основания или аминокислотные остатки, соответственно, число звеньев в непрерывной последовательности, которые находятся между фланкируемым элементом и, независимо, первым и/или вторым фланкирующими элементами, может составлять, например, 50 звеньев или менее, например, не более 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 звеньев.

[0066] **Фрагмент:** В контексте данного документа термин «фрагмент» относится к структуре, которая содержит и/или состоит из дискретной части эталонного агента (иногда называемого «родительским агентом»). В некоторых вариантах осуществления во фрагменте отсутствуют один или более элементов, присутствующих в эталонном агенте. В некоторых вариантах осуществления фрагмент содержит или состоит из одного или более элементов, присутствующих в эталонном агенте. В некоторых вариантах осуществления эталонный агент представляет собой полимер, такой как полинуклеотид или полипептид. В некоторых вариантах осуществления фрагмент полимера содержит или состоит из по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более мономерных звеньев (например, остатков) эталонного полимера. В некоторых вариантах осуществления фрагмент полимера содержит или состоит из по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более мономерных звеньев (например, остатков), находящихся в эталонном полимере. Фрагмент эталонного полимера не обязательно является идентичным соответствующей части эталонного полимера. В некоторых вариантах осуществления фрагмент эталонного полимера может представлять собой полимер, имеющий последовательность из остатков, имеющую по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с эталонным полимером. Фрагмент может быть создан путем физической фрагментации эталонного агента или нет. В некоторых случаях фрагмент создан путем физической фрагментации эталонного агента.

В некоторых случаях фрагмент не создан путем физической фрагментации эталонного агента и может вместо этого быть получен, например, путем *de novo* синтеза или другими способами.

[0067] **Ген, трансген:** В контексте данного документа термин «ген» относится к последовательности ДНК, которая представляет собой или содержит кодирующую последовательность (т. е. последовательность ДНК, которая кодирует экспрессионный продукт, такой как РНК-продукт и/или полипептидный продукт), необязательно вместе с некоторыми или всеми регуляторными последовательностями, которые контролируют экспрессию кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления ген содержит некодирующую последовательность, такую как, без ограничения, интроны. В некоторых вариантах осуществления ген может содержать как кодирующую (например, экзонную), так и некодирующую (например, интронную) последовательности. В некоторых вариантах осуществления ген содержит регуляторную последовательность, которая представляет собой промотор. В некоторых вариантах осуществления ген содержит одно или оба из (i) нуклеотидов ДНК, распространяющихся на predetermined число нуклеотидов выше кодирующей последовательности в контексте эталона, такого как геном-источник, и (ii) нуклеотидов ДНК, распространяющихся на predetermined число нуклеотидов ниже кодирующей последовательности в контексте эталона, такого как геном-источник. В различных вариантах осуществления predetermined число нуклеотидов может составлять 500 п. о., 1 т. о., 2 т. о., 3 т. о., 4 т. о., 5 т. о., 10 т. о., 20 т. о., 30 т. о., 40 т. о., 50 т. о., 75 т. о. или 100 т. о. В контексте данного документа термин «трансген» относится к гену, который не является эндогенным или нативным в контексте эталона, в котором ген присутствует или в который ген можно поместить путем конструирования.

[0068] **Генный продукт или экспрессионный продукт:** В контексте данного документа термин «генный продукт» или «экспрессионный продукт» в общем случае относится к РНК, транскрибируемой с гена (до и/или после процессинга), или полипептиду (до и/или после модификации), кодируемому РНК, транскрибируемой с гена.

[0069] **Клетка-хозяин, клетка-мишень:** В контексте данного документа термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую была внесена экзогенная ДНК (рекомбинантная или иная), такая как трансген. Специалистам в данной области техники известно, что «клетка-хозяин» может представлять собой клетку, в которую была изначально внесена экзогенная ДНК, и/или ее потомство или копии, идеальные или неидеальные. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит один или более вирусных генов или трансгенов. В некоторых вариантах осуществления

предполагаемая или потенциальная клетка-хозяин может называться клеткой-мишенью.

[0070] В различных вариантах осуществления клетку-хозяина или клетку-мишень идентифицируют по наличию, отсутствию или уровню экспрессии различных поверхностных маркеров.

[0071] Утверждение, что клетка или популяция клеток является «положительной» в отношении конкретного маркера или экспрессирующей его, относится к выявляемому наличию этого конкретного маркера на или в клетке. Когда речь идет о поверхностном маркере, этот термин может относиться к наличию поверхностной экспрессии, выявляемой методом проточной цитометрии, например, посредством окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и выявления указанного антитела, причем окрашивание можно выявить методом проточной цитометрии на уровне, значительно большем, чем окрашивание, выявляемое при проведении такой же процедуры с совпадающим по изотипу контролем в условиях, в остальном идентичных, и/или на уровне, по существу сходном с таковым для клетки, заведомо положительной в отношении маркера, и/или на уровне, по существу большем, чем для клетки, заведомо отрицательной в отношении маркера.

[0072] Утверждение, что клетка или популяция клеток является «отрицательной» в отношении конкретного маркера или не экспрессирует его, относится к отсутствию существенного выявляемого наличия этого конкретного маркера на или в клетке. Когда речь идет о поверхностном маркере, этот термин может относиться к отсутствию поверхностной экспрессии, выявляемой методом проточной цитометрии, например, посредством окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и выявления указанного антитела, причем окрашивание нельзя выявить методом проточной цитометрии на уровне, значительно большем, чем окрашивание, выявляемое при проведении такой же процедуры с совпадающим по изотипу контролем в условиях, в остальном идентичных, и/или на уровне, по существу меньшем такового для клетки, заведомо положительной в отношении маркера, и/или на уровне, по существу сходном по сравнению с таковым для клетки, заведомо отрицательной в отношении маркера.

[0073] **Идентичность**: В контексте данного документа термин «идентичность» относится к общему сходству между полимерными молекулами, например, между молекулами нуклеиновых кислот (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Методы расчета процента идентичности между двумя предоставленными последовательностями известны в данной области техники. Термин «% идентичности последовательности» относится к родству между двумя или более последовательностями, определяемому путем сравнения последовательностей. В

данной области техники «идентичность» также означает степень родства последовательности между последовательностями белков и нуклеиновых кислот, определяемую по совпадению между участками таких последовательностей. «Идентичность» (часто называемую «сходством») можно легко определить известными методами, включая описанные в: *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1994); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology* (Von Heijne, G., ed.) Academic Press (1987); и *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Oxford University Press, NY (1992). Предпочтительные методы определения идентичности разработаны для обеспечения наилучшего соответствия между исследуемыми последовательностями. Методы для определения идентичности и сходства запрограммированы в общественно доступных компьютерных программах. Например, расчет процента идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, например, можно осуществлять путем выравнивания двух последовательностей (или комплементарной последовательности одной или обеих последовательностей) в целях оптимального сравнения (например, в одну или обе из первой и второй последовательностей можно вносить гэпы для оптимального выравнивания, а неидентичными последовательностями можно пренебречь в целях сравнения). Затем сравнивают нуклеотиды или аминокислоты в соответствующих позициях. Если позиция в первой последовательности занята таким же остатком (например, нуклеотидом или аминокислотой), что и соответствующая позиция во второй последовательности, то молекулы в этой позиции являются идентичными. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных позиций в последовательностях, необязательно с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые может быть необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью компьютерного алгоритма, как BLAST (основной инструмент поиска локального выравнивания). Выравнивание последовательностей и расчеты процента идентичности можно проводить, используя программу Megalign из пакета для биоинформационных вычислений LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin). Множественное выравнивание последовательностей также можно проводить, используя метод выравнивания Clustal (Higgins and Sharp CABIOS, 5, 151-153 (1989) с параметрами по умолчанию (ШТРАФ ЗА ГЭП=10, ШТРАФ ЗА ДЛИНУ ГЭПА=10). Релевантные

программы также включают пакет программ GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin); BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin); и программу FASTA, в основе которой лежит алгоритм Смита - Уотермана (Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Publisher: Plenum, New York, N.Y. В контексте этого изобретения следует понимать, что в случае применения программного обеспечения для анализа последовательностей результаты анализа основаны на «значениях по умолчанию» указанных программ. «Значения по умолчанию» означают любой набор значений или параметров, который изначально загружается с программным обеспечением при первой инициации.

[0074] **«Улучшать», «повышать», «ингибировать» или «снижать»:** В контексте данного документа термины «улучшать», «повышать», «ингибировать» и «снижать» и их грамматические эквиваленты указывают на качественное или количественное отличие от эталона.

[0075] **Выделенный:** В контексте данного документа термин «выделенный» относится к веществу и/или объекту, которые были (1) отделены по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми они были связаны при первоначальной выработке (в природе и/или в экспериментальных условиях), и/или (2) разработаны, получены, изготовлены и/или произведены человеком. Выделенные вещества и/или объекты могут быть отделены от 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более чем 99% других компонентов, с которыми они были первоначально связаны. В некоторых вариантах осуществления выделенные агенты имеют чистоту 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более чем 99%. В контексте данного документа вещество является «чистым», если оно по существу не содержит других компонентов. В некоторых вариантах осуществления, как известно специалистам в данной области техники, вещество может все еще считаться «выделенным» или даже «чистым» после объединения с некоторыми другими компонентами, такими как, например, один или более носителей или эксципиентов (например, буфер, растворитель, вода и т. д.); в таких вариантах осуществления процент выделения или чистоты вещества рассчитывают без учета таких носителей или эксципиентов. Например, в некоторых вариантах осуществления биологический полимер, такой как полипептид или полинуклеотид, который встречается в природе, считается «выделенным», когда: а) в силу своего происхождения или источника получения он не связан с некоторыми или всеми из компонентов, которые находятся вместе с ним в его

естественном состоянии в природе; b) он по существу не содержит других полипептидов или нуклеиновых кислот того же вида, который его вырабатывает в природе; c) он экспрессируется или иным образом находится в ассоциации с компонентами клетки или другой экспрессионной системы, которая не относится к виду, который его вырабатывает в природе. Таким образом, например, в некоторых вариантах осуществления полипептид, который синтезирован химически или синтезирован в клеточной системе, отличной от той, которая вырабатывает его в природе, считается *«выделенным»* полипептидом. В некоторых альтернативных или дополнительных вариантах осуществления полипептид, который был подвергнут одному или более способам очистки, может считаться *«выделенным»* полипептидом в той степени, в которой он был отделен от других компонентов, а) с которыми он связан в природе; и/или b) с которыми он был связан при первоначальной выработке.

[0076] **Функционально связанный:** В контексте данного документа термин «функционально связанный» относится к такой ассоциации по меньшей мере первого элемента и второго элемента, при которой составляющие элементы находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предполагаемым образом. Например, регуляторная последовательность нуклеиновой кислоты является *«функционально связанной»* с кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, если регуляторная последовательность и кодирующая последовательность связаны образом, который позволяет регуляторной последовательности контролировать экспрессию кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления *«функционально связанная»* регуляторная последовательность прямо или непрямо ковалентно связана с кодирующей последовательностью (например, в одной нуклеиновой кислоте). В некоторых вариантах осуществления регуляторная последовательность контролирует экспрессию кодирующей последовательности в *транс*-конфигурации, а включение регуляторной последовательности в ту же самую нуклеиновую кислоту, что и кодирующая последовательность, не является обязательным условием функциональной связи.

[0077] **Фармацевтически приемлемый:** В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый», применимо к одному или более, или всем компонентам для составления описанной в данном документе композиции, означает, что каждый компонент должен быть совместимым с другими ингредиентами и не вредным для реципиента.

[0078] **Фармацевтически приемлемый носитель:** В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к фармацевтически приемлемым материалу, композиции или несущей среде, таким как жидкий или твердый

наполнитель, разбавитель, эксципиент или инкапсулирующий растворитель материал, которые облегчают составление агента (например, фармацевтического агента), модифицируют биодоступность агента или облегчают перенос агента из одного органа или части тела субъекта в другие. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозиториев; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; рН-забуференные растворы; сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

[0079] **Фармацевтическая композиция:** В контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, в которой активный агент составлен вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями.

[0080] **Промотор:** В контексте данного документа «промотор» или «промоторная последовательность» может представлять собой регуляторную область ДНК, которая прямо или непрямо (например, посредством связанных с промотором белков или веществ) участвует в инициации и/или процессе транскрипции кодирующей последовательности. В подходящих условиях промотор может инициировать транскрипцию кодирующей последовательности после связывания одного или более факторов транскрипции и/или регуляторных фрагментов с промотором. Промотор, который участвует в инициации транскрипции кодирующей последовательности, может быть «функционально связан» с кодирующей последовательностью. В некоторых случаях промотор может представлять собой или содержать регуляторную область ДНК, которая простирается от сайта инициации транскрипции (на 3' конце) до позиции выше (5' направление), так что обозначенная таким образом последовательность содержит одно или оба из минимального количества оснований или элементов, необходимых для инициации события транскрипции. Промотор может представлять собой, содержать или быть функционально ассоциированным или функционально связанным с последовательностями контроля

экспрессии, такими как последовательности энхансеров и репрессоров. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть индуцибельным. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть конститутивным промотором. В некоторых вариантах осуществления кондициональный (например, индуцибельный) промотор может быть однонаправленным или двунаправленным. Промотор может представлять собой или содержать последовательность, идентичную последовательности, которая, как известно, встречается в геноме конкретного вида. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой или включать гибридный промотор, в котором последовательность, содержащая область регуляции транскрипции, может быть получена из одного источника, а последовательность, содержащая область инициации транскрипции, может быть получена из второго источника. Системы для связывания элементов контроля с кодирующей последовательностью в трансгене хорошо известны в данной области техники (общие технологии молекулярной биологии и рекомбинантных ДНК описаны в Sambrook, Fritsch, and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

[0081] **Эталон:** В контексте данного документа термин «эталон» относится к стандарту или контролю, относительно которого проводится сравнение. Например, в некоторых вариантах осуществления агент, образец, последовательность, субъекта, животное или индивида, или их популяцию, или репрезентативную для них меру или характеристику сравнивают с эталоном, агентом, образцом, последовательностью, животным или индивидом, или их популяцией, или репрезентативной для них мерой или характеристикой. В некоторых вариантах осуществления эталон представляет собой измеряемое значение. В некоторых вариантах осуществления эталон представляет собой стандартное или ожидаемое значение. В некоторых вариантах осуществления эталон представляет собой историческое значение. Референс может быть количественным или качественным. Как правило, как известно специалистам в данной области техники, эталон и значение, с которым его сравнивают, представляют измерение в сравнимых условиях. Для специалистов в данной области будет очевиден факт наличия достаточного сходства для подтверждения достоверности и/или сравнения. В некоторых вариантах осуществления соответствующим эталоном может быть агент, образец, последовательность, субъект, животное или индивид, или их популяция в условиях, которые специалист в данной области техники посчитает сравнимыми, например, в целях оценки одной или более конкретных переменных (например, наличия или отсутствия агента или условия), или репрезентативная для них мера или характеристика.

[0082] **Регуляторная последовательность:** В данном документе в контексте

экспрессии кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты регуляторная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая контролирует экспрессию кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления регуляторная последовательность может контролировать или влиять на один или более аспектов генной экспрессии (например, специфической в отношении типа клеток экспрессии, индуцибельной экспрессии и т. д.).

[0083] *Субъект*: В контексте данного документа термин «субъект» относится к организму, как правило, млекопитающему (например, человеку, крысе или мышши). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает заболеванием, расстройством или состоянием. В некоторых вариантах осуществления субъект восприимчив к заболеванию, расстройству или состоянию. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует один или более симптомов или одну или более характеристик заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект не страдает заболеванием, расстройством или состоянием. В некоторых вариантах осуществления субъект не демонстрирует один или более симптомов или одну или более характеристик заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет один или более признаков, характерных для восприимчивости или подверженности риску заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта, протестированного в отношении заболевания, расстройства или состояния, и/или проходившего терапию. В некоторых случаях субъект-человек может взаимозаменяемо называться «пациентом» или «индивидом».

[0084] *Терапевтический агент*: В контексте данного документа термин «терапевтический агент» относится к любому агенту, который вызывает необходимый фармакологический эффект при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления агент считается терапевтическим, если он демонстрирует статистически значимый эффект в соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция может представлять собой популяцию модельных организмов или людей. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция может определяться различными критериями, такими как определенная возрастная группа, пол, генетический фон, ранее существовавшие клинические состояния и т. д. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой вещество, которое можно использовать для лечения заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой агент, который был одобрен или должен быть одобрен государственным органом, прежде чем он может быть зарегистрирован для продажи с целью введения людям. В

некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой агент, для введения которого людям необходимо медицинское предписание.

[0085] *Терапевтически эффективное количество*: В контексте данного документа «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое оказывает необходимый эффект, ради которого его вводят. В некоторых вариантах осуществления этот термин относится к количеству, которое является достаточным при введении популяции, страдающей или подверженной заболеванию, расстройству и/или состоянию в соответствии с терапевтической схемой введения, для лечения заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое снижает частоту и/или тяжесть, и/или задерживает появление одного или более симптомов заболевания, расстройства и/или состояния. Специалистам в данной области техники известно, что термин «*терапевтически эффективное количество*» по сути не требует успешного лечения конкретного индивида. Скорее, терапевтически эффективное количество может представлять собой такое количество, которое обеспечивает конкретный необходимый фармакологический ответ у значительного числа субъектов при введении пациентам, нуждающимся в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления отнесение к терапевтически эффективному количеству может быть отнесением к количеству, измеренному в одной или более конкретных тканях (например, ткани, пораженной заболеванием, расстройством или состоянием) или жидкостях (например, крови, слюне, сыворотке, поте, слезах, моче и т. д.). Специалистам в данной области техники известно, что в некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество конкретного агента можно составлять и/или вводить в однократной дозе. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество агента можно составлять и/или вводить в виде множества доз, например, в качестве части схемы введения.

[0086] *Лечение*: В контексте данного документа термин «лечение» (также «лечить») относится к применению терапии, которая частично или полностью облегчает, снижается интенсивность, ослабляет, подавляет, задерживает начало, уменьшает тяжесть и/или уменьшает частоту появления одного или более симптомов, признаков и/или причин конкретного заболевания, расстройства или состояния, или которую применяют с целью достижения любого из этих результатов. В некоторых вариантах осуществления такое лечение может относиться к субъекту, который не демонстрирует признаков соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния, и/или субъекта, который демонстрирует только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния. В

альтернативном или дополнительном варианте такое лечение может относиться к субъекту, который демонстрирует один или более установленных признаков соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может относиться к субъекту, у которого было диагностировано соответствующее заболевание, расстройство и/или состояние. В некоторых вариантах осуществления лечение может относиться к субъекту, который заведомо имеет один или более факторов восприимчивости, которые статистически коррелируют с повышенным риском развития соответствующего заболевания, расстройства или состояния. «Профилактическое лечение» включает лечение, применяемое к субъекту, который не демонстрирует признаков или симптомов подлежащего лечению состояния или демонстрирует только ранние признаки или симптомы подлежащего лечению состояния, так что лечение применяется с целью уменьшения, предотвращения или снижения риска развития состояния. Таким образом, профилактическое лечение имеет функцию превентивного лечения состояния. «Терапевтическое лечение» включает лечение, применяемое к субъекту, который не демонстрирует симптомы или признаки состояния, и применяется к субъекту с целью уменьшения тяжести или прогрессирования состояния.

[0087] *Единичная доза*: В контексте данного документа термин «единичная доза» относится к количеству, вводимому в виде одной дозы и/или физически дискретной единицы фармацевтической композиции. Во многих вариантах осуществления единичная доза содержит predetermined количество активного агента, например, predetermined вирусный титр (число вирусов, вирионов или вирусных частиц в заданном объеме). В некоторых вариантах осуществления единичная доза содержит полную однократную дозу агента. В некоторых вариантах осуществления вводят более одной единичной дозы для обеспечения полной однократной дозы. В некоторых вариантах осуществления необходимо или ожидаемо необходимо введение нескольких единичных доз с целью достижения предполагаемого эффекта. Единичная доза может представлять собой, например, объем жидкости (например, приемлемого носителя), содержащий predetermined количество одного или более терапевтических фрагментов, predetermined количество одного или более терапевтических фрагментов в твердой форме, состав для продолжительного высвобождения или устройство доставки лекарственного средства, содержащие predetermined количество одного или более терапевтических фрагментов, и т. д. Следует понимать, что единичная доза может находиться в составе, который содержит любой из ряда компонентов в дополнение к терапевтическому(им) фрагменту(ам). Например, могут быть включены приемлемые носители (например, фармацевтически приемлемые носители), разбавители,

стабилизаторы, буфера, консерванты и т. д. Специалистам в данной области техники будет понятно, что во многих вариантах осуществления общая соответствующая суточная дозировка конкретного терапевтического агента может включать часть или множество единичных доз, и может быть определена, например, медицинским работником, с медицинской точки зрения. В некоторых вариантах осуществления конкретный эффективный уровень дозы для любого конкретного субъекта или организма может зависеть от ряда факторов, включая подлежащее лечению заболевание и степень тяжести заболевания; активность конкретного применяемого активного соединения; конкретную применяемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион субъекта; время введения и скорость выведения конкретного применяемого активного соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства и/или дополнительные виды терапии, применяемые в комбинации или одновременно с конкретными применяемыми соединениями; и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0088] Многие графические материалы, приведенные в данном документе, более понятны в цвете. Заявитель считает цветные версии графических материалов частью оригинальной поданной заявки и сохраняет право представления цветных изображений графических материалов в следующих работах.

[0089] Фиг. 1. Схемы типовых векторов. Схемы типовых векторов иллюстрируют возможное упорядочение компонентов в интегрированных кассетах и кассетах временной экспрессии, применимых в вариантах осуществления предложенных векторов Ad35. Интегрированные кассеты содержат транспозон и другие компоненты между сайтами *frt*. Векторы HDAd могут содержать экспрессионные продукты (эксп. продукт), такие как γ -глобин, GFP, mCherry и hFVIII(ET3); протоморы, такие как EF1 α , промотор PGK или β -промотор; селективные маркеры, такие как mgmt^{P140K}; регуляторные элементы (рег. элементы), такие как промоторы, хвосты поли-A и/или инсуляторы (такие как cHS4). Кассеты временной экспрессии содержат аналогичные компоненты, а также молекулы для разрезания ДНК (например, spCas9) или редакторы оснований и нацеливающие на геном гидовые элементы (GTG; например, oGPHK). Векторы на основе транспозазы содержат нацеленную рекомбиназу (например, FlpE) и транспозазу (например, SB100x). Векторы, хотя и проиллюстрированы в одной ориентации/одном направлении, могут, в альтернативном варианте, быть предоставлены в обратном направлении.

[0090] Фиг. 2A-2F. Интегрирующийся вектор HDAd5/35++ для генной терапии ГСКП гемоглобинопатий. (Фиг. 2A) Структура вектора. В HDAd- γ -глобин/mgmt, 11,8 т. о.

транспозон фланкируется инвертированными повторами (ИП) транспозона и сайтами FRT для интеграции посредством гиперактивной транспозазы Sleeping Beauty (Спящая красавица или SB100X), обеспечиваемой из вектора HDAd-SB (правая панель). Экспрессионная кассета γ -глобина содержит 4,3 т. о. версию LCR β -глобина, содержащую 4 области гиперчувствительности (HS) к ДНКазе и 0,7 т. о. промотор β -глобина. Использовали ген 76-Пе HBG1, содержащий 3'-НТО (для стабилизации мРНК в эритроцитах). Чтобы избежать взаимодействия между LCR/ β -промотором и промотором EF1A, между кассетами был вставлен 1,2 т. о. куриный инсулятор хроматина HS4 (Ins). Вектор HDAd-SB содержит ген для усиливаемой активностью транспозазы SB100X и рекомбиназы Flpe под управлением универсально активных промоторов PGK и EF1A, соответственно. (Фиг. 2B) *In vivo* трансдукция мобилизованных мышей CD46tg. ГСКП мобилизовали путем п/к инъекций человеческого рекомбинантного G-CSF в течение 4 дней с последующей 1 п/к инъекцией AMD3100. Через тридцать и 60 минут после инъекции AMD3100 животным в/в вводили 1:1 смесь HDAd- γ -глобин/mgmt плюс HDAd-SB (2 инъекции, каждая по 4×10^{10} вирусных частиц). Мышей обрабатывали иммуносупрессивными (ИС) лекарственными средствами в течение следующих 4 недель, чтобы избежать иммунных ответов против человеческого γ -глобина и MGMT^{P140K}. Обработку O⁶-BG/BCNU начинали на 4 неделе и повторяли каждые 2 недели 3 раза. С каждым циклом повышали концентрацию BCNU от 5 до 7,5 и 10 мг/кг. Иммуносупрессию возобновляли через 2 недели после последней инъекции O⁶-BG/BCNU. (Фиг. 2C) Процентное содержание γ -глобин человека⁺ периферических RBC, измеренное методом проточной цитометрии. (Фиг. 2D) Процентное содержание γ -глобин человека⁺ клеток в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК), общем количестве клеток, эритроидных Ter119⁺ клетках и незритроидных Ter119⁻ клетках. (Фиг. 2E) Процентное содержание белка человеческого γ -глобина по сравнению с цепями глобина (α , β -основной, β -минорной) взрослых мышей, измеренной методом ВЭЖХ в RBC на 18 неделе. (Фиг. 2F) Процентное содержание мРНК человеческого γ -глобина по сравнению с мРНК β -основной цепи глобина взрослых мышей, измеренное методом ОТ-кПЦР в общем числе клеток периферической крови на 18 неделе. Мышей, которые не получали никакой обработки, использовали в качестве контроля. На Фиг. 2C-2F каждый символ представляет отдельное животное.

[0091] Фиг. 3. ВЭЖХ-анализ цепей глобина в RBC от контрольной мыши hCD46tg и репрезентативной мыши CD46tg после *in vivo* трансдукции/отбора. Числа (вольты) указывают пиковые интенсивности. Всего проанализировали 4 мыши из каждой группы с аналогичными результатами. Данные представлены на Фиг. 2E. На Фиг. 3 значения

площади под кривой (ППК) вынесены слева от соответствующего пика.

[0092] Фиг. 4А-4С. Анализ мышей, которых подвергли трансплантации, со сбором клеток костного мозга Lin⁻ через 18 недель после *in vivo* трансдукции («вторичные реципиенты»). (Фиг. 4А) Приживление, измеренное в образцах крови в указанные моменты времени на основании процентного содержания человеческих CD46-позитивных клеток в МКПК. (Фиг. 4В) Приживление в костном мозге, селезенке и МКПК на 20 неделе. (Фиг. 4С) Отношение человеческого γ и мышинового белка α -глобина, измеренное методом ВЭЖХ в RBC. Каждый символ представляет отдельное животное. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Краскела - Уоллиса.

[0093] Фиг. 5А-5Е. Анализ интеграции трансгена в клетках костного мозга вторичных реципиентов на 20 неделе. (Фиг. 5А) Локализация сайтов интеграции в мышинных хромосомах клеток костного мозга. Проиллюстрирована репрезентативная мышшь. Каждая линия представляет сайт интеграции. Число сайтов интеграции в этом образце составляет 2197. (Фиг. 5В) Распределение интеграции в геномных областях. Данные по сайтам интеграции от 5 мышей объединяли и использовали для построения графика. (Фиг. 5С) Сравнивали число интеграций, перекрывающихся с непрерывными геномными окнами и рандомизированными геномными окнами, и размер. Объединенные данные использовали на Фиг. 5В). Р-значение по критерию χ^2 Пирсона для сходства составляет 0,06381, что показывает, что профиль интеграции близок к случайному. (Фиг. 5D) Число копий трансгена. Геномную ДНК из общих клеток костного мозга от нетрансдуцированных контрольных мышей и вторичных реципиентов на 20 неделе подвергали кПЦР со специфическими к человеческому γ -глобину праймерами. Приведено число копий на клетку для отдельных животных. Каждый символ представляет отдельное животное. (Фиг. 5Е) Число копий трансгенов в отдельных колониях клональных предшественников. Lin⁻ клетки костного мозга высевали в метилцеллюлозу, а через 15 дней собирали отдельные колонии. Проводили кПЦР геномной ДНК. Приведен нормализованный сигнал кПЦР в отдельных колониях, выраженный в виде числа копий трансгена на клетку (n=113). Каждый символ представляет число копий в отдельной колонии, полученной из одиночной клетки.

[0094] Фиг. 6. кПЦР в полученных из одиночных клеток колониях предшественников для измерения VCN (смотрите Фиг. 7Е).

[0095] Фиг. 7А-7Е. Гематологические параметры после *in vivo* трансдукции/отбора ГСКП у мышей CD46tg (18 неделя после инъекции HDAd). (Фиг. 7А) Число WBC. (Фиг. 7В) Репрезентативные мазки крови от необработанных мышей и мышей через 18 недель

после инъекции HDAd- γ -глобин/mgmt плюс HDAd-SB. Масштабная планка: 20 мкм. Ядра WBC окрашиваются в пурпурный цвет. (Фиг. 7C) Гематологические параметры. Hb, гемоглобин; HCT, гематокрит; MCV, средний корпускулярный объем; MCH, средний корпускулярный гемоглобин; MCHC, концентрация среднего корпускулярного гемоглобина; RDW, ширина распределения эритроцитов по объему. $n \geq 3$, * $P < 0,05$. Статистический анализ проводили, используя 2-факторный ANOVA. (Фиг. 7D) клеточная композиция костного мозга у наивных мышей (контроль) и обработанных мышей, умерщвленных на 18 неделе. Приведено процентное содержание положительных в отношении маркера линии дифференцировки клеток (Ter119+, CD3+, CD19+ и Gr-1+ клеток) и ГСКП (клетки LSK). (Фиг. 7E) Колониеобразующий потенциал Lin- клеток костного мозга, собранных через 18 недель после *in vivo* трансдукции. Приведено число колоний, которые образовались после посева 2500 Lin- клеток. На Фиг. 7A и Фиг. 7C-7E каждый символ представляет отдельное животное. NE, нейтрофилы; LY, лимфоциты; MO, моноциты; BA, базофилы.

[0096] Фиг. 8. Создание CD46^{+/+}/Hbbth-3 модели талассемии. Самок мышей CD46tg скрещивали с самцами мышей Hbbth-3. Гибридных мышей поколения F1 обратно скрещивали с мышами hCD46^{+/+} для создания мышей Hbbth-3, гомозиготных в отношении hCD46^{+/+}

[0097] Фиг. 9A-9C. Фенотип CD46^{+/+}/Hbbth-3 мышинной модели талассемии. (Фиг. 9A) Гематологические параметры мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 ($n=7$) по сравнению с мышами CD46tg ($n=3$) и Hbbth-3 ($n=3$). Каждый символ представляет отдельное животное. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,0002$, *** $P \leq 0,00003$. Статистический анализ проводили, используя 2-факторный ANOVA. RET, ретикулоциты. (Фиг. 9B) Репрезентативные мазки периферической крови после окрашивания красителем Мэй - Грюнвальда/Гимза. Масштабная планка: 20 мкм. (Фиг. 9C) Экстрамедуллярный гемопоэз по окрашиванию H&E в срезах печени и селезенки мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 (2 нижние левые панели) по сравнению со срезами селезенки и печени мышей CD46tg (2 верхние панели). Масштабные планки: 20 мкм. Кластеры эритробластов в печени указаны на нижней левой панели. Круги на нижней средней панели обозначают мегакариоциты в селезенке. Отложение железа (гранулярные синеватые отложения) по окрашиванию берлинской лазурью Перлсу в селезенке проиллюстрированы на верхней правой панели для мышей CD46tg и нижней правой панели для мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3. Масштабная планка: 25 мкм.

[0098] Фиг. 10. Анализ белых кровяных клеток у талассемических мышей (Hbbth-3 и CD46^{+/+}/Hbbth-3) по сравнению со «здоровыми» мышами CD46tg. WBC: белые

кровяные клетки, NEU: нейтрофилы, LY: лимфоциты, MONO: моноциты. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,0002$, *** $p \leq 0,00003$. Это исходные уровни у мышей до обработки. (n=8 для CD46tg, n=4 для Hbbth3, n=20 для CD46^{+/+}/Hbbth3). Каждый символ представляет отдельное животное. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Краскела - Уоллиса.

[0099] Фиг. 11. Мобилизация ГСКП у мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3. Приведено число мобилизованных клеток LSK (линия дифференцировки-/Sca-1⁺/c-Kit⁺) в периферической крови через 1 час после последней инъекции AMD3100. n=17 мобилизованных мышей; n=3 необработанных мышей. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Краскела - Уоллиса.

[00100] Фиг. 12. In vivo трансдукция/отбор мобилизованных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3. In vivo трансдукция мобилизованных мышей CD46^{+/+}/Hbbth3. ГСКП мобилизовали путем п/к инъекций человеческого рекомбинантного G-CSF в течение 6 дней (дни 1-6), за которыми следовали три п/к инъекции AMD3100/плериксафора (дни 5-7). Через 30 и 60 минут после инъекции плериксафора животным внутривенно вводили 1:1 смесь HDAd- γ -глобин/mgtm+HDAd-SB (2 инъекции, каждая по 4×10^{10} вч). После in vivo трансдукции применяли иммуносупрессию в течение 17 недель, чтобы избежать иммунных ответов против белков человеческого γ -глобина и MGMT^{P140K}. На 17 неделе обработанные мыши служили в качестве доноров для вторичных трансплантатов или же их подвергали in vivo отбору с O⁶-BG/BCNU. Вторичных реципиентов C57Bl/6 наблюдали в течение 16 недель при иммуносупрессии, а затем умерщвляли. Мыши, которых подвергали in vivo отбору, получали обработку O⁶-BG/BCNU с повышением дозы (5, 7,5, 10, 10 мг/кг) через неделю. Иммуносупрессию возобновляли через две недели после последней дозы O⁶-BG/BCNU. На 29 неделе мышей умерщвляли, а их костный мозг трансплантировали вторичным реципиентам C57Bl/6.

[0101] Фиг. 13A-13F. Анализ in vivo трансдуцированных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3, которые не получали обработку O⁶BG/BCNU. (Фиг. 13A) Процентное содержание человеческого γ -глобина в периферических RBC, измеренное методом проточной цитометрии. Этот эксперимент проводили 3 раза, обозначенных разной формой символов. (Фиг. 13B) Экспрессия γ -глобина в эритроидных (Ter119⁺) и неэритроидных (Ter119⁻) кровяных клетках. *** $P \leq 0,00003$ по 1-факторному критерию ANOVA. (Фиг. 13C) Анализ RBC здоровых (CD46tg) мышей (n=3), мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 до мобилизации и in vivo трансдукции (n=14) и мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3, которых подвергли in vivo трансдукции и проанализировали на 16 неделе (n=8). * $P \leq 0,05$. Статистический анализ проводили, используя 2-факторный ANOVA. (Фиг. 13D) Гистологический фенотип. Вверху: Мазки

крови. Посередине: Суправитальное окрашивание мазков периферической крови бриллианткрезил синим для выявления ретикулоцитов. Процентное содержание положительно окрашенных ретикулоцитов в репрезентативных мазках составляло: для CD46tg 8% \pm 0,8%; для CD46^{+/+}/Hbbth-3 до трансдукции 39% \pm 1,3%; и для CD46^{+/+}/Hbbth-3 на 16 неделе после трансдукции 26% \pm 0,45%. Внизу: Экстремедуллярный гемопоэз. Масштабные планки: 20 мкм. (Фиг. 13E и Фиг. 13F) Анализ вторичных реципиентов. Общий костный мозг *in vivo* трансдуцированных мышей на 16 неделе трансплантировали мышам C57BL/6, которые получали сублетальное предварительное кондиционирование бусульфаном. Мыши получали иммуносупрессию во время периода наблюдения. (Фиг. 13E) Приживление на основе процентного содержания CD46 человека⁺ (hCD46⁺) МКПК. (Реципиенты C57BL/6 не экспрессируют hCD46.) (Фиг. 13F) Процентное содержание человеческого γ -глобин⁺ RBC. Каждый символ представляет отдельное животное.

[0102] Фиг. 14A-14F. Анализ экспрессии γ -глобина у *in vivo* трансдуцированных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 после *in vivo* отбора. (Фиг. 14A) Процентное содержание человеческого γ -глобина в периферических RBC, измеренное методом проточной цитометрии. Стрелками указаны моменты времени обработки O⁶-VG/VCNU. Разные символы представляют 3 независимых эксперимента. Данные вплоть до 16 недели идентичны данным на Фиг. 13A. (Фиг. 14B) Процентное содержание экспрессирующих γ -глобин клеток в гемопоэтических тканях на момент умерщвления (29 неделя), проанализированное методом проточной цитометрии. *P \leq 0,05, **P \leq 0,0002, ***P \leq 0,00003. (Фиг. 14C) Экспрессия γ -глобина в MACS-очищенных клетках Ter119. Проводили иммуномагнитный отбор клеток костного мозга от первичных реципиентов на 29 неделе в отношении клеток Ter119⁺. Экспрессию γ -глобина измеряли в клетках Ter119⁺ и Ter119⁻ методом проточной цитометрии. ***P \leq 0,0002. (Фиг. 13D) Кратность обогащения γ -глобин⁺ эритроидных (Ter119⁺) и неэритроидных (Ter119⁻) клеток в периферической крови, костном мозге и селезенке до и после *in vivo* отбора (неделя 16 и неделя 29). n=5, **P \leq 0,0002. (Фиг. 14E) Процентное содержание белка человеческого γ -глобина по сравнению с белком мышиноного α -глобина, измеренное методом ВЭЖХ в RBC. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Краскела - Уоллиса. (Фиг. 14F) Уровень мРНК человеческого γ -глобина относительно мРНК β -основной цепи глобина взрослых мышей, измеренный методом ОТ-кПЦР в клетках периферической крови. Необработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 использовали в качестве контроля. Каждый символ представляет отдельное животное.

[0103] Фиг. 15A-15D. ВЭЖХ-анализ цепей глобина в RBC. (Фиг. 15A) Репрезентативные хроматограммы пиков мышиноного глобина у контрольной мыши

CD46tg. Отмечены пики для альфа (α), бета (β)-минорной и β -основной цепей глобина взрослой мыши. (Фиг. 15B-15D) Хроматограмма RBC от мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 (№ 71). Следует отметить, что эти мыши являются гетерозиготными в отношении делеций β -минорного и β -основного гена. С этим могут быть связаны дополнительные пики приблизительно на 29 мин. На (Фиг. 15D) отмечен пик, специфический для человеческого γ -глобина. Приведены репрезентативные хроматограммы. Числа (вольты) указывают пиковые интенсивности. На Фиг. 15C и 15D значения ППК вынесены слева от соответствующего пика.

[0104] Фиг. 16. Анализ ДНК обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 на 29 неделе. Число копий трансгена (γ -глобина) на клетку костного мозга. Каждый символ представляет отдельное животное.

[0105] Фиг. 17A-17E. Фенотипическая коррекция мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 путем *in vivo* трансдукции/отбора ГСКП. (Фиг. 17A) Анализ RBC здоровых (CD46tg) мышей, мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 до мобилизации и *in vivo* трансдукции и мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3, которых подвергли *in vivo* трансдукции/отбору (анализ проведен на 29 неделе после инфузии HDAd) (n=5). *P \leq 0,05, **P \leq 0,0002, ***P \leq 0,00003. Статистический анализ проводили, используя 2-факторный ANOVA. (Фиг. 17B) Суправитальное окрашивание мазков периферической крови бриллианткрезил синим для выявления ретикулоцитов. Стрелками указаны ретикулоциты, содержащие характерную остаточную РНК и микроорганеллы. Процентное содержание положительно окрашенных ретикулоцитов в репрезентативных мазках составляло: для CD46 7%; для CD46^{+/+}/Hbbth-3 до обработки 31%; и для CD46^{+/+}/Hbbth-3 после обработки 12%. Масштабная планка: 20 мкм. (Фиг. 17C) Вверху: Мазки крови. Масштабная планка: 20 мкм. Посередине: Цитоцентрифугаты костного мозга. Стрелками указаны эритробласты на разных стадиях созревания и обратный сдвиг в эритропоэзе с преобладанием проэритробластов у обработанных мышей. Масштабная планка: 25 мкм. Внизу: Тканевый гемосидероз по окрашиванию по Перлсу. Отложение железа показано в виде цитоплазматических синих пигментов гемосидерина в срезах ткани селезенки. Изображения мазков крови для контрольных мышей (CD46tg и CD46^{+/+}/Hbbth-3, до трансдукции) на (Фиг. 17C) и (Фиг. 18D) получены из одного образца. (Фиг. 17D) Макроскопические изображения селезенки 1 репрезентативной мыши CD46tg и 1 необработанной мыши CD46^{+/+}/Hbbth-3 и 5 обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3. (Фиг. 17E) На момент умерщвления размер селезенки определяли как отношение массы селезенки к общей массе тела (мг/г). Каждый символ представляет отдельное животное. Данные представлены в виде среднего \pm СПС. *P \leq 0,05. Статистический анализ проводили, используя 1-факторный ANOVA.

[0106] Фиг. 18A-18E. Анализ вторичных реципиентов C57BL/6 с трансплантированными клетками костного мозга от обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3. (Фиг. 18A) Уровни приживления, измеренные в периферии, на основании процентного содержания CD46 человека⁺ (hCD46⁺) клеток в МКПК после кондиционирования бусульфаном или облучения всего тела (ОВТ). (Реципиенты C57BL/6 не экспрессируют hCD46.) (Фиг. 18B) Процентное содержание экспрессирующих человеческий γ -глобин RBC периферической крови. Все мыши получали иммуносупрессию, начиная с 4 недели после трансплантации. (Фиг. 18C) Процентное содержание γ -глобин⁺ клеток в hCD46⁺ (полученных от донора) клетках. (Фиг. 18C и Фиг. 18D) Экспрессия γ -глобина/CD46 у вторичных реципиентов C57BL/6 на 20 неделе после трансплантации (предварительное кондиционирование бусульфаном). Проводили иммуномагнитное отделение CD46⁺ клеток от химерного костного мозга 3 репрезентативных вторичных мышей и анализировали в отношении экспрессии γ -глобина методом проточной цитометрии. Следует отметить, что, в отличие от людей, мыши huCD46tg экспрессируют CD46 на RBC. (Фиг. 18C) Уровни присутствия γ -глобина/CD46 первичных и вторичных реципиентов на момент умерщвления. (Фиг. 18D) Экспрессия γ -глобина в CD46⁺-отобранных клетках из гемопоэтических тканей вторичных реципиентов (неделя 20). Каждый символ представляет отдельное животное. (Фиг. 18E) Экспрессия γ -глобина у вторичных реципиентов, которые получали новый (второй) раунд мобилизации ГСКП/in vivo трансдукции (n=5). Вторичных реципиентов (с предварительным кондиционированием бусульфаном) анализировали в отношении экспрессии γ -глобина и CD46 на 20 неделе после трансплантации («до in vivo трансдукции»). Затем этих мышей мобилизовали и трансдуцировали in vivo векторами HDAd- γ -глобин плюс HDAd-SB. Через четыре недели после in vivo трансдукции мышей умерщвляли и проводили анализ («неделя 4 после in vivo трансдукции»). ***P \leq 0,00003. Статистический анализ проводили, используя 1-факторный ANOVA.

[0107] Фиг. 19A-19D. Безопасность in vivo трансдукции/отбора в мышинной CD46^{+/+}/Hbbth-3 модели. (Фиг. 19A) Число WBC и тромбоцитов (PLT) во время и после in vivo отбора. Обработка O⁶BG/BCNU указана звездочками. n \geq 3. (Фиг. 19B) Абсолютное число циркулирующих субпопуляций WBC. n \geq 3. (Фиг. 19C) Клеточная композиция костного мозга у контрольных и обработанных мышей, умерщвленных на 29 неделе. Приведено процентное содержание положительных в отношении маркера линии дифференцировки клеток (Ter119⁺, CD3⁺, CD19⁺ и Gr-1⁺ клеток) и ГСКП (LSK клеток). (Фиг. 19D) Колониеобразующий потенциал клеток костного мозга, собранных на 29 неделе. Каждый символ представляет отдельное животное. *P \leq 0,05, **P \leq 0,0002, ***P \leq

0,00003. Статистический анализ проводили, используя 2-факторный ANOVA. NEU: нейтрофилы; LY: лимфоциты; MO: моноциты.

[0108] Фиг. 20A-20F. Эффект анти-HDAd5/35⁺⁺ антител на второй раунд трансдукции. (Фиг. 20A) Мышей CD46tg мобилизовали и инъецировали HDAd-mgmt/GFP+HDAd-SB. Образцы сыворотки получали как указано. (Фиг. 20B, Фиг. 20C) Анализ МКПК методом проточной цитометрии на 4 день и 4 неделю после мобилизации/трансдукции. (Фиг. 20D) Второй раунд мобилизации/трансдукции на 4 неделе и последующий анализ GFP. (Фиг. 20E) Титры анти-HDAd5/35⁺⁺ антитела на основании ОП₄₅₀. Титр ОП₄₅₀=0,2 считается нейтрализующим. (Фиг. 20F) Процентное содержание GFP-положительных МКПК, измеренное в разных когортах (смотрите Фиг. 20B-20D). Контролем являются необработанные мыши CD46tg. Каждый символ (Фиг. 20E) и (Фиг. 20F) представляет отдельное животное. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Краскела - Уоллиса.

[0109] Фиг. 21A-21D. Биораспределение ДНК-вектора на 18 неделе после инъекции HDAd (10 недель *in vivo* отбора) (Фиг. 21A) Конструкция праймера. Светло-серые праймеры являются специфическими в отношении кассеты трансгена и будут выявлять как интегрированную, так и эписомальную векторную ДНК. Темно-серые праймеры будут выявлять добавочную векторную ДНК, полученную из плазмиды рНСА. После SB100x-опосредованной интеграции соответствующая целевая область для темно-серых праймеров будет утрачена. Следовательно, темно-серые праймеры используют для измерения копий эписомального вектора. (Фиг. 21B) Стандартная кривая для числа копий интегрированного трансгена. (Фиг. 21C) Стандартная кривая для числа копий НСА (эписомального вектора). (Фиг. 21D) Число копий интегрированного трансгена на клетку. Копии эписомального вектора (темно-серые праймеры) вычитали из общего числа копий вектора (светло-серые праймеры). Вектор-специфические сигналы нормализовали относительно GAPDH. Каждый символ представляет отдельное животное.

[0110] Фиг. 22A-22C. *In vitro* анализ для оценки мутагенности обработки O⁶BG/BCNU. (Фиг. 22A) После восстановления в течение ночи после криоконсервации CD34⁺ клетки трансдуцировали HDAd-mgmt/GFP или контролем HDAd при МЗ 3000 вч/клетка, что опосредовало экспрессию GFP в 50% клеток через два дня. Затем клетки обрабатывали 10 мМ O⁶BG, а потом 25 мМ BCNU (или растворителя ДМСО) в течение 2 часов. После промывки клетки высевали в метилцеллюлозу для анализа КОЕ (3000 клеток на 35 мм планшет). Через 14 дней проводили подсчет колоний и объединенных клеток, а геномную ДНК подвергали полноэкзомному секвенированию. (Фиг. 22B) Число объединенных клеток на планшет. Каждый символ представляет число клеток в

отдельном 35 мм планшете. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Краскела - Уоллиса. (Фиг. 22С) Репрезентативная колония из группы HDAd-mgmt/GFP+O⁶BG/BCNU. Продемонстрирована экспрессия GFP в большинстве клеток и снижение интенсивности GFP на периферии колонии вследствие потери эписомальных вирусных геномов. Масштабная планка равна 1 мм.

[0111] Фиг. 23. Структуры векторов. HDAd-короткая-LCR: Этот вектор содержит 4,3 т. о. мини-LCR, состоящую из коровых областей сайтов гиперчувствительности (HS) к ДНКазе 1-4 и 0,66 т. о. промотор β -глобина. Длина транспозона составляет 11,8 т. о. HDAd-длинная-LCR. Ген γ -глобина находится под управлением 21,5 т. о. LCR β -глобина (xp11: 5292319-5270789), а 1,6 т. о. промотора β -глобина (xp11: 5228631-5227023 или xp11: 5228631-5227018, например) и 3'HS1 области (xp11: 5206867-5203839), также полученной из локуса β -глобина. Для стабилизации РНК в эритроидных клетках НТО гена γ -глобина связывали с 3' концом гена γ -глобина. Вектор также содержит экспрессионную кассету для mgmtP140K, позволяющую проводить *in vivo* отбор трансдуцированных ГСКП и потомства ГСКП. Экспрессионные кассеты γ -глобина и mgmt разделены куриным инсулятором глобина HS4 (cHS4). 32,4 т. о. транспозон LCR- γ -глобин/mgmt фланкируется инвертированными повторами (ИП), распознаваемыми SB100x, и сайтами *flr*, которые делают возможной циркуляризацию транспозона рекомбиназой *Flpe*. HDAd-SB: Второй вектор, необходимый для интеграции, содержит экспрессионные кассеты для усиливаемой активностью транспозазы Sleeping Beauty SB100x и рекомбиназы *Flpe*.

[0112] Фиг. 24А-24F. SB100x-опосредованная интеграция 32,4 т. о. транспозона после *ex vivo* трансдукции ГСКП с HDAd-длинная-LCR. (Фиг. 24А) Экспериментальная схема: Lin⁻ клетки костного мозга от CD46-трансгенных мышей трансдуцировали HDAd-длинная-LCR и HDAd-SB при общей МЗ 500 вч/клетка. После одного дня в культуре 1×10⁶ трансдуцированных клеток/мышь трансплантировали мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения. На 4 неделю начинали обработку O6BG/BCNU и повторяли четыре раза каждые две недели. С каждым циклом повышали концентрацию BCNU от 5 мг/кг до 7,5 мг/кг и 10 мг/кг (дважды). На 20 неделе мышей умерщвляли. (Фиг. 24В) Процентное содержание положительных в отношении человеческого γ -глобина периферических красных кровяных клеток (RBC), измеренное методом проточной цитометрии. Каждый символ представляет отдельное животное. (Фиг. 24С) Репрезентативные данные проточной цитометрии, иллюстрирующие экспрессию человеческого γ -глобина в эритроидных (Ter119⁺) клетках костного мозга (нижняя панель) на 20 неделе после трансплантации. На верхней панели проиллюстрирована мышь, которой трансплантировали ложно-трансдуцированные клетки. (Фиг. 24D) Схема иПЦР-

анализа: Пять микрограммов геномной ДНК расщепляли SacI, повторно лигировали и подвергали гнездовой инвертированной ПЦР с указанными праймерами (смотрите Материал и методы). (Фиг. 24E) Электрофорез а агарозном геле клонированных плазмид, содержащих интеграционные соединения. Указанные полосы вырезали и секвенировали. Хромосомная локализация сайтов интеграции приведена под гелем. (Фиг. 24F) Примеры соединительных последовательностей: 5' концевая последовательность вектора, последовательность ИП/ПП Sleeping Beauty, интеграционное соединение (xp15, 6805206) SEQ ID NO: 1; 5' концевая последовательность вектора, последовательность ИП/ПП Sleeping Beauty, интеграционное соединение (xpX, 16897322) SEQ ID NO: 2; 3' концевая последовательность вектора, последовательность ИП/ПП Sleeping Beauty, интеграционное соединение (xp4, 10207667) SEQ ID NO: 3. Тело вектора и последовательности ИП/ПП обозначены обычным текстом и подчеркиванием, соответственно. Хромосомная последовательность обозначена жирным текстом. Динуклеотиды ТА, используемые SB100x в месте соединения ИП и хромосомной ДНК, взяты в скобки.

[0113] Фиг. 25A-25E. *In vivo* трансдукция ГКСП HDAd-длинная-LCR, содержащей 32,4 т. о. транспозон, и HDAd-короткая-LCR, содержащей 11,8 т. о. транспозон. (Фиг. 25A) Схема обработки: Мышей hCD46tg мобилизовали и в/в инъецировали HDAd-короткая-LCR+HDAd-SB или HDAd-длинная-LCR +HDAd-SB (2 раза, каждый по 4×10^{10} вч 1:1 смеси обоих вирусов). Через пять недель начинали обработку ОБВГ/BCNU. С каждым циклом повышали концентрацию BCNU от 5 мг/кг до 7,5 мг/кг и 10 мг/кг. Концентрация ОБВГ составляла 30 мг/кг в случае каждой из четырех обработок. Мышей наблюдали до 20 недели, после чего животных умерщвляли для анализа. Lin- клетки костного мозга использовали для трансплантации вторичным реципиентам. Затем вторичных реципиентов наблюдали в течение 16 недель. (Фиг. 25B) Процентное содержание положительных в отношении человеческого γ -глобина клеток в периферических красных кровяных клетках (RBC), измеренное методом проточной цитометрии. Каждый символ представляет отдельное животное. У ложнотрансдуцированных мышей менее 0,1% клеток были γ -глобин-положительными. (Фиг. 25C) Уровни цепей белка γ -глобина, измеренные методом ВЭЖХ, в RBC на 20 неделе после *in vivo* трансдукции ГКСП. Приведено процентное содержание цепей белка γ -глобина человека и α -глобина мыши. (Фиг. 25D) Уровни мРНК γ -глобина, измеренные методом кОТ-ПЦР, в общей крови на 20 неделе после *in vivo* трансдукции ГКСП. Приведено процентное содержание мРНК γ -глобина человека и мРНК α -глобина мыши. (Фиг. 25E) Число копий вектора на клетку в мононуклеарных клетках костного мозга, собранных на 20 неделе после *in vivo* трансдукции ГКСП. Разница между двумя группами

не является значимой. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA.

[0114] Фиг. 26A-26D. Гематологические параметры на 20 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП. (Фиг. 26A) Белые кровяные клетки (WBC), нейтрофилы (NE), лейкоциты (LY), моноциты (MO), эозинофилы (EO) и базофилы (BA). (Фиг. 26B) Эритропоэтические параметры. RBC: красные кровяные клетки, Hb, гемоглобин; MCV, средний корпускулярный объем; MCH, средний корпускулярный гемоглобин; MCHC, концентрация среднего корпускулярного гемоглобина; RDW, ширина распределения эритроцитов по объему. Разница между тремя группами не была значимой. (Фиг. 26C) Клеточная композиция костного мозга. (Фиг. 26D) Колониеобразующий потенциал Lin⁻ клеток костного мозга. Разница между группами не была значимой на Фиг. 26A-26D.

[00115] Фиг. 27. Схема анализа сайта вставки. Указана локализация сайтов NheI и KpnI в векторе HDAd-длинная-LCR по сравнению с инвертированными повторами (ИП) Sleeping Beauty. Эти ферменты разрезают близко, но за пределами ИП/ПП SB и используются для уменьшения фона неинтегрированных векторов. Геномную ДНК из Lin⁻ клеток костного мозга расщепляли NheI и KpnI, а после термоинактивации дополнительно расщепляли NlaIII. NlaIII имеет 4-нуклеотидный сайт распознавания и создает небольшие фрагменты ДНК. Расщепленную ДНК затем лигировали с двухцепочечными олигонуклеотидами с известной последовательностью и совместимыми концами с расщепленными NlaIII фрагментами. После термоинактивации и очистки линкер-лигированные продукты использовали для линейной амплификации, которая создает популяцию одноцепочечных (оц) ДНК, примированных из левого плеча SB. Праймер является биотинилированным, поэтому оцДНК можно собирать с помощью стрептавидиновых гранул. После интенсивной промывки оцДНК элюировали с гранул и подвергали дополнительной амплификации посредством двух раундов гнездовой ПЦР. ПЦР-ампликоны очищали в геле, клонировали, секвенировали и картировали на последовательности мышинового генома, чтобы отметить сайты интеграции.

[0116] Фиг. 28A-28D. Анализ сайтов интеграции вектора в ГСКП методом LAM-PCR/NGS. Геномную ДНК выделяли из клеток костного мозга, собранных на 20 неделе после *in vivo* трансдукции HDAd-длинная-LCR+HDAd-SB. (Фиг. 28A) Хромосомное распределение сайтов интеграции. Сайты интеграции отмечены вертикальными линиями. (Фиг. 28B) Примеры соединительных последовательностей: последовательность ИП/ПП Sleeping Beauty, интеграционное соединение (xp7, 79796094) SEQ ID NO: 4; последовательность ИП/ПП Sleeping Beauty, интеграционное соединение (область повтора) SEQ ID NO: 5. Последовательности ИП/ПП обозначены подчеркиванием и

жирным шрифтом. Хромосомная последовательность обозначена обычным текстом. Динуклеотиды ТА, используемые SB100x в месте соединения ИП и хромосомной ДНК, выделены жирным шрифтом. (Фиг. 28С) Сайты интеграции картировали на мышинный геном и анализировали их положение относительно генов. Приведен процент событий интеграции, которые произошли на 1 т. о. выше сайтов инициации транскрипции (СИТ) (0,0%), 5' НТО экзонов (0,0%), кодирующих белок последовательностей (0,0%), интронов (17,0%), 3' НТО (0,0%), 1 т. о. ниже 3'НТО (0,0%), и в межгенных областях (83,0%). (Фиг, 28D) профиль интеграции в мышинных геномных окнах. Сравнивали число интеграций, перекрывающихся с непрерывными геномными окнами и рандомизированными геномными окнами, и размер. Это показывает, что профиль интеграции является аналогичным в непрерывных и случайных окнах. Максимальное число интеграций в любом заданном окне составляло не больше 3; при этом одна интеграция на окно характеризовалась большей частотой.

[0117] Фиг. 29А-29I. Анализ вторичных реципиентов. Lin- клетки костного мозга, полученные на 20 неделе от *in vivo* трансдуцированных мышей CD46tg, трансплантировали мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения. Вторичных реципиентов наблюдали в течение 16 недель. (Фиг. 29А) Уровни приживления на основании процентного содержания CD46-положительных МКПК на 4, 8, 12 и 16 неделях после трансплантации. Разница между двумя группами не была значимой. (Фиг. 29В) Процентное содержание экспрессирующих γ -глобин RBC периферической крови, измеренное методом проточной цитометрии. Разница между двумя группами не является значимой. (Фиг. 29С) Число копий вектора на клетку в МНК костного мозга, собранных на 20 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП. Разница между двумя группами не является значимой. (Фиг. 29D) Анализ цепей человеческого γ -глобина методом ВЭЖХ в RBC вторичных реципиентов. Приведено процентное содержание γ -глобина человека и α -глобина взрослой мыши. *** $p < 0,0001$. (Фиг. 29Е) Уровни мРНК γ -глобина в общем количестве клеток крови по сравнению с мРНК α -глобина мыши. (Фиг. 29F) Процентное содержание экспрессирующих γ -глобин эритроидных (Ter119⁺ клеток) в всем МНК костного мозга. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA. (Фиг. 29G) Уровни мРНК γ -глобина в МНК костного мозга на 16 неделе п. т. Приведено процентное содержание мРНК γ -глобина человека и мРНК β -основного глобина мыши. (Фиг. 29H) Эритроидная специфичность. Процентное содержание γ -глобин⁺ клеток в эритроидных (Ter119⁺) и неэритроидных (Ter119⁻) клетках. (Фиг. 29I) Число копий вектора (ЧКВ) на клетку в МНК костного мозга, собранных на 20 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП. Разница между двумя группами не является значимой.

[0118] Фиг. 30А-30D. Гематологические параметры у вторичных реципиентов на 16 неделе после трансплантации. (Фиг. 30А) Белые кровяные клетки. (Фиг. 30В) Эритропоэтические параметры. RBC: красные кровяные клетки, Hb, гемоглобин; MCV, средний корпускулярный объем; MCH, средний корпускулярный гемоглобин; MCHC, концентрация среднего корпускулярного гемоглобина; RDW, ширина распределения эритроцитов по объему. (Фиг. 30С) Клеточная композиция костного мозга. (Фиг. 30D) Колониеобразующий потенциал Lin- клеток костного мозга. Разница между группами не была значимой на Фиг. 30А-30D. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA.

[0119] Фиг. 31А-31D. In vitro исследования с человеческими CD34+ клетками. (Фиг. 31А) Схема эксперимента: CD34+ клетки трансдуцировали HDAd-длинная-LCR+HD-SB или HDAd-короткая-LCR+HDAd-SB и подвергали эритроидной дифференцировке (ЭД). In vitro отбор с O6BG-BCNU начинали на 5 день ЭД. На 18 день клетки анализировали методом проточной цитометрии (Фиг. 31В) и ВЭЖХ (Фиг. 31С). (Фиг. 31D) Число копий вектора на 18 день. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$

[0120] Фиг. 32А-32H. Экспрессия человеческого γ -глобина после in vivo генной терапии ГСК мышей Hbb^{th3}/CD46 с HDAd-короткая-LCR и HDAd-длинная-LCR. (Фиг. 32А) Схема обработки. В отличие от Фиг. 25А-25Е, на Фиг. 32А-32D приведены результаты для мышей Hbb^{th3}/CD46 с талассемией. (Фиг. 32В) Процентное содержание положительных в отношении человеческого γ -глобина клеток в периферических красных кровяных клетках (RBC), измеренное методом проточной цитометрии. Каждый символ представляет отдельное животное. (Фиг. 32С) Уровни цепей белка γ -глобина, измеренные методом ВЭЖХ, в RBC на 18 неделе после in vivo трансдукции ГСКП. Приведено процентное содержание цепей белка γ -глобина человека и α -глобина мыши. (Фиг. 32D) Репрезентативные хроматограммы для необработанной мыши Hbb^{th3}/CD46 (левая панель) и мыши на 21 неделе после обработки. Указаны мышинные α - и β -цепи, а также добавленный человеческий γ -глобин.

[0121] Фиг. 32Е-32H. Экспрессия человеческого γ -глобина после in vivo генной терапии ГСКП мышей Hbbth3/CD46+/+ с HDAd-короткая-LCR и HDAd-длинная-LCR. (Фиг. 32Е) Схема обработки: В отличие от исследования, приведенного на Фиг. 25, это исследование проводили с мышами Hbbth3/CD46 с талассемией. (Фиг. 32F) Процентное содержание положительных в отношении человеческого γ -глобина клеток в периферических красных кровяных клетках (RBC), измеренное методом проточной цитометрии. Каждый символ представляет отдельное животное. (Фиг. 32G) Уровни цепей

белка γ -глобина, измеренные методом ВЭЖХ, в RBC на 10-16 неделях после *in vivo* трансдукции ГСКП. Приведено процентное содержание цепей белка γ -глобина человека и α -глобина мыши. (Фиг. 32H) Репрезентативные хроматограммы для необработанной мыши Hbbth3/CD46+/+ (левая панель) и мыши на 16 неделе после обработки. Указаны мышинные α - и β -цепи, а также добавленный человеческий γ -глобин. Следует отметить, что с мышами Hbbth3/CD46+/+ проводили два независимых исследования. Первое исследование: N=6 для HD-длинная-LCR и N=2 для HDAd-короткая-LCR с наблюдением в течение 21 недели. Второе исследование: N=4 для HD-длинная-LCR и N=5 для HDAd-короткая-LCR с наблюдением в течение 16 недель. На Фиг. 32F приведены объединенные данные до недели 21. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$

[0122] Фиг. 33A, 33B. Анализ костного мозга на момент умерщвления. Костный мозг получали на 16 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП мышей Hbbth3/CD46+/+. (Фиг. 33A) Число копий вектора на клетку МНК костного мозга. Разница между двумя группами не является значимой. (Фиг. 33B) Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) γ -глобина в эритроидных (Ter119+) клетках. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA.

[0123] Фиг. 34. Микрофотографии, иллюстрирующие нормализованную морфологию эритроцитов C57BL6 (нормальных мышей) и мышей Townes SCA до обработки и на 10 неделе после обработки длинной LCR.

[0124] Фиг. 35. Микрофотографии, иллюстрирующие нормализованный эритропоэз (число ретикулоцитов) для мышей Townes до обработки и мышей Townes на 10 неделе после обработки (длинной LCR).

[0125] Фиг. 36A-36C. Фенотипическая коррекция. (Фиг. 36A, 36B) Морфология кровяных клеток, при этом на левой панели проиллюстрированы мазки крови, окрашенные красителем Гимза, а на правой панели проиллюстрированы мазки крови, окрашенные красителем Мэй - Грюнвальда. Остатки ядер и цитоплазмы в ретикулоцитах приводят к пурпурному окрашиванию. (Фиг. 36A) Сравнение до и на 14 неделе. (Фиг. 36B) Сравнение красителя Гимза и ретикулоцитов для мышей CD46tg, Hbb^{th3}/CD46 до, мышей Hbb^{th3}/CD46 с HDAd-длинная-LCR на 18 неделе и мышей Hbb^{th3}/CD46 с HDAd-длинная-LCR на 21 неделе. (Фиг. 36C) Цитоцентрифугаты костного мозга. Видно обратный сдвиг в эритропоэзе с преобладанием проэритробластов у обработанных мышей. Масштабная планка составляет 20 мкм.

[0126] Фиг. 37A, 37B. Фенотипическая коррекция (неделя 16). (Фиг. 37A) Левые панели: Мазки крови, окрашенные красителем Гимза/Мэй - Грюнвальда (5 мин). Правые

панели: Мазки крови, окрашенные бриллианткрезил синим в отношении ретикулоцитов. Остатки ядер и цитоплазмы в ретикулоцитах проявляются в виде пурпурного окрашивания. (Фиг. 37В) Цитоцентрифугаты костного мозга, окрашенные красителем Гимза/Мэй - Грюнвальда (15 мин). (Фиг. 37А и 37В) Верхняя панель: Нормальное клеточное распределение костного мозга - эритроидная линия дифференцировки представлены всеми стадиями дифференцировки эритроцитов. Средняя панель: Преобладание эритроидной линии дифференцировки над линией дифференцировки белых клеток - эритроидная линия дифференцировки состоит в основном из проэритробластов и базофильных эритробластов. Нижняя панель: Нормальное клеточное распределение костного мозга - эритроидная линия дифференцировки в основном представлена созревающими полихроматическими и ортохроматическими эритробластами. Масштабные планки составляют 25 мкм.

[0127] Фиг. 38: Приведено графическое изображение нормализованных параметров эритроцитов векторов с длинной LCR, векторов с короткой LCR и контроля CD46tg на 1 неделе (верхняя панель) и 10 неделе (нижняя панель).

[0128] Фиг. 39А, 39В. Гематологические параметры до и после *in vivo* генной терапии ГСКП мышей Hbbth3/CD46+/+ (неделя 16). (Фиг. 39А) Число ретикулоцитов. (Фиг. 39В) Гематологические параметры. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$

[0129] Фиг. 40А, 40В. Фенотипическая коррекция экстремедуллярного гемопоэза в селезенке и печени. (Фиг. 40Аi) Размер селезенки на момент умерщвления (неделя 16). Левая панель: репрезентативные изображения селезенки. Правая панель: обобщенные данные. Каждый символ представляет отдельное животное. Статистический анализ проводили, используя однофакторный ANOVA. ** $p < 0,0001$. Разница между двумя векторами не является значимой. (Фиг. 40В) Экстремедуллярный гемопоэз по окрашиванию гематоксилином/эозином в срезах печени и селезенки. Кластеры эритробластов в печени и мегакариоцитов в селезенке мышей Hbbth3/CD46+/+ указаны черными стрелками. Масштабные планки составляют 20 мкм. Показаны репрезентативные изображения.

[0130] Фиг. 41. Фенотипическая коррекция гемосидероза в селезенке и печени (неделя 16). Отложение железа показано по окрашиванию по Перлсу в виде цитоплазматических синих пигментов гемосидерина в срезах селезенки и печени. Масштабные планки составляют 20 мкм. Показаны репрезентативные срезы. (Эксп: 2,24 мс, увеличение: 4,1х, насыщение: 1,50, гамма: 0,60).

[0131] Фиг. 42А-42С. Анализ костного мозга на момент умерщвления (неделя 21).

Костный мозг получали на 21 неделе после *in vivo* трансдукции ГСК мышей Hbb^{th3}/CD46tg. (Фиг. 42A) Число копий вектора на клетку МНК костного мозга. (Фиг. 42B, 42C) Эритроидная специфичность экспрессии γ -глобина. (Фиг. 42B) Процентное содержание экспрессирующих γ -глобин эритроидных (Ter119⁺) и неэритроидных (Ter119⁻) клеток. * $p < 0,05$. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA.

[0132] Фиг. 43. Экстрamedулярный гемопоэз по окрашиванию гематоксилином/эозином в срезах печени и селезенки от мышей CD46tg и CD46^{+/+}/Hbb^{th-3} до введения аденовирусного донорного вектора. Отложение железа показано по окрашиванию по Перлсу в виде цитоплазматических синих пигментов гемосидерина в селезенке.

[0133] Фиг. 44A-44E. Фенотипическая коррекция мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 путем *in vivo* трансдукции ГСКП/отбора. (Фиг. 44A) Анализ RBC здоровых (CD46tg) мышей, мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 до мобилизации и *in vivo* трансдукции и мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3, которых подвергли *in vivo* трансдукции/отбору (анализ проведен на 29 неделе после инфузии HDAd) (n=5). * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,0002$, *** $P \leq 0,00003$. Статистический анализ проводили, используя 2-факторный ANOVA. (Фиг. 44B) Суправитальное окрашивание мазков периферической крови бриллианткрезил синим для выявления ретикулоцитов. Стрелками указаны ретикулоциты, содержащие характерную остаточную РНК и микроорганеллы. Процентное содержание положительно окрашенных ретикулоцитов в репрезентативных мазках составляло: для CD46 7%; для CD46^{+/+}/Hbbth-3 до обработки 31%; и для CD46^{+/+}/Hbbth-3 после обработки 12%. Масштабная планка: 20 мкм. (Фиг. 44C) Вверху: Мазки крови. Масштабная планка: 20 мкм. Посередине: Цитоцентрифугаты костного мозга. Стрелками указаны эритробласты на разных стадиях созревания и обратный сдвиг в эритропоэзе с преобладанием проэритробластов у обработанных мышей. Масштабная планка: 25 мкм. Внизу: Тканевый гемосидероз по окрашиванию по Перлсу. Отложение железа показано в виде цитоплазматических синих пигментов гемосидерина в срезах ткани селезенки. Изображения мазков крови для контрольных мышей (CD46tg и CD46^{+/+}/Hbbth-3, до трансдукции) на С и Фиг. 5D получены из одного образца. (Фиг. 44D) Макроскопические изображения селезенки 1 репрезентативной мыши CD46tg и 1 необработанной мыши CD46^{+/+}/Hbbth-3 и 5 обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3. (Фиг. 44E) На момент умерщвления размер селезенки определяли как отношение массы селезенки к общей массе тела (мг/г). Каждый символ представляет отдельное животное. Данные представлены в виде среднего \pm СПС. * $P \leq 0,05$. Статистический анализ проводили, используя 1-факторный ANOVA.

[0134] Фиг. 45. Клеточная композиция костного мозга мышей CD46 и

обработанных мышей Hbbth3/CD46 на 16 неделе после *in vivo* трансдукции. Разница между группами не была значимой. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA.

[0135] Фиг. 46. Стратегия гейтинга человеческого γ -глобина. Фиксированные и пермеабелизированные RBC от мышей CD46/Hbbth3 окрашивали в отношении эритроидного маркера Ter-119 и внутриклеточного γ -глобина.

[0136] Фиг. 47А, 47В. Эффект SB100х-опосредованной интеграции на транскриптом CD34+ клеток. (Фиг. 47А) Схема эксперимента. CD34+ клетки инфицировали вектором HDAd5/35++, содержащим каскету GFP/mgmt под управлением промотора EF1 α , одним или в комбинации с HDAd-SB. Трансдуцированные клетки размножали в среде для эритроидной дифференцировки в течение 16 дней. Два раунда отбора O6BG/BCNU (50 мкМ O6BG+35 мкМ BCNU) обеспечивали обогащение GFP-положительными клетками с интегрированными транспозонами. На 16 день GFP-положительные клетки подвергали сортировке методом FACS (образец № 6). Для сравнения (образец № 5) использовали CD34+ клетки, которые были трансдуцированы одним вектором mgmt/GFP и подвергнуты отбору. Поскольку контрольные клетки не экспрессируют SB100х, они утратили эписомальный вектор mgmt/GFP и, следовательно, являлись GFP-отрицательными. Общую РНК из обоих образцов подвергали РНК-секвенированию Omega Bioservices. (Фиг. 47В) Гены с измененной экспрессией мРНК (log2-кратное изменение) упорядочены на основании из р-значения.

[0137] Фиг. 48. Уровни экспрессии мРНК mgmt в МНК костного мозга на 16 неделе после *in vivo* трансдукции. Уровни человеческого mgmt^{P140K} и мышиногo mRPL10 измеряли методом кОТ-ПЦР в общем количестве МНК костного мозга. (mRPL10 является мышинным конститутивным геном). Относительные уровни дополнительно делили на ЧКВ (смотрите Фиг. 33). Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA.

[0138] Фиг. 49. *In vivo* трансдукция ГСК в векторе hCD46tg у мышей: «длинные» и «короткие» векторы LCR. *In vivo* трансдукция вектора Hbb^{th3}/CD46 у мышей. В группе 1 показана *in vivo* трансдукция HDAd-длинная-LCR- γ -глобин/mgmt плюс HDAd-SB/Flpe у семи мышей. В группе 2 показана *in vivo* трансдукция HDAd-короткая-LCR γ -глобин/mgmt плюс HDAd-SB/Flpe у трех мышей. Для O⁶BG, BCNU были необходимы только три цикла отбора.

[0139] Фиг. 50. Тест мышей Thbb (H6). Графические результаты показывают отсутствие разницы и практически полное отсутствие экспрессии человеческого γ -глобина среди мышей при трансдукции длинными векторами LCR в сравнении с короткими

векторами LCR.

[0140] Фиг. 51. Тест мышей Thbb (H8). Графические результаты показывают наличие разницы среди мышей при трансдукции длинными векторами LCR в сравнении с короткими векторами LCR, при этом неясно, был ли короткий вирус LCR мертвым у мышей.

[0141] Фиг. 52. Графическое изображение, иллюстрирующее процентное содержание экспрессирующих человеческий γ -глобин RBC у мышей. Это график иллюстрирует 100% присутствия всего лишь после трех циклов *in vivo* отбора.

[0142] Фиг. 53. Графическое изображение ВЭЖХ, иллюстрирующее относительно содержание человеческого γ -глобина по сравнению с мышинным HbA (неделя 10). Это график демонстрирует значительно большие уровни γ -глобина для длинной LCR по сравнению с короткой LCR.

[0143] Фиг. 54. Графическое изображение типовой ВЭЖХ на 10 неделе для мыши № 57, содержащей длинный вектор LCR.

[0144] Фиг. 55A-55E. Характеристики AAVS1-специфического вектора CRISPR/Cas9 и донорного вектора для ГР-опосредованной интеграции. (Фиг. 55A) Структура вектора HDAd-CRISPR: The AAVS1-специфическая оgPHK транскрибируется PolIII с промотора U6, а ген *spCas9* находится под управлением промотора EF1 α . Экспрессия Cas9 контролируется miR-183-5p и miR-218-5p, которые супрессируют экспрессию Cas9 в вырабатывающих HDAd клетках 116, но не оказывают негативного влияния на экспрессию Cas9 в CD34+ клетках (Sayadaminova et al., Mol Ther Methods Clin Dev, 1, 14057, 2015). Соответствующие сайты-мишени микроPHK (miR-T) были вставлены в 3' нетранслируемую область гена β -глобина (3'НТО). (Фиг. 55B) Частота расщепления сайта-мишени в человеческих CD34+ клетках, измеренная с помощью анализа T7E1 через 3 дня после трансдукции HDAd-CRISPR при МЗ 2000 вч/клетка. Продукты специфического расщепления имеют размер 474 п. о. и 294 п. о. Эффективность расщепления приведена ниже в геле. (Фиг. 55C) 13 наиболее часто встречающихся инделей (SEQ ID NO: 6-18, в порядке сверху вниз) в HDAd-CRISPR-трансдуцированных CD34+ клетках. Выделенная светло-серым последовательность иллюстрирует мишень гидовой PHK, при этом последовательность TAM отмечена средне-серым выделением. Сайт расщепления CRISPR/Cas9 отмечен вертикальной стрелкой. Зеленым выделена вставка, вызванная НГСК. (Фиг. 55D) Структура донорного вектора для интеграции в сайт AAVS1 (HDAd-GFP-донор). Ген *mgmtP140K* связан с геном GFP посредством саморасщепляющегося пикорнавирусного пептида 2A. Эти гены находятся под управлением промотора EF1 α . PA: сигнал полиаденилирования. Кассета трансгена

фланкируется 0,8 т. о. областями гомологии с локусом AAVS1 аналогично ранее опубликованному исследованию (Lombardo et al., Nat Methods 8, 861-869, 2011). Выше и ниже области гомологии находятся сайты распознавания для AAVS1-специфической CRISPR/Cas9 для высвобождения донорной кассеты. (Фиг. 55E) Высвобождение донорной кассеты. CD34⁺ клетки инфицировали HDAd-GFP-донор (при МЗ 1000 или 2000 вч/клетка), одним или в комбинации с HDAd-CRISPR (МЗ 1000 вч/клетка). Через три дня геномную ДНК подвергали саузерн-блоттингу с GFP-специфическим зондом. (Линейный) полноразмерный геном HDAd-донор-GFP соответствует 36 т. о. Высвобожденная кассета соответствует 4,7 т. о. Частота расщепления приведена под гелем.

[0145] Фиг. 56A-56F. Нацеленная интеграция в сравнении с SB100 \times -опосредованной интеграцией в клетках HUDEP-2. (Фиг. 56A) Схема эксперимента. Клетки HUDEP-2 трансдуцировали указанными векторами HDAd при МЗ 1000 вч/клетка для каждого вируса. После размножения в течение 21 дня GFP-положительные клетки рассортировывали в 96-луночный планшет. Клоны из одиночных клеток получали путем дополнительного размножения в течение 2 недель. Экспрессию GFP измеряли на 2 и 21 день после трансдукции в клеточной популяции или на 35 день в клеточных клонах. (Фиг. 56B) Проточная цитометрия GFP в клетках, обработанных одним донорным вектором или векторами с нацеленным или SB100 \times -опосредованным механизмами интеграции на 2 и 21 день. (Фиг. 56C) Средняя интенсивность флуоресценции GFP в общем количестве GFP⁺ клеток с нацеленной или SB100 \times -опосредованной интеграцией (день 21). Приведенные данные (среднее \pm СО) представляют три независимых эксперимента. (Фиг. 56D) Средняя интенсивность флуоресценции GFP в одиночных клонах. Каждый символ представляет один клеточный клон. Приведенные данные (среднее \pm СО) представляют два независимых эксперимента. (Фиг. 56E) Проточная цитометрия, иллюстрирующая экспрессию GFP в репрезентативных клеточных клонах с нацеленной или SB100 \times -опосредованной интеграцией. (Фиг. 56F) Число копий вектора в клеточных клонах, определенное методом кПЦР с использованием праймеров GFP.

[0146] Фиг. 57A, 57B. Анализ интеграции клонов HUDEP-2, трансдуцированных векторами с нацеленной интеграцией. (Фиг. 57A) Анализ сайтов интеграции методом инвертированной ПЦР. На верхней диаграмме показано расположение используемых сайтов NcoI и праймеров (полу-стрелки, темно-серые: праймеры EF1 α для 5'-соединений; светло-серые: праймеры рА для 3'-соединений). Указан ожидаемый размер ампликона с каждой стороны для нацеленной интеграции. На нижних изображениях геля приведены результаты иПЦР. Каждая дорожка представляет один клеточный клон. Использовали 1 т. о. лэддер от New England Biolabs. Была зарегистрирована дополнительная полоса

эндогенного Efl α , поскольку праймеры Efl α были адаптированы. В случае клона № 20, хотя размер ампликона отличается от прогнозируемого, клонирование и секвенирование выявили, что это клон с целевой интеграцией. (Фиг. 57B) Анализ методом инвертированной ПЦР. На верхней диаграмме показано расположение праймеров. Приведен ожидаемый размер продуктов для различных профилей интеграции. Нижние изображения геля демонстрируют, что большинство клонов характеризовались моноаллельной нацеленной интеграцией. С учетом результатов с (Фиг. 57A), неожиданный размер ампликонов из клонов № 17, № 20 и № 36, вероятно, является результатом конкатемерной интеграции.

[0147] Фиг. 58A-58C. Расщепление сайта-мишени AAVS1 у мышей AAVS1/CD46tg. (Фиг. 58A) *In vitro* анализ. Частота расщепления сайта-мишени в отрицательных по линии дифференцировки костного мозга клетках от мышей AAVS1/CD46tg, измеренная через 3 дня после *in vitro* трансдукции HDAd-CRISPR при указанной МЗ. (Фиг. 58B) Процентное содержание общего количества инделей AAVS1, полученное посредством глубокого секвенирования ДНК из общего количества мононуклеарных клеток костного мозга на 14 неделе после трансплантации. Каждый символ представляет отдельное животное. (Фиг. 58C) 29 наиболее часто встречающихся инделей (SEQ ID NO: 19-23, 21, 21, 26-30, 27, 32, 28, 34-47), в порядке сверху вниз) у мышей. Приведены репрезентативные данные. Желтая последовательность иллюстрирует мишень геновой РНК, при этом последовательность ТАМ отмечена синим. Сайт расщепления CRISPR/Cas9 отмечен вертикальной стрелкой.

[0148] Фиг. 59A-59D. *Ex vivo* трансдукция Lin- клеток AAVS1/CD46 с HDAd-AAVS1 и HDAd-GFP-донор и последующей трансплантацией реципиентам после летальной дозы облучения. (Фиг. 59A) Схема эксперимента: Костный мозг получали от мышей AAVS1/CD46tg и выделяли отрицательные по линии дифференцировки клетки (Lin-) методом MACS. Lin- клетки трансдуцировали HDAd-CRISPR и HDAd-GFP-донор, отдельно или в комбинации, при общей МЗ 500 вч/клетка. После одного дня в культуре 1×10^6 трансдуцированных клеток/мышь трансплантировали мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения. На 4 неделю начинали обработку O⁶BG/BCNU и повторяли три раза каждые две недели. С каждым циклом повышали концентрацию BCNU от 5 мг/кг до 7,5 мг/кг и 10 мг/кг. На 14 неделе мышей умерщвляли, а Lin- клетки костного мозга использовали для трансплантации вторичным реципиентам C57Bl/6 после летальной дозы облучения, которых затем наблюдали в течение 16 недель. (Фиг. 59B) Процентное содержание GFP-положительных клеток в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), измеренное методом проточной цитометрии. Показаны группы, которым

трансплантировали Lin- клетки, трансдуцированные только HDAd-CRISPR, только HDAd-GFP-донор и HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор. Каждый символ представляет отдельное животное. (Фиг. 59C) Процентное содержание GFP+ клеток в МКПК от репрезентативных мышей, которым трансплантировали Lin- клетки. Приведены данные по 4 неделе (до отбора) и 12 неделе (после отбора). (Фиг. 59D) Процентное содержание GFP+ клеток в положительных по линии дифференцировки клетках CD3+ (Т-клетки), CD19+ (В-клетки), Gr-1+ (миелоидные клетки) и в ГСК (клетки LSK).

[0149] Фиг. 60А-60Е. Анализ приживления *ex vivo* трансдуцированных Lin- клеток. (Фиг. 60А) Приживление трансплантированных клеток на основании экспрессии человеческого CD46 на МКПК, измеренной методом проточной цитометрии. Каждый символ представляет отдельное животное. Следует отметить, что трансдуцированные донорные клетки экспрессировали CD46, тогда как реципиентные мыши C57Bl/6 - нет. (Фиг. 60В) Процентное содержание CD46-положительных клеток в МКПК (кровь), селезенке и костном мозге на 14 неделе. (Фиг. 60С) Процентное содержание GFP-положительных клеток в МКПК, селезенке и костном мозге на 14 неделе. (Фиг. 60D) Процентное содержание LSK и положительных по линии дифференцировки клеток в разных условиях трансдукции. Разница между тремя группами не является значимой. (Фиг. 60Е) Анализ GFP+ колоний. Высевали общие Lin- клетки костного мозга с 14 недели и через 12 дней анализировали экспрессию GFP в колониях. Каждый символ представляет среднее число GFP+ колоний для отдельной мыши (левые панели). Клетки из всех колоний объединяли и анализировали методом проточной цитометрии (правые панели).

[0150] Фиг. 61А-61F. Анализ присутствия GFP у вторичных реципиентов. Клетки костного мозга от демонстрировавших ответ мышей, которым трансплантировали трансдуцированные HDAd-GFP-донор или HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор Lin- клетки, получали на 14 неделе после трансплантации, уменьшали численность положительных по линии дифференцировки клеток и трансплантировали мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения. (Фиг. 61А) GFP-проточная цитометрия МКПК для четырех мышей-реципиентов. На правой панели приведен типичный анализ. По вертикальной оси показано окрашивание в отношении hCD46, по горизонтальной оси показано окрашивание GFP. (Фиг. 61В) Процентное содержание GFP-положительных клеток в МКПК, селезенке и костном мозге на 16 неделе. (Фиг. 61С) Проточный анализ GFP положительных и отрицательных по линии дифференцировки клеток у реципиентов через 16 недель после трансплантации. (Фиг. 61D) Анализ GFP+ колоний. Высевали общие Lin- клетки костного мозга с 16 недели и через 12 дней анализировали экспрессию GFP в колониях. Каждый

символ представляет среднее число GFP⁺ колоний для отдельной мыши (левые панели). Клетки из всех колоний объединяли и анализировали методом проточной цитометрии (правые панели). (Фиг. 61E) Приживление трансплантированных клеток на основании экспрессии человеческого CD46 на МКПК, измеренной методом проточной цитометрии. (Фиг. 61F) Процентное содержание положительных и отрицательных по линии дифференцировки клеток в разных условиях трансдукции. Разница между двумя группами не является значимой.

[0151] Фиг. 62A-62F. *In vivo* трансдукция мышей AAVS1/CD46tg с использованием HDAd-AAVS1-CRISPR+HDAd-GFP-донор. (Фиг. 62A) Схема обработки. Мышей AAVS1/hCD46tg мобилизовали и в/в инъецировали HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор (2 раза, каждый по 4×10^{10} вч 1:1 смеси обоих вирусов). Через четыре недели начинали обработку ОбВГ/BCNU. С каждым циклом повышали концентрацию BCNU от 2,5 мг/кг до 7,5 мг/кг и 10 мг/кг. Концентрация ОбВГ составляла 30 мг/кг в случае каждой из трех обработок. Мышей наблюдали до 12 недели, после чего животных умерщвляли для анализа и трансплантации Lin⁻ клеток вторичным реципиентам. Затем вторичных реципиентов наблюдали в течение 16 недель. (Фиг. 62B) Процентное содержание GFP-положительных клеток в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), измеренное методом проточной цитометрии. (Фиг. 62C) Процентное содержание GFP-положительных клеток в МКПК, селезенке и костном мозге на 14 неделе. (Фиг. 62D) Процентное содержание GFP⁺ клеток в положительных по линии дифференцировки клетках CD3⁺ (Т-клетки), CD19⁺ (В-клетки), Gr-1⁺ (миелоидные клетки) и в ГСК (клетки LSK). (Фиг. 62E) Анализ GFP⁺ колоний. Высевали общие Lin⁻ клетки костного мозга с 14 недели и через 12 дней анализировали экспрессию GFP в колониях. Каждый символ представляет среднее число GFP⁺ колоний для отдельной мыши (левые панели). Клетки из всех колоний объединяли и анализировали методом проточной цитометрии (правые панели). (Фиг. 62F) Процентное содержание положительных и отрицательных по линии дифференцировки клеток на 14 неделе.

[0152] Фиг. 63A-63E. Анализ вторичных реципиентов с Фиг. 59A-59D. На 14 неделе Lin⁻ клетки костного мозга от *in vivo* трансдуцированных мышей AAVS1/hCD46tg трансплантировали реципиентам C57Bl/6 после летальной дозы облучения. (Фиг. 63A) GFP-проточная цитометрия МКПК для шести мышей-реципиентов. (Фиг. 63B) Экспрессия GFP в мононуклеарных клетках в крови, селезенке и костном мозге. (Фиг. 63C) Проточный анализ GFP-положительных и отрицательных по линии дифференцировки клеток у реципиентов через 16 недель после трансплантации. (Фиг. 63D) Приживление трансплантированных клеток на основании экспрессии человеческого

CD46 на МКПК, измеренной методом проточной цитометрии. (Фиг. 63F) Процентное содержание положительных и отрицательных по линии дифференцировки клеток на 16 неделе.

[0153] Фиг. 64A-64H. *Ex vivo* трансдукция Lin⁻ клеток AAVS1/CD46 векторами HDAd-AAVS1 и HDAd-донор- γ -глобин и последующая трансплантация реципиентам после летальной дозы облучения. (Фиг. 64A) Структура донора. Общая структура является такой же, как и у вектора HDAds-GFP-донор (смотрите Фиг. 55D). Области гомологии длиннее (1,8 т. о. по сравнению с 0,8 т. о.) в новом векторе HDAd-глобин-донор. Экспрессионная кассета γ -глобина содержит 4,3 т. о. версию LCR γ -глобина, содержащую четыре области гиперчувствительности (HS) к ДНКазе и промотор γ -глобина (Lisowski et al., Blood. 110, 4175-4178, 1996). Использовали полноразмерную кДНК γ -глобина, содержащую 3'-НТО (для стабилизации мРНК в эритроцитах). Ген mgmtP140K находится под управлением универсально активного промотора EF1 α . Для терминирования транскрипции используют двунаправленный сигнал полиаденилирования SV40. Чтобы избежать взаимодействия между LCR/ β -промотором и промотором EF1 α , между кассетами вставляли 1,2 т. о. куриный инсулятор хроматина HS4 (Emery et al., Proc Natl Acad Sci USA, 97, 9150-9155, 2000). (Фиг. 64B) Схема обработки является такой же, как проиллюстрирована на Фиг. 57A. (Фиг. 64C) Процентное содержание положительных в отношении человеческого γ -глобина клеток в периферических красных кровяных клетках (RBC), измеренное методом проточной цитометрии. (Фиг. 64D) Процентное содержание и (Фиг. 64E) средняя интенсивность флуоресценции положительных в отношении человеческого γ -глобина клеток в эритроидных (Ter119⁺) и неэритроидных (Ter119⁻) клетках в крови и костном мозге на 16 неделе после *in vivo* трансдукции. * $p < 0,05$. (Фиг. 64F) Процентное содержание цепей γ -глобина по сравнению с мышинными β -основными цепями, измеренное в RBC на 16 неделе методом ВЭЖХ. (Фиг. 64G) Процентное содержание мРНК γ -глобина по сравнению с РНК мышинных β -основных цепей, измеренное в RBC на 16 неделе методом кОТ-ПЦР. (Фиг. 64H) Число копий вектора на клетку в колониях, полученных из Lin⁻ клеток. Каждый символ представляет одну колонию. Разница между животными не является значимой.

[0154] Фиг. 65A, 65B. Приживание Lin⁻ клеток AAVS1/CD46, трансдуцированных векторами HDAd-CRISPR и HDAd-глобин-донор. (Фиг. 65A) Приживание трансплантированных клеток на основании экспрессии человеческого CD46 на МКПК, измеренной методом проточной цитометрии. (Фиг. 65B) Процентное содержание CD46-положительных клеток в положительных по линии дифференцировки МКПК (кровь), селезенке и клетках костного мозга, а также клетках LSK костного мозга на 16 неделе.

[0155] Фиг. 66А-66С. Анализ вторичных реципиентов с Фиг. 64А-64Н. Клетки костного мозга от мышей, которым трансплантировали трансдуцированные HDAd-CRISPR+HDAd-глобин-донор Lin- клетки, получали на 16 неделе после трансплантации, уменьшали численность положительных по линии дифференцировки клеток и трансплантировали мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения. (Фиг. 66А) Проточная цитометрия в отношении γ -глобина RBC для пяти мышей-реципиентов. (Фиг. 66В) Процентное содержание CD46-положительных клеток в положительных по линии дифференцировки МКПК. (Фиг. 66С) Композиция костного мозга на 16 неделе после трансплантации вторичным реципиентам.

[0156] Фиг. 67А-67Н. In vivo трансдукция мышей AAVS1/CD46tg с использованием HDAd-CRISPR+HDAd-глобин-донор. (Фиг. 67А) Схема обработки. (Фиг. 67В) Процентное содержание γ -глобин-положительных RBC. (Фиг. 67С) Репрезентативный точечный график, иллюстрирующий процент экспрессии γ -глобина в периферических RBC от нетрансдуцированных контрольных мышей или мышей на 16 неделе после трансдукции. (Фиг. 67D) Средняя интенсивность флуоресценции γ -глобина в эритроидных (Ter119+) и неэритроидных (Ter119-) клетках в крови и костном мозге. * $p < 0,05$. (Фиг. 67E) Процентное содержание цепей γ -глобина по сравнению с мышинными β -основными цепями, измеренное в RBC на 16 неделе методом ВЭЖХ. * $p < 0,05$. (Фиг. 67F) Процентное содержание мРНК γ -глобина по сравнению с РНК мышинных β -основных цепей, измеренное в RBC на 16 неделе методом кОТ-ПЦР. * $p < 0,05$. (Фиг. 67G) Число копий вектора на клетку в колониях, полученных их Lin- клеток от четырех демонстрировавших ответ мышей. Каждый символ представляет одну колонию. Разница между животными не является значимой. (Фиг. 67H) Композиция положительных по линии дифференцировки клеток в крови, селезенке и костном мозге и клеток LSK в костном мозге на 16 неделе после in vivo трансдукции.

[0157] Фиг. 68А-68D. Анализ вторичных реципиентов с Фиг. 67А-67Н. (Фиг. 68А) Приживление трансплантированных клеток на основании экспрессии человеческого CD46 на МКПК, измеренной методом проточной цитометрии. (Фиг. 68В) Экспрессия γ -глобина в RBC. (Фиг. 68С) Процентное содержание цепей γ -глобина по сравнению с мышинными β -основными цепями, измеренное в RBC вторичных реципиентов на 16 неделе методом ВЭЖХ. (Фиг. 68D) Композиция положительных по линии дифференцировки клеток в крови, селезенке и костном мозге на 16 неделе после in vivo трансдукции.

[0158] Фиг. 69А, 69В. Локализация и структура локуса AAVS1 у трансгенных мышей AAVS1/CD46. (Фиг. 69А) Данные TLA, демонстрирующие несовпадения в хромосоме 14. Использовали пару AAVS1-специфических праймеров. На правой панели

показана увеличенная секция хромосомы 14, на которой видно 18 т. о. пробел. Этот пробел соответствует добавленным локусам AAVS1 человека. (Фиг. 69B)

[0159] Фиг. 70. Подробная структура локусов AAVS1 с указанием геномной локализации. Затененные участки AAVS1 были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Пустые участки были выведены из анализа рестрикции и информации по генетическому фону трансгенных мышей AAVS1 от Jackson Laboratory. Сайты расщепления CRISPR/Cas9 указаны разрывами. Повторы № 2 - № 5 представляют собой полные 8,2 т. о. фрагменты AAVS1 EcoRI человека, тогда как повторы № 1 и № 5 содержат только часть фрагмента EcoRI. Следует отметить, что в повторе № 5 отсутствует полное 5' плечо гомологии. Результат в зависимости от расщепления CRISPR/Cas9 мультикопийного локуса AAVS1, присутствующего у мышей AAVS1tg. Правила, касающиеся позиций разрезания, следующие: а) Один разрез в повторе № 1 - № 4: предпочтительно. б) Один разрез в повторе № 5: менее предпочтительно из-за неполного левого плеча гомологии. в) Два разреза в двух противоположно ориентированных повторах (например, № 1 и № 4): отсутствие ГР-опосредованной целевой интеграции из-за отсутствия правого плеча гомологии. г) Два разреза в двух повторах в одном направлении (например, № 1 и № 2): предпочтительно. е) В случае более чем 2 разрезов учитывается только один, проксимальный к мышинной последовательности гДНК с каждой стороны: применимо правило в) или г) соответственно. ф) Разрезы в повторах № 1 и № 5 и делеция центральной области. Кроме того, ГР-опосредованная нацеленная интеграция в повторе № 2 - № 4 с продолжением разрезания CRISPR во фланкирующих повторах, например, № 1 и № 5, может привести к потере уже интегрированного трансгена.

[0160] Фиг. 71А, 71В. Анализ сайта интеграции Саузерн-методом геномной ДНК, выделенной на 16 неделе после *ex vivo* или *in vivo* трансдукции ГСК HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор. (Фиг. 71А) Гибридикация с AAVS1-специфическим зондом. На верхней панели приведены ожидаемый размер фрагмента EcoRI и локализация зонда. На нижней панели приведен анализ отдельной мыши в условиях *ex vivo* и *in vivo* трансдукции. Большие полосы представляют нецелевые повторы локусов AAVS1. (Фиг. 71В) Гибридикация BspI-расщепленной ДНК с GFP-специфическим зондом. Профиль полос обсуждается в другом месте.

[0161] Фиг. 72А-72С. Анализ сайта интеграции методом инвертированной ПЦР (иПЦР) геномной ДНК, выделенной на 16 неделе после *ex vivo* или *in vivo* трансдукции ГСК HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор. (Фиг. 72А) На диаграмме показано расположение сайтов NcoI и праймеров (полу-стрелки: праймеры EF1a для 5' соединений; светло-серые:

праймеры рА для 3' соединений). Указан ожидаемый размер ампликона с каждой стороны для нацеленной интеграции в повторе № 5 . (Фиг. 72В) Результаты иПЦР с использованием геномной ДНК из общего количества клеток костного мозга. Каждая дорожка представляет одну мышь. № 009, № 023, № 943, № 944 и № 946 соответствуют мышам после *ex vivo* трансдукции ГСК. № 147, № 304 и № 467 соответствуют *in vivo* трансдуцированным животным. (Фиг. 72С) Анализ иПЦР GFP-положительных колоний. Высевали Lin- клетки костного мозга от мышей на 14 неделе, через 20 дней выделяли геномную ДНК из GFP+ колоний и использовали для иПЦР. Анализировали мышей № 943 и № 946. Каждая дорожка представляет одну колонию. Светло-серая стрелка: нацеленная интеграция; темно-серая стрелка: ненацеленная интеграция; средне-серая стрелка: интегрирован весь вирусный геном HDAd.

[0162] Фиг. 73А, 73В. Анализ сайта интеграции методом инвертированной ПЦР (иПЦР) геномной ДНК, выделенной на 16 неделе после *ex vivo* или *in vivo* трансдукции ГСК HDAd-CRISPR+HDAd-глобин-донор. (Фиг. 73А) На диаграмме показано расположение сайтов NcoI и праймеров (полу-стрелки: черные: праймеры EF1 α для 5' соединений; серые: праймеры рА для 3' соединений). Приведен ожидаемый размер ампликона с каждой стороны для нацеленной интеграции в повторе № 5 . (Фиг. 73В) Результаты иПЦР с использованием геномной ДНК из общего количества клеток костного мозга. Каждая дорожка представляет одну мышь. № 321, № 322, № 856, № 857, № 858 и № 945 соответствуют мышам с *ex vivo* трансдукцией. № 504, № 816 № 869 и № 898 соответствуют *in vivo* трансдуцированным животным. Белые наконечники стрелок указывают на нацеленную интеграцию; серые, пунктирные наконечники стрелок: ненацеленная интеграция; белая полная стрелка: интегрирован весь вирусный геном HDAd.

[0163] Фиг. 74А-74D. (Фиг. 74А) Векторы HDAd5/35++ для *in vivo* трансдукции ГСКП. В HDAd-GFP/mgmt транспозон фланкируется инвертированными повторами (ИП) транспозона и сайтами *frt* для интеграции посредством гиперактивной транспозазы Sleeping Beauty (SB100X), обеспечиваемой из вектора HDAd-SB. Кассета трансгена содержит управляемый промотором PGK ген GFP, связанный с 3'НТО β -глобина, а также управляемую промотором EF1 α кассету *mgmtP140K*. Обе кассеты разделены куриным инсулятором глобина HS4. Проводили мобилизацию ГСКП у трансгенных мышей *neu/CD46* путем п/к инъекции человеческого рекомбинантного G-CSF (5 мкг/мышь/день, 4 дня), за которой следовала п/к инъекция AMD3100 (5 мг/кг) через восемнадцать часов после последней инъекции G-CSF. Всего в/в инъецировали 8×10^{10} вирусных частиц HDAd-GFP/mgmt+HDAd-SB через один час после AMD3100. Для предотвращения

высвобождения провоспалительных цитокинов после инъекции HDAd животные получали дексаметазон (10 мг/кг), в/б, за 16 ч и 2 ч до инъекции вируса. Через шесть недель проводили три раунда O⁶BG/BCNU (в/б), чтобы активировать попадание трансдуцированных ГСКП в периферический кровоток (30 мг/кг O⁶BG плюс 5, 7,5 и 10 мг/кг BCNU). Через семнадцать недель после *in vivo* трансдукции в жировое тело молочной железы имплантировали 1×10^6 клеток ММС. Через пять недель получали опухоли и другие ткани и анализировали в отношении экспрессии GFP. (Фиг. 74B) Левая панель: Процентное содержание GFP-экспрессирующих МКПК в разные моменты времени после *in vivo* трансдукции. Каждый символ представляет отдельное животное. Правая панель: Процентное содержание GFP⁺ клеток в клетках, окрашенных в отношении маркера пан-лейкоцитов CD45 в костном мозге, селезенке, крови и расщепленной коллагеназой/диспазой опухоли. (Фиг. 74C) Срезы опухолей, окрашенные антителом против GFP и антителом против ламинина, белка внеклеточного матрикса. Масштабная планка составляет 50 мкм. (Фиг. 74D) Иммунофенотипирование GFP⁺ МКПК в крови и GFP⁺ клеток в опухоли.

[0164] Фиг. 75. Экспрессия крысиного Neu в клетках ММС. Клетки окрашивали Neu-специфическим моноклональным антителом 7.16.4, а потом ФИТЦ-конъюгированным антителом к мышиному Ig. Приведено репрезентативное изображение, полученное методом конфокальной микроскопии, культивируемых клеток ММС. Neu-специфические сигналы соответствуют более светлым оттенкам. Масштабная планка составляет 20 мкм.

[0165] Фиг. 76. Стратегия гейтинга для иммунофенотипирования.

[0166] Фиг. 77. Иммунофенотипирование GFP⁺ клеток в костном мозге и селезенке (модель ММС). Подробности смотрите на Фиг. 74D.

[0167] Фиг. 78A-78F. Экспрессия GFP в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах после *in vivo* трансдукции ГСКП (модель TC-1). (Фиг. 78A) Схема эксперимента. Проводили мобилизацию ГСКП у трансгенных мышей CD46tg путем п/к инъекции человеческого рекомбинантного G-CSF (5 мг/мышь/день, 4 дня), за которой следовала п/к инъекция AMD3100 (5 мг/кг) через восемнадцать часов после последней инъекции G-CSF. Всего в/в инъецировали 8×10^{10} вирусных частиц HDAd-GFP/mgmt+HDAd-SB через один час после AMD3100. Для предотвращения высвобождения провоспалительных цитокинов после инъекции HDAd животные получали дексаметазон (10 мг/кг), в/б, за 16 ч и 2 ч до инъекции вируса. Через шесть недель проводили три раунда O⁶BG/BCNU (в/б), чтобы активировать попадание трансдуцированных ГСКП в периферический кровоток (30 мг/кг O⁶BG плюс 5, 7,5 и 10 мг/кг BCNU). Через 17 недель после *in vivo* трансдукции в жировое

тело молочной железы имплантировали 5×10^4 клеток ТС-1. Через пять недель получали опухоли и другие ткани и анализировали в отношении экспрессии GFP. (Фиг. 78B) Процентное содержание GFP-экспрессирующих МКПК в разные моменты времени после *in vivo* трансдукции. Каждый символ представляет отдельное животное. (Фиг. 78C) Процентное содержание GFP⁺ клеток в клетках, окрашенных в отношении маркера пан-лейкоцитов CD45 в костном мозге, селезенке, крови и расщепленной коллагеназой/диспазой опухоли. (Фиг. 78D) Репрезентативные данные проточной цитометрии для GFP⁺ клеток в общем количестве клеток (злокачественные+опухоль-инфильтрирующие) и GFP⁺ положительных лейкоцитов. (Фиг. 78E). Репрезентативный сред опухоли. Левая панель: флуоресценция GFP. Правая панель: окрашивание антителами против GFP (белый цвет) и белка внеклеточного матрикса ламинина (серый цвет). Масштабная планка составляет 50 мм. (Фиг. 78F) Иммунофенотипирование GFP⁺ клеток в опухоли и МКПК в крови. Для проточной цитометрии лейкоцитов использовали панель 8с (CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, CD19) и миелоидную панель 9с (CD45, CD11с, F4/80, MHCII, SiglecF-РесCP, Ly6C, CD11b, Ly6G) от BD Biosciences.

[0168] Фиг. 79А-79С. Отбор миРНК для супрессии в клетках, отличных от опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов. (Фиг. 79А) миРНК-зависимая регуляция тканевой специфичности экспрессии трансгена. миРНК выполняют функцию гидовых молекул посредством спаривания оснований с последовательностями-мишенями, называемым сайтами-мишенями миРНК (miR-T), как правило, находящимися в 3' нетранслируемой области (3' НТО) нативных мРНК. Это взаимодействие рекрутирует эффекторные комплексы, опосредующие расщепление мРНК или репрессию трансляции. Если мРНК трансгена содержит miR-T для миРНК, которая экспрессируется на высоких уровнях в данном типе клеток, в этом типе клеток будет предотвращаться экспрессия трансгена. И наоборот, в типах клеток, которые не экспрессируют эту конкретную миРНК, трансген будет экспрессироваться (Brown et al., Nat Med. 2006;12: 585- 591). (Фиг. 79В) Проводили секвенирование микроРНК для объединенной РНК от пяти мышей (модель neu/CD46tg-ММС, 17 день после инокуляции опухоли). Приведено нормализованное число считываний микроРНК (считываний на миллион картированных микроРНК+1), идентифицированных путем секвенирования малых РНК 13 образцов селезенки, костного мозга и крови в сравнении с GFP⁺ опухолью. МикроРНК, которые не присутствуют в опухоли, включая miR-423, выровнены слева на диаграмма рассеяния с псевдосчетом 1. miR-423-5p указана на блоке. (Фиг. 79С) Проводили секвенирование микроРНК для объединенной РНК от пяти мышей (модель CD46tg/ТС-1, день 17). Относительный уровень экспрессии первых 10 миРНК по сравнению с уровнями в опухоли

(установленными на 1).

[0169] Фиг. 80А-80С. Эффект сверхэкспрессии сайта-мишени miR-423-5p на ГСКП. (Фиг. 80А) Структура вектора. HDAd-GFP-miR-423 содержит четыре сайта-мишени miR-423-5p в 3'НТО, связанной с геном GFP. (Фиг. 80В) Мышиные ГСКП (M) (Lin⁻— клетки из костного мозга CD46-трансгенной мышью) и человеческие ГСКП (Hu) (CD34⁺ клетки) инфицировали HDAd-GFP или HDAd-GFP-miR423 при МЗ 500 или 3000 вч/клетка, соответственно. Через три дня клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блоттинга в отношении CDKN1A. Блоты повторно зондировали антителами к β-актину, чтобы скорректировать разницу в загрузке. На правой панели приведена количественная оценка сигналов CDKN1A, нормализованных к сигналам β-актина. Сигналы от соответствующих мышиных и человеческих образцов HDAd-GFP/mgmt брали за 100%. (Фиг. 80С) Эффект на образование колонии предшественников. Через один день после инфекции HDAd мышиные клетки Lin⁻ ($2,5 \times 10^3$ клеток на 35 мм планшет) или человеческие CD34⁺ клетки (3×10^3 клеток/планшет) высевали для анализа колоний. Подсчет колоний проводили через 12 дней. N=3. * p<0,05. Статистическую значимость рассчитывали по двустороннему t-критерию Стьюдента (Microsoft Excel). (В соответствии с предыдущими исследованиями (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2018;9: 390-401; Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 9: 142-152, 2018), инфекция ГСКП при относительно высокой МЗ немного снижала колониобразующую способность ГСКП.)

[0170] Фиг. 81. Подтверждение экспрессии miR-423-5p методом нозерн-блоттинга. Общую РНК (2 мкг) из отрицательных по линии дифференцировки клеток костного мозга, селезенки, общего количества клеток крови и ММС-/ТС-1-опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов разделяли в 15% денатурирующем полиакриламидном геле, а блоты гибридизировали с зондом, специфическими к miRNA-423-5p, а потом с зондом для РНК Ub (в качестве загрузочного контроля). Длина предшественника Mir-423 составляет 70 п. о., а длина зрелой miРНК составляет 23 п. о. miR-423-5p-специфические сигналы видимы для крови, костного мозга и селезенки, но отсутствуют в опухоль-инфильтрирующих клетках в обеих опухолевых моделях.

[0171] Фиг. 82А, 82В. Экспрессия miРНК 423-5p у человека. (Фиг. 82А) Данные по уровням miR-423-5p опубликованы в Ludwig et al., Nucleic Acids Res. 2016;44: 3865-3877. Слева направо подписи по оси у включают: адипоцит, артерия, толстая кишка, твердая мозговая оболочка, почка, печень, легкое, мышца, миокард, кожа, селезенка, желудок, яичко, щитовидная железа, двенадцатиперстная кишка тонкого кишечника, тощая кишка тонкого кишечника, поджелудочная железа, надпочечная железа, кора почки, мозговое вещество почки, пищевод, предстательная железа, костный мозг, вена, лимфатический

узел, плевра, гипофиз, спинной мозг, таламус, белое вещество головного мозга, каудальное ядро головного мозга, серое вещество головного мозга, височная кора головного мозга, фронтальная кора головного мозга, затылочная кора головного мозга и мозжечок. (Фиг. 82B) На график нанесены данные секвенирования миРНК для двух пациентов с раком яичника (объединенные). CD45+ клетки выделяли из биопсии низкодифференцированной серозной опухоли яичника. РНК выделяли из опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов и соответствующих МКПК и подвергали секвенированию миРНК LC Sciences, LLC. Указана миРНК-423-5p.

[0172] Фиг. 83A-83E. In vivo терапия ГСКП и ингибитором иммунных контрольных точек α PD-L1- γ 1 в модели neu/ММС. (Фиг. 83A) Экспрессия PDL1 (белый цвет) в опухолевых клетках ММС. Масштабная планка составляет 20 мкм. (Фиг. 83B) Общая структура терапевтического вектора такая же, как показана на Фиг. 74A. Этот вектор содержит экспрессионные кассеты для scFv против мышинового PD-L1, связанного с тегом HA и сигналом секреции (LS) на 5' конце и с доменами шарнир-CH2-CH3 человеческого IgG1 и тегом mус на 3' конце. Сайты-мишени miR423-5p вставляли в 3'НТО, чтобы ограничить экспрессию α PD-L1- γ 1 опухоль-инфильтрирующими клетками за счет регуляции miR423-5p. Этот вектор также содержит экспрессионную кассету для mgmt^{P140K}. (Фиг. 83C) Объем опухолей после инокуляции клеток ММС (день 0) у мышей с HDAd-GFP/mgmt и HDAd- α PD-L1- γ 1 in vivo трансдуцированными ГСКП. Мышей в группе HDAd- α PD-L1- γ 1 повторно стимулировали подкожной инъекцией 1×10^5 клеток ММС на 80 день после первой инъекции опухолевых клеток. Каждая кривая представляет отдельное животное. (Фиг. 83D) Анализ Т-клеточных ответов методом проточной цитометрии. Спленциты от наивных neu-трансгенных мышей и обработанных HDAd- α PD-L1- γ 1 мышей (день 100) анализировали методом проточной цитометрии в отношении CD4, CD8 и внутриклеточного IFN γ или окрашивали тетрамером Neu. N=3. *p < 0,05. (Фиг. 83E) Ответ IFN γ после стимуляции Neu+ и Neu клетками. Спленциты от наивных neu-трансгенных мышей и обработанных HDAd- α PDL1- γ 1 мышей (день 100) подвергали воздействию инактивированных клеток ММС (Neu+) или спленцитов от neu-трансгенных мышей (Neu-), или обрабатывали РМА/иономицином («noAg»). Приведена концентрация IFN γ в культуральных супернатантах. N=3. * p < 0,005.

[0173] Фиг. 84A-84C. Кинетика экспрессии α PD-L1- γ 1. (Фиг. 84A) Вестерн-блоттинг α PD-L1- γ 1 с антителами к тегу HA. На 17 день умерщвляли трех животных и анализировали ткани в отношении экспрессии α PD-L1- γ 1 методом вестерн-блоттинга. Белок α PD-L1- γ 1 не был полностью восстановлен, что привело к наличию остатков полного α PD-L1- γ 1 с двумя цепями scFv (130 кДа) (смотрите правую панель в отношении

структуры α PD-L1- γ 1). Окрашивание в отношении β -актина использовали для загрузочного контроля. Проиллюстрированы репрезентативные образцы. Также приведена количественная оценка сигналов вестерн-блоттинга. N=5 мышей. (Фиг. 84B) Экспрессия мРНК α PD-L1- γ 1 в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах, МКПК, клетках костного мозга и спленоцитах. В качестве внутреннего контроля использовали мРНК мышечного PPIA. Результаты рассчитывали в соответствии с методом $2(-\Delta\Delta Ct)$ и представляли в виде процента относительной экспрессии, установив уровень кДНК соответствующих опухолевых образцов как 100%. (Фиг. 84C) Уровни секретируемого α PD-L1- γ 1 в сыворотке, измеренные методом ELISA с использованием рекомбинантного мышечного PD-L1 и конъюгата анти-НА антитела и HRP для выявления. Каждый символ представляет отдельное животное. * $p < 0,05$. Статистическую значимость рассчитывали по двустороннему t-критерию Стьюдента (Microsoft Excel).

[0174] Фиг. 85A-85F. Исследование иммунопрофилактики в модели рака яичника ID8-p53^{-/-}brca2^{-/-}. (Фиг. 85A) Анализ опухолей ID8-p53^{-/-}brca2^{-/-}. CD46-трансгенным мышам внутрибрюшинно инъецировали в целом 2×10^6 ID8-p53^{-/-}brca2^{-/-} клеток. Асциты/кахексия развивались через 6-8 недель. Затем опухоли удаляли и расщепляли диспазой/коллагеназой для проточной цитометрии. Часть клеток сортировали на опухолеассоциированные макрофаги (TAM), нейтрофилы (TAN) и Т-клетки (TIL) для анализа методом нозерн-блоттинга. (смотрите Фиг. 76). (Фиг. 85B) Иммунофенотипирование опухолеассоциированных лейкоцитов. (Фиг. 85C) Нозерн-блоттинг для miR-423-5p. На дорожку загружали в целом 1 μ г РНК. На верхней панели приведены сигналы после зондирования ³²P-меченым зондом miR-423-5p. Блот отделяли и повторно зондировали специфическим в РНК U6 зондом (нижняя панель). ³²P-меченый маркер Decade от Ambion проводили по правой дорожке. (Фиг. 85D) Экспериментальная схема. CD46-трансгенных мышей мобилизовали и инъецировали HDAd- α PDL1 γ 1miR423+HDAd-SB, HDAd-GFP-miR423+HDAd-SB или инъецировали ложно. Проводили четыре раунда отбора O⁶BG/BCNU *in vivo*. ID8-p53^{-/-}brca2^{-/-} клетки инъецировали внутрибрюшинно через две недели после последней обработки O⁶BG/BCNU. Через две, шесть и одиннадцать недель после инъекции опухолевых клеток анализировали уровни α PDL1 γ 1 в сыворотке. Появление асцитов или патологических проявлений/кахексии считали конечными точками. (Фиг. 85E) График выживаемости Каплана - Мейера. N=7. (Фиг. 85F) Сывороточные уровни α PDL1 γ 1, измеренные методом ELISA. Каждый символ представляет отдельное животное. * $p < 0,05$. Статистическую значимость рассчитывали по двустороннему t-критерию Стьюдента (Microsoft Excel).

[0175] Фиг. 86A-86D. Исследование иммунотерапии в модели рака яичника ID8-

p53^{-/-}brca2^{-/-}. (Фиг. 86А) Клинические условия для предотвращения повторного появления рака. *In vivo* трансдукция ГСК начинается после хирургической циторедукции опухоли или, если хирургическое вмешательство не является вариантом, вместе с химиотерапией. O⁶BG/BCNU *in vivo* отбор можно объединять с химиотерапией. В результате *in vivo* трансдукции/отбора ГСКП готовые к действию ГСКП будут покоиться до повторного появления рака, которое инициирует дифференцировку ГСКП и активацию экспрессии эффекторного гена. (Фиг. 86В) Экспериментальная схема. CD46-трансгенных мышей внутрибрюшинно инъецировали 1×10⁶ опухолевых клеток ID8-p53^{-/-}brca2^{-/-}. После установления опухолей проводили *in vivo* трансдукцию и отбор ГСКП. Активацию miR-423-зависимой экспрессионной системы отслеживали на основании сывороточных уровней αPDL1γ1. (Фиг. 86С) График выживаемости Каплана - Мейера. В контрольных условиях инъецировали HDAd-GFP-miR423. N=9. (Фиг. 86D) Сывороточные уровни αPDL1γ1 измеряли методом ELISA. Каждый символ представляет отдельное животное. * p < 0,05. Статистическую значимость рассчитывали по двустороннему t-критерию Стьюдента (Microsoft Excel).

[0176] Фиг. 87А, 87В. Аутоиммунные реакции у животных, умерщвленных на 17 день на пике αPD-L1-γ1 перед обращением опухолевого роста. (Фиг. 87А) Обесцвечивание меха у обработанного животного (правая панель) по сравнению с животным до обработки (левая панель). (Фиг. 87В) Гистологический анализ органов от обработанного животного. Срезы окрашивали H&E. Проиллюстрированы репрезентативные участки. Масштабная планка равна 20 мм. Следует отметить инфильтраты мононуклеарных клеток.

[0177] Фиг. 88А-88Н. Эффект терапии анти-PD-L1 моноклональным антителом у не-трансгенных мышей с опухолями ММС и эффект *in vivo* трансдукции ГСК на гемопоэз. Когда опухоли достигали объема 100 мм³, мыши получали внутрибрюшинные инъекции моноклонального антитела против мышинового PD1-L1 muDX400* (5 мг/кг в/б) (4х каждые 4 дня) или изотипического контрольного антитела. (Фиг. 88А) Приведен объем опухолей у отдельных мышей. (Фиг. 88В) График выживаемости Каплана - Мейера, демонстрирующий большую выживаемость с анти-PD-L1. Опухоли с объемом 1000 мм³ считали конечной точкой. Разница между двумя группами не является значимой. (Фиг. 88С) Число кровяных клеток у hCD46-трансгенных мышей приведено на Фиг. 85D на 2 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП (Фиг. 85А) Гематологические параметры. RBC: красные кровяные клетки, Hb, гемоглобин; MCV, средний корпускулярный объем; MCH, средний корпускулярный гемоглобин; MCHC, концентрация среднего корпускулярного гемоглобина; RDW, ширина распределения эритроцитов по объему. Статистический

анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA. Разница между тремя группами не была значимой. (Фиг. 88E) Секвенирование миРНК фракций GFP+ клеток. (Фиг. 88F) Кинетика экспрессии α PDL1 по данным вестерн-блоттинга, КОТ-ПЦР и сывороточного ELISA. (Фиг. 88G) миРНК-регулируемая генная экспрессия. (Фиг. 88H) Обобщенная схема описанных иммунопрофилактики и предотвращения повторного появления рака.

[0178] Фиг. 89A-89H. Данные относятся к экспрессии GFP из эритроцитов.

[0179] Фиг. 90A-90I. Данные относятся к экспрессии человеческого фактора VIII из эритроцитов.

[0180] Фиг. 91A-91D. Гематологические аномалии не наблюдаются.

[0181] Фиг. 92A-92G. Фенотипическая коррекция гемофилии А несмотря на ингибирующие антитела.

[0182] Фиг. 93A-93E. In vivo трансдукция у макаков (*M. fascicularis*). (Фиг. 93A) Экспериментальный план-график; (Фиг. 93B-93D) присутствие GFP в мобилизованных CD34+ клетках в периферической крови; (Фиг. 93E) костном мозге (день 3).

[0183] Фиг. 94A-94M. Объединенные in vivo трансдукция и отбор ГСК. $mgmt^{P140K}$ обеспечивает механизм лекарственной резистентности и избирательного размножения генномодифицированных клеток. (P140K-мутант человеческой O(6)-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) придает резистентность к ингибитору MGMT O(6)-(4-бромотенил)гуанину (O6BG), также известному как бензилгуанин. (Фиг. 94A) Вектор для MGMT^{P140K}. (Фиг. 94B) Экспериментальный дизайн, иллюстрирующий план-график и дозировки для инъекций. (Фиг. 94C) Данные, иллюстрирующие процент GFP+ клеток в МКПК. (Фиг. 94D) Данные, иллюстрирующие процент GFP+ клеток в костном мозге на 26 неделе. (Фиг. 94E) Вектор Ad5/35-GFP. (Фиг. 94F) Экспериментальный протокол, иллюстрирующий, что свинохвостых макаков подвергали 4-дневной мобилизации с последующей инъекцией Ad5/35. (Фиг. 94G) ID животных и дозы G-CSF, SCF, AMD3100 и Ad5/35-GFP. (Фиг. 94H) AMD3100 повышал общие уровни CD34+ стволовых клеток в три раза лучше, чем один G-CSF/SCF и в 65 раз относительно исходного уровня; на левой панели приведено процентное содержание CD34+ стволовых клеток в периферической крови; на правой панели приведено число CD34+ клеток. (Фиг. 94I) Мобилизованные клетки после инъекции Ad5/35 образуют здоровые колонии без искажения линии дифференцировки; на левой панели приведены численные данные, иллюстрирующие частоту и число колоний от нуля до шести часов после инъекции Ad5/35; на правой панели приведено визуальное изучение морфологии CD34+ клеток. (Фиг. 94J) На верхней панели приведены данные проточной цитометрии клеток Ad5/35-GFP от нуля до 6 часов после инъекции. На нижней панели приведены численные данные по числу колоний,

содержащих Ad5/35-GFP через ноль, два и шесть часов после инъекции. (Фиг. 94K) Более 3% периферических CD34+ клеток экспрессируют GFP после инъекции Ad5/35. На верхней панели проиллюстрированы CD34+ клетки, выделенные из слоя мононуклеарных клеток (МНК) от нуля до 8 дней после инъекции Ad5/35. На нижней панели проиллюстрирована средняя экспрессия GFP+ через 2 и 6 часов после инъекции. (Фиг. 94L) Несколько методов подтверждают успешную трансдукцию циркулирующих клеток после мобилизации и инъекции Ad5/35. На левой панели проиллюстрировано выявление Taqman векторной ДНК. На правой панели приведены данные проточной цитометрии по экспрессии GFP. (Фиг. 94M) Модифицированные клетки возвращаются обратно в костный мозг. На левой панели приведены данные проточной цитометрии, иллюстрирующие изменение CD34+ и GFP+ клеток через три, семь и 73 дня после инъекции Ad5/35. На правой панели приведен процент GFP+, CD34+ клеток на исходном уровне и через три, семь и 73 дня после инъекции Ad5/35.

[0184] Фиг. 95. Признаки репрезентативного хелперного вируса Ad35 и векторов, описанных в данном документе. Пятиконечная звезда относится к следующему тексту: - комбинация (добавление и повторная активация) для SB100x и нацеливания; -множество оgPHK для CRISPR или BE; -миPHK (miR187/218)-регулируемая экспрессия Cas9; и - автоинактивация Cas9.

[0185] Фиг. 96. Схема вектора HDAd-TI-комбо. Система CRISPR нацелена на два разных сайта (промотор HBG и эритроидный энхансер bcl11a), что приводит к повышению повторной активации гамма.

[0186] Фиг. 97A-97D. (Фиг. 97A). После совместного инфицирования HDAd-SB и HDAd-комбо будет происходить экспрессия Flpe и высвобождение ИП-фланкируемого транспозона, который затем будет интегрироваться в геном транспозазой SB100x. Одновременно будет происходить экспрессия HBG1 и bcl11a-E CRISPR и генерация инделей ДНК, что приведет к повторной активации γ -глобина. После Flp-опосредованного высвобождения транспозона будет происходить разрушение кассеты CRISPR, позволяя, таким образом, избежать цитотоксичности. Система CRISPR нацелена на два разных сайта (промотор HBG и эритроидный энхансер bcl11a), что приводит к повышению γ повторной активации. (Фиг. 97B) Стратегия нацеливания; (Фиг. 97C) эритроид-специфический энхансер BCL11A; (Фиг. 97D) сайт связывания BCL11A в промоторе HBG (SEQ ID NO: 48). Схему HDAd-SB и HdAd-комб-SB можно найти на Фиг. 102.

[0187] Фиг. 98A-98N. Двойные векторы CRISPR и повторная активация γ -глобина. (Фиг. 98A) Конструкции векторов для HDAd-Bcl11ae-CRISPR, HDAd-HBG-CRISPR, HDAd-Dual-CRISPR и HDAd-скремблированного. (Фиг. 98B) Векторы HD-Ad5/35++

CRISPR для вектора с двойной гРНК. (Фиг. 98C) Трансдукция HD-Ad5/35++ CRISPR линии эритроидных клеток-предшественников человека (HUDEP-2) проиллюстрирована до и после дифференцировки. План-схема приведена под изображениями клеток HUDEP-2. (Фиг. 98D) Вектор HD-AD5/35++ с «двойной» гРНК не оказывает негативного влияния на жизнеспособность клеток по сравнению с необработанными (НЕОБР), BCL11A или HBG векторами. (Фиг. 98E) Вектор HD-AD5/35++ с «двойной» гРНК не оказывает негативного влияния на пролиферацию по сравнению с НЕОБР, BCL11A или HBG векторами. (Фиг. 98F, Фиг. 98G) Двойные векторы обеспечивают уровни редактирования аналогичные с наблюдаемыми для векторов на основе одиночной гРНК в отношении локусов-мишеней (Фиг. 98F), энхансера Bcl11a и (Фиг. 98G) промотора HBG. (Фиг. 98H) Вектор HD-AD5/35++ с «двойной» гРНК обеспечивает уровни редактирования локусов-мишеней аналогичные с наблюдаемыми для векторов на основе одиночной гРНК. (Фиг. 98I) Значительно большее процентное содержание HbF⁺ клеток наблюдали методом проточной цитометрии в клетках HUDEP-2, трансдуцированных вектором HD-Ad5/35 с «двойной» гРНК по сравнению с векторами на основе одиночной гРНК. Гистограмма, обобщающая данные проточной цитометрии, находится под данными проточной цитометрии. (Фиг. 98J) Общая экспрессия гамма-глобина, измеренная методом ВЭЖХ, была значительно выше в образцах с двойным нацеливанием. (Фиг. 98K) Наблюдали значительно большую экспрессию фетального глобина в клонах с двойным нокаутом по сравнению с клонами с одинарным нокаутом, что предполагает возможный синергетический эффект двух мутаций, приводящий к большей экспрессии гамма/клетка. (Фиг. 98L) На схеме показано, что мобилизованные CD34⁺ клетки периферической крови были трансдуцированы векторами HDAd5/35++ CRISPR. Чтобы минимизировать цитотоксичность CRISPR/Cas9, клетки после этого трансдуцировали вектором HDAd5/35++, который экспрессирует анти-Cas9 пептиды. Клетки трансплантировали мышам NSG после сублетальной дозы облучения и анализировали. (Фиг. 98M) На 10 неделе после трансплантации клетки, трансдуцированные вектором HD-Ad5/35 с «двойной» гРНК, демонстрировали приживание аналогичное с клетками, трансдуцированными векторами на основе одиночной гРНК. Композиция линии дифференцировки была аналогичной во всех группах. (Фиг. 98N) CD34⁺ клетки, трансдуцированные и отредактированные вектором на основе двойной гРНК, эффективно приживались у мышей NSG. Кроме того, приживленные клетки с двойным нацеливанием после эритроидной дифференцировки экспрессировали более высокие уровни гамма-глобина относительно контроля по сравнению с клетками с одинарным нацеливанием, несмотря на относительно меньшие уровни редактирования.

[0188] Фиг. 99А-99U. Ex vivo трансдукция нормальных и thal CD34+ клеток с двойным редактированием. (Фиг. 99А) Экспериментальный дизайн. (Фиг. 99В) Экспрессия HBF и (Фиг. 99С) СИФ в колониях на 15 день для нормальных CD34+ клеток. * указывает, что $p=0,034$. (Фиг. 99D) Данные проточной цитометрии, описывающие экспрессию HBF в колониях на 15 день для нормальных CD34+ клетках. (Фиг. 99Е) Экспрессия HBF и (Фиг. 99F) СИФ после эритроидной дифференцировки (ЭД) для нормальных CD34+ клеток. * указывает, что $p=0,01$. (Фиг. 99G) TE71 для сайта HBG и (Фиг. 99H) TE71 для сайта BCL11A через 48 часов после трансдукции (txd) в нормальных CD34+ клетках. (Фиг. 99I) Данные проточной цитометрии, описывающие экспрессию HBF в ЭК и эритроидную дифференцировку. (Фиг. 99J-99U) Thal CD34+ клетки. (Фиг. 99J) Иммунофенотип клеток на 0 день, нетрансдуцированные клетки и клетки, трансдуцированные CRISPR-двойным, и (Фиг. 99K) кривая роста со сравнением нетрансдуцированных клеток и клеток, трансдуцированных CRISPR-двойным в течение 11 дней. (Фиг. 99L) Экспрессия HBF и (Фиг. 99M) СИФ в колониях на 15 день. ** указывает, что $p=0,0046$. (Фиг. 99N) Экспрессия HBF в эритроидном и миелоидном компартменте со сравнением трансдуцированных CRISPR-двойным и нетрансдуцированных клеток. (Фиг. 99O) Экспрессия HBF в эритроидном и миелоидном компартменте со сравнением трансдуцированных CRISPR-двойным А и В нетрансдуцированных клеток. (Фиг. 99P) Экспрессия HBF в ЭК и (Фиг. 99Q) СИФ. *** указывает, что $p=0,0003$, и **** указывает, что $p=0,00003$. (Фиг. 99R) Данные проточной цитометрии, описывающие экспрессию HBF при P04 и P18. (Фиг. 99S, 99T) TE71 для эритроидной дифференцировки сайта HBG при (Фиг. 99S) p04 и (Фиг. 99T) p18. (Фиг. 99U) TE71 для сайта BCL11A через 48 часов после трансдукции.

[0189] Фиг. 100. Обобщенные графические результаты, описывающие комбинацию добавления гена γ -глобина и повторной активации эндогенного γ -глобина.

[0190] Фиг. 101. Используемые в данном документе векторы HDAd5/35++. Добавление гена γ -глобина осуществляют посредством системы транспозазы SB100x, состоящей из вектора транспозона с ИП и сайтами *frt*, фланкирующими экспрессионную кассету (смотрите HDAd-комбо и HDAd-SB-добавление), и второго вектора (HDAd-SB), который обеспечивает SB100x и рекомбиназу Flpe в *транс-конфигурации*. Кассета транспозона для случайной интеграции состоит из мини LCR β -глобина/промотора для эритроид-специфической экспрессии γ -глобина. 3'НТО служит для стабилизации мРНК в эритроидных клетках. Экспрессионное звено γ -глобина отделено куриным инсулятором глобина HS4 от кассеты для экспрессии *mgmt*^{P140K} с универсально активного промотора PGK. Кассета CRISPR/Cas9 в векторах HDAd-CRISPR и HDAd-комбо содержит

управляемую промотором U6 оРНК, специфическую к сайту связывания BCL11A в пределах промотора HBG1/2, SpCas9 под контролем промотора EF1 α . Экспрессия Cas9 в клетках-продуцентах HDAd супрессируется системой регуляции миРНК (Saydaminova et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2015, 1: 14057, 2015). В HDAd-комбо кассета CRISPR/Cas9 размещена за пределами транспозона, поэтому она будет утрачена после Flpe/SB100x-опосредованной интеграции (смотрите Фиг. 102).

[0191] Фиг. 102. Схема контролируемой экспрессии Cas9. В HDAd-комбо взаимодействие рекомбиназы Flpe с сайтами fgt приводит к циркуляризации транспозона, оставляя линейный фрагмент вектора, содержащий кассету CRISPR. Предыдущие исследования с системой SB100x/Flpe продемонстрировали, что эти части вектора быстро теряются, когда циркуляризованный транспозон интегрируется в геном хозяина с помощью SB100x (Yant et al., Nat Biotechnol., 20: 999-1005, 2002).

[0192] Фиг. 103A-103D. In vitro исследования с клетками HUDEP-2 для анализа экспрессии Cas9 и γ -глобина. (Фиг. 103A и 103B) Анализ экспрессии Cas9 методом вестерн-блоттинга. Клетки HUDEP-2 трансдуцировали HDAd-комбо, одним и в комбинации с HDAd-SB (т. е. вектором, который обеспечивает Flpe и SB100x в транс). In vitro эритроидная дифференцировка начиналась через 4 дня после трансдукции и продолжалась в течение 8 дней. (Эритроидная дифференцировка делает возможной экспрессию γ -глобина). Правая панель: репрезентативный вестерн-блоттинг с использованием антител к Cas9 и β -актину в качестве зондов. Левая панель: Обобщенные данные по сигналам Cas9. Столбики сравнивают Cas9 с и без совместного инфицирования HDAd-SB, т. е. уменьшение количества Cas9 посредством механизма Flpe/SB100x. (Фиг. 103C) Анализ экспрессии γ -глобина методом проточной цитометрии. Клетки HUDEP-2 трансдуцировали HDAd-CRISPR («разрез»), HDAd-SB-добавление («добавление»)+HDAd-SB или HDAd-комбо («комбо»)+HDAd-SB и анализировали в указанные моменты времени. (Фиг. 103D) Уровни мРНК γ -глобина методом кОТ-ПЦР. д. п. т., дни после трансдукции. Дифф., дифференцировка. * $p < 0,05$

[0193] Фиг. 104A-104I. Исследования экспрессии γ -глобина после in vivo трансдукции мышей CD46/ β -YAC. (Фиг. 104A) Схема эксперимента. ГСКП мобилизовали путем подкожных (п/к) инъекций человеческого рекомбинантного G-CSF в течение 4 дней с последующей одной п/к инъекцией AMD3100. Через 30 и 60 минут после инъекции AMD3100 животным внутривенно вводили 1:1 смесь следующих векторов HDAd (2 инъекции, каждая по 4×10^{10} вч): HDAd-комбо+HDAd-SB, HDAd-SB-добавление+HDAd-SB и HDAd-разрез. Мышей обрабатывали иммуносупрессивными (ИС) лекарственными средствами в течение следующих 4 недель, чтобы избежать иммунных ответов против

человеческого γ -глобина и MGMT. Обработку O⁶-BG/BCNU начинали на 4 неделе и повторяли каждые 2 недели 3 раза. С каждым циклом повышали концентрацию BCNU от 5 мг/кг до 7,5 мг/кг и 10 мг/кг. На 18 неделе животных умерщвляли для анализа образцов ткани и получения Lin⁻ клеток костного мозга для вторичной трансплантации мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения, которых затем наблюдали еще в течение 16 недель. (Фиг. 104B) Выявление экспрессии γ -глобина в периферических красных кровяных клетках методом проточной цитометрии для групп «комбо» и «разрез». (Фиг. 104C) Уровни белка γ -глобина, измеренные методом ВЭЖХ. Правая панель: Хроматограмма лизатов RBC (неделя 18) с отмеченными человеческим β -глобином, повторно активированным человеческим A γ и добавленными цепями γ -глобина. Левая панель: Обобщенные данные ВЭЖХ. приведено процентное содержание общего γ -глобина относительно человеческого β -глобина для мышей CD46/ β -YAC, обработанных вектором «разрез», «добавление» и «комбо». * $p < 0,05$, н. з. (Фиг. 104D) Экспрессия мРНК γ -глобина относительно экспрессии мРНК мышинных β -основных цепей (измеренная методом КОТ-ПЦР). (Фиг. 104E) Процент расщепления сайта-мишени CRISPR/Cas9. Геномную ДНК из МКПК и МНК костного мозга, полученную на 18 неделе от мышей, *in vivo* трансдуцированных «разрез» и «комбо», подвергали анализу T7E1. Приведены обобщенные данные с Фиг. 105. * $p < 0,05$. (Фиг. 104F) Число копий интегрированного вектора, измеренное в ГСКП костного мозга на 18 неделе после трансдукции векторами «добавление» и «комбо». Разница между группами не является значимой. (Фиг. 104G) Спектр ЧКВ в отдельных КОЕ от обработанных вектором «комбо» мышей. Lin⁻ клетки костного мозга высевали для анализа предшественников и измеряли ЧКВ в отдельных колониях методом кПЦР. Приведены данные по четырем разным мышам. (Фиг. 104H) Белок человеческого γ -человеческого β -глобина методом ВЭЖХ. (Фиг. 104I) Процент экспрессии мРНК человеческого γ -глобина относительно экспрессии мРНК мышинных β -основных цепей.

[0194] Фиг. 105A, 105B. Хроматограммы лизатов RBC с отмеченными пиками β - и γ -глобина. (Фиг. 105A) На верхней панели проиллюстрированы мыши β -YAC до обработки. На средних панелях проиллюстрирована неделя 18 после трансдукции HDAd-CRISPR («разрез»). На левой панели проиллюстрирована повторная активация как G γ , так и A γ . На нижних панелях проиллюстрирована неделя 18 после трансдукции HDAd-CRISPR («разрез»). (Фиг. 105B) Пики отмечены на последней нижней панели. Каждая хроматограмма представляет отдельное животное. Следует отметить, что количество человеческого β -глобина снижалось с повышением количества γ -глобина (обратное переключение глобина).

[0195] Фиг. 106. Данные анализа T7E1 для МНК из крови, селезенки и костного мозга на 16 неделе после трансдукции векторами «разрез» и «комбо». Специфические фрагменты расщепления CRISPR/Cas9 (255 и 110 п. о.) отмечены стрелками. Процент расщепления на основании количественной оценки сигнала полосы приведен под каждой дорожкой.

[0196] Фиг. 107A-107F. Анализ вторичных реципиентов Lin⁻ клеток от трансдуцированных мышей CD46/ β -YAC. (Фиг. 107A) Процентное содержание экспрессирующих человеческий γ -глобин RBC периферической крови в указанные моменты времени. Все мыши получали иммуносупрессию, начиная с 4 недели после трансплантации. (Фиг. 107B) Уровень белка γ -глобина относительно человеческого β -глобина на 16 неделе после трансплантации. (Фиг. 107C и 107D) Уровень белка γ -глобина относительно мышинового $\beta_{\text{основного}}$ -глобина и человеческого β -глобина. (Фиг. 107E) Композиция положительных по линии дифференцировки клеток в МНК крови, селезенки и костного мозга на 16 неделе после трансдукции вектором «комбо» по сравнению с нетрансдуцированными контрольными мышами. Фиг. 107F. Число копий вектора на клетку в общем количестве лейкоцитов от группы HDAd-комбо, измеренное методом кПЦР с использованием праймеров γ -глобина.

[0197] Фиг. 108A-108D. Создание и характеристики трижды трансгенных мышей CD46/Townes в качестве модели для SCD. (Фиг. 108A) Разведение мышей CD46/Townes. Мышей Townes ($h\alpha/h\alpha::\beta^S/\beta^S$) скрещивали на протяжении трех раундов с CD46-трансгенными мышами. Животных, которые были гомозиготными в отношении CD46, HbS и HbA, использовали для исследований *in vivo* трансдукции. (Фиг. 108B) Мазки периферической крови мышей CD46/Townes с типичными признаками человеческого заболевания, включая анизопойкилоцитоз, полихромазию (черные стрелки), серповидные и фрагментированные клетки (черные стрелки со звездочкой). Масштабная планка составляет 15 мкм. (Фиг. 108C) Гематологический анализ периферической крови от мышей CD46/Townes по сравнению с родительскими «здоровыми» CD46-трансгенными мышами. Ret: ретикулоциты; RBC: красные кровяные клетки, Hb: гемоглобин; HCT: гематокрит; WBC: белые кровяные клетки. Вся разница является значимой ($p < 0,05$). (Фиг. 108D) Спленомегалия у мышей CD46/Townes. Приведено отношение массы селезенки к массе тела у мышей CD46tg и CD46/Townes. N=3.

[0198] Фиг. 109A-109F. Экспрессия γ -глобина после *in vivo* трансдукции ГСКП мышей CD46/Townes. Мышей мобилизовали, вводили HDAd-комбо+HDAd-SB и обрабатывали O⁶BG/BCNU, как описано для Фиг. 104. (Фиг. 109A) Присутствие γ -глобина в периферических RBC, измеренное методом проточной цитометрии. Пустые квадраты

иллюстрируют присутствие в RBC необработанных мышей CD46/Townes. Вертикальными стрелками указаны циклы *in vivo* отбора. (Фиг. 109B) Уровни γ -глобина в RBC, измеренные на 13 неделе методом ВЭЖХ. Левая панель: Обобщенные уровни γ -глобина относительно человеческого α -глобина и цепей β^S -глобина у отдельных мышей. Пустые квадраты иллюстрируют уровни в RBC необработанных мышей CD46/Townes. Правая панель: Репрезентативные хроматограммы мышей CD46/Townes до обработки (верхняя панель) и на 13 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП с HDAd-комбо+HDAd-SB. Указаны пики для человеческого β^- , β^S , повторно активированного $A\gamma$ и добавленного γ -глобина. (Фиг. 109C) Процентное содержание повторно активированного $A\gamma$ на основании ВЭЖХ. (Фиг. 109D) Процентное содержание общей мРНК γ -глобина относительно мРНК человеческого α -глобина и β^S -глобина у отдельных мышей. (Фиг. 109E) Число копий интегрированного вектора, измеренное в ГСКП костного мозга на 163 неделе после трансдукции HDAd-комбо. (Фиг. 109F) Расщепление сайта-мишени HBG1/2, общее количество нуклеарных клеток костного мозга, Lin^- клеток, МКПК и спленоцитов мышей CD46/Townes на 13 неделе после инъекции HDAd-комбо. Специфические фрагменты расщепления CRISPR/Cas9 (255 и 110 п. о.) отмечены стрелками. Процент расщепления на основании количественной оценки сигнала полосы приведен под каждой дорожкой.

[0199] Фиг. 110A, 110B. Анализ вторичных реципиентов, которым трансплантировали Lin^- клетки от трансдуцированных мышей CD46/Townes. (Фиг. 110A) Процентное содержание экспрессирующих человеческий γ -глобин RBC периферической крови. (Фиг. 110B) Уровень белка γ -глобина относительно человеческого α - и β^S -глобина на 16 неделе после трансплантации.

[0200] Фиг. 111A-111C. Фенотипическая коррекция в крови. (Фиг. 111A) Мазки крови, окрашенные в отношении ретикулоцитов бриллианткрезил синим. Этот краситель окрашивает остатки ядер и цитоплазматических компартментов. (Количественную оценку можно найти на Фиг. 109C, первая группа столбиков). Масштабная планка составляет 20 мкм. (Фиг. 111B) Мазки крови, демонстрирующие нормоцитарную морфологию эритроцитов после генной терапии HDAd-комбо. (Фиг. 111C) Гематологический анализ периферической крови. Разница между «CD46» и «CD46/Townes на 13 нед. после комбо» не является значимой.

[0201] Фиг. 112A-112C. Фенотипическая коррекция в селезенке и печени. (Фиг. 112A) Гистология ткани. Верхняя панель: отложение железа в селезенке. Гемосидерин был выявлен в срезах селезенки посредством окрашивания берлинской лазурью по Перлсу. Масштабная планка составляет 20 мкм. Средняя и нижняя панели: экстрамедуллярный гемопоэз при окрашивании гематоксилином/эозином в срезах

селезенки и печени. Кластеры эритробластов в печени и мегакариоцитов в селезенке мышей CD46/Townes указаны белыми стрелками. Масштабные планки составляют 20 мкм. Показаны репрезентативные изображения. (Фиг. 112B) Размер селезенки, измеримая характеристика компенсаторного гемопоэза, у обработанных мышей CD46/Townes является сравнимым с родительскими мышами CD46. (Фиг. 112C) 4-кратное увеличение изображений срезов печени с Фиг. 112A. Серповидные RBC в печеночном синусоиде мышей CD46/Townes до обработки (левая панель) и отсутствие серповидных эритроцитов в печеночных синусоидах после обработки (правая панель).

[0202] Фиг. 113. Левый конец генома хелперного вируса Ad5/35. Последовательности, затененные темно-серым цветом, соответствуют нативной последовательности Ad5, т. е. незатененные или выделенные светло-серым цветом последовательности были внесены искусственно. Последовательности, выделенные светло-серым цветом, представляют 2 копии (тандемно повторенных) последовательностей loxP. При наличии белка «рекомбиназы cre» происходит удаление нуклеотидной последовательности между двумя последовательностями loxP (оставляя одну копию loxP). Поскольку последовательность Ad5 между сайтами loxP важна для упаковки аденовирусной ДНК в капсиды (в ядре клетки-продуцента), это удаление приводит к неупаковываемости геномной ДНК хелперного аденовируса. Следовательно, эффективность процесса удаления имеет прямое влияние на уровень упаковки хелперной геномной ДНК (нежелательному «загрязнению» хелперным вирусом). Ввиду вышесказанного, чтобы транслировать такую же схему на серотипы аденовируса, отличные от Ad5, необходимо обеспечить следующее: 1. Идентифицировать последовательности, важные для упаковки, так, чтобы они могли фланкироваться вставками последовательности loxP и удаляться в присутствии рекомбиназы cre. Идентификация этих последовательностей не является простой, если эти последовательности имеют слабое сходство. 2. Определить, где в нативной последовательности ДНК вставка последовательности loxP будет иметь эффект на размножение и упаковку хелперного вируса (в отсутствие рекомбиназы cre). 3. Определить расстояние между последовательностями loxP, чтобы обеспечить эффективное удаление последовательностей упаковки и свести упаковку хелперного вируса к минимуму во время выработки хелпер-зависимого аденовируса (т. е. в экспрессирующей рекомбиназу cre линии клеток, такой как линия клеток 116).

[0203] Фиг. 114. Выравнивание сигналов упаковки Ad5 и Ad35 (SEQ ID NO: 49 и 50). Выравнивание левых концевых последовательностей Ad5 с Ad35 помогает идентифицировать сигналы упаковки. Мотивы в последовательности Ad5, важные для

упаковки (от AI до AV) находятся в прямоугольниках (смотрите Фиг. 1B в Schmid et al., J Virol., 71(5):3375-4, 1997). Расположение сайтов вставки loxP указано черными стрелками. Видно, что вставки фланкируют AI-AIV и разрушают AV. Следует отметить, что дополнительный сигнал упаковки AVI и AVII, указанный в Schmid et al., был удален в хелперном вирусе Ad5 как часть удаления E1 этого вектора.

[0204] Фиг. 115. Схема pAd35GLN-5E4. Этот вектор Ad35 первого поколения (с удалением E1/E3) получен из векторизованного генома Ad35 (штамм Holden от ATCC) с использованием технологии рекомбинационной инженерии (PMID: 28538186). Затем векторную плазмиду использовали для вставки сайтов loxP.

[0205] Фиг. 116. Информация по сигналам упаковки плазмиды. Сайты вставки LoxP сайта упаковки (PS)1 находятся за нуклеотидами 178 и 344. Это должно сдвинуть AI до AIV. Оставшаяся часть сигнала упаковки, включая AVI и AVII (после 344), была удалена (как часть удаления E1 (от 345 до 3113)). Сайты вставки PS2 LoxP находятся за нуклеотидами 178 и 481. Кроме того, были удалены нуклеотиды 179-365, поэтому участок от AI до AV отсутствует. Оставшиеся мотивы упаковки AVI и AVII могут быть удалены рекомбиназой cre во время выработки HDAd. Удаление E1 находится от 482 до 3113. Сайты вставки PS3 LoxP находятся за нуклеотидами 154 и 481. Можно сохранить три сконструированных вектора. Процентное содержание вирусных геномов с перестроенными сайтами loxP составляло 50, 20 и 60% для PS1, PS2 и PS3, соответственно. Перестройка происходит, когда на сайты loxP оказывают сильное влияние вирусная репликация и генная экспрессия. Векторы с перестроенными сайтами loxP подлежат упаковке и будут загрязнять препарат HDAd. SEQ ID NO: 286, 51 и 52 иллюстрируют векторы, схематически изображенные как PS1, PS2 и PS3, соответственно.

[0206] Фиг. 117. Платформа HDAd35 следующего поколения по сравнению с текущей платформой HDAd5/35. Оба вектора содержат кассету CMV-GFP. Вектор Ad35 не содержит иммуногенный капсидный белок Ad5. Продемонстрирована сравнимая эффективность трансдукции CD34+ клеток *in vitro*. Связующее исследование демонстрирует сравнимую эффективность трансдукции CD34+ клеток *in vitro*. Человеческие ГСК, периферические CD34+ клетки от G-CSF-мобилизованных доноров, трансдуцировали HDAd35 (полученным с Ad35-хелпером P-2) или химерным вектором, содержащим капсид Ad5 с фибром из Ad35, при M3 500, 1000, 2000 вч/клетка. Процентное содержание GFP-положительных клеток измеряли через 48 часов после добавления вируса в трех независимых экспериментах. Следует отметить, что инфицирование HDAd35 инициировало цитопатический эффект через 48 часов вследствие загрязнения хелперным вирусом.

[0207] Фиг. 118. Хелперный вектор PS2 был переделан, чтобы сфокусироваться на исследованиях на обезьянах. Были переняты следующие действия из: удаления области E1, мутантного сигнала упаковки, фланкируемого Loxp, мутантной последовательности упаковки, удаления области E3 (27435 □ 30540), замещения Ad5E4orf6, вставки ДНК-вкладыша, фланкирующей кассеты сорGFP, и внесения мутации в головку для создания Ad35K++.

[0208] Фиг. 119. Приведена мутантная последовательность сигнала упаковки. Остатки 1-137 представляют ИКП Ad35. Жирным шрифтом представлены сайты SwaI, сайт Loxp выделен курсивом, а мутантный сигнал упаковки подчеркнут.

[0209] Фиг. 120А, 120В. Схематические изображения различных вариантов хелперного вектора и сигнала упаковки. В вариантах осуществления область E3 (27388 □ 30402) удалена, а кассета CMV-eGFP расположена в рамках удаления E3, Ad35K++, и eGFP используется вместо сорGFP. Можно сохранить все четыре хелперных вектора, содержащих варианты сигнала упаковки, проиллюстрированные на (Фиг. 120А). Сайты Loxp были перестроены, поскольку амплификация могла быть более эффективной. Дополнительные варианты сигнала упаковки проиллюстрированы на Фиг. 120В.

[0210] Фиг. 121. Изображение вектора HDAd-комбо.

[0211] Фиг. 122. Экспериментальный протокол.

[0212] Фиг. 123. Векторы для редактирования мотива GATAA в пределах +58 области эритроидного энхансера bcl11a. Структура вектора проиллюстрирована на верхней панели. Оба вектора нацелены на мотив GATAA. На нижней панели проиллюстрировано изменение оснований, опосредованное вектором HDAd-C-BE. (SEQ ID NO: 65-68)

[0213] Фиг. 124А-124С. Анализ векторов на человеческих CD34+ клетках. (Фиг. 124А) Клетки инфицировали при МЗ 2000 вч/клетка и через один день подвергали эритроидной дифференцировке в течение 18 дней. (Фиг. 124В) Аликвоты клеток анализировали в отношении расщепления сайта-мишени с помощью анализа T7E1A в разные моменты времени. Левые столбики: HDAd-wtCRISPR, правые столбики: HDAd-C-BE. (Фиг. 124С) Процентное содержание γ -глобин+ клеток в конце эритроидной дифференцировки.

[0214] Фиг. 125. Приживление трансдуцированных HDAd-wtCRISPR и HDAd-C-BE CD34+ клеток. МЗ трансдукции составляла 2000 вч/клетка. Приживление измеряли на основании процентного содержания человеческих CD45+ клеток в мононуклеарных клетках периферической крови.

[0215] Фиг. 126. Векторы HDAd для редактирования оснований. оgPHK нацелены

на эритроидный энхансер *bcl11a* (верхняя панель) или сайт связывания белка *BCL11a* в *HBG1/2*. На средней панели проиллюстрирован % преобразования оснований в день эритроидной дифференцировки линии эритроидных клеток-предшественников *HUDEP-2*. На правой панели проиллюстрирован уровень повторной активации γ -глобина. (SEQ ID NO: 67, 65 и 71)

[0216] Фиг. 127А, 127В. (Фиг. 127А) Мазок крови с типичными серповидными эритроцитами. (Фиг. 127В) Эритроидные параметры.

[0217] Фиг. 128А-128С. (Фиг. 128А) *In vivo* трансдукция мышей Townes/CD46 без *in vivo* отбора. (Фиг. 128В) Повторная активация γ -глобина в RBC. (Фиг. 128С) Окрашивание ретикулоцитов мазков крови до обработки и на 8 неделе после обработки.

[0218] Фиг. 129А-129D. *In vivo* трансдукция ГСК у мобилизованных макаков. После мобилизации G-CSF, SCF и AMD3100 два взрослых макака получали HDAd-GFP (1×10^{12} вч/кг) путем внутривенной инъекции. Перед инъекцией HDAd животных предварительно обрабатывали дексаметазоном, чтобы блокировать потенциальное высвобождение цитокинов. (Фиг. 129А) Очищенные CD34+ клетки периферической крови, полученные в указанные моменты времени, культивировали и анализировали в отношении экспрессии GFP методом проточной цитометрии. Приведен средний процент клеток, экспрессирующих GFP в течение 4 дней в культуре (Фиг. 129В) Репрезентативные проточный графики CD34+ клеток, экспрессирующих GFP до (0 ч) или после (6 ч) инъекции HDAd-GFP. (Фиг. 129С) Анализ образования колоний начинали с очищенными CD34+ клетками из периферической крови или из общего количества МКПК. Через 14 дней в культуре собирали отдельные колонии и анализировали в отношении наличия ДНК GFP методом ПЦР. (Фиг. 129D) Анализ экспрессии GFP в CD34+ клетках костного мозга. Показан репрезентативный блот. В этом исследовании инъецировали только HDAd-GFP и, следовательно, измеряли только краткосрочную экспрессию GFP.

[0219] Фиг. 130. Скрининг гидовых последовательностей. Клетки *HUDEP-2* трансфицировали редакторами оснований, перечисленными в таблице 14. Экспрессию γ -глобина измеряли через 4 дня после трансфекции (4 дпт) и 6 дней после *in vitro* эритроидной дифференцировки (дифф. 6 д). Вектор CRISPR/Cas9, нацеленный на мотив TGACCA в промоторе *HBG1/2*, использовали в качестве положительного контроля (пол. ктрл). СВЕ, нацеленный на кодирующую область *CCR5*, был включен в качестве отрицательного контроля (огОтр). Приведенные данные (среднее \pm СО) представляют два независимых эксперимента.

[0220] Фиг. 131А, 131В. Сравнение разных версий редакторов цитидиновых оснований. (Фиг. 131А) Клетки 293 (НЕК293) трансфицировали векторами WTCas9 или

BE+pSP-BE4-sgBCL11Ae1 (3+1 мкг), расщепление сайта-мишени энхансера bcl11a анализировали через 4 дня после трансфекции с помощью анализа T7E1. (Фиг. 131B) Такое же исследование проводили в линиях клеток эритролейкоза (K562) с векторами WTCas9 или BE+pSP-BE4-sgBCL11Ae1 (2+0,66 мкг).

[0221] Фиг. 132A-132C. Дизайн и сохранение векторов HDAd5/35++_BE. (Фиг. 132A) Дизайн вектора редактора цитидиновых оснований (CBE). Можно получить, но с низким выходом. (Фиг. 132B) 1-ая версия дизайна вектора редактора адениновых оснований (ABE). Невозможно получить. (Фиг. 132C) Оптимизация кодонов ABE для снижения повторяемости. Включено сравнение последовательностей, иллюстрирующее оптимизацию кодонов TadA (фермент аденозиндезаминаза тРНК) (SEQ ID NO: 260 и 261)

[0222] Фиг. 133A-133H. Конструкция и подтверждение векторов HDAd5/35++_BE. (Фиг. 133A) Диаграмма вектора HDAd_ABE. 4,2 т. о. кассета MGMT/GFP, фланкируемая двумя ИП *frt*, делает возможной интегрированную экспрессию при совместной доставке с вектором HDAd_SB. Компоненты 8,0 т. о. редактора оснований были сконструированы за пределами транспозона для временной экспрессии. Два повтора TadAN были кодон-оптимизированы для снижения повторения последовательностей (* обозначает каталитический повтор). Элемент ответа микроРНК (miR) был вставлен в 3' НТО человеческого β -глобина для минимизации токсичности клеток-производителей за счет специфической понижающей регуляции экспрессии ABE в клетках 116. PGK, человеческий промотор PGK. bGHpA, последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста. SV40pA, сигнал полиаденилирования вируса обезьян 40. ИКП, инвертированный концевой повтор. ψ , сигнал упаковки. (Фиг. 133B) Информация по созданным вирусным векторам. Перечисленные продукты получены из одного 3 л роллера. (Фиг. 133C) Подтверждение вирусных векторов в клетках HUDEP-2. Клетки трансдуцировали различными векторами при указанной МЗ (вч/клетка). Экспрессию γ -глобина измеряли через 4 дня после трансфекции (4 дпт) и 6 дней после *in vitro* эритроидной дифференцировки (дифф. 6 д). Вектор CBE, нацеленный на кодирующую область CCR5, был включен в качестве отрицательного контроля (огОтр). Приведенные данные (среднее \pm СО) представляют два независимых эксперимента. (Фиг. 133D) Преобразование основания-мишени HDAd_sgHBG№ 2. Геномные сегменты HBG1 или HBG2, включающие основания-мишени, амплифицировали и подвергали секвенированию по Сэнгеру. Данные анализировали с помощью EditR 1.0.9. Стрелками указаны основания-мишени. % преобразования приведен под хроматограммами. (Фиг. 133E) % экспрессии γ -глобина по сравнению с α - или β -глобином, измеренный методом ВЭЖХ на 6 день после дифференцировки. МЗ=1000. Приведенные данные (среднее \pm СО) представляют два

независимых эксперимента. Фиг. 133F-133H) Репрезентативный клон (№ 3), полученный из клеток HUDEP-2, трансдуцированных HDAd_sgHBG№ 2. Моноаллельное преобразование основания -116A□G было выявлено в промоторе HBG1 (Фиг. 133F), что приводит к 100% γ -глобин+ клеток по данным проточной цитометрии (Фиг. 133G). Уровни белка γ -глобина измеряли методом ВЭЖХ (Фиг. 133H).

[0223] Фиг. 134A-134C. Данные, подтверждающие Фиг. 133. (Фиг. 134A) Дополнение к Фиг. 133D. Преобразование оснований-мишеней в клетках HUDEP-2, обработанных указанными вирусами. (Фиг. 134B) Репрезентативные клоны одиночных клеток HUDEP-2. Дополнение к Фиг. 133F. В со стрелкой указывают на биаллельное редактирование, а М и стрелка указывают на моноаллельное редактирование. (Фиг. 134C) Экспрессия γ -глобина в соответствующих клонах одиночных клеток HUDEP-2, проиллюстрированных выше. Дополнение к Фиг. 133G.

[0224] Фиг. 135A-135I. Повторная активация γ -глобина у мышей β YAC после *in vivo* трансдукции и отбора. (Фиг. 135A) Экспериментальная процедура. Мышей β -YAC/CD46 (n=9) мобилизовали G-CSF/AMD3100 и *in vivo* трансдуцировали HDAd_sgHBG№ 2+HDAd_SB. Проводили четыре раунда отбора с помощью O^bBG/BCNU на 4, 6, 8 и 10 неделях после трансдукции, соответственно. Мышей умерщвляли на 16 неделе. Выделяли отрицательные () по линии дифференцировки клетки и *in vivo* инъецировали мышам C57BL/6 после летальной дозы облучения. Мышей со вторичной трансплантацией наблюдали еще в течение 16 недель. (Фиг. 135B) Присутствие GFP в МКПК в различные моменты времени после трансдукции. Каждая точка представляет одно животное. (Фиг. 135C) Репрезентативные точечные графики экспрессии GFP в МКПК. (Фиг. 135D) Экспрессия γ -глобина в клетках крови, измеренная методом проточной цитометрии. (Фиг. 135E) Репрезентативные точечные графики экспрессии γ -глобина в клетках крови. (Фиг. 135F) Экспрессия γ -глобина по данным проточной цитометрии в Ter-119⁺ и Ter-119⁻ клетках в крови и костном мозге в конечный момент времени у первичных мышей. (Фиг. 135G) Уровень белка γ -глобина в лизатах красных кровяных клеток, измеренный методом ВЭЖХ. Приведенные данные представляют процентное содержание по сравнению с мышинным α - или β -глобином или человеческим β -глобином. (Фиг. 135H) Экспрессия γ -глобина на уровне мРНК, измеренная методом ОТ-ПЦР. Приведенные данные представляют кратность изменения по сравнению с мРНК мышинового HBA или HBV, или человеческого HBV. (Фиг. 135I) Число копий вектора (копий на клетку) в общем количестве клеток костного мозга. Использовали праймеры к MGMT.

[0225] Фиг. 136. График ВЭЖХ с репрезентативными данными приведен на Фиг.

135H.

[0226] Фиг. 137A-137G. Преобразование оснований-мишеней. (Фиг. 137A) Гидовая последовательность sgHBG № 2. Нумерация начиналась с 5' конца. Оранжевым фоном выделен мотив TGACCA, известный сайт связывания BCL11A. Два аденина (A5 и A8) в мотиве указаны двумя стрелками. (Фиг. 137B) Процент преобразования оснований-мишеней. Показаны как A5, так и A8 в промоторных областях HBG1 и HBG2. Каждая точка представляет одно животное (n=9). (Фиг. 137C) Репрезентативные хроматограммы, демонстрирующие преобразование оснований-мишеней в областях HBG1 и HBG2 мыши № 1108. (Фиг. 137D) Корреляция между средним преобразованием оснований и экспрессией γ -глобина. Процент среднего преобразования оснований у каждого животного представлял средний уровень в A5 и A8 в промоторных областях HBG1 и HBG2. Каждая точка представляет одно животное (n=9). (Фиг. 137E) Сравнение преобразования оснований в A5 и A8. Каждая точка представляет одно животное (n=9). (Фиг. 137F) Таблица, демонстрирующая процент преобразования целевых нуклеотидов аденина. (Фиг. 137G) Хроматограмма, демонстрирующая преобразование оснований-мишеней для конкретной мыши (SEQ ID NO: 250).

[0227] Фиг. 138A-138D. Профиль безопасности. (Фиг. 138A) Гематологический анализ методом HEMAVET® с использованием образцов крови на 16 неделе после трансдукции. Приведенные данные представляют среднее \pm СО по 9 мышам, трансдуцированным HDAd_sgHBG № 2 и 3 нетрансдуцированным контрольным мышам. (Фиг. 138B) Процентное содержание ретикулоцитов в образцах крови на 16 неделе. Образцы окрашивали бриллианткрезил синим. Приведенные данные представляют среднее \pm СО по 4 мышам, трансдуцированным HDAd_sgHBG № 2 и 3 нетрансдуцированным контрольным мышам. (Фиг. 138C) Клеточная композиция в МНК костного мозга первичных мышей в конечный момент времени. Нетрансдуцированных мышей использовали в качестве контроля. Каждая точка представляет одно животное. (Фиг. 138D) Репрезентативное окрашивание ретикулоцитов бриллианткрезил синим.

[0228] Фиг. 139A-139C. Вторичная трансплантация. (Фиг. 139A) Приживление, измеренное по экспрессии человеческого CD46 в МКПК методом проточной цитометрии. (Фиг. 139B) Экспрессия GFP в МКПК. (Фиг. 139C) Экспрессия γ -глобина в клетках периферической крови, выявленная методом проточной цитометрии.

[0229] Фиг. 140A, 140B. Выявление межгенной делеции. (Фиг. 140A) Выявление межгенной 4,9 т. о. делеции было описано ранее (Li et al., Blood, 131(26): 2915, 2018). Геномную ДНК, выделенную из общих МНК костного мозга использовали в качестве матрицы. 9,9 т. о. геномную область, проходящую через два сайта разрезания CRISPR в

промоторах HBG1 и HBG2, амплифицировали методом ПЦР. Дополнительная 5,0 т. о. полоса в продукте указывает на появление 4,9 т. о. делеции. Процент делеции рассчитывали в соответствии с формулой стандартной кривой, которую строили с помощью ПЦР, используя матрицы с определенными соотношениями 4,9 т. о. делеции. Образцы, полученные от мышей, *in vivo* трансдуцированных вектором CRISPR, нацеленным на промотор HBG1/2, использовали для сравнения. Каждая дорожка представляет одно животное. (Фиг. 140В) Обобщенные данные по проценту делеции приведены на Фиг. 140А. Каждая точка представляет одно животное.

[0230] Фиг. 141. Цитотоксичность BE в сравнении с CRISPR/Cas9. Основной проблемой существующих технологий редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9 является то, что они вносят двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР), которые могут быть вредными для клеток-хозяев, вызывая нежелательную делецию крупного фрагмента и p53-зависимые ответы на повреждение ДНК. Редакторы оснований способны вставлять точные нуклеотидные мутации в геномных локусах-мишенях и обеспечивать преимущество недопущения ДЦР. В этом исследовании показано, что на важную функциональную характеристику ГСК, а именно приживление у мышей NSG после сублетальной дозы облучения, не влияет BE, но она резко снижается после трансдукции человеческих CD34+ клеток с CRISPR/Cas9-экспрессирующим вектором.

[0231] Фиг. 142. Ожидаемое редактирование, опосредованное BE4-sgBCL11AE1. Схема, иллюстрирующая редактирование локуса BCL11A. Проиллюстрированы мотив GATAA (SEQ ID NO: 65) и разрушенный мотив GATAA после редактирования оснований (SEQ ID NO: 67).

[0232] Фиг. 143. Оптимальная локация для мишеней. Схема последовательности нуклеиновой кислоты, на которой выделены типовые локации для нацеливания. На этой фигуре показано, частично, редактирование С на Т, когда мишень С находится в позициях от 4 до 8 в пределах протоспейсера.

[0233] На Фиг. 144 приведена схема вектора, кодирующего редактор оснований.

[0234] Фиг. 145. Диаграмма вирусной гДНК. Схема вирусной гДНК (HBG2-miR, редактор аденина), которая представляет одну непрерывную конструкцию, но была разделена на секции исключительно для удобства представления.

[0235] Фиг. 146. Последовательности TadA. Схематическое представление последовательностей TadA и TadA* (SEQ ID NO: 265 и 266), включая последовательности ДНК двух «TadA +32aa» (SEQ ID NO: 367 и 268).

[0236] Фиг. 147. Редактирование оснований. Схематическое представление последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 269) и отредактированной

последовательности (SEQ ID NO: 269).

[0237] Фиг. 148. Редактирование оснований. Схематическое представление и два геля, относящиеся к редактированию оснований вирусом HDAd5/35++_BE4-sgBCL11Ae1-FI-mgmtGFP (041318-1).

[0238] Фиг. 149. Процент γ -глобин+ клеток. График, иллюстрирующий процентное содержание γ -глобин+ клеток при указанной МЗ.

[0239] Фиг. 150. Повторная активация HbF за счет редактирования оснований. Перечень векторов и связанная с ними информация.

[0240] Фиг. 151. Перечень векторов и связанная с ними информация, а также график, иллюстрирующий процент HbF+ клеток при различных МЗ редакторов оснований.

[0241] Фиг. 152. Экспрессия γ -глобина (HUDEP-2), 2-ое исследование. График, иллюстрирующий % HbF+ из второго исследования в клетках HUDEP-2.

[0242] Фиг. 153. Экспрессия γ -глобина (HUDEP-2), полученные из одиночных клеток клоны. График, иллюстрирующий % HbF+ в различных полученных из одиночных клеток клонах.

[0243] Фиг. 154A-154S. Данные, представляющие полученные из одиночных клеток клоны. Каждая из Фиг. 154A-154S содержит данные, представляющие клон из одиночной клетки. (SEQ ID NO: 271, 250, 252)

[0244] Фиг. 155. Тест в клетках 293FT. Два геля, демонстрирующие результаты использования редакторов оснований в клетках 293FT.

[0245] Фиг. 156A-156D. Секвенирование по Сэнгеру для подтверждения отредактированных оснований (клетки 293FT). Каждая из Фиг. 156A-156D содержит хроматограммы, демонстрирующие результаты секвенирования по Сэнгеру. (SEQ ID NO: 269, 275-278)

[0246] Фиг. 157. Тест в клетках HUDEP-2. Два геля, демонстрирующие результаты использования редакторов оснований в клетках HUDEP-2 через 4 дня после трансфекции.

[0247] Фиг. 158. Экспрессия γ -глобина (HUDEP-2). График, иллюстрирующий экспрессию γ -глобина.

[0248] Фиг. 159A-159D. Секвенирование по Сэнгеру для подтверждения отредактированных оснований (клетки HUDEP-2). Каждая из Фиг. 159A-159D содержит хроматограммы, демонстрирующие результаты секвенирования по Сэнгеру, при наличии. (SEQ ID NO: 269, 275-278)

[0249] Фиг. 160. Выбранные конструкции для выработки вируса HDAd (в условиях макси-получения). Перечень показаний отбора сконструированных векторов

определенных конструкций для выработки вируса HDAd (в условиях макси-получения).

[0250] Фиг. 161. Таблица, демонстрирующая приживление huCD45+ клеток.

[0251] Фиг. 162. Временная трансфекция клеток HUDEP-2 (расщепление T7E1). Гели, демонстрирующие результаты временной трансфекции клеток HUDEP-2 (расщепление T7E1).

[0252] Фиг. 163. Применение двойного вектора редактирования оснований. Схематическое представление варианта осуществления двойного вектора редактирования оснований (SEQ ID NO: 279).

[0253] Фиг. 164. Векторная схема вектора HDad5/35++ комбо, иллюстрирующая добавление гена человеческого γ -глобина/mgmt транспозазой SB100x и повторную активацию γ -глобина резуса с использованием CRISPR, нацеленных на эритроидный энхансер bcl11a и сайт связывания BCL11A в промоторе HBG.

[0254] Фиг. 165. Векторная схема, иллюстрирующая вектор HDAd-sgAAVS1-gm (без Cas9) и HDAd-Comb2. К свойствам этого вектора относятся 1,8 т. о. плечо гомологии (ПГ), GFP для отслеживания трансдукции в МКПК, кассета CRISPR за пределами ПГ и нацеливание на промотор HBG.

[0255] Фиг. 166. Векторная схема HDAd-gh-комбо с экспрессией gh γ -глобина с использованием управляемого промотором LCR β -глобина экзогенного γ -глобина и повторной активацией эндогенного γ -глобина за счет CRISPR/Cas9-опосредованного разрушения области связывания репрессора промотора γ -глобина.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0256] В настоящем изобретении описаны, помимо прочего, рекомбинантные аденовирусные векторы, такие как векторы Ad5/35 и Ad35, нацеленные на CD46 для *in vivo* редактирования генов гемопоэтических стволовых клеток. Векторы Ad35 могут содержать мутации белка головки, которые повышают связывание CD46, системы контроля миРНК, которые регулируют экспрессию генов, компоненты CRISPR для активации эндогенной экспрессии генов, маркеры положительного отбора, регуляторные последовательности областей контроля локуса (LCR) β -глобина в мини- или длинной форме, системы транспозазы/рекомбиназы и/или различные другие последовательности, описанные в данном документе, включая, без ограничения, ряд других преимущественных признаков, которые способствуют *in vivo* генной терапии без кондиционирования.

[0257] Несмотря на разработку множества инструментов для генной терапии, конструирование векторов и/или терапевтически полезной нагрузки остается существенной проблемой в данной области. Нагрузку для генной терапии могут доставлять вирусные векторы или невирусные векторы. Типовые невирусные векторы

включают системы доставки на основе катионных липидов, липидных наноэмульсий, твердых липидных наночастиц, пептидов и полимеров. Вирусные векторы могут включать векторы на основе AAV, вируса простого герпеса, ретровируса, лентивируса, флавивируса, вируса бешенства, вируса кори, вируса ньюкаслской болезни, поксвируса, пикорнавируса, вирусов Коксаки и аденовирусные векторы, каждый с разными отличными характеристиками. Среди аденовирусов также существует более 50 серотипов. Также существует терапевтическая нагрузка для экспрессии и/или модификации последовательностей нуклеиновых кислот, включая, без ограничения, нагрузку, кодирующую белки, регуляторные нуклеиновые кислоты, системы CRISPR/Cas9, системы редактирования оснований, системы транспозонов и системы гомологичной рекомбинации. Предложенные в данном документе способы и композиции для генной терапии решают, без ограничения, различные проблемы, связанные с применением аденовирусных векторов и/или различных терапевтических нагрузок.

[0258] Хотя изобретение в настоящем описании может быть представлено в конкретном контексте (например, контексте аденовирусного вектора или генома, например, контексте Ad5, Ad5/35 или Ad35), каждый компонент дополнительно описан независимо от любого такого контекста и, следовательно, может быть заявлен независимо от такого контекста. Типовые описания включают последовательности и нагрузочные конструкции по настоящему изобретению, которые, как понятно специалистам в данной области техники, могут иметь общую релевантность, не ограниченную каким-либо конкретным вектором, серотипом или другим контекстом.

[0259] Далее аспекты настоящего изобретения более подробно описаны следующим образом: (I) Векторы для генной терапии; (II) Популяции клеток-мишеней; (III) Дозировки, составы и введение; (IV) Применения; (V) Типовые варианты осуществления; (VI) Экспериментальные примеры; и (VII) Заключительные параграфы.

I. Векторы для генной терапии

[0260] Аденовирусные векторы (или, взаимозаменяемо, «векторы на основе аденовируса») и геномы относятся к конструкциям, содержащим последовательности аденовируса, достаточные для (a) поддержания упаковки экспрессионной конструкции и (b) экспрессии кодирующей последовательности. Аденовирусные геномы могут представлять собой линейные двухцепочечные молекулы ДНК. Как понятно специалистам в данной области техники, линейный геном, такой как аденовирусный геном, может находиться в кольцевой плазмиде, например, в целях выработки вируса.

[0261] Природные аденовирусные геномы имеют длину в диапазоне от 26 т. о. до 45 т. о. в зависимости от серотипа.

[0262] Аденовирусные векторы содержат аденовирусную ДНК, фланкируемую с обоих концов инвертированными концевыми повторами (ИКП), которые действуют как собственный праймер, стимулируя независимый от примазы синтез ДНК и облегчая интеграцию в геном хозяина. Аденовирусные геномы также содержат последовательность упаковки, которая облегчает надлежащую упаковку вирусного транскрипта и расположена в левом плече генома. Вирусные транскрипты кодируют несколько белков, включая ранние транскрипционные единицы, E1, E2, E3 и E4 и поздние транскрипционные единицы, которые кодируют структурные компоненты вириона Ad (Lee et al., *Genes Dis.*, 4(2):43-63, 2017).

[0263] Аденовирусные векторы содержат аденовирусные геномы. Рекомбинантные аденовирусные векторы представляют собой аденовирусные векторы, которые содержат рекомбинантный аденовирусный геном. Рекомбинантный аденовирусный вектор содержит генетически сконструированную форму аденовируса. Специалистам в данной области техники понятно, что в настоящей заявке описание аденовирусного вектора включает описание его аденовирусного генома, а описание аденовирусного генома включает описание аденовирусного вектора, содержащего описанный аденовирусный геном.

[0264] Аденовирус представляет собой крупный безоболочечный вирус икосаэдрической формы. Вирусный капсид содержит три типа белков, включая белки фибера, пентона и гексона. Гексон составляет большую часть вирусного капсида, образуя 20 треугольных поверхностей. Основание пентона расположено на 12 вершинах капсида, а фибер (также называемый фибером с головкой) выступает из каждого основания пентона. Эти белки, пентон и фибер, являются исключительно важными для связывания рецепторов и интернализации, поскольку они облегчают присоединение капсида к клетке-хозяину (Lee et al., *Genes Dis.*, 4(2):43-63, 2017).

[0265] Фибер Ad35 представляет собой белковый тример фибера, причем каждый белок фибера содержит N-концевой хвостовой домен, который взаимодействует с пентамерным основанием пентона, C-концевой глобулярный домен головки (головку фибера), который функционирует как сайт присоединения для рецепторов клетки-хозяина, и центральный стержневой домен, который соединяет домены хвоста и головки (стержень). Хвостовой домен тримерного фибера присоединяется к пентамерному основанию пентона в оси 5-го порядка. В различных вариантах осуществления головка фибера Ad35 содержит аминокислоты от 123 до 320 канонического белка фибера Ad35 дикого типа. В различных вариантах осуществления головка фибера Ad35 содержит по меньшей мере 60 аминокислот (например, по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120,

130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 198 аминокислот), имеющих по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) идентичности последовательности с соответствующим фрагментом аминокислот от 123 до 320 канонического белка фибера Ad35 дикого типа. В различных вариантах осуществления головка фибера сконструирована для повышения аффинности к CD46 и/или для придания большей аффинности к CD46 белку фибера, фиберу или вектору по сравнению с эталонными головкой фибера, белком фибера, фибером или вектором, содержащими канонический белок фибера Ad35 дикого типа, необязательно при этом повышение является повышением по меньшей мере в 1,1 раза, например, по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 раз. Центральный стержневой домен состоит из 5,5 β -повторов, каждый из которых содержит 15-20 аминокислот, которые кодируют две антипараллельные β -цепи, соединенные β -изгибом. β -повторы соединяются с образованием продолговатой структуры из трех переплетенных спиральных цепей, которые характеризуются высокой жесткостью и стабильностью.

[0266] Аденовирус особенно подходит для применения в качестве вектора для переноса генов из-за среднего размера своего генома, простоты обработки, высокого титра, широкого диапазона клеток-мишеней и высокой инфекционности. Оба конца вирусного генома содержат ИКП из 100-200 пар оснований, которые представляют собой цис-элементы, необходимые для репликации и упаковки вирусной ДНК. Ранняя (E) и поздняя (L) области генома содержат разные транскрипционные единицы, которые разделяются при начале репликации вирусной ДНК. Область E1 (E1A и E1B) кодирует белки, отвечающие за регуляцию транскрипции вирусного генома и некоторых клеточных генов. Экспрессия области E2 (E2A и E2B) приводит к синтезу белков для репликации вирусной ДНК. Эти белки участвуют в репликации ДНК, поздней экспрессии генов и отключении клеток-хозяев. Продукты поздних генов, включая большинство белков вирусного капсида, экспрессируются только после существенного процессинга одного первичного транскрипта, созданного главным поздним промотором (ГПП или MLP). ГПП особенно эффективен во время поздней фазы инфекции, а все мРНК, создаваемые с этого промотора, обладают тройной 5'-лидерной последовательностью (TPL), что делает их предпочтительными мРНК для трансляции.

I(A). Серотипы векторов для генной терапии

[0267] Среди аденовирусов также существует более 50 серотипов. Аденовирус типа 5 представляет собой человеческий аденовирус, для которого известно большое количество биохимической и генетической информации и который исторически применяли для большинства конструкций с использованием аденовируса в качестве

вектора. Ad5 широко использовали в исследованиях генной терапии.

[0268] При этом большинство людей имеют нейтрализующие сывороточные антитела, направленные против белков капсида Ad5, которые могут блокировать *in vivo* трансдукцию аденовирусными векторами, которые содержат капсид Ad5, такими как векторы HDAd5/35, т. е. векторы, которые содержат белки капсида Ad5 и химерные фибры Ad35. Хотя существование нейтрализующих сывороточных антител, направленных против белков капсида Ad5, не нивелирует терапевтическую значимость аденовирусных векторов, которые содержат капсиды Ad5, аденовирусные векторы, которые не содержат капсиды Ad5, обеспечили бы дополнительное преимущество, связанное со снижением общего риска клинически значимого иммуногенного ответа, в частности у субъектов, которые имеют нейтрализующие сывороточные антитела, направленные против белков капсида Ad5.

[0269] Ad35 относится к одному из наиболее редких из 57 известных человеческих серотипов с серопревалентностью < 7% и отсутствие перекрестной реактивности с Ad5. Ad35 является менее иммуногенным, чем Ad5, что частично связано с ослаблением активации Т-клеток головкой фибера Ad35. Кроме того, после внутривенной (в/в) инъекции наблюдается только минимальная трансдукция (выявляемая только ПЦР) тканей, включая печень, у трансгенных в отношении человеческого CD46 (hCD46tg) мышей и отличных от человека приматов. Векторы Ad35 первого поколения клинически использовали в целях вакцинации.

I(A)(i). Векторы Ad35 для генной терапии

[0270] Полный геном репрезентативного природного аденовируса Ad35 известен и общедоступен (смотрите, например, Gao et al., 2003 *Gene Ther.* 10(23): 1941-9; Reddy et al. 2003 *Virology* 311(2): 384-393; GenBank Accession No. AX049983). Хотя геном Ad5 составляет 35935 п. о. с содержанием G+C 55,2%, геном Ad35 составляет 34794 п. о. с содержанием G+C 48,9%. Геном Ad35 фланкируется инвертированными концевыми повторами (ИКП). В различных вариантах осуществления ИКП Ad35 содержат 137 п. о. (например, 5' Ad35, который содержит нуклеотиды 1-137 или 4-140 по номеру доступа GenBank № AX049983, и 3' ИКП, который содержит нуклеотиды 34658-34794 по номеру доступа GenBank № AX049983), что длиннее, чем в случае Ad5 (103 п. о.). В различных вариантах осуществления 5' ИКП Ad35 содержит по меньшей мере 80 нуклеотидов (например, по меньшей мере 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 нуклеотидов, например, число нуклеотидов с нижней границей 80, 90, 100, 110, 120 или 130 нуклеотидов и верхней границей 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 нуклеотидов, например, 137 нуклеотидов), имеющих по меньшей мере 80% идентичности

последовательности (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с соответствующим фрагментом из нуклеотидов 1-200 по номеру доступа GenBank № AX049983, а 3' ИКП Ad35 содержит по меньшей мере 80 нуклеотидов (например, по меньшей мере 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 нуклеотидов, например, число нуклеотидов нижней границей 80, 90, 100, 110, 120 или 130 нуклеотидов и верхней границей 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 нуклеотидов, например, 137 нуклеотидов), имеющих по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с соответствующим фрагментом из нуклеотидов 34595-34794 по номеру доступа GenBank № AX049983. В различных вариантах осуществления ИКП достаточно для одного или более из капсидирования и/или репликации Ad35. В различных вариантах осуществления последовательность ИКП Ad35 для векторов Ad35 отличается тем, что первые 8 п. о. представляют собой СТАТСТАТ, а не САТСАТСА (Wunderlich, J. Gen Viro. 95: 1574-1584, 2014).

[0271] В различных вариантах осуществления упаковка аденовирусного генома опосредована доменом *cis*-действующей последовательности упаковки, расположенным на 5' конце вирусного генома смежно с ИКП, а упаковка происходит полярным образом слева направо. Последовательность упаковки Ad35 расположена на левом конце генома с пятью-семью предполагаемыми повторами «А». В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает рекомбинантный донорный вектор или геном Ad35, который содержит последовательность упаковки Ad35. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает рекомбинантный хелперный вектор или геном Ad35, который содержит последовательность упаковки, фланкируемую сайтами рекомбиназы. В различных вариантах осуществления последовательность упаковки Ad35 относится к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотиды 138-481 по номеру доступа GenBank № AX049983, или ее фрагменту, достаточному или необходимому для упаковки вектора или генома Ad35 (например так, чтобы фланкирование последовательности сайтами рекомбиназы и вырезание путем рекомбинации сайтов рекомбиназы делало вектор или геном дефицитным по упаковке, например, по меньшей мере на 10% по сравнению с эталоном, содержащим последовательность упаковки, например, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, необязательно при этом эталон содержит последовательность упаковки, фланкируемую сайтами рекомбиназы). В различных вариантах осуществления последовательность

упаковки Ad35 содержит по меньшей мере 80 нуклеотидов (например, по меньшей мере 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275 или 300 нуклеотидов, например, число нуклеотидов с нижней границей 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 нуклеотидов и верхней границей 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275 или 300 нуклеотидов), имеющих по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с соответствующим фрагментом из нуклеотидов 137-481 по номеру доступа GenBank № AX049983.

[0272] В различных вариантах осуществления хелперный вектор Ad35 может содержать сайты рекомбиназы, вставленные, чтобы фланкировать последовательность упаковки, при этом первый сайт рекомбиназы вставлен непосредственно рядом с (например, перед или после) позицией, выбранной из промежутка между нуклеотидом 130 и нуклеотидом 400 (например, между нуклеотидами 138 и 180, 138 и 200, 138 и 220, 138 и 240, 138 и 260, 138 и 280, 138 и 300, 138 и 320, 138 и 340, 138 и 360, 138 и 366, 138 и 380 или 138 и 400), а второй сайт рекомбиназы вставлен непосредственно рядом с (например, после или перед) позицией, выбранной из промежутка между нуклеотидом 300 и нуклеотидом 550 (например, между нуклеотидами 344 и 360, 344 и 380, 344 и 400, 344 и 420, 344 и 440, 344 и 460, 344 и 480, 344 и 481, 344 и 500, 344 и 520, 344 и 540 или 344 и 550). Специалистам в данной области техники понятно, что термин последовательность упаковки не обязательно включает все элементы упаковки, присутствующие в данном векторе или геноме. Например, хелперный геном может включать прямые повторы рекомбиназы, которые фланкируют последовательность упаковки, при этом фланкируемая последовательность упаковки не содержит все элементы упаковки, присутствующие в хелперном геноме. Соответственно, в определенных вариантах осуществления один или два прямых повтора рекомбиназы хелперного генома расположены в пределах большей последовательности упаковки, например так, чтобы большая последовательность упаковки становилась непрерывной за счет внесения одного или двух прямых повторов рекомбиназы. В различных вариантах осуществления прямые повторы рекомбиназы хелперного генома фланкируют фрагмент последовательности упаковки так, чтобы вырезание фланкируемой последовательности упаковки путем рекомбинации прямых повторов рекомбиназы снижало или устраняло (в более общем случае, разрушало) упаковку хелперного генома и/или способность хелперного генома к упаковке. В качестве примера, прямые повторы (ПП) рекомбиназы расположены в пределах 550 нуклеотидов от 5' конца генома Ad35 с целью функционального разрушения сигнала упаковки Ad35, но не 5' ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления ПП

расположены ближе, чем 550 нуклеотидов от 5' конца генома Ad35, например, в пределах 540, 530, 520, 510, 500, 495, 490, 480, 470, 450, 440, 400, 380, 360 нуклеотидов или ближе чем в пределах 360 нуклеотидов от 5' конца генома Ad35, с целью функционального разрушения сигнала упаковки Ad35, но не 5' ИКП Ad35.

[0273] В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает рекомбинантный донорный вектор или геном Ad35, который содержит 5' ИКП Ad35, последовательность упаковки Ad35 и 3' ИКП Ad35. В определенных вариантах осуществления 5' ИКП Ad35, последовательность упаковки Ad35 и 3' ИКП Ad35 являются единственными фрагментами рекомбинантного донорного вектора или генома Ad35 (*например*, единственными фрагментами на протяжении 50 или на протяжении 100 пар оснований), которые получены из и/или имеют по меньшей мере 80% идентичности с каноническим геномом Ad35.

[0274] Ранние области Ad35 включают E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4. Промежуточные области Ad35 включают pIX и IVa2. Поздняя транскрипционная единица Ad35 транскрибируется с главного позднего промотора (MLP), расположенного на 16,9 единицах карты. Поздние мРНК в Ad35 можно поделить на пять семейств мРНК (L1-L5) в зависимости от того, какой сигнал поли(А) используется этими мРНК. С учетом консенсусного элемента инициации MLP и последовательностей донорного сайта сплайсинга и акцепторного сайта сплайсинга длина тройной лидерной последовательности (TPL) прогнозируемо составляет 204 нуклеотида. Первая лидерная последовательность TPL, которая примыкает к MLP, составляет в длину 45 нуклеотидов. Вторая лидерная последовательность, расположенная в пределах кодирующей области ДНК-полимеразы, составляет в длину 72 нуклеотида. Третья лидерная последовательность лежит в пределах кодирующей области концевой белка-предшественника (pTP) области E2B и составляет в длину 87 нуклеотидов. Хотя Ad5 содержит два вирус-ассоциированных (ВА) гена РНК, в геноме Ad35 находится только один вирус-ассоциированный ген РНК. Этот ВА ген РНК расположен между генами, кодирующими белок 52/55К L1 и pTP.

[0275] В конкретных вариантах осуществления вектор Ad35++ представляет собой химерный вектор с мутантной головкой фибера Ad35 (*например*, рекомбинантный вектор Ad35 с мутантной головкой фибера Ad35 или вектор Ad5/35 с мутантной головкой фибера Ad35). В конкретных вариантах осуществления геном Ad35++ представляет собой геном, который кодирует мутантную головку фибера Ad35 (*например*, рекомбинантный хелперный геном Ad35, кодирующий мутантную головку фибера Ad35, или хелперный геном Ad5/35, кодирующий мутантную головку фибера Ad35). В различных вариантах

осуществления мутантная головка фибера Ad35++ представляет собой головку фибера Ad35, мутированную для повышения аффинности к CD46, например в 25 раз, например так, чтобы мутантная головка фибера Ad35++ повышала эффективность трансдукции клеток, например, при меньшей множественности заражения (M3) (Li and Lieber, FEBS Letters, 593(24): 3623-3648, 2019).

[0276] В различных вариантах осуществления мутантная головка фибера Ad35++ содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из Ile192Val, Asp207Gly (или Glu207Gly в определенных последовательностях Ad35), Asn217Asp, Thr226Ala, Thr245Ala, Thr254Pro, Ile256Leu, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His. В различных вариантах осуществления мутантная головка фибера Ad35++ содержит каждую из следующих мутаций: Ile192Val, Asp207Gly (или Glu207Gly в определенных последовательностях Ad35), Asn217Asp, Thr226Ala, Thr245Ala, Thr254Pro, Ile256Leu, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His. В различных вариантах осуществления нумерация аминокислот фибера Ad35 приведена в соответствии с номером доступа GenBank AP_000601 или соответствующей ему аминокислотной последовательностью, например, где позиция 207 представляет собой Glu или Asp. В различных вариантах осуществления фибер Ad35 имеет аминокислотную последовательность в соответствии с номером доступа GenBank AP_000601. Дополнительное описание мутаций головки фибера Ad35++ можно найти в Wang 2008 J. Virol. 82(21): 10567-10579, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки в отношении головок фибера.

I(A)(ii). Векторы Ad5/35 для генной терапии

[0277] Векторы Ad5/35 по настоящему изобретению включают аденовирусные векторы, которые содержат полинуклеотиды капсида Ad5 и химерные полинуклеотиды фибера, содержащие головку фибера Ad35, при этом химерный полинуклеотид фибера, как правило, также содержит стержень фибера Ad35 (например, аминокислоты фибера Ad5 1-44 в комбинации с аминокислотами фибера Ad35 44-323). В различных вариантах осуществления фибер содержит мутантную головку фибера Ad35++. В различных векторах Ad5/35 по настоящему изобретению все белки за исключением доменов головки фибера и стержня получены из серотипа 5, тогда как домены головки фибера и стержень были получены из серотипа 35, а мутации, которые повышают аффинность к CD46 были внесены в головку фибера Ad35 (смотрите WO 2010/120541 A2). Дополнительно, в различных вариантах осуществления ИКП и последовательность упаковки векторов Ad5/35 получены из Ad5. (Смотрите таблицу 1 в отношении типовых мутаций головки; и Фиг. 95 в отношении общей схемы получения вектора HDAd35).

[0278] **Таблица 1: Мутированная головка Ad35 для повышения связывания с**

CD46

	Kd (Oleks)	
A1: Asn217Asp Thr245Pro Ile256Leu*	A1 4,82 нМ	Asp207Gly +++ Thr245Ala ++ Ile256Leu +
A2: <i>Asp207Gly Thr245Ala*</i>	A2 0,629 нМ	
A3: <i>Asp207Gly Thr226Ala*</i>	A3 1,407 нМ	
A8: Ile192Val Ile256Val ?	A8 13,6850 нМ	
B1: Asp207Gly*	B1 1,774 нМ	
B2: wtAd35(207Asp)	B2 14,98 нМ	
B3: Asn217Asp*	B3 16,85 нМ	
B4: Thr245Ala*	B4 7,64 нМ	
B5: Ile256Leu*	B5 10,96 нМ	
B6: Ad3	B6 отсутствие связывания	
B7: Ad11	B7 11,22 нМ	
M1: Arg279Cys**	M1 отсутствие связывания	
M3: Arg279His**	M3 отсутствие связывания	
wtAd35*	13,7 нМ	
wtAd35*	15,36 нМ	
AA: <i>Asp207Gly Thr245Ala Ile256Leu*</i>	0,943 нМ	

*Опубликовано в Wang et al. (J. Virol., 82(21):10567-10579, 2008)

**Опубликовано в Wang et al. (J. Virol. 81(23):12785-12792, 2007)

I(B). Хелпер-зависимые векторы Ad35 и Ad5/35

[0279] В общем случае путь от природного аденовирусного вектора к хелпер-зависимому аденовирусному вектору может занимать три поколения. Аденовирусные векторы первого поколения сконструированы для удаления генов E1 и E3. Без этих генов аденовирусные векторы не могут реплицироваться сами по себе, но могут быть получены в E1-экспрессирующих линиях клеток млекопитающих, таких как клетки HEK293. С одними лишь модификациями первого поколения клонирующая емкость аденовирусного вектора ограничена, а иммунный ответ хозяина против вектора может оказаться проблематичным для эффективной экспрессии нагрузки. Аденовирусные векторы второго поколения помимо удаления E1/E3 сконструированы для удаления неструктурных генов E2 и E4, что приводит к повышению емкости и снижению иммуногенности. Аденовирусный вектор третьего поколения (также называемый «выпотрошенным»

аденовирусным вектором высокой емкости или хелпер-зависимым аденовирусным вектором (HdAd)) дополнительно сконструирован для удаления всех вирусных кодирующих последовательностей и сохранения только ИКП генома и последовательности упаковки генома или ее функционального фрагмента. Поскольку эти геномы не кодируют белки, необходимые для выработки вируса, они являются хелпер-зависимыми: хелпер-зависимый геном может быть упакован в вектор только если он присутствует в клетке, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает вирусные белки, в *транс*. Эти хелпер-зависимые векторы также характеризуются еще большей емкостью и дополнительно сниженной иммуногенностью. Поскольку последовательности каждого вирусного генома являются разными по меньшей мере для каждого серотипа, соответствующие модификации, необходимые для получения хелпер-зависимого вирусного генома и/или хелперного генома для заданного серотипа, невозможно предсказать на основе доступной информации, касающейся других серотипов.

[0280] Хелпер-зависимые аденовирусные векторы (HdAd), сконструированные с отсутствием всех вирусных кодирующих последовательностей, могут эффективно трансдуцировать широкий спектр типов клеток и могут опосредовать долгосрочную экспрессию трансгена с пренебрежимо малой хронической токсичностью. Посредством удаления вирусных кодирующих последовательностей и оставления только cis-действующих элементов, необходимых для репликации (ИКП) и капсидирования (ψ) генома, снижается клеточный иммунный ответ против вектора Ad. Векторы HdAd обладают большой клонирующей емкостью до 37 т. о., что позволяет осуществлять доставку больших нагрузок. Эти нагрузки могут включать крупные терапевтические гены или даже несколько трансгенов и крупные регуляторные компоненты для повышения, продления и регуляции экспрессии трансгена. Как и в случае других аденовирусных векторов, типичный геном HdAd в целом остается эписомальным и не интегрируется в геном хозяина (Rosewell et al., J Genet Syndr Gene Ther. Suppl 5:001, 2011, doi: 10.4172/2157-7412.s5-001).

[0281] В некоторых векторных системах HdAd один вирусный геном (или хелперный геном) кодирует все белки, необходимые для репликации, но имеет кондициональный дефект в последовательности упаковки, что снижает вероятность его упаковки в вирион. Как указано выше, для этого необходима идентификация последовательности упаковки или ее обеспечивающего функциональность (например, функционально необходимого) фрагмента и модификация рассматриваемого генома таким образом, чтобы она не подавляла размножение хелперного вектора, что невозможно

установить на основании известной информации касательно других аденовирусных серотипов. Отдельный донорный вирусный геном содержит (например, содержит только) вирусные ИКП, нагрузку (например, терапевтическую нагрузку) и функциональную последовательность упаковки (например, нормальную последовательность упаковки дикого типа или ее функциональный фрагмент), что обеспечивает возможность избирательной упаковки этого донорного вирусного генома в вирусные векторы HDAd и выделения из клеток-продуцентов. Донорные векторы HDAd можно дополнительно очищать от хелперных векторов физическими способами. В общем случае в вирусных векторах HDAd и составах вирусных векторов HDAd может возникать и допускаться некоторое загрязнение хелперными векторами и/или хелперными геномами.

[0282] В некоторых векторных системах HDAd в хелперном геноме используется система Cre/loxP. В определенных таких векторных системах HDAd донорный геном HDAd содержит 500 п. о. некодирующей аденовирусной ДНК, которая содержит аденовирусные ИКП, необходимые для репликации генома, и ψ , которая представляет собой последовательность упаковки или ее функциональный фрагмент, необходимые для капсидирования генома в капсид. Также были получены данные, что геном донорного вектора HDAd может быть наиболее эффективно упакован, когда его общая длина составляет от 27,7 т. о. до 37 т. о. и может состоять, например, из терапевтической нагрузки или последовательности-«вкладыша». Донорный геном HDAd можно доставлять в клетки, такие как клетки 293 (HEK293), которые экспрессируют рекомбиназу Cre, необязательно при этом донорный геном HDAd доставляют в клетки в невирусной форме, такой как форма бактериальной плазмиды (например, когда донорный геном HDAd сконструирован в виде бактериальной плазмиды (pHDAd) и высвобождается за счет расщепления рестрикционными ферментами). Те же клетки можно трансдуцировать хелперным геномом, который может содержать вектор Ad с удалением E1, несущий последовательность упаковки или ее обеспечивающий функциональность (например, функционально необходимый) фрагмент, фланкируемые сайтами loxP, так, чтобы после инфицирования клеток 293, экспрессирующих рекомбиназу Cre, происходило вырезание последовательности упаковки или ее обеспечивающего функциональность (например, функционально необходимого) фрагмента из хелперного генома посредством Cre-опосредованной сайт-специфической рекомбинации между сайтами loxP. Таким образом, донорный геном HDAd можно трансфицировать в клетки 293 (HEK293), которые экспрессируют Cre и трансдуцированы хелперным геномом, несущим последовательность упаковки (ψ) или ее функциональный фрагмент, фланкируемые сайтами рекомбиназы (например, сайтами loxP), так чтобы вырезание ψ , опосредованное соответствующей

рекомбиназой (например, Сте-опосредованное вырезание), делало хелперный вирусный геном неупаковываемым, но способным обеспечивать все необходимые транс-действующие факторы для размножения HDAd. После вырезания последовательности упаковки или ее обеспечивающего функциональность (например, функционально необходимого) фрагмента хелперный геном становится неупаковываемым, но при этом способным проходить репликацию ДНК и, таким образом, транс-дополнять репликацию и капсидирование донорного генома HDAd. В некоторых вариантах осуществления, чтобы предотвратить генерацию компетентного по репликации Ad (RCA; E1⁺) вследствие гомологичной рекомбинации между хелперным геномом и донорным геномом HDAd, присутствующими в клетках 293 (HEK293), в область E3 можно вставлять последовательность-«вкладыш», чтобы сделать любые продукты рекомбинации E1⁺ слишком большими для упаковки. Были разработаны аналогичные системы получения HDAd с использованием FLP (например, FLP_e)/*frt* сайт-специфической рекомбинации, в которых FLP-опосредованная рекомбинация между сайтами *frt*, фланкирующими последовательность упаковки хелперного генома, обеспечивает отбор против капсидирования хелперных геномов в клетках 293 (HEK293), которые экспрессируют FLP. Были разработаны альтернативные стратегии отбора против хелперных векторов. Хелперный вирус Ad35, как правило, содержит все вирусные гены, за исключением генов из E1, поскольку экспрессионные продукты E1 могут быть обеспечены за счет комплементарной экспрессии из генома линии клеток-производителей.

[0283] Донорные векторы, донорные геномы HDAd5/35, хелперные векторы и хелперные геномы являются примерами композиций, предложенных в данном документе, и используются в различных способах по настоящему изобретению. Вектор или геном HDAd5/35 представляет собой хелпер-зависимый химерный вектор или геном Ad5/35 с головкой фибера Ad35 и стержнем Ad5. Вектор или геном HDAd5/35++ представляет собой хелпер-зависимый химерный вектор или геном Ad5/35 с мутантной головкой фибера Ad35. Этот вектор мутирован для повышения аффинности к CD46, например, в 25 раз, и повышает эффективность трансдукции клеток при более низкой множественности заражения (M3) (Li & Lieber, FEBS Letters, 593(24): 3623-3648, 2019). Хелперный вектор Ad5/35 представляет собой вектор, который содержит хелперный геном, содержащий кондиционально экспрессируемую (например, фланкируемую сайтом *frt* или сайтом *loxP*) последовательность упаковки и кодирующий все необходимые транс-действующие факторы для выработки вирионов Ad5/35, в которые может быть упакован донорный геном.

[0284] Донорные векторы, донорные геномы HDAd35, хелперные векторы и

хелперные геномы также являются примерами композиций, предложенных в данном документе, и используются в различных способах по настоящему изобретению. Вектор или геном HDAd35 представляет собой хелпер-зависимый вектор или геном Ad35. Вектор или геном HDAd35++ представляет собой хелпер-зависимый вектор или геном Ad35 с мутантной головкой фибера Ad35, которая повышает его аффинность к CD46 и повышает эффективность трансдукции клеток. Хелперный вектор Ad35 представляет собой вектор, который содержит хелперный геном, содержащий кондиционально экспрессируемую (например, фланкируемую сайтом *flr* или сайтом *loxP*) последовательность упаковки и кодирующий все необходимые транс-действующие факторы для выработки вирионов Ad35, в которые может быть упакован донорный геном. Настоящее изобретение дополнительно включает систему получения донорного вектора HDAd35, содержащую клетку, содержащую донорный геном HDAd35 и хелперный геном Ad35. В определенных таких клетках вирусные белки, кодируемые и экспрессируемые хелперным геномом, могут использоваться для выработки донорных векторов HDAd35, в которые упакован донорный геном HDAd35. Соответственно, настоящее изобретение включает способы получения донорных векторов HDAd35 путем культивирования клеток, которые содержат донорный геном HDAd35 и хелперный геном Ad35. В некоторых вариантах осуществления клетки кодируют и экспрессируют рекомбиназу, которая соответствует прямым повторам рекомбиназы, которые фланкируют последовательность упаковки хелперного вектора Ad35. В некоторых вариантах осуществления фланкируемая последовательность упаковки хелперного генома Ad35 вырезана.

[0285] В некоторых вариантах осуществления хелперный геном Ad35 кодирует все кодирующие последовательности Ad35. В некоторых вариантах осуществления хелперный геном Ad35 кодирует и/или экспрессирует все кодирующие последовательности Ad35, за исключением одной или более кодирующих последовательностей области E1, и/или кодирующей последовательности E3, и/или кодирующей последовательности E4. В различных вариантах осуществления хелперный геном, который не кодирует и/или не экспрессирует ген E1 Ad35, не кодирует и/или не экспрессирует ген E4 Ad35, необязательно при этом хелперный геном Ad35 дополнительно сконструирован содержащим кодирующую последовательность E4orf6 Ad5. В различных вариантах осуществления, как понятно специалистам в данной области техники, клетки из композиций и способов для получения донорных векторов HDAd35 могут представлять собой клетки, которые экспрессируют экспрессионный продукт E1 Ad5. В различных вариантах осуществления, как понятно специалистам в данной области техники, клетки из композиций и способов для получения донорных векторов HDAd35

могут представлять собой клетки 293 Т (НЕК293).

[0286] Хелпер может быть сконструирован из векторов дикого типа или аналогичных компетентных по размножению векторов, таких как компетентный по размножению вектор Ad5 дикого типа или вектор Ad35. Как понятно специалистам в данной области техники, одной из стратегий, которую можно использовать при конструировании хелперного вектора, является удаление или иное функциональное нарушение экспрессии гена E1. Область E1, расположенная в 5' части аденовирусных геномов, кодирует белки, необходимые для экспрессии дикого типа ранних и поздних генов. Удаление E1 снижает или устраняет экспрессию определенных вирусных генов, контролируемых E1, а хелперные вирусы с удалением E1 являются дефективными по репликации. Соответственно, хелперный вирус с отсутствием E1 можно размножать, используя линии клеток, которые экспрессируют E1. Например, если хелперный вектор Ad35 с отсутствием E1 сконструирован, чтобы кодировать E4orf6 Ad5, хелперный вектор можно размножать в линии клеток, которая экспрессирует E1 Ad5, и если хелперный вектор Ad35 с отсутствием E1 кодирует E4orf6 Ad5, хелперный вектор можно размножать в линии клеток, которая экспрессирует E1 Ad5. В случае одного типового типа клеток для получения вектора HDAd35, клетки НЕК293 экспрессируют E1b55k Ad5, который, как известно, образует комплекс с белком E4 Ad5 ORF6. В таблице 2 приведены обобщенные данные по экспрессионным продуктам, кодируемым геномом Ad35 (смотрите Gao, Gene Ther. 10:1941-1949, 2003).

[0287] **Таблица 2. Предсказанные трансляционные характеристики генома Ad35.**

Характеристики		От	До
<i>Области E1 и pIX</i>			
E1A 261R		569	1148
	Соединение	1233	1441
E1A 230R		569	1055
	Соединение	1233	1441
E1A 58R		569	640
	Соединение	1233	1337
E1B 214R (малый Т-антиген)		1611	2153
E1B 494R (крупный Т-антиген)		1916	3400
pIX		3484	3903
ОРС-1		2366	2689

Характеристики		От	До
<i>Области E2 и IVa2 (комплементарная цепь)</i>			
IVa2		5579	5590
	Соединение	3966	5300
ДНК E2B pol		5069	8437
E2B pTP		8440	10 356
E2A DBP		22 414	23 415
ОРС-2		5988	6482
ОРС-3		7847	8257
ОРС-4		15 663	15 971
ОРС-5		15 743	16 216
ОРС-6		16 457	17 041
ОРС-7		17 543	17 938
ОРС-8		17 994	18 713
ОРС-9		21 858	22 436
ОРС-10		22 128	22 502
ОРС-11		23 027	23 488
<i>Область E3</i>			
12,2 т. белок E3		27 198	27 515
15,0 т. белок E3		27 469	27 864
18,5 т. белок E3		27 849	28 349
20,3 т. белок E3		28 369	28 914
20,6 т. белок E3		28 932	29 495
15,2 т. белок E3		29 817	30 221
15,3 т. белок E3		30 214	30 621
ОРС-12		25 693	26 019
ОРС-13		27 908	28 240
<i>Область E4 (комплементарная цепь)</i>			
E4 299R		32 075	32 974
E4 145R		33 604	34 041
E4 125R		34 038	34 415
E4 117R		33 254	33 607
E4 122R		32 877	33 245
ОРС-14		33 100	33 609

Характеристики		От	До
Область ВА РНК		10 433	10 594
L-область			
52,55 т. L1		10 653	11 819
L1 Ша		11 845	13 608
L2 III (основание пентона)		13 690	15 375
L2 pVII		15 383	15 961
L2 V		16 004	17 059
L3 pVI		17 399	18 139
L3 II (гексон)		18 255	21 113
L3 23К (протеаза)		21 150	21 779
100 т. L4		23 446	25 884
22 т. L4		25 616	26 191
33 т. L4		25 616	25 934
	Соединение	26 104	26 465
L4 pVIII		26 515	27 198
L5 IV (фибер)		30 826	31 797

[0288] Настоящее изобретение включает, помимо прочего, донорные векторы и геномы HDAd35, которые содержат ИКП Ad35 (например, 5' ИКП Ad35 и 3' ИКП), например, когда два ИКП Ad35 фланкируют нагрузку. Настоящее изобретение включает, помимо прочего, донорные векторы и геномы HDAd35, которые содержат последовательность упаковки Ad35 или ее функциональный фрагмент. Настоящее изобретение включает, помимо прочего, донорные векторы и геномы HDAd35, в которых удалена E1 или ее фрагмент (например, в которых удаление E1 включает удаление нуклеотидов 481-3112 номера доступа GenBank № AX049983 или соответствующих позиций другой последовательности вектора Ad35, предложенной в данной документе). Настоящее изобретение включает, помимо прочего, векторы и геномы HDAd35, в которых удалена E3 или ее фрагмент (например, в которых удаление E3 включает удаление нуклеотидов 27609-30402 или 27435-30542 номера доступа GenBank № AX049983 или соответствующих позиций другой последовательности вектора Ad35, предложенной в данной документе).

[0289] Настоящее изобретение включает, помимо прочего, хелперные векторы и геномы Ad35, которые содержат два элемента сайтов рекомбинации, которые фланкируют последовательность упаковки или ее обеспечивающий функциональность (например, функционально необходимый) фрагмент, причем каждый элемент сайтов рекомбинации

включает сайт рекомбинации, при этом два сайта рекомбинации представляют собой сайты для одной и той же рекомбиназы. Конструкцию хелперного вектора Ad35, как было указано выше, невозможно предсказуемо сконструировать на основе существующей информации, касающейся других векторов. Наоборот, релевантные последовательности Ad35 очень отличаются от, например, соответствующих последовательностей Ad5 (сравните, например, 600 и 620 5' нуклеотидов Ad35 и Ad5). Более того, последовательность упаковки является специфической в отношении серотипа. Последовательность упаковки Ad35 содержит последовательности, которые соответствуют по меньшей мере одиночным последовательностям упаковки Ad5 AI, AII, AIII, AIV и AV. Соответственно, для получения хелперного вектора Ad35 необходимо несколько непрогнозируемых определений, включая (1) идентификацию последовательности упаковки Ad35 или ее обеспечивающей функциональность (например, функционально необходимого) фрагмента для фланкирования сайтами рекомбиназы (например, сайтами loxP) путем вставки элементов сайтов рекомбиназы в рассматриваемый геном, что непросто в случаях ограниченного сходства последовательности; (2) идентификацию вставок элементов сайтов рекомбиназы, которые не подавляют размножение хелперного вектора (в условиях, когда последовательность упаковки или ее обеспечивающий функциональность (например, функционально необходимый) фрагмент не вырезаны), что невозможно предсказать; и/или (3) идентификацию расстояния между элементами сайтов рекомбиназы, которое обеспечивает эффективное удаление последовательности упаковки или ее обеспечивающей функциональность (например, функционально необходимого) фрагмента с одновременным снижением упаковки хелперного вируса во время выработки донорных векторов HDAd35 (например, в экспрессирующей рекомбиназу сге линии клеток, такой как линия клеток 116).

[0290] Настоящее изобретение включает множество типовых хелперных векторов и геномов Ad35, которые (1) содержат сайты loxP, фланкирующие обеспечивающий функциональность или функционально необходимый фрагмент последовательности упаковки Ad35, по меньшей мере так, чтобы рекомбинация сайтов loxP, приводящая к вырезанию фланкируемой последовательности, снижала размножение вектора, например, по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (например, снижала размножение вектора на процентное значение с нижней границей 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% и верхней границей 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%), необязательно при этом процент размножения измеряют как число вирусных частиц, получаемых при

размножении вырезанного вектора (фланкируемая сайтами рекомбиназы последовательность вырезана), по сравнению с полным вектором (фланкируемая сайтами рекомбиназы последовательность не вырезана) или вектором Ad35 дикого типа в сравнимых условиях.

[0291] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 178 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 437. Вырезание фланкируемой loxP последовательности удаляет последовательности упаковки от AI до AIV. В определенных таких вариантах осуществления удаление нуклеотидов 345-3113 удаляет ген E1, а также одиночные последовательности упаковки AVI и AVII. Соответственно, фланкируемая последовательность упаковки или ее фрагмент соответствует позициям 179-344. Было показано, что векторы в соответствии с этим описанием могут размножаться.

[0292] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 178 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 481, при этом нуклеотиды 179-365 удалены (удаление последовательностей упаковки от AI до AV так, чтобы оставшиеся последовательности AVI и AVII находились в последовательности нуклеиновой кислоты, фланкируемой элементами сайтов рекомбиназы. В определенных таких вариантах осуществления удаление нуклеотидов 482-3113 удаляет ген E1. Соответственно, фланкируемая последовательность упаковки или ее фрагмент соответствует позициям 366-481. Было показано, что векторы в соответствии с этим описанием могут размножаться.

[0293] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 154 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 481. В определенных таких вариантах осуществления удаление нуклеотидов 482-3113 удаляет ген E1. Соответственно, фланкируемая последовательность упаковки или ее фрагмент соответствует позициям 155-481. Было показано, что векторы в соответствии с этим описанием могут размножаться.

[0294] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 158 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 480. Было показано, что векторы в соответствии с этим описанием могут размножаться. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27388-30402, включая область E3. В

определенных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор Ad35⁺⁺.

[0295] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 158 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 446. Было показано, что векторы в соответствии с этим описанием могут размножаться. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27388-30402, включая область E3. В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор Ad35⁺⁺.

[0296] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 179 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 480. Было показано, что векторы в соответствии с этим описанием могут размножаться. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27388-30402, включая область E3. В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор Ad35⁺⁺.

[0297] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 206 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 480. Было показано, что векторы в соответствии с этим описанием могут размножаться. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27388-30402, включая область E3. В определенных вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27607-30409 или 27609-30402. В определенных вариантах осуществления нуклеотиды 27240-27608 не удалены.

[0298] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 139 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 446. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27609-30402.

[0299] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 158 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 446. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27609-30402.

[0300] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 179 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 446. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27609-30402.

[0301] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 201 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 446. В определенных

таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27609-30402.

[0302] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 158 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 481. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27609-30402.

[0303] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 179 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 384. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27609-30402.

[0304] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 179 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 481. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27609-30402.

[0305] В по меньшей мере одном типовом хелперном векторе Ad35 элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 206 и элемент сайта рекомбиназы (например, элемент loxP) вставлен после нуклеотида 481. В определенных таких вариантах осуществления удалены нуклеотиды 27609-30402.

[0306] Дополнительным необязательным вариантом конструирования может быть конструирование хелперного генома, имеющего размер, который позволяет проводить отделение хелперного вектора от донорного вектора HDAd35 путем центрифугирования, например, путем ультрацентрифугирования CsCl. Другие способы достижения этого результата включают увеличение размера хелперного генома по сравнению с типичным геномом Ad35, который имеет длину дикого типа 34794 п.о. В частности, аденовирусные геномы можно увеличивать путем конструирования до по меньшей мере 104% длины дикого типа. Определенные хелперные векторы по настоящему изобретению содержат область E1 и область E4 Ad35, удаленную область E3 и могут содержать нагрузку и/или последовательность-вкладыш.

[0307] Хелперные векторы Ad35 можно использовать для получения донорных векторов Ad35. Получение векторов HDAd35++ может включать совместную трансфекцию плазмиды, содержащей геном вектора HDAd, и дефективного по упаковке хелперного вируса, который обеспечивает структурные и неструктурные вирусные белки. Геном хелперного вируса может сохранять размножение донорного вектора Ad35, так что донорный вектор Ad35 можно получать, например, в большом масштабе, и выделять. В данной области техники известны различные протоколы, например, в Palmer et al., 2009 Gene Therapy Protocols. Methods in Molecular Biology, Volume 433. Humana Press; Totowa,

NJ: 2009. pp. 33-53.

[0308] Настоящее изобретение включает типовые данные, демонстрирующие, что донорные векторы HDAd35 по настоящему изобретению функционируют сравнимо с донорными векторами HDAd5/35 при трансдукции человеческих CD34+ клеток согласно данным измерения процента контактировавших клеток, экспрессирующих последовательность, кодирующую GFP. Результаты были подтверждены при разных МЗ в диапазоне от 500 до 2000 векторных частиц на контактировавшую клетку. Типовые эксперименты проводили, используя донорные векторы HDAd35, используемые при генерации; типовые данные получали, используя хелперный вектор Ad35, описанный выше, в котором сайты loxP фланкируют нуклеотиды 366-481 (смотрите, например, Фиг. 117).

[0309] В данном документе предложены различные типовые донорные векторы. В настоящем изобретении предложены, в качестве неограничивающих примеров, донорные геномы HDAd35, приведенные в таблицах 3-6.

[0310] **Таблица 3: Типовой донорный вектор HDAd35 в соответствии с SEQ ID NO: 304.**

Характеристика последовательности	Позиция в SEQ ID NO: 304
Ad35 5' (включая ИКП, последовательность упаковки)	Начало: 1 Конец: 481
Прямой повтор рекомбиназы FRT	Начало: 14126 Конец: 14159 (комплементарная)
Инвертированный повтор транспозазы рТ4	Начало: 14220 Конец: 14463
Промотор EF1 α	Начало: 14491 Конец: 15825
Кассета отбора mgmt ^{P140K}	Начало: 15843 Конец: 16466
Последовательность поли-А	Начало: 16484 Конец: 16705
Инвертированный повтор транспозазы рТ4	Начало: 16735 Конец: 17000
Прямой повтор рекомбиназы FRT	Начало: 17107 Конец: 17140 (комплементарная)
Ad35 3' (включая ИКП)	Начало: 28823 Конец: 29230

[0311] **Таблица 4: Типовой донорный вектор HDAd35 в соответствии с SEQ ID NO: 305**

Характеристика последовательности	Позиция в SEQ ID NO: 305
Ad35 5' (включая ИКП, последовательность упаковки)	Начало: 1 Конец: 481

Прямой повтор рекомбиназы FRT	Начало: 14126 Конец: 14159 (комплементарная)
Инвертированный повтор транспозазы рТ4	Начало: 14220 Конец: 14463
Промотор EF1 α	Начало: 14478 Конец: 15812
Кассета отбора mgmt ^{Р140К}	Начало: 15830 Конец: 16450
Последовательность, кодирующая пептид 2А	Начало: 16451 Конец: 16522
Последовательность, кодирующая GFP	Начало: 16523 Конец: 17242
Последовательность поли-А SV40	Начало: 17269 Конец: 17390
Инвертированный повтор транспозазы рТ4	Начало: 17501 Конец: 17766
Прямой повтор рекомбиназы FRT	Начало: 17873 Конец: 17906 (комплементарная)
Ad35 3' (включая ИКП)	Начало: 29589 Конец: 29996

[0312] Таблица 5: Типовой донорный вектор HDAd35 в соответствии с SEQ ID NO: 288.

Характеристика последовательности	Позиция в SEQ ID NO: 288
Ad35 5' (включая ИКП, последовательность упаковки)	Начало: 1 Конец: 481
Прямой повтор рекомбиназы FRT	Начало: 14126 Конец: 14159 (комплементарная)
Инвертированный повтор транспозазы рТ4	Начало: 14220 Конец: 14463
Промотор EF1 α	Начало: 14478 Конец: 15812
Кассета отбора mgmt ^{Р140К}	Начало: 15830 Конец: 16450
Последовательность, кодирующая пептид 2А	Начало: 16451 Конец: 16522
Последовательность, кодирующая mCherry	Начало: 16526 Конец: 17230
Последовательность поли-А SV40	Начало: 17259 Конец: 17380
Инвертированный повтор транспозазы рТ4	Начало: 17491 Конец: 17756
Прямой повтор рекомбиназы FRT	Начало: 17863 Конец: 17896 (комплементарная)
Ad35 3' (включая ИКП)	Начало: 29579 Конец: 29986

[0313] Таблица 6: Типовой поддерживающий вектор в соответствии с SEQ ID NO: 289.

Характеристика последовательности	Позиция в SEQ ID NO: 289
-----------------------------------	--------------------------

Ad35 5' (включая ИКП, последовательность упаковки)	Начало: 1 Конец: 481
Промотор PGK	Начало: 14103 Конец: 14614
Последовательность, кодирующая транспозазу SB100x	Начало: 14763 Конец: 15785
Последовательность поли-А BGH	Начало: 15811 Конец: 16128
Последовательность поли-А В-глобина	Начало: 16088 Конец: 16376 (комплементарная)
Последовательность, кодирующая рекомбиназу Flpe	Начало: 16488 Конец: 17759 (комплементарная)
Промотор EF1 α	Начало: 17780 Конец: 18895 (комплементарная)
Ad35 3' (включая ИКП)	Начало: 29751 Конец: 30158

[0314] Таблица 7: Типовой хелперный вектор Ad35 в соответствии с SEQ ID

NO: 286

Характеристика последовательности	Позиция в SEQ ID NO: 286
Ad35 5' (включая ИКП) (Ad35, нт 1-178)	Начало: 2582 Конец: 2759
Сайт рекомбиназы LoxP	Начало: 2768 Конец: 2801
Последовательность упаковки Ad35 (Ad35, нт 179-344)	Начало: 2808 Конец: 2973
Сайт рекомбиназы LoxP	Начало: 2974 Конец: 3007
Последовательность Ad35 (Ad35, нт 3112-27435)	Начало: 3016 Конец: 27338
Последовательность лямбда-1	Начало: 27393 Конец: 29862 (комплементарная)
Последовательность поли-А BGH	Начало: 30176 Конец: 30390
Последовательность, кодирующая CopGFP	Начало: 30415 Конец: 31080 (комплементарная)
Промотор CMV	Начало: 31127 Конец: 31779 (комплементарная)
Последовательность лямбда-2	Начало: 31831 Конец: 33360
Последовательность Ad35 (Ad35, нт 30544-31879)	Начало: 33421 Конец: 34756
Последовательность E4orf6 Ad5	Начало: 34752 Конец: 35866

Ad35 3' (включая ИКП) (Ad35, нт 32972-34794)	Начало: 35864 Конец: 37686
--	----------------------------

[0315] **Таблица 8: Типовой хелперный вектор Ad35 в соответствии с SEQ ID NO: 51.**

Характеристика последовательности	Позиция в SEQ ID NO: 51
Ad35 5' (включая ИКП) (Ad35, нт 1-178)	Начало: 2582 Конец: 2759
Сайт рекомбиназы LoxP	Начало: 2768 Конец: 2801
Последовательность упаковки Ad35 (Ad35, нт 366-481)	Начало: 2808 Конец: 2923
Сайт рекомбиназы LoxP	Начало: 2924 Конец: 2957
Последовательность Ad35 (Ad35, нт 3112-2743)	Начало: 2966 Конец: 27288
Последовательность лямбда-1	Начало: 27343 Конец: 29812 (комплементарная)
Последовательность поли-А BGH	Начало: 30126 Конец: 30340
Последовательность, кодирующая CopGFP	Начало: 30365 Конец: 31030 (комплементарная)
Промотор CMV	Начало: 31077 Конец: 31729 (комплементарная)
Последовательность лямбда-2	Начало: 31781 Конец: 33310
Последовательность Ad35 (Ad35, нт 30544-31879)	Начало: 33371 Конец: 34706
Последовательность E4orf6 Ad5	Начало: 34702 Конец: 35816
Ad35 3' (включая ИКП) (Ad35, нт 32972-34794)	Начало: 35814 Конец: 37636

[0316] **Таблица 9: Типовой хелперный вектор Ad35 в соответствии с SEQ ID NO: 52.**

Характеристика последовательности	Позиция в SEQ ID NO: 52
Ad35 5' (включая ИКП) (Ad35, нт 1-154)	Начало: 2582 Конец: 2735
Сайт рекомбиназы LoxP	Начало: 2744 Конец: 2777
Последовательность упаковки Ad35 (Ad35, нт 155-481)	Начало: 2784 Конец: 3110
Сайт рекомбиназы LoxP	Начало: 3111 Конец: 3144
Последовательность Ad35 (Ad35, нт 3112-	Начало: 3153 Конец: 27475

27435)	
Последовательность лямбда-1	Начало: 27530 Конец: 29999 (комплементарная)
Последовательность поли-А BGH	Начало: 30313 Конец: 30527
Последовательность, кодирующая CopGFP	Начало: 30552 Конец: 31217 (комплементарная)
Промотор CMV	Начало: 31264 Конец: 31916 (комплементарная)
Последовательность лямбда-2	Начало: 31968 Конец: 33497
Последовательность Ad35 (Ad35, нт 30544-31879)	Начало: 33558 Конец: 34893
Последовательность E4orf6 Ad5	Начало: 34889 Конец: 36003
Ad35 3' (включая ИКП) (Ad35, нт 32972-34794)	Начало: 36001 Конец: 37823

И(С). Нагрузка векторов для генной терапии

[0317] Донорные векторы и геномы Ad35 и Ad5/35 по настоящему изобретению могут содержать ряд нагрузок нуклеиновой кислоты, которые могут содержать одну или более кодирующих последовательностей, которые кодируют один или более экспрессионных продуктов, одну или более регуляторных последовательностей, функционально связанных с кодирующей последовательностью, одну или более последовательностей-вкладышей и т. п. В различных вариантах осуществления нагрузка сконструирована так, чтобы обеспечить необходимый результат, такой как терапевтический эффект в клетке-хозяине или системе, например, экспрессию представляющего терапевтический интерес белка или экспрессию системы редактирования генов, например, системы CRISPR/Cas или системы редактирования оснований, для создания представляющей терапевтический интерес модификации последовательности. В некоторых вариантах осуществления нагрузка может содержать ген. Ген может содержать не только кодирующие последовательности, но также регуляторные области, такие как промоторы, энхансеры, области терминации, области контроля локусов (LCR), элементы сигналов терминации и полиаденилирования, элементы сигналов сплайсинга и т. п. Этот термин дополнительно может включать все интроны и другие последовательности ДНК, сплайсируемые с мРНК-транскрипта, наряду с вариантами, образуемыми как результат сайтов альтернативного сплайсинга. Последовательности также могут включать вырожденные кодоны эталонной последовательности или последовательности, которые можно вносить для обеспечения

неслучайного использования кодонов в конкретном организме или типе клеток.

[0318] Нагрузка может содержать один ген или несколько генов. Нагрузка может содержать одну регуляторную последовательность или множество регуляторных последовательностей. Нагрузка может содержать одну кодирующую последовательность или множество кодирующих последовательностей. Нагрузка может содержать множество кодирующих последовательностей, когда индивидуальные экспрессионные продукты кодирующих последовательностей функционируют вместе, например, как в случае эндонуклеазы и гидовой РНК, или независимо, например, как два отдельных белка, которые не связываются ни напрямую, ни не напрямую. В некоторых случаях множество кодирующих последовательностей могут функционировать совместно, например, когда эндонуклеаза и гидовая РНК приводят к повышению экспрессии кодирующей последовательности, эндогенной для клетки-хозяина или системы, а нагрузка дополнительно кодирует и экспрессирует белок, обладающий по меньшей мере одним видом биологической активности, соответствующей таковой белка, кодируемого эндогенной кодирующей последовательностью. Как понятно специалистам в данной области техники, любые предложенные в данном документе кодируемые нагрузкой экспрессионные продукты, которые не кодируются каноническим геномом Ad35 дикого типа, могут называться гетерологичным экспрессионным продуктом.

I(C)(i). Экспрессионные продукты нагрузки

[0319] Нагрузка аденовирусного донорного вектора или аденовирусного донорного генома по настоящему изобретению может содержать одну или более кодирующих последовательностей, которые кодируют любой из ряда экспрессионных продуктов. Типовые экспрессионные продукты включают белки, в том числе, без ограничения, белки для заместительной терапии для лечения заболеваний или состояний, характеризующихся низкой экспрессией или активностью биологически активного белка по сравнению с эталонным уровнем. Типовые экспрессионные продукты включают системы CRISPR/Cas и редакторов оснований. Типовые экспрессионные продукты включают антитела, CAR и TCR. Типовые экспрессионные продукты включают малые РНК. В различных вариантах осуществления интеграция всей или части нагрузки донорного вектора в геном клетки-хозяина не является необходимой для доставки в клетку-мишень донорного вектора или генома для осуществления предполагаемого или целевого эффекта, например, в определенных случаях, в которых предполагаемый или целевой эффект включает редактирование генома клетки-хозяина системой CRISPR или системой редактора оснований. В различных вариантах осуществления интеграция всей или части нагрузки донорного вектора в геном клетки-хозяина является необходимой или предпочтительной

для доставки в клетку-мишень донорного вектора или генома для осуществления предполагаемого или целевого эффекта, например, когда экспрессия кодируемого нагрузкой экспрессионного продукта необходима в дочерних клетках трансдуцированной клетки-мишени. В различных вариантах осуществления нагрузка может содержать последовательность нуклеиновой кислоты для интеграции в геном клетки-хозяина («элемент интеграции»), например, путем рекомбинации или транспозиции.

[0320] Генную последовательность, кодирующую один или более терапевтических белков, легко можно получить синтетическими или рекомбинантными методами из релевантной аминокислотной последовательности. В конкретных вариантах осуществления генная последовательность, кодирующая любую из этих последовательностей, также может иметь один или более сайтов рестрикционных ферментов на 5' и/или 3' концах кодирующей последовательности с целью обеспечения простоты вырезания и замещения генной последовательности, кодирующей последовательность, другой генной последовательностью, кодирующей отличную последовательность. В конкретных вариантах осуществления генная последовательность, кодирующая последовательности, может быть кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих.

[0321] Конкретные примеры терапевтических генов и/или генных продуктов включают γ -глобин, фактор VIII, γ C, JAK3, IL7RA, RAG1, RAG2, DCLRE1C, PRKDC, LIG4, NHEJ1, CD3D, CD3E, CD3Z, CD3G, PTPRC, ZAP70, LCK, AK2, ADA, PNP, WHN, CHD7, ORA11, STIM1, CORO1A, CIITA, RFXANK, RFX5, RFXAP, RMRP, DKC1, TERT, TINF2, DCLRE1B и SLC46A1; гены семейства FANC, включая FancA, FancB, FancC, FancD1 (BRCA2), FancD2, FancE, FancF, FancG, FancI, FancJ (BRIP1), FancL, FancM, FancN (PALB2), FancO (RAD51C), FancP (SLX4), FancQ (ERCC4), FancR (RAD51), FancS (BRCA1), FancT (UBE2T), FancU (XRCC2), FancV (MAD2L2), and FancW (RFD3); растворимый CD40; CTLA; Fas L; антитела к CD4, CD5, CD7, CD52 и т. д.; антитела к IL1, IL2, IL6; антитело к TCR, специфически присутствующему на аутореактивных Т-клетках; IL4; IL10; IL12; IL13; IL1Ra, sIL1RI, sIL1RII; sTNFR1; sTNFR2; антитела к TNF; P53, PTPN22 и DRB1*1501/DQB1*0602; гены семейства глобинов; WAS; phox; дистрофин, пируваткиназу; CLN3; ABCD1; арилсульфатазу А; SFTPВ; SFTPС; NLX2.1; ABCA3; GATA1; гены рибосомального белка; TERT; TERC; DKC1; TINF2; CFTR; LRRK2; PARK2; PARK7; PINK1; SNCA; PSEN1; PSEN2; APP; SOD1; TDP43; FUS; убиквитин 2; C9ORF72 и другие терапевтические гены, описанные в данном документе.

[0322] Терапевтический ген может быть выбран так, чтобы обеспечивать терапевтически эффективный ответ против заболеваний, связанных с красными клетками

крови и свертыванием. В конкретных вариантах осуществления заболевание представляет собой гемоглобинопатию, такую как талассемия или серповидно-клеточная анемия/характеристика. Терапевтический ген может представлять собой, например, ген, который индуцирует или повышает выработку гемоглобина; индуцирует или повышает выработку β -глобина, γ -глобина или α -глобина; или повышает доступность кислорода для клеток в организме. Терапевтический ген может представлять собой, например, HBB или CYP5R3. Типовые эффективные варианты лечения могут, например, повышать число клеток крови, улучшать функцию клеток крови или повышать насыщение клеток кислородом у пациентов. В другом конкретном варианте осуществления заболевание представляет собой гемофилию. Терапевтический ген может представлять собой, например, ген, который повышает выработку фактора коагуляции/свертывания VIII или фактора коагуляции/свертывания IX, обуславливает выработку нормальных версий фактора коагуляции VIII или фактора коагуляции IX, ген, который снижает выработку антител к фактору коагуляции/свертывания VIII или фактору коагуляции/свертывания IX, или ген, который обуславливает надлежащее образование тромбов. Типовые терапевтические гены включают F8 и F9. Типовые эффективные варианты лечения могут, например, повышать или индуцировать выработку факторов коагуляции/свертывания VIII и IX; улучшать функционирование факторов коагуляции/свертывания VIII и IX или снижать время свертывания у субъектов.

[0323] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения донорный вектор кодирует ген глобина, причем белок глобина, кодируемый геном глобина, выбран из γ -глобина, β -глобина и/или α -глобина. Гены глобина по настоящему изобретению могут содержать, например, одну или более регуляторных последовательностей, таких как промотор, функционально связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок глобина. Как понятно специалистам в данной области техники, каждый из γ -глобина, β -глобина и/или α -глобина является компонентом фетального и/или взрослого гемоглобина и, следовательно, применим в различных векторах, описанных в данном документе.

[0324] В различных вариантах осуществления повышение экспрессии белка глобина может относиться к одному или более из (i) повышения количества, концентрации или экспрессии (например, транскрипции или трансляции кодирующих нуклеиновых кислот) в клетке или системе белка глобина, имеющего конкретную последовательность; (ii) повышения количества, концентрации или экспрессии (например, транскрипции или трансляции кодирующих нуклеиновых кислот) в клетке или системе белка глобина конкретного типа (например, общего количества всех белков, которые

могут быть идентифицированы как γ -глобин (или, в альтернативном варианте, β -глобин или α -глобин) специалистами в данной области техники или как указано в настоящем описании), не принимая во внимание последовательности белков относительно друг друга; и/или (iii) экспрессии в клетке или системе гетерологичного белка глобина, например, белка глобина, не кодируемого клеткой-хозяином до генной терапии.

[0325] В следующих ссылках описаны конкретные типовые последовательности функциональных генов глобина. Ссылки 1-4 относятся к последовательностям глобина α -типа, а ссылки 4-12 относятся к последовательностям глобина β -типа (включая последовательности β и γ глобина), причем эти последовательности включены в данный документ посредством ссылки: (1) номер доступа GenBank № Z84721 (Mar. 19, 1997); (2) Номер доступа GenBank № NM_000517 (Oct. 31, 2000); (3) Hardison et al., J. Mol. Biol. (1991) 222(2):233-249; (4) A Syllabus of Human Hemoglobin Variants (1996), авторства Titus et al., опубликовано The Sickle Cell Anemia Foundation in Augusta, Ga. (онлайн-доступ на globin.cse.psu.edu); (5) номер доступа GenBank № J00179 (Aug. 26, 1993); (6) Tagle et al., Genomics (1992) 13(3):741-760; (7) Grosveld et al., Cell (1987) 51(6):975-985; (8) Li et al., Blood (1999) 93(7):2208-2216; (9) Gorman et al., J. Biol. Chem. (2000) 275(46):35914-35919; (10) Slightom et al., Cell (1980) 21(3):627-638; (11) Fritsch et al., Cell (1980) 19(4): 959-972; (12) Marotta et al., J. Biol. Chem. (1977) 252(14):5040-5053. Информацию по дополнительным кодирующим и не кодирующим областям генов, кодирующих глобин, смотрите, например, в Marotta et al., Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 19, 165-175, 1976, Lawn et al., Cell 21 (3), 647-651, 1980, и Sadelain et al., PNAS.; 92:6728-6732, 1995.

[0326] Типовая аминокислотная последовательность субъединицы β гемоглобина приведена, например, по номером доступа NCBI № P68871. Типовая аминокислотная последовательность β -глобина приведена, например, по номером доступа NCBI № NP_000509.

[0327] Помимо терапевтических генов и/или генных продуктов трансген также может кодировать терапевтические молекулы, такие как реагенты ингибиторов контрольных точек, молекулы химерных антигенных рецепторов, специфические к одному или более раковым антигенам, и/или T-клеточные рецепторы, специфические к одному или более раковым антигенам.

[0328] В другом примере терапевтический ген может быть выбран так, чтобы обеспечивать терапевтически эффективный ответ против лизосомной болезни накопления. В конкретных вариантах осуществления лизосомное расстройство накопления представляет собой мукополисахаридоз (МПС) типа I; МПС II или синдром Хантера; МПС III или синдром Санфилиппо; МПС IV или синдром Моркио; МПС V; МПС VI или

синдром Марото - Лами; МПС VII или синдром Слая; α -маннозидоз; β -маннозидоз; болезнь накопления гликогена типа I, также известную как БНГ1, болезнь фон Гирке или болезнь Тея - Сакса; болезнь Помпе; болезнь Гоше; болезнь Фабри. Терапевтический ген может представлять собой, например, ген, кодирующий или индуцирующий выработку фермента, или который иным образом вызывает деградацию мукополисахаридов в лизосомах. Типовые терапевтические гены включают IDUA или идуронидазу, IDS, GNS, HGSNAT, SGSH, NAGLU, GUSB, GALNS, GLB1, ARSB и HYAL1. Типовые эффективные генетические терапевтические средства для лизосомных расстройств накопления могут, например, кодировать или индуцировать выработку фермента, отвечающего за деградацию различных веществ в лизосомах; снижать, устранять, предотвращать или задерживать набухание в различных органах, включая голову (напр., макроцефалия), печень, селезенку, язык или голосовые связки; уменьшать количество жидкости в головном мозге; уменьшать аномалии сердечных клапанов; предотвращать сужение дыхательных путей или расширять их и предотвращать связанные с этим респираторные состояния, такие как инфекции и апноэ во время сна; снижать, устранять, предотвращать или задерживать разрушение нейронов и/или связанных симптомов.

[0329] В другом примере терапевтический ген может быть выбран так, чтобы обеспечивать терапевтически эффективный ответ против гиперпролиферативного заболевания. В конкретных вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой рак. Терапевтический ген может представлять собой, например, ген опухолевого супрессора, ген, который индуцирует апоптоз, ген, кодирующий фермент, ген, кодирующий антитело, или ген, кодирующий гормон. Типовые терапевтические гены и генные продукты включают (в дополнение к перечисленным в другом месте данного документа) 101F6, 123F2 (RASSF1), 53BP2, abl, ABLI, ADP, aFGF, APC, ApoAI, ApoAIV, ApoE, ATM, BAI-1, BDNF, бета*(BLU), bFGF, BLC1, BLC6, BRCA1, BRCA2, CBFA1, CBL, C-CAM, CNTF, COX-1, CSFIR, CTS-1, цитозиндезаминазу, DBCCR-1, DCC, Dp, DPC-4, E1A, E2F, EBRB2, erb, ERBA, ERBB, ETS1, ETS2, ETV6, Fab, FCC, FGF, FGR, FHIT, fms, FOX, FUS1, FYN, G-CSF, GDAIF, Gene 21 (NPRL2), Gene 26 (CACNA2D2), GM-CSF, GMF, gsp, HCR, HIC-1, HRAS, hst, IGF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, ING1, интерферон α , интерферон β , интерферон γ , IRF-1, JUN, KRAS, LUCA-1 (HYAL1), LUCA-2 (HYAL2), LYN, MADH4, MADR2, MCC, mda7, MDM2, MEN-I, MEN-II, MLL, MMAC1, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, neu, NF-1, NF-2, NGF, NOEY1, NOEY2, NRAS, NT3, NT5, OVCA1, p16, p21, p27, p57, p73, p300, PGS, PIM1, PL6, PML, PTEN, raf, Rap1A, ras, Rb, RB1, RET, rks-3, ScFv, scFV ras, SEM A3, SRC, TALI, TCL3, TFPI, тромбоспондин, тимидинкиназу, TNF, TP53, trk, T-VEC, VEGF, VHL, WT1, WT-1, YES и

zas1. Типовые эффективные генетические терапевтические средства могут подавлять или устранять опухоли, приводить к уменьшению числа раковых клеток, снижению размера опухолей, замедлять или устранять рост опухолей или облегчать симптомы, вызванные опухолями.

[0330] В другом примере терапевтический ген может быть выбран так, чтобы обеспечивать терапевтически эффективный ответ против инфекционного заболевания. В конкретных вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой вирус иммунодефицита человека (ВИЧ или HIV). Терапевтический ген может представлять собой, например, ген, придающий иммунным клеткам резистентность к инфекции ВИЧ, или который делает иммунные клетки способными эффективно нейтрализовать вирус посредством иммунного восстановления, полиморфизмы генов, кодирующих белки, экспрессируемые иммунными клетками, гены, обеспечивающие преимущество в борьбе с инфекцией, которые не экспрессируются в организме пациента, гены, кодирующие инфекционный агент, рецептор или корецептор; ген, кодирующий лиганды для рецепторов или корецепторов; вирусные и клеточные гены, важные для вирусной репликации, включая ген, кодирующий рибозимы, антисмысловую РНК, малую интерферирующую РНК (миРНК) или РНК-ловушку для блокирования действия определенных транскрипционных факторов; ген, кодирующий доминантно-негативные вирусные белки, внутриклеточные антитела, интракины и суицидальные гены. Типовые терапевтические гены и генные продукты включают $\alpha 2\beta 1$; $\alpha \nu \beta 3$; $\alpha \nu \beta 5$; $\alpha \nu \beta 63$; BOB/GPR15; Bonzo/STRL-33/TYMSTR; CCR2; CCR3; CCR5; CCR8; CD4; CD46; CD55; CXCR4; аминокептидазу-N; HHV-7; ICAM; ICAM-1; PRR2/HveB; HveA; α -дистрогликан; LDLR/ $\alpha 2$ MR/LRP; PVR; PRR1/HveC; и рецептор ламинина. Терапевтически эффективное количество для лечения ВИЧ, например, может повышать иммунитет субъекта против ВИЧ, ослаблять симптом, связанный со СПИДом или ВИЧ, или индуцировать у субъекта врожденный или адаптивный иммунный ответ против ВИЧ. Иммунный ответ против ВИЧ может включать выработку антител и приводить к предотвращению СПИДа и/или ослаблять симптом СПИДа или ВИЧ-инфекции субъекта или снижать или устранять инфекционность и/или вирулентность ВИЧ.

[0331] В различных вариантах осуществления вектор или геном по настоящему изобретению например, хелперный вектор Ad35 или хелперный геном Ad35, кодирует и/или экспрессирует анти-CRISPR (Acr) белок, например, полученный из фага, который ингибирует нормальную активность CRISPR/Cas.

I(C)(i)(a). Связывающий домен, антитело, CAR и TCR как экспрессионные продукты нагрузки

[0332] Настоящее изобретение включает ряд связывающих доменов. Антитела являются одним из примеров связывающих доменов и включают цельные антитела или связывающие фрагменты антител, например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, и их одноцепочечные (sc) формы и фрагменты (например, scFv), которые специфически связываются с клеточным маркером. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут включать все или часть поликлональных антител, моноклональных антител, человеческих антител, гуманизированных антител, синтетических антител, нечеловеческих антител, рекомбинантных антител, химерных антител, биспецифических антител, мини-тел и линейных антител. Их функциональные фрагменты включают однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VHH) нанотела верблюдов и т. п.

[0333] В некоторых случаях scFv можно получать в соответствии со способами, известными в данной области техники (смотрите, например, Bird et al., Science 242:423-426, 1988; и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Молекулы scFv можно получать путем связывания областей антитела VL и VH, используя гибкие полипептидные линкеры. При применении короткого полипептидного линкера (например, 5-10 аминокислот) можно предотвратить внутрицепочечное сворачивание. Внутрицепочечное сворачивание также необходимо для того, чтобы соединить вместе две переменные области с образованием функционального сайта связывания эпитопа. Примеры ориентации и размеров линкеров смотрите, например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, US 2005/0100543, US 2005/0175606, US 2007/0014794, WO2006/020258 и WO2007/024715.

[0334] scFv может содержать линкер из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более аминокислотных остатков между областями VL и VH. В конкретных вариантах осуществления линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В общем случае линкерные последовательности, которые используют для соединения VL и VH в scFv, имеют длину от пяти до 35 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления VL-VH линкер содержит от пяти до 35, от десяти до 30 аминокислот или от 15 до 25 аминокислот. Вариации длины линкера могут сохранять или повышать активность, обуславливая превосходную эффективность в исследованиях активности.

[0335] В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность scFv содержит аминокислоты глицин и серин. В конкретных вариантах осуществления линкерная последовательность содержит группы глициновых и сериновых повторов, например, от одного до десяти повторов (GlyxSery)_n, где x и y независимо представляют

собой целое число от 0 до 10 при условии, что x и y оба не равны 0, а n представляет собой целое число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10), и при этом связанные области VH-VL образуют функциональный иммуноглобулин-подобный связывающий домен (например, scFv, scTCR). Конкретные примеры включают $(\text{Gly4Ser})_n$, $(\text{Gly3Ser})_n(\text{Gly4Ser})_n$, $(\text{Gly3Ser})_n(\text{Gly2Ser})_n$, $(\text{Gly3Ser})_n(\text{Gly4Ser})_1$, $(\text{Gly4Ser})_1$, $(\text{Gly3Ser})_1$ или $(\text{Gly2Ser})_1$. В конкретных вариантах осуществления линкер представляет собой $(\text{Gly4Ser})_4$ или $(\text{Gly4Ser})_3$. Как указано посредством ссылки на scTCR выше, такие линкеры также можно использовать для связывания цепей $V\alpha/\beta$ и $C\alpha/\beta$ T-клеточного рецептора (например, $V\alpha$ - $C\alpha$, $V\beta$ - $C\beta$, $V\alpha$ - $V\beta$).

[0336] Дополнительные примеры включают грабателя на основе scFv- и антитела на основе растворимого домена VH. Эти антитела образуют связывающие области с использованием только переменных областей тяжелой цепи. Смотрите, например, Jespers et al., *Nat. Biotechnol.* 22:1161, 2004; Cortez-Retamozo et al., *Cancer Res.* 64:2853, 2004; Baral et al., *Nature Med.* 12:580, 2006; и Barthelemy et al., *J. Biol. Chem.* 283:3639, 2008.

[0337] В некоторых случаях предпочтительно, чтобы связывающий домен был получен от того же вида, в котором он в конечном итоге будет использоваться. Например, в случае применения для людей может быть предпочтительно, чтобы антигенсвязывающий домен включал человеческое антитело, гуманизованное антитело или их фрагмент или сконструированную форму. Антитела человеческого происхождения или гуманизованные антитела имеют сниженную или отсутствующую иммуногенность для людей и имеют меньшее число неиммуногенных эпитопов по сравнению с нечеловеческими антителами. Антитела и их сконструированные фрагменты в общем случае выбирают так, чтобы они имели сниженный уровень антигенности или не имели антигенности в организме субъектов-людей.

[0338] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен включает гуманизованное антитело или его сконструированный фрагмент. В конкретных вариантах осуществления нечеловеческое антитело является гуманизованным, при этом один или более аминокислотных остатков антитела модифицированы для повышения сходства с антителом, которое естественным образом вырабатывается у человека, или его фрагментом. Эти аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называются «импортированными» остатками, которые обычно взяты из «импортированного» переменного домена. Как предложено в данном документе, гуманизованные антитела или фрагменты антител включают одну или более CDR из молекул иммуноглобулина и каркасных областей нечеловеческого происхождения,

причем аминокислотные остатки, содержащие каркасную область, полностью или большей частью получены из зародышевой линии человека. В одном аспекте антигенсвязывающий домен является гуманизированным. Гуманизированное антитело можно получить с помощью ряда методик, известных в данной области техники, включая прививание CDR (смотрите, например, Европейский патент № EP 239400; WO 91/09967; и US 5225539, US 5530101 и US 5585089), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (смотрите, например, EP 592106 и EP 519596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; и Roguska et al., *PNAS*, 91:969-973, 1994), перетасовку цепей (смотрите, например, US 5565332) и методики, описанные, например, в US 2005/0042664, US 2005/0048617, US 6407213, US 5766886, WO 9317105, Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25, 2002, Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60, 2000, Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79, 2000, Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16): 10678-84, 1997, Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904, 1996, Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s, 1995, Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22, 1995, Sandhu, *Gene*, 150(2):409-10, 1994, и Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73, 1994. Часто каркасные остатки в каркасных областях замещают соответствующим остатком из антитела-донора CDR для изменения, например улучшения, связывания с клеточным маркером. Эти каркасные замещения идентифицируют методами, хорошо известными в данной области техники, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для идентификации каркасных остатков, важных для связывания с клеточным маркером, и сравнения последовательностей для определения необычных каркасных остатков в конкретных позициях. (Смотрите, например, US 5585089; и Riechmann et al., *Nature*, 332:323, 1988).

[0339] Антитела и другие связывающие домены, которые специфически связывают конкретный клеточный маркер, можно получать, используя методы получения моноклональных антител, методы фагового дисплея, методы генерации человеческих или гуманизированных антител или методы с использованием трансгенного животного или растения, сконструированного для выработки антител, как известно специалистам в данной области техники (смотрите, например, US 6291161 и US 6291158). Библиотеки фагового дисплея частично или полностью синтетических антител находятся в общем доступе и по ним можно проводит скрининг в отношении антитела или его фрагмента, которые могут связываться с клеточным маркером. Например, связывающие домены можно идентифицировать путем скрининга фаговой библиотеки Fab в отношении фрагментов Fab, которые связываются с представляющим интерес клеточным маркером (смотрите Hoet et al., *Nat. Biotechnol.* 23:344, 2005). Библиотеки фагового дисплея

человеческих антител также находятся в общем доступе. В дополнение, для разработки связывающих доменов можно использовать традиционные стратегии создания гибридомы, используя представляющий интерес клеточный маркер в качестве иммуногена в удобных системах (например, мышах, HuMAb mouse® (GenPharm Int'l. Inc., Mountain View, CA), TC mouse® (Kirin Pharma Co. Ltd., Tokyo, JP), KM-mouse® (Medarex, Inc., Princeton, NJ), ламах, курах, крысах, хомяках, кроликах и т. д.). В конкретных вариантах осуществления антитела специфически связываются с клеточным маркером, экспрессируемым преимущественно конкретным типом раковых клеток, и перекрестно не реагируют с неспецифическими компонентами или неродственными мишенями. После идентификации можно проводить выделение и/или определение аминокислотной последовательности антитела и генной последовательности, кодирующей антитело.

[0340] В конкретных вариантах осуществления терапевтический ген может кодировать антитело или связывающий фрагмент антитела, такой как Fab или scFv. Типовые антитела (включая scFv), которые можно экспрессировать, включают представленные и описанные в WO2014/164553A1, US2017/0283504, US 7,083,785, US 10,189,906, US 10,174,095, WO2005102387, US2011/0206701A1, WO2014/179759A1, US2018/0037651A1, US2018/0118822A1, WO2008/047242A2, WO1996/016990A1, WO200/5103083A2 и WO1999/062526A2. Также можно использовать антитела, описанные выше в отношении связывающих доменов, а также атезолизумаб, блинатумомаб, брентуксимаб, цетуксимаб, цирмтузумаб, фарлетузумаб, гемтузумаб, ОКТ3, ореговомаб, промиксимаб, пембролизумаб и трастузумаб.

[0341] Также можно использовать ингибиторы иммунных контрольных точек. Ингибиторы иммунных контрольных точек относятся к соединениям, которые ингибируют функцию иммуноингибирующего белка контрольной точки. Ингибирование включает снижение функции и полную блокировку. Предпочтительные ингибиторы иммунных контрольных точек представляют собой антитела, которые специфически распознают белки иммунных контрольных точек. Известен ряд ингибиторов иммунных контрольных точек, а по аналогии с этими известными ингибиторами белков иммунных контрольных точек могут быть разработаны альтернативные ингибиторы иммунных контрольных точек в (ближайшем) будущем. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают пептиды, антитела, молекулы нуклеиновых кислот и малые молекулы. В конкретных вариантах осуществления ингибиторы иммунных контрольных точек повышают пролиферацию, миграцию, персистенцию и/или цитотоксическую активность CD8⁺ Т-клеток у субъекта и, в частности, опухоль-инфильтрирующих CD8⁺ Т-клеток у субъекта. Другой типовой ингибитор иммунных контрольных точек включает ингибитор

контрольных точек, описанный в примере 4. Соответственно, типовые ингибиторы иммунных контрольных точек по настоящему изобретению включают антитело α PD-L1 γ 1 (альтернативный вариант названия - α PD-L1 γ 1). α PD-L1 γ 1 дополнительно описано в Engeland et al. *Mol Ther* 22(11):1949-1959, 2014, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении анти-PD-L1 антител, кодирующих их нуклеиновых кислот и их применений.

[0342] Примеры антител к PD-1 и PD-L1 описаны в US 7488802; US 7943743; US 8008449; US 8168757; US 8217149, WO03042402, WO2008156712, WO2010089411, WO2010036959, WO2011066342, WO2011159877, WO2011082400 и WO2011161699. В некоторых вариантах осуществления блокаторы PD-1 включают анти-PD-L1 антитела. В определенных других вариантах осуществления блокаторы PD-1 включают анти-PD-1 антитела и сходные связывающие белки, такие как ниволумаб (MDX 1106, BMS 936558, ONO 4538), полностью человеческое антитело IgG4, которое связывает и блокирует активацию PD-1 его лигандами PD-L1 и PD-L2; ламбролизумаб (МК-3475 или SCH 900475), гуманизованное моноклональное антитело IgG4 против PD-1; CT-011 гуманизованное антитело, которое связывает PD-1; AMP-224 представляет собой слитый белок B7-DC; Fc-часть антитела; BMS-936559 (MDX-1105-01) для блокирования PD-L1 (B7-H1).

[0343] Другие ингибиторы иммунных контрольных точек включают ингибиторы гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), такие как IMP321, растворимый слитый белок Ig (Brignone et al., 2007, *J. Immunol.* 179:4202-4211). Другие ингибиторы иммунных контрольных точек включают ингибиторы B7, такие как ингибиторы B7-H3 и B7-H4. В частности, анти-B7-H3 антитело MGA271 (Loo et al., 2012, *Clin. Cancer Res.* July 15 (18) 3834). Также включены ингибиторы TIM3 (Т-клеточного домена иммуноглобулина и домена муцина 3) (Fourcade et al., *J. Exp. Med.* 207:2175-86, 2010 и Sakuishi et al., *J. Exp. Med.* 207:2187-94, 2010). В контексте данного документа термин «TIM-3» имеет свое общепринятое в данной области техники значение и относится к содержащей Т-клеточный домен иммуноглобулина и домен муцина молекулу 3. Естественным лигандом TIM-3 является галектин 9 (Ga19). Соответственно, в контексте данного документа термин «ингибитор TIM-3» относится к соединению, веществу или композиции, которые могут ингибировать функцию TIM-3. Например, ингибитор может ингибировать экспрессию или активность TIM-3, модулировать или блокировать путь сигнализации TIM-3 и/или блокировать связывание TIM-3 с галектином-9. Антитела, обладающие специфичностью к TIM-3, хорошо известны в данной области техники и, как правило, представляют собой описанные в WO2011/155607, WO2013/006490 и WO2010/117057.

[0344] Дополнительные конкретные ингибиторы иммунных контрольных точек включают атезолизумаб, BMS-936559, ипилимумаб, MEDI0680, MEDI4736, MSB0010718C, пембролизумаб, пидилизумаб и тремелимумаб. Также смотрите WO 1998/42752; WO 2000/37504; WO 2001/014424; WO 2004/035607; US 2005/0201994; US 2002/0039581; US 2002/086014; US 5811097; US 5855887; US 5977318; US 6051227; US 6984720; US 6682736; US 6207156; US 6682736; US 7109003; US 7132281; EP1212422B1; Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071 (1998); Camacho et al., J. Clin. Oncology, 22(145): Abstract No. 2505, 2004 (антитело CP-675206); и Мокыр et al., Cancer Res, 58:5301-5304, 1998.

[0345] Настоящее изобретение дополнительно включает антитела и другие связывающие домены, которые связывают CD4, CD5, CD7, CD52, и т. д.; антитела к IL1, IL2, IL6; антитело к TCR, специфически присутствующему на аутореактивных Т-клетках; IL4; IL10; IL12; IL13; IL1Ra; sIL1RI; sIL1RII; антитела к TNF; ABCA3; ABCD1; ADA; AK2; APP; аргиназу; арилсульфатазу А; A1AT; CD3D; CD3E; CD3G; CD3Z; CFTR; CHD7; химерный антигенный рецептор (CAR); СИТА; CLN3; фактор комплемента, CORO1A; CTLA; ингибитор C1; C9ORF72; DCLRE1B; DCLRE1C; рецепторы-ловушки; DKC1; DRB1*1501/DQB1*0602; дистрофин; ферменты; фактор VIII, гены семейства FANC (FancA, FancB, FancC, FancD1 (BRCA2), FancD2, FancE, FancF, FancG, FancI, FancJ (BRIP1), FancL, FancM, FancN (PALB2), FancO (RAD51C), FancP (SLX4), FancQ (ERCC4), FancR (RAD51), FancS (BRCA1), FancT (UBE2T), FancU (XRCC2), FancV (MAD2L2) и FancW (RFWD3)); Fas L; FUS; GATA1; гены семейства глобинов (т. е. γ -глобина); F8; глутаминазу; HBA1; HBA2; HBB; IL7RA; JAK3; LCK; LIG4; LRRK2; NHEJ1; NLX2.1; нейтрализующие антитела; ORAI1; PARK2; PARK7; phox; PINK1; PNP; PRKDC; PSEN1; PSEN2; PTPN22; PTPRC; P53; пируваткиназу; RAG1; RAG2; RFXANK; RFXAP; RFX5; RMRP; гены рибосомальных белков; SFTPB; SFTPC; SOD1; растворимый CD40; STIM1; sTNFRI; sTNFRII; SLC46A1; SNCA; TDP43; TERT; TERC; TINF2; убиквитин 2; WAS; WHN; ZAP70; γ C; и другие терапевтические гены, описанные в данном документе.

[0346] Альтернативный источник связывающих доменов включает последовательности, которые кодируют библиотеки случайных пептидов, или последовательности, которые кодируют сконструированное разнообразие аминокислот в петлевых областях альтернативных не принадлежащих антителам скаффолдов, такие как scTCR (смотрите, например, Lake et al., Int. Immunol. 11:745, 1999; Maynard et al., J. Immunol. Methods 306:51, 2005; US 8,361,794), домены фибриногена (смотрите, например, Weisel et al., Science 230:1388, 1985), домены Куница (смотрите, например, US 6,423,498), сконструированные белки с анкириновыми повторами (DARPin; Binz et al., J. Mol. Biol.

332:489, 2003 и Binz et al., *Nat. Biotechnol.* 22:575, 2004), фибронектин-связывающие домены (аднектины или монотела; Richards et al., *J. Mol. Biol.* 326:1475, 2003; Parker et al., *Protein Eng. Des. Selec.* 18:435, 2005 и Hackel et al., *J. Mol. Biol.* 381:1238-1252, 2008), минипротеины с цистеиновым выступом (Vita et al., 1995, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 92:6404-6408; Martin et al., 2002, *Nat. Biotechnol.* 21:71, 2002 и Huang et al., *Structure* 13:755, 2005), домены с тетратрикопептидными повторами (Main et al., *Structure* 11:497, 2003 и Cortajarena et al., *ACS Chem. Biol.* 3:161, 2008), домены с лейцин-богатыми повторами (Stumpp et al., *J. Mol. Biol.* 332:471, 2003), домены липокалина (смотрите, например, WO 2006/095164, Beste et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 96:1898, 1999 и Schönfeld et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 106:8198, 2009), V-подобные домены (смотрите, например, US 2007/0065431), домены лектина C-типа (Zelensky and Gready, *FEBS J.* 272:6179, 2005; Beavil et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 89:753, 1992 и Sato et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 100:7779, 2003), mAb2 или Fc-область с антигенсвязывающим доменом (Fcab™ (F-Star Biotechnology, Cambridge UK; смотрите, например, WO 2007/098934 and WO 2006/072620), белки с повторами armadillo (смотрите, например, Madhurantakam et al., *Protein Sci.* 21: 1015, 2012; WO 2009/040338), аффилин (Ebersbach et al., *J. Mol. Biol.* 372: 172, 2007), аффитело, авимеры, ноттины, финомеры, атримеры, ассоциированный с цитотоксическими T-лимфоцитами белок 4 (Weidle et al., *Cancer Gen. Proteo.* 10:155, 2013) и т. п. (Nord et al., *Protein Eng.* 8:601, 1995; Nord et al., *Nat. Biotechnol.* 15:772, 1997; Nord et al., *Euro. J. Biochem.* 268:4269, 2001; Binz et al., *Nat. Biotechnol.* 23:1257, 2005; Voersma and Plückthun, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849, 2011).

[0347] Пептидные аптамеры содержат пептидную петлю (которая является специфической к клеточному маркеру), присоединенную в обоих концах к белковому скаффолду. Это двойное структурное ограничение повышает аффинность связывания пептидных аптамеров до уровней, сравнимых с антителами. Длина вариабельной петли, как правило, составляет от 8 до 20 аминокислот, а скаффолдом может быть любой белок, который является стабильным, растворимым, небольшим и нетоксичным. Выбор пептидного аптамера можно осуществлять, используя разные системы, такие как система дрожжевых двойных гибридов (например, систему дрожжевых двойных гибридов Gal4) или система-ловушка взаимодействия LexA.

[0348] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен связывает клеточный маркер CD33. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен, который связывает CD33, получен из одного из гемтузумаба, аклизумаба или HuM195. В конкретных вариантах осуществления CD33-связывающий домен представляет собой человеческий или гуманизированный связывающий домен, содержащий вариабельную

область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 91, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 92, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 93, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 94, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 95, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 96.

[0349] В конкретных вариантах осуществления CD33-связывающий домен представляет собой человеческий или гуманизированный scFv, содержащий переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 97, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 98, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 99, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 100, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 101, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 102. Дополнительную информацию касательно связывающих доменов, которые связывают CD33, смотрите в патенте США № 8759494.

[0350] В конкретных вариантах осуществления последовательность, которая связывает человеческий CD33, содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 103, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 104. В конкретных вариантах осуществления последовательность, которая связывает человеческий CD33, содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 103, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 106.

[0351] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен связывает полноразмерный CD33 (CD33FL). В конкретных вариантах осуществления связывающий домен, который связывает CD33FL, получен из по меньшей мере одного из 5D12, 8F5, 1H7, линтузумаба или гемтузумаба. В конкретных вариантах осуществления CD33FL-связывающий домен является человеческим или гуманизированным и содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 107, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 108, последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 109), последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 110, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 111, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 112. Дополнительную информацию касательно связывающих доменов, которые связывают CD33FL, смотрите в PCT/US17/42264.

[0352] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен, который связывает человеческий CD33FL, содержит переменную область легкой цепи,

содержащую последовательность SEQ ID NO: 113, и вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 114.

[0353] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен связывает клеточный маркер CD33DeltaE2 (CD33ΔE2). В конкретных вариантах осуществления связывающий домен, который связывает CD33ΔE2, получен из по меньшей мере одного из 12B12, 4H10, 11D5, 13E11, 11D11 или 1H7. В конкретных вариантах осуществления CD33ΔE2-связывающий домен является человеческим или гуманизированным и содержит вариательную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 115, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 116, последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 117, последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 118, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 119, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 120. Дополнительную информацию касательно связывающих доменов, которые связывают CD33ΔE2, смотрите в PCT/US17/42264.

[0354] В конкретных вариантах осуществления последовательность, которая связывает человеческий CD33ΔE2, содержит вариательную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 121, и вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 122.

[0355] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен связывает клеточный маркер Her2. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен, который связывает HER2, получен из трастузумаба (Герцептин). В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит вариательную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 123, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 124, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 125, и вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 126, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 127, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 128.

[0356] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен связывает клеточный маркер PD-L1. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен, который связывает PD-L1, получен из по меньшей мере одного из пембролизумаба или FAZ053 (Novartis). В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит вариательную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 129, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 130, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 131, и вариательную область

тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 132, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 133, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 134.

[0357] Типовой связывающий домен для PD-L1 может включать или быть получен из авелумаба или атезолизумаба. В конкретных вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи авелумаба содержит SEQ ID NO: 135. В конкретных вариантах осуществления переменная область легкой цепи авелумаба содержит SEQ ID NO: 136.

[0358] В конкретных вариантах осуществления области CDR авелумаба содержат: CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 137; CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 138; CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 139; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 140; CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 141; и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 142. В конкретных вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи атезолизумаба содержит SEQ ID NO: 143. В конкретных вариантах осуществления переменная область легкой цепи атезолизумаба содержит SEQ ID NO: 144.

[0359] В конкретных вариантах осуществления области CDR атезолизумаба содержат: CDRH, содержащую SEQ ID NO: 145; CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 146; CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 147; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 148; CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 149; и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 150.

[0360] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен связывает клеточный маркер PSMA. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 151, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 152, последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 153. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 154, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 155, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 156.

[0361] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен связывает клеточный маркер MUC16. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен является человеческим или гуманизированным и содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 157, последовательность CDRL2, содержащую GAS, последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 158. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен является человеческим или гуманизированным и содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 159,

последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 160, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 161.

[0362] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен связывает клеточный маркер FOLR. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен, который связывает FOLR, получен из фарлетузимаба. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 162, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 163, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 164, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 165, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 166, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 167.

[0363] Типовой связывающий домен для мезотелина может включать или быть получен из аматуксимаба. В конкретных вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи аматуксимаба содержит SEQ ID NO: 168. В конкретных вариантах осуществления переменная область легкой цепи аматуксимаба содержит SEQ ID NO: 169.

[0364] В конкретных вариантах осуществления области CDR аматуксимаба содержат: последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 170; последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 171; последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 172; последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 173; последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 174; и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 175.

[0365] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен представляет собой sc T-клеточный рецептор (scTCR), содержащий цепи $V\alpha/\beta$ и $C\alpha/\beta$ (например, $V\alpha-C\alpha$, $V\beta-C\beta$, $V\alpha-V\beta$) или содержащий пару $V\alpha-C\alpha$, $V\beta-C\beta$, $V\alpha-V\beta$, специфическую в отношении представляющего интерес клеточного маркера (например, комплекса пептид-ГКГС).

[0366] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5% или на 100% идентичной аминокислотной последовательности известных или идентифицированных $V\alpha$, $V\beta$, $C\alpha$ или $C\beta$ TCR, причем каждая CDR содержит ноль изменений или не более одного, двух или трех изменений относительно TCR или его фрагмента или производного, который

специфически связывается с целевым клеточным маркером.

[0367] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит области $V\alpha$, $V\beta$, $C\alpha$ и/или $C\beta$, полученные из или на основании $V\alpha$, $V\beta$, $C\alpha$ и/или $C\beta$ известного или идентифицированного TCR (например, высокоаффинного TCR), и содержит одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с $V\alpha$, $V\beta$, $C\alpha$ и/или $C\beta$ известного или идентифицированного TCR. Вставка, делеция или замена может находиться в любом месте в области $V\alpha$, $V\beta$, $C\alpha$ и/или $C\beta$, включая amino- или карбокси-конец или оба конца этих областей, при условии, что каждая CDR содержит ноль изменений или не более одного, двух или трех изменений, и при условии, что целевой связывающий домен, содержащий модифицированную область $V\alpha$, $V\beta$, $C\alpha$ или $C\beta$, все еще может специфически связываться со своей мишенью с аффинностью и динамикой, аналогичной дикому типу.

[0368] В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит или представляет собой последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5% или на 100% идентичной аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) или вариабельной области тяжелой цепи (VH), или им обеим, каждая CDR содержит ноль или не более одного, двух или трех изменений относительно моноклонального антитела или его фрагмента или производного, которые специфически связываются с представляющим интерес клеточным маркером.

[0369] В конкретных вариантах осуществления область VL в связывающем домене по настоящему изобретению получена из или основана на VL известного моноклонального антитела и содержит одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с VL известного моноклонального антитела. Вставка, делеция или замена может находиться в любом месте в области VL, включая amino- или карбокси-конец или оба конца этой области, при условии, что каждая CDR содержит ноль изменений или не более одного, двух или трех изменений, и при условии, что связывающий домен, содержащий

модифицированную область VL, все еще может специфически связывать свою мишень с аффинностью, аналогичной связывающему домену дикого типа.

[0370] В конкретных вариантах осуществления область VH в связывающем домене по настоящему изобретению может быть получена из или основана на VH известного моноклонального антитела и может содержать одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с VH известного моноклонального антитела. Вставка, делеция или замена может находиться в любом месте в области VH, включая амино- или карбокси-конец или оба конца этой области, при условии, что каждая CDR содержит ноль изменений или не более одного, двух или трех изменений, и при условии, что связывающий домен, содержащий модифицированную область VH, все еще может специфически связывать свою мишень с аффинностью, аналогичной связывающему домену дикого типа.

[0371] Точные аминокислотные границы заданных CDR или FR можно легко определить, используя любую из ряда хорошо известных схем, включая описанные в: Kabat et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (схема нумерации по Kabat); Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273: 927-948, 1997 (схема нумерации по Chothia); Maccallum et al., J Mol Biol 262: 732-745, 1996 (контактная схема нумерации); Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 9268-9272, 1989 (схема нумерации AbM); Lefranc et al., Dev Comp Immunol 27(1): 55-77, 2003 (схема нумерации IMGT); и Honegger and Pluckthun, J Mol Biol 309(3): 657-670, 2001 (схема нумерации «Aho»). Границы заданных CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на структурном выравнивании, тогда как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация для обеих схем, по Kabat и по Chothia, основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител со вставками, обозначаемыми вставленными буквами, например, «30a», и делециями, присутствующими в некоторых антителах. В этих двух схемах некоторые вставки и делеции («индели») помещены в разных позициях, что приводит к разнице в нумерации. Контактная схема основана на анализе комплексных кристаллических структур и во многих отношениях является аналогичной схеме нумерации Chothia. В конкретных вариантах осуществления последовательности CDR антитела, описанные в данном документе, приведены в соответствии с нумерацией по Kabat.

[0372] Конкретные клеточные маркеры, связанные с раком предстательной железы, включают PSMA, WT1, простатический антиген стволовых клеток (PSCA) и SV40 T. Конкретные клеточные маркеры, связанные с раком молочной железы, включают HER2 и ERBB2. Конкретные клеточные маркеры, связанные с раком яичника, включают L1-CAM, внеклеточный домен MUC16 (MUC-CD), фолат-связывающий белок (фолатный рецептор), Льюис Y, мезотелин и WT-1. Конкретные клеточные маркеры, связанные с раком поджелудочной железы, включают мезотелин, CEA и CD24. Конкретные клеточные маркеры, связанные с множественной миеломой, включают BCMA, GPRC5D, CD38 и CS-1. Конкретные маркеры, связанные с лейкозом и/или лимфомой, включают CLL-1, CD123, CD33 и PD-L1.

[0373] Также предусмотрены связывающие домены, специфические в отношении агентов инфекционных заболеваний, например, за счет связывания антигена инфекционного агента. Они включают, например, вирусные антигены или другие вирусные маркеры, например, которые экспрессируются инфицированными вирусом клетками. Типовые вирусы включают аденовирусы, аренавирусы, буннавирусы, коронавирусы, флавивирусы, хантавирусы, гепаднавирусы, герпесвирусы, папилломавирусы, парамиксовирусы, парвовирусы, пикорнавирусы, поксвирусы, ортомиксовирусы, ретровирусы, реовирусы, рабдовирусы, ротавирусы, губчатые вирусы или тогавирусы. В дополнительных вариантах осуществления маркеры вирусного антигена включают пептиды, экспрессируемые CMV, простудными вирусами, вирусом Эпштейна - Барр, вирусами гриппа, вирусами гепатита А, В и С, вирусом простого герпеса, HIV, вирусом инфлюэнцы, японского энцефалита, кори, полиомиелита, бешенства, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом краснухи, вирусом натуральной оспы, вирусом ветряной оспы или вирусом лихорадки Западного Нила.

[0374] В качестве дополнительных конкретных примеров цитомегаловирусные антигены включают оболочечный гликопротеин В и CMV pp65; антигены вируса Эпштейна - Барр EBV EBNA1, EBV P18 и EBV P23; антигены гепатита включают S, М и L белки HBV, пре-S антиген HBV, HBCAG DELTA, HBV HBE, вирусную РНК гепатита С, HCV NS3 и HCV NS4; антигены вируса простого герпеса включают немедленно-ранние белки и гликопротеин D; антигены HIV включают генные продукты генов gag, pol и env, такие как HIV gp32, HIV gp41, HIV gp120, HIV gp160, HIV P17/24, HIV P24, HIV P55 GAG, HIV P66 POL, HIV TAT, HIV GP36, белок Nef и обратная транскриптаза; антигены инфлюэнцы включают гемагглютинин и нейраминидазу; антигены вируса японского энцефалита включают белки E, М-Е, М-Е-NS1, NS1, NS1-NS2A и 80% E; антигены кори включают слитый белок вируса кори; антигены бешенства включают гликопротеин

бешенства и нуклеопротеин бешенства; антигены респираторно-синцитиального вируса включают слитый белок RSV и белок M2; ротавирусные антигены включают VP7sc; антигены краснухи включают белки E1 и E2; и антигены вируса ветряной оспы включают gpI и gpII.

[0375] Дополнительные конкретные типовые последовательности вирусных антигенов включают: Nef (66-97) (SEQ ID NO: 176), Nef (116-145) (SEQ ID NO: 177), Gag p17 (17-35) (SEQ ID NO: 178), Gag p17-p24 (253-284) (SEQ ID NO: 179) и Pol 325-355 (RT 158-188) (SEQ ID NO: 180). Смотрите *Fundamental Virology, Second Edition*, eds. Fields, B. N. and Knipe, D. M. (Raven Press, New York, 1991) в отношении дополнительных примеров вирусных антигенов.

[0376] Был достигнут значительный прогресс в генетическом конструировании Т-клеток иммунной системы для нацеливания и уничтожения нежелательных типов клеток, таких как раковые клетки. Многие из этих Т-клеток были генетически сконструированы для экспрессии конструкций химерного антигенного рецептора (CAR). CAR представляют собой белки, содержащие несколько разных подкомпонентов, которые позволяют генетически модифицированным Т-клеткам распознавать и уничтожать раковые клетки. Эти подкомпоненты включают по меньшей мере внеклеточный компонент и внутриклеточный компонент.

[0377] Внеклеточный компонент содержит связывающий домен, который специфически связывает маркер, который преимущественно присутствует на поверхности нежелательных клеток. Когда связывающий домен связывает такие маркеры внутриклеточный компонент направляет Т-клетку для разрушения связанной раковой клетки. Связывающий домен, как правило, представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), полученный из моноклонального антитела (mAb), но может быть основан на других форматах, которые содержат антитело-подобный антигенсвязывающий сайт.

[0378] Внутриклеточные компоненты обеспечивают сигналы активации на основании включения эффекторного домена. В CAR первого поколения использовали цитоплазматическую область CD3 ζ в качестве эффекторного домена. В CAR второго поколения использовали CD3 ζ в комбинации с кластером дифференцировки 28 (CD28) или 4-1BB (CD137), тогда как в CAR третьего поколения использовали CD3 ζ в комбинации с CD28 и 401BB в пределах внутриклеточных эффекторных доменов.

[0379] В общем случае CAR также содержат одну или более линкерных последовательностей, которые используются в молекуле в разных целях. Например, трансмембранный домен можно использовать, чтобы связать внеклеточный компонент

CAR с внутриклеточным компонентом. Последовательность гибкого линкера, часто называемую спейсерной областью, которая является мембрано-проксимальной к связывающему домену, можно использовать для создания дополнительного расстояния между связывающим доменом и клеточной мембраной. Это может обеспечить преимущество снижения стерического несоответствия в отношении связывания на основании близости к мембране. Обычной спейсерной областью, используемой с этой целью, является линкер IgG4. Можно использовать более компактные спейсеры или более длинные спейсеры в зависимости от целевого клеточного маркера. Другие потенциальные подкомпоненты CAR более подробно описаны в другом месте данного документа. Далее компоненты CAR описаны с дополнительными подробностями следующим образом: (a) Связывающие домены; (b) Внутриклеточные сигнальные компоненты; (c) Линкеры; (d) Трансмембранные домены; (e) Соединительные аминокислоты; и (f) Контрольные элементы, включая кассеты тегов.

[0380] (a) *Связывающие домены.* Связывающие домены включают любое вещество, которое связывается с клеточным маркером с образованием комплекса, включая, без ограничения, все связывающие домены и антитела, описанные в данном документе. Выбор связывающего домена может зависеть от типа и числа клеточных маркеров, которые определяют поверхность клетки-мишени. Примеры связывающих доменов включают лиганды клеточных маркеров, лиганды рецепторов, антитела, пептиды, пептидные аптамеры, рецепторы (например, T-клеточные рецепторы) или их комбинации или сконструированные фрагменты или форматы.

[0381] (b) *Внутриклеточные сигнальные компоненты.* Внутриклеточные или, по-иному, цитоплазматические сигнальные компоненты CAR отвечают за активацию клетки, в которой экспрессируется CAR. Таким образом, термин «внутриклеточные сигнальные компоненты» или «внутриклеточные компоненты» означает любую часть внутриклеточного домена, достаточную для передачи сигнала активации. Внутриклеточные компоненты экспрессируемого CAR могут включать эффекторные домены. Эффекторный домен представляет собой внутриклеточную часть слитого белка или рецептора, которая прямо или непрямо стимулирует биологический или физиологический ответ в клетке при получении соответствующего сигнала. В определенных вариантах осуществления эффекторный домен является частью белка или белкового комплекса, который в связанном состоянии принимает сигнал, или он связывается непосредственно с молекулой-мишенью, что инициирует сигнал из эффекторного домена. Эффекторный домен может непосредственно стимулировать клеточный ответ, когда он содержит один или более сигнальных доменов или мотивов,

таких как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В других вариантах осуществления эффекторный домен непрямо стимулирует клеточный ответ посредством связывания с одним или более другими белками, которые прямо стимулируют клеточный ответ, такими как костимулирующие домены.

[0382] Эффекторные домены могут обеспечивать активацию по меньшей мере одной функции модифицированной клетки после связывания клеточного маркера, экспрессируемого раковой клеткой. Активация модифицированной клетки может включать одно или более из дифференцировки, пролиферации и/или активации или других эффекторных функций. В конкретных вариантах осуществления эффекторный домен может содержать внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий T-клеточный рецептор и костимулирующий домен, который может содержать цитоплазматическую последовательность из корецептора или костимулирующей молекулы.

[0383] Эффекторный домен может содержать один, два, три или более рецепторных сигнальных доменов, внутриклеточных сигнальных компонентов (например, цитоплазматических сигнальных последовательностей), костимулирующих доменов и их комбинации. Типовые эффекторные домены включают сигнальные и стимулирующие домены, выбранные из: 4-1BB (CD137), CARD11, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD27, CD28, CD79A, CD79B, DAP10, FcR α , FcR β (Fc ϵ R1b), FcR γ , Fyn, HVEM (LIGHTR), ICOS, LAG3, LAT, Lck, LRP, NKG2D, NOTCH1, pT α , PTCH2, OX40, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, TCR α , TCR β , TRIM, Wnt, Zap70, или любую их комбинацию. В конкретных вариантах осуществления типовые эффекторные домены включают сигнальные и костимулирующие домены, выбранные из: CD86, Fc γ RIIa, DAP12, CD30, CD40, PD-1, лимфоцитарного функционального антигена-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA4, VLA1, CD49a, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, GADS, PAG/Cbp, NKp44, NKp30 или NKp46.

[0384] Последовательности внутриклеточных сигнальных компонентов, которые действуют стимулирующим образом, могут включать iTAM. Примеры iTAM, включая первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают полученные

из CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD5, CD22, CD66d, CD79a, CD79b, и обычные FcR γ (FCER1G), Fc γ R1a, FcR β (Fc ϵ Rib), DAP10 и DAP12. В конкретных вариантах осуществления варианты CD3 ζ сохраняют по меньшей мере одну, две, три или все области ITAM.

[0385] В конкретных вариантах осуществления эффекторный домен содержит цитоплазматическую часть, которая связывается с цитоплазматическим сигнальным белком, причем цитоплазматический сигнальный белок представляет собой рецептор лимфоцита или его сигнальный домен, белок, содержащий множество ITAM, костимулирующий домен или любую их комбинацию.

[0386] Дополнительные примеры внутриклеточных сигнальных компонентов включают цитоплазматические последовательности цепи CD3 ζ и/или корцепторы, которые действуют вместе, иницируя передачу сигнала после задействования связывающего домена.

[0387] Костимулирующий домен представляет собой домен, чья активация может быть необходимой для эффективного ответа лимфоцитов на связывание клеточного маркера. Некоторые молекулы являются взаимозаменяемыми в качестве внутриклеточных сигнальных компонентов или костимулирующих доменов. Примеры костимулирующих доменов CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, лимфоцитарный функциональный антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83. Например, было показано, что костимуляция CD27 повышает размножение, эффекторную функцию и выживаемость человеческих CART-клеток *in vitro* и повышает персистенцию и противораковую активность человеческих T-клеток *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706). Дополнительные примеры таких молекул костимулирующих доменов включают CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), NKG2D, CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp и CD19a.

[0388] В конкретных вариантах осуществления аминокислотная последовательность внутриклеточного сигнального компонента содержит вариант CD3 ζ и часть внутриклеточного сигнального компонента 4-1BB.

[0389] В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный

компонент содержит (i) весь или часть сигнального домена CD3 ζ , (ii) весь или часть сигнального домена 4-1BB или (iii) весь или часть сигнального домена CD3 ζ и 4-1BB.

[0390] внутриклеточные компоненты также могут включать одно или более из белка сигнального пути Wnt (например, LRP, Ryk или ROR2), сигнального пути NOTCH (например, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 или NOTCH4), сигнального пути Hedgehog (например, PTCH или SMO), рецепторных тирозинкиназ (RTK) (например, семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGF), семейства рецепторов фактора роста фибробластов (FGF), семейства рецепторов фактора роста гепатоцитов (HGF), семейства рецепторов инсулина (IR), семейства рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGF), семейства рецепторов фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), семейства рецепторов тропомидин-рецепторной киназы (Trk), семейства рецепторов эфрина (Eph), семейства рецепторов AXL, семейства рецепторов лейкоцитарной тирозинкиназы (LTK), семейства рецепторов тирозинкиназы с иммуноглобулин-подобным и EGF-подобным доменами 1 (TIE), семейства орфанных рецепторов типа рецепторной тирозинкиназы (ROR), семейства рецепторов домена дискоидина (DDR), семейства рецепторов перестроенных во время трансфекции (RET), семейства рецепторов подобных тирозинпротеинкиназе (PTK7), семейства рецепторов, родственных рецепторной тирозинкиназы (RYK), или семейства рецепторов мышечно-специфической киназы (MuSK)); сопряженных с протеином G рецепторов, GPCR (Frizzled или Smoothened); рецепторов серин/треонинкиназы (BMPR или TGFR); или цитокиновых рецепторов (IL1R, IL2R, IL7R или IL15R).

[0391] (c) *Линкеры*. В контексте данного документа линкер может представлять собой любую часть молекулы CAR, которая служит для соединения двух других подкомпонентов молекулы. Некоторые линкеры не служат цели, иной чем связывание других компонентов, тогда как многие линкеры служат дополнительной цели. Линкеры в контексте связывания полученных из VL и VH антитела связывающих доменов scFv описаны выше. Линкеры также могут содержать спейсерные области и соединительные аминокислоты.

[0392] Спейсерные области являются типом линкерной области, который используют для создания необходимого расстояния от других связанных компонентов и/или придания гибкости. В конкретных вариантах осуществления длину спейсерной области можно подбирать под индивидуальные клеточные маркеры на нежелательных клетках, чтобы оптимизировать распознавание и разрушение нежелательных клеток. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает повышенный отклик клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. В конкретных вариантах

осуществления длину спейсерной области можно выбирать на основании расположения эпитопа клеточного маркера, аффинности связывающего домена к эпитопу и/или способности модифицированных клеток, экспрессирующих молекулу, пролиферировать *in vitro* и/или *in vivo* в ответ на распознавание клеточного маркера. Спейсерные области также обеспечивают высокие уровни экспрессии в модифицированных клетках.

[0393] Типовые спейсеры включают имеющие от 10 до 250 аминокислот, от 10 до 200 аминокислот, от 10 до 150 аминокислот, от 10 до от 100 аминокислот, от 10 до 50 аминокислот или от 10 до 25 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления спейсерная область составляет 12 аминокислот, 20 аминокислот, 21 аминокислот, 26 аминокислот, 27 аминокислот, 45 аминокислот или 50 аминокислот.

[0394] В конкретных вариантах осуществления спейсерная область выбрана из группы, содержащей всю или часть последовательности шарнирной области из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgD, одну или в комбинации со всей или частью области CH2; всей или частью области CH3; или всей или частью области CH2 и всей или частью области CH3.

[0395] Типовые спейсеры включают только шарнирную область IgG4, шарнирную область IgG4, связанную с доменами CH2 и CH3, или шарнирную область IgG4, связанную с доменом CH3. В конкретных вариантах осуществления спейсер содержит линкер IgG4 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 181. Шарнирные области можно модифицировать, чтобы избежать нежелательных структурных взаимодействий, таких как димеризация с непредусмотренными партнерами.

[0396] В конкретных вариантах осуществления спейсерная область содержит шарнирную область, которая представляет собой междоменную (стеблевую) область С-лектина типа II или стеблевую область молекулы кластера дифференцировки (CD). В контексте данного документа выражение «шарнирная область иммуноглобулина дикого типа» относится к встречающимся в природе аминокислотным последовательностям верхней и средней шарнирной области, расположенным между и соединяющим домены CH1 и CH2 (для IgG, IgA и IgD) или расположенным между и соединяющим домены CH1 и CH3 (для IgE и IgM), находящиеся в тяжелой цепи антитела.

[0397] «Стеблевая область» С-лектина типа II или молекулы CD относится к части внеклеточного домена С-лектина типа II или молекулы CD, которая расположена между подобным лектину С-типа доменом (CTLD; например, аналогично CTLD рецепторов естественных клеток-киллеров) и гидрофобной частью (трансмембранным доменом). Например, внеклеточный домен человеческого CD94 (номер доступа GenBank № AAC50291.1) соответствует аминокислотным остаткам 34-179, но CTLD соответствует

аминокислотным остаткам 61-176, поэтому стеблевая область молекулы человеческого CD94 содержит аминокислотные остатки 34-60, которые расположены между гидрофобной частью (трансмембранным доменом) и CTLD (смотрите Boyington et al., *Immunity* 10:15, 1999; в отношении описания других стеблевых областей, также смотрите Beavil et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:153, 1992; и Figdor et al., *Nat. Rev. Immunol.* 2:11, 2002). Эти молекулы С-лектина типа II или CD также могут содержать соединительные аминокислоты (описанные ниже) между стеблевой областью и трансмембранной областью CTLD. В другом примере 233-аминокислотный белок человеческого NKG2A (номер доступа GenBank № P26715.1) имеет гидрофобную часть (трансмембранный домен) в диапазоне аминокислот 71-93 и внеклеточный домен в диапазоне аминокислот 94-233. CTLD содержит аминокислоты 119-231, а стеблевая область содержит аминокислоты 99-116, которые могут фланкироваться дополнительными соединительными аминокислотами. Другие молекулы С-лектина типа II или CD, а также их внеклеточные лиганд-связывающие домены, стеблевые области и CTLD известны в данной области техники (смотрите, например, номера доступа GenBank №№ NP 001993.2; AAN07037.1; NP 001773.1; AAL65234.1; CAA04925.1; в отношении последовательностей человеческих CD23, CD69, CD72, NKG2A и NKG2D и их описаний, соответственно).

[0398] Типовые спейсеры также включают описанные в Hudecek et al. (*Clin. Cancer Res.*, 19:3153, 2013) или WO2014/031687. В конкретных вариантах осуществления спейсерная область может представлять собой линкер CD28 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 182. В конкретных вариантах осуществления спейсерная область представляет собой SEQ ID NO: 183. В конкретных вариантах осуществления спейсерная область представляет собой SEQ ID NO: 184.

[0399] В конкретных вариантах осуществления длинный спейсер составляет более 119 аминокислот (например, 229 аминокислот), спейсер промежуточной длины составляет 13-119 аминокислот, а короткий спейсер составляет более 12 аминокислот или меньше. Пример спейсерной области промежуточной длины включает всю или часть шарнирной области IgG4 и область СН3. Пример длинного спейсера включает всю или часть шарнирной области IgG4, область СН2 и область СН3. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения предпочтительными являются короткие спейсерные последовательности.

[0400] В качестве дополнительного описания касательно спейсерных областей, внеклеточный компонент слитого белка необязательно содержит внеклеточную несигнальную спейсерную или линкерную область, которая, например, может располагать связывающий домен на некотором расстоянии от поверхности клетки-хозяина (например,

Т-клетки), чтобы обеспечить надлежащие контакт клетка/клетка, связывание антигена и активацию (Patel et al., Gene Therapy 6: 412-419 (1999)). Как указано, внеклеточная спейсерная область слитого связывающего белка в общем случае расположена между гидрофобной частью или трансмембранным доменом и внеклеточным связывающим доменом, а длину спейсерной области можно варьировать, чтобы максимизировать распознавание антигена (например, распознавание опухоли) с учетом выбранной молекулы-мишени, выбранного эпитопа связывания или размера и аффинности антигенсвязывающего домена (смотрите, например, Guest et al., J. Immunother. 28:203-11, 2005; WO 2014/031687). В определенных вариантах осуществления спейсерная область содержит шарнирную область иммуноглобулина. Шарнирная область иммуноглобулина может представлять собой шарнирную область иммуноглобулина дикого типа или измененную шарнирную область иммуноглобулина дикого типа. В определенных вариантах осуществления шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область иммуноглобулина человека. Шарнирная область иммуноглобулина может представлять собой шарнирную область IgG, IgA, IgD, IgE или IgM. Шарнирная область IgG может представлять собой шарнирную область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Типовая измененная шарнирная область IgG4 описана в публикации PCT № WO 2014/031687. Другие примеры шарнирных областей, используемые в описанных в данном документе слитых связывающих белках, включают шарнирную область, присутствующую во внеклеточных областях мембранных белков 1 типа, таких как CD8 α , CD4, CD28 и CD7, которые могут быть дикого типа или вариантами.

[0401] В определенных вариантах осуществления внеклеточная спейсерная область содержит весь или часть Fc-домена, выбранную из: домена CH1, домена CH2, домена CH3, домена CH4 или любой их комбинации (смотрите, например, WO 2014/031687). Fc-домен или его часть могут быть дикого типа или измененными (например, для снижения эффекторной функции антитела). В определенных вариантах осуществления внеклеточный компонент содержит шарнирную область иммуноглобулина, домен CH2, домен CH3 или любую их комбинацию, расположенные между связывающим доменом и гидрофобной частью. В определенных вариантах осуществления внеклеточный компонент содержит шарнирную область IgG1, домен CH2 IgG1 и домен CH3 IgG1. В дополнительных вариантах осуществления домен CH2 IgG1 содержит (i) мутацию N297Q, (ii) замену первых шести аминокислот (APEFLG) на APPVA, или как (i), так и (ii). В определенных вариантах осуществления шарнирная область иммуноглобулина, Fc-домен, или их часть, или оба этих элемента являются человеческими.

[0402] (d) *Трансмембранные домены.* Как указано, трансмембранные домены в

молекуле CAR часто служат для соединения внеклеточного компонента и внутриклеточного компонента через клеточную мембрану. Трансмембранный домен может удерживать экспрессируемую молекулу в мембране модифицированной клетки.

[0403] Трансмембранный домен может быть получен из природного или из синтетического источника. Если источник является природным, трансмембранный домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные домены могут включать по меньшей мере трансмембранные области цепей α , β или ζ T-клеточного рецептора, CD28, CD27, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен может содержать по меньшей мере трансмембранную(ые) область(и), например, из KIR2DS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD 11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R β , IL2R γ , IL7R a, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, DNAM1(CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9(CD229), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D или NKG2C. В конкретных вариантах осуществления можно применять ряд человеческих шарнирных областей, а также шарнирную область человеческого Ig (иммуноглобулина) (например, шарнирную область IgG4, шарнирную область IgD), GS-линкер (например, GS-линкер, описанный в данном документе), шарнирную область KIR2DS2 или шарнирную область CD8a.

[0404] В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен имеет трехмерную структуру, которая является термодинамически стабильной в клеточной мембране и в общем случае имеет длину в диапазоне от 15 до 30 аминокислот. Структура трансмембранного домена может включать α -спираль, β -бочку, β -складчатость, β -спираль или любую их комбинацию.

[0405] Трансмембранный домен может содержать одну или более дополнительных аминокислот, смежных с трансмембранной областью, например, одну или более аминокислот в пределах внеклеточной области CAR (например, до 15 аминокислот внеклеточной области) и/или одну или более дополнительных аминокислот в пределах внутриклеточной области CAR (например, до 15 аминокислот внутриклеточной области). В одном аспекте трансмембранный домен получен из того же белка, из которого получен сигнальный домен, костимулирующий домен или шарнирный домен. В одном аспекте

трансмембранный домен не получен из того же белка, из которого получен любой другой домен CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован посредством аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или отличных поверхностных мембранных белков для минимизации взаимодействий с другими непредусмотренными членами рецепторного комплекса. В одном аспекте трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим CAR на клеточной поверхности CAR-экспрессирующей клетки. В другом аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или замещена так, чтобы минимизировать взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, присутствующего в той же CAR-экспрессирующей клетке. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность трансмембранного домена CD28.

[0406] *(e) Соединительные аминокислоты.* Соединительные аминокислоты могут представлять собой линкер, который можно использовать для соединения последовательностей доменов CAR, когда нет необходимости и/или потребности в расстоянии, обеспечиваемом спейсером. Соединительные аминокислоты представляют собой короткие аминокислотные последовательности, которые можно использовать для соединения костимулирующих внутриклеточных сигнальных компонентов. В конкретных вариантах осуществления соединительные аминокислоты составляют 9 аминокислот или менее.

[0407] Соединительные аминокислоты могут представлять собой короткий олиго- или белковый линкер, предпочтительно длиной от 2 до 9 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот) для образования линкера. В конкретных вариантах осуществления в качестве подходящего линкера из соединительных аминокислот можно использовать глицин-сериновый дублет. В конкретных вариантах осуществления в качестве подходящей соединительной аминокислоты можно использовать одну аминокислоту, например, аланин, глицин.

[0408] *(f) Контрольные элементы, включая кассеты тегов, маркеры трансдукции и суицидальные переключатели.* В конкретных вариантах осуществления конструкции CAR могут содержать одно или более из кассет тегов, маркеров трансдукции и/или суицидальных переключателей. В некоторых вариантах осуществления маркер трансдукции и/или суицидальный переключатель находится в той же самой конструкции, но экспрессируется в виде отдельной молекулы на клеточной поверхности. Кассеты тегов и маркеры трансдукции можно использовать для активации, стимуляции пролиферации,

выявления, обогащения в отношении, выделения, отслеживания, истощения и/или устранения генетически модифицированных клеток *in vitro*, *in vivo* и/или *ex vivo*. «Кассета тега» относится к уникальной синтетической пептидной последовательности, присоединенной, слитой с CAR или являющейся его частью, с которой способна специфически связываться когнатная связывающая молекула (например, лиганд, антитело или другой партнер по связыванию), причем свойство связывания можно использовать для активации, стимуляции пролиферации, выявления, обогащения в отношении, выделения, отслеживания, истощения и/или устранения меченого тегом белка и/или клеток, экспрессирующих меченый тегом белок. Маркеры трансдукции могут служить в тех же целях, но получены из молекул природного происхождения и часто экспрессируются с помощью элемента пропуска, который отделяет маркер трансдукции от остальной части молекулы CAR.

[0409] Кассеты тегов, которые связывают когнатные связывающие молекулы, включают, например, His-тег, Flag-тег, Xpress-тег, Avi-тег, тег кальмодулина, тег полиглутамата, HA-тег, Myc-тег, Softag 1, Softag 3 и V5-тег. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит Myc-тег.

[0410] Конъюгированные связывающие молекулы, которые специфически связывают последовательности кассеты тега, описанные в данном документе, являются коммерчески доступными. Например, содержащие His-тег антитела коммерчески доступны от поставщиков, включая Life Technologies, Pierce Antibodies и GenScript. Содержащие Flag-тег антитела коммерчески доступны от поставщиков, включая Pierce Antibodies, GenScript и Sigma-Aldrich. Содержащие Xpress-тег антитела коммерчески доступны от поставщиков, включая Pierce Antibodies, Life Technologies и GenScript. Содержащие Avi-тег антитела коммерчески доступны от поставщиков, включая Pierce Antibodies, IsBio и Genecorpeia. Содержащие тег кальмодулина антитела коммерчески доступны от поставщиков, включая Santa Cruz Biotechnology, Abcam и Pierce Antibodies. Содержащие HA-тег антитела коммерчески доступны от поставщиков, включая Pierce Antibodies, Cell Signal и Abcam. Содержащие Myc-тег антитела коммерчески доступны от поставщиков, включая Santa Cruz Biotechnology, Abcam и Cell Signal.

[0411] Маркеры трансдукции могут быть выбраны из по меньшей мере одного из усеченного CD19 (tCD19; смотрите Budde et al., Blood 122: 1660, 2013); усеченного человеческого EGFR (tEGFR; смотрите Wang et al., Blood 118: 1255, 2011); внеклеточного домена человеческого CD34; и/или RQR8, в котором скомбинированы эпитопы-мишени из CD34 (смотрите Fehse et al., Mol. Therapy 1(5 Pt 1); 448-456, 2000) и антигенов CD20 (смотрите Philip et al., Blood 124: 1277-1278, 2014).

[0412] В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий конструкцию iCaspase9 (iCasp9), может быть вставлен в нуклеотидную конструкцию CAR в качестве суицидального переключателя.

[0413] Контрольные элементы могут присутствовать в множестве копий CAR или могут экспрессироваться в виде отдельных молекул с помощью элемента пропуска. Например, CAR может содержать одну, две, три, четыре или пять кассет тегов, и/или также могут экспрессироваться один, два, три, четыре или пять маркеров трансдукции. Например, варианты осуществления могут включать конструкцию CAR, содержащую две кассеты Мус-тегов, или кассету His-тега и HA-тега, или кассету HA-тега и тега Softag 1, или кассету Мус-тега и SBP-тега. В конкретных вариантах осуществления CAR, который будет мультимеризоваться после экспрессии, содержит кассеты разных тегов. В конкретных вариантах осуществления маркер трансдукции включает tEFGF. Типовые маркеры трансдукции и когнатные пары описаны в US 13/463247.

[0414] Одним из преимуществ наличия по меньшей мере одного контрольного элемента в CAR является то, что вводимые субъекту CAR-экспрессирующие клетки можно истощать, используя когнатную связывающую молекулу к кассете тега. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ истощения модифицированной клетки, экспрессирующей CAR, с помощью антитела, специфического к кассете тега, используя когнатную связывающую молекулу, специфическую к контрольному элементу, или используя вторую модифицированную клетку, экспрессирующую CAR и обладающую специфичностью к контрольному элементу. Устранение модифицированных клеток можно осуществлять, используя агенты для истощения, специфические к контрольному элементу.

[0415] В определенных вариантах осуществления модифицированные клетки, экспрессирующие химерную молекулу, можно выявлять или отслеживать *in vivo*, используя антитела, которые специфически связываются с контрольным элементом (например, антитела к тегу), или другие когнатные связывающие молекулы, которые специфически связываются с контрольным элементом, при этом партнеры по связыванию для контрольного элемента конъюгированы с флуоресцентным красителем, радиоактивным индикатором, наночастицей из оксида железа или другим агентом для визуализации, известным в данной области техники, для выявления с помощью рентгенографии, КТ-сканирования, МРТ-сканирования, ПЭТ-сканирования, ультразвука, проточной цитометрии, систем визуализации, работающих в ближней инфракрасной области, или других методов визуализации (смотрите, например, Yu, et al., *Theranostics* 2:3, 2012).

[0416] Таким образом, модифицированные клетки, экспрессирующие по меньшей мере один контрольный элемент с CAR, может быть легче, например, идентифицировать, выделять, сортировать, индуцировать их пролиферацию, отслеживать и/или устранять по сравнению с модифицированной клеткой без кассеты тега.

[0417] Типовые CAR и варианты архитектуры CAR, применимые в способах и композициях по настоящему изобретению, включают приведенные в WO2012/138475A1, US 9,624,306B2, US9266960B2, US2017/017477, EP2694549B1, US2017/0283504, US2017/0281766, US20170283500, US2018/0086846, US2010/0105136, US2010/0105136, WO2012/079000, WO2008045437, WO2016/139487A1 и WO2014/039523.

[0418] TCR относится к встречающимся в природе Т-клеточным рецепторам. ГСК можно модифицировать *in vivo* для экспрессии выбранного TCR. Гибриды CAR/TCR относятся к белкам, имеющим элемент TCR и элемент CAR. Например, гибрид CAR/TCR может иметь встречающийся в природе связывающий домен TCR с эффекторным доменом, с которым связывающий домен TCR не ассоциирован в природе. Гибрид CAR/TCR может иметь мутированный связывающий домен TCR и сигнальный домен ITAM. Гибрид CAR/TCR может иметь встречающийся в природе TCR со вставленным не встречающимися в природе спейсерной областью или трансмембранным доменом.

[0419] Конкретные гибриды CAR/TCR включают гибриды TRuC® (слитая конструкция Т-клеточного рецептора); TCR2 Therapeutics, Cambridge, MA. В качестве примера, получение слитых белков TCR описано в Международных патентных публикациях WO 2018/026953 и WO 2018/067993 и в публикации заявки US 2017/0166622.

[0420] В конкретных вариантах осуществления гибриды CAR/TCR включают «слитый белок Т-клеточного рецептора» или «TFP». TFP содержит рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, включая TCR, который в общем случае способен i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном размещении в Т-клетке или на ее поверхности.

[0421] В конкретных вариантах осуществления TFP содержит фрагмент антитела, которое связывает раковый антиген (например, CD19, ROR1), причем последовательность фрагмента антитела является смежной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу TCR или ее часть, и находится с ней в одной рамке считывания. TFP способны связываться с одной или более эндогенных (или, в альтернативном варианте, с одной или более экзогенных или с комбинацией эндогенных и экзогенных) субъединиц TCR с целью образования функционального комплекса TCR.

I(C)(i)(b). Системы и компоненты редактирования генов

[0422] В различных вариантах осуществления нагрузка по настоящему изобретению кодирует по меньшей мере один компонент или все компоненты системы редактирования генов. Системы редактирования генов по настоящему изобретению включают системы CRISPR и системы редактирования оснований. В широком смысле системы редактирования генов могут содержать множество компонентов, включая фермент для редактирования генов, выбранный из CRISPR-ассоциированной РНК-направляемой эндонуклеазы и фермента для редактирования оснований, и по меньшей мере одну гРНК. Соответственно, системы редактирования генов по настоящему изобретению могут содержать (i) в случае системы CRISPR, фермент CRISPR, который представляет собой CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу, и по меньшей мере гидовую РНК (гРНК), и (ii) в случае системы редактирования оснований, фермент для редактирования оснований и по меньшей мере одну гРНК.

[0423] Настоящее изобретение включает, что самоинактивирующиеся системы редактирования генов включают системы редактирования генов, находящиеся в векторе по настоящему изобретению и становящиеся нефункциональными после вырезания и/или интеграции в геном клетки-хозяина части вектора, например, элемента интеграции. В различных вариантах осуществления система редактирования генов становится нефункциональной за счет разрушения векторной последовательности, кодирующей по меньшей мере один компонент системы редактирования генов после вырезания элемента интеграции и/или интеграции элемента в геном клетки-хозяина.

[0424] Настоящее изобретение включает, в различных вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую систему редактирования генов, в которой фермент CRISPR или фермент для редактирования оснований функционально связан с промотором PGK. Настоящее изобретение включает экспериментальное открытие, что PGK является более слабым промотором в клетках-продуцентах, таких как клетки НЕК293, для выработки донорного вектора (т. е. обуславливает относительно низкие или сниженные уровни экспрессии кодирующей последовательности, например, по сравнению с промотором Efl α в клетке-продуценте и/или по сравнению с промотором PGK в ГСК), но обуславливает эффективную экспрессию трансгена в ГСК (т. е. обуславливает относительно высокие или повышенные уровни экспрессии кодирующей последовательности, например, по сравнению с промотором Efl α в ГСК и/или по сравнению с промотором PGK в клетке-продуценте, такой как клетка НЕК293).

[0425] В различных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая систему редактирования генов, которая содержит фермент CRISPR или фермент для редактирования оснований, содержит сайт-мишень микроРНК, который

снижает или подавляет экспрессию фермента в клетках-продуцентах, таких как клетки HEK293, например, чтобы избежать или уменьшить потенциальные нежелательные явления экспрессии системы редактирования генов (например, экспрессии системы редактирования оснований) в клетках-продуцентах, например, от экспрессии TadA и/или Tad*. В различных вариантах осуществления последовательность miR может представлять собой последовательность, которая подавляет экспрессию фермента редактирования оснований или CRISPR в клетке-продуценте во время выработки донорного вектора HDAd35, например, как описано в Saydamina et al., Mol. Ther. Meth. Clin. Dev. 1: 14057, 2015; Li et al., Mol. Ther. Meth. Clin. Dev. 9: 390-401, 2018, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[0426] Поэтому во избежание сомнений настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая систему редактирования генов, может содержать любое или все из (i) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент CRISPR или фермент редактирования оснований, необязательно при этом последовательность нуклеиновой кислоты содержит модифицированный TadA и/или TadA*, как описано в данном документе; (ii) промотор PGK, функционально связанный с последовательностью, кодирующей фермент CRISPR или фермент редактирования оснований; и (iii) сайт-мишень микроРНК, который снижает или подавляет экспрессию фермента в клетках-продуцентах, таких как клетки HEK293. Настоящее изобретение включает, что эти характеристики (i, ii и iii) могут способствовать эффективной генной терапии, отдельно или в синергетической комбинации.

I(C)(i)(b)(1). Экспрессионные продукты нагрузки с CRISPR

[0427] Нуклеазная система CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)/Cas (CRISPR-ассоциированный белок) представляет собой сконструированную нуклеазную систему, используемую для генетического конструирования на основе бактериальных систем. Частично она основана на адаптивном иммунном ответе многих бактерий и архей. Когда вирус или плаزمида внедряется в бактерию, сегменты ДНК внедренного агента преобразуются в РНК CRISPR (сгРНК) посредством «иммунного» ответа бактерии. сгРНК ассоциируется за счет области частичной комплементарности с другим типом РНК, называемым трасгРНК, для направления нуклеазы Cas к области гомологии к сгРНК в целевой ДНК, называемой «протоспейсером». Нуклеаза Cas расщепляет ДНК с генерацией тупых концов в месте двухцепочечного разрыва в сайтах, определяемых 20-нуклеотидной последовательностью комплементарной цепи, содержащейся в транскрипте сгРНК. В некоторых случаях для сайт-специфического распознавания и расщепления ДНК нуклеазой Cas требуется как

сгРНК, так и trасгРНК.

[0428] Гидовая РНК (гРНК) является одним из примеров нацеливающего элемента. В самой простой форме рГНК обеспечивает последовательность, нацеленную на сайт в геноме на основании комплементарности (например, сгРНК). При этом, как объясняется ниже, гРНК также может содержать дополнительные компоненты. Например, в конкретных вариантах осуществления гРНК может содержать нацеливающую последовательность (например, сгРНК) и компонент для связывания нацеливающей последовательности с разрезающим элементом. Этим связывающим компонентом может быть trасгРНК. В конкретных вариантах осуществления, как описано ниже, гРНК, включая сгРНК и trасгРНК, может экспрессироваться в виде одиночной молекулы, называемой одиночной гРНК (огРНК). гРНК также может быть связана с разрезающим элементом посредством других механизмов, например, посредством наночастицы или посредством экспрессии или конструирования двойной или многоцелевой молекулы. Специалистам в данной области техники понятно, что гРНК или другие нацеливающие элементы для осуществления коррекции или модификации выбранной последовательности нуклеиновой кислоты, например, в клетке-хозяине аденовирусного донорного вектора или генома по настоящему изобретению, можно легко сконструировать и реализовать, например, на основании доступной информации по последовательности.

[0429] В конкретных вариантах осуществления нацеливающие элементы (например, гРНК) могут содержать одну или более модификаций (например, модификацию оснований, модификацию остова) для придания нуклеиновой кислоте нового или усиленного свойства (например, улучшенной стабильности). Модифицированные остовы, включают те, которые содержат атом фосфора в остове, и те, которые не содержат атом фосфора в остове. Подходящие модифицированные остовы, содержащие атом фосфора, могут включать, например, тиофосфаты, хиральные тиофосфаты, дитиофосфаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метильные и другие алкильные фосфонаты, такие как 3'-алкилен фосфонаты, 5'-алкилен фосфонаты, хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминокилфосфорамидаты, фосфородиамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, селенофосфаты и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, их 2'-5' связанные аналоги и имеющие обратную полярность, причем одна или более межнуклеотидных связей являются 3'-3', 5'-5' или 2'-2' связями. Подходящие нацеливающие элементы, имеющие обратную полярность, могут содержать одинарную 3'-3' связь в крайней 3' межнуклеотидной связи, (т. е. один инвертированный нуклеозидный остаток, в котором отсутствует нуклеосамооснование или на

его месте находится гидроксильная группа). Также могут быть включены различные соли (например, хлорид калия или хлорид натрия), смешанные соли и формы свободных кислот.

[0430] Нацеливающие элементы могут содержать одну или более тиофосфатных и/или содержащих гетероатом межнуклеозидных связей, в частности --CH₂-NH-O-CH₂-, --CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (т. е. метиленовый (метилямино) или ММІ-остов), --CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, --CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- и --O--N(CH₃)-CH₂-CH₂- (где нативная фосфодиэфирная межнуклеотидная связь представлена как --O--P(=O)(OH)-O-CH₂-).

[0431] В конкретных вариантах осуществления нацеливающие элементы могут содержать морфолино-структуру остова. Например, нацеливающие элементы могут содержать 6-членное морфолиновое кольцо вместо рибозного кольца. В некоторых из этих вариантов осуществления фосфородиамидатная или другая отличная от фосфодиэфирной межнуклеозидная связь замещает тиофосфатную связь.

[0432] В конкретных вариантах осуществления нацеливающие элементы могут содержать один или более замещенных сахарных фрагментов. Подходящие полинуклеотиды могут содержать сахарную замещающую группу, выбранную из: OH; F; O-, S- или N-алкила; O-, S- или N-алкенила; O-, S- или N-алкинила; или O-алкил-O-алкила, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C1-C10 алкил или C2-C10 алкенил и алкинил. Особенно подходящими являются O((CH₂)_nO)_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON((CH₂)_nCH₃)₂, где n и m равны 1-10.

[0433] Примеры разрезающих элементов включают нуклеазы. Локусы CRISPR-Cas имеют более 50 генных семейств, и не существует строго универсальных генов, свидетельствующих о быстрой эволюции и большом разнообразии архитектуры локусов. Типовые нуклеазы Cas включают CasI, CasIb, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известную как CsnI и CsxI2), CasI0, CpfI, C2c3, C2c2 и C2clCsyI, Csy2, Csy3, CseI, Cse2, CseI, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, CmrI, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, CpfI, Csbl, Csb2, Csb3, CsxI7, CsxI4, CsxI0, CsxI6, CsaX, Csx3, CsxI, CsxI5, CsfI, Csf2, Csf3 и Csf4.

[0434] Существует три основных типа нуклеаз Cas (тип I, тип II и тип III) и 10 подтипов, включая 5 белков типа I, 3 типа II и 2 типа III (смотрите, например, Hochstrasser and Doudna, Trends Biochem Sci, 2015:40(1):58-66). Cas-нуклеазы типа II включают CasI, Cas2, Csn2 и Cas9. Эти Cas-нуклеазы известны специалистам в данной области техники. Например, аминокислотная последовательность полипептида Cas9 Streptococcus pyogenes дикого типа приведена, например, в NCBI Ref. Seq. № NP 269215, а аминокислотная

последовательность полипептида Cas9 *Streptococcus thermophilus* дикого типа приведена, например, в NCBI Ref. Seq. No. WP_011681470.

[0435] В конкретных вариантах осуществления Cas9 относится к РНК-направляемому связывающему двухцепочечную ДНК белку нуклеазы или белку никазы. Нуклеаза Cas9 дикого типа содержит два функциональных домена, например, RuvC и HNH, которые разрезают разные цепи ДНК. Cas9 может индуцировать двухцепочечные разрывы в геномной ДНК (ДНК-мишени), когда активны оба функциональных домена. Фермент Cas9, в некоторых вариантах осуществления, содержит один или более каталитических доменов белка Cas9, полученного из бактерии, такой как *Corynebacter*, *Sutterella*, *Legionella*, *Treponema*, *Filif actor*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Flavivola*, *Flavobacterium*, *Sphaerochaeta*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Neisseria*, *Roseburia*, *Parvibaculum*, *Staphylococcus*, *Nitratifactor* и *Campylobacter*. В некоторых вариантах осуществления Cas9 представляет собой слитый белок, например, два каталитических домена получены от разных видов бактерий.

[0436] Как было указано ранее, система CRISPR/Cas была сконструирована так, чтобы в определенных случаях crРНК и tracrРНК могли объединяться в одну молекулу, называемую одиночной гРНК (огРНК). В этом подходе конструирования огРНК направляет Cas для нацеливания на любую необходимую последовательность (смотрите, например, Jinek et al., *Science* 337:816-821, 2012; Jinek et al., *eLife* 2:e00471, 2013; Segal, *eLife* 2:e00563, 2013). Таким образом, система CRISPR/Cas может быть сконструирована для создания двухцепочечного разрыва в необходимой мишени в геноме клетки и эксплуатации эндогенных механизмов клетки для репарации индуцированного разрыва путем ГР или НГСК. В конкретных вариантах осуществления, описанных в данном документе, используются плечи гомологии для стимуляции ГР в определенных сайтах интеграции.

[0437] Применимые варианты нуклеазы Cas9 включают одиночный неактивный каталитический домен, такой как фермент RuvC” или HNH” или никаза. Никаза Cas9 может иметь только один активный функциональный домен и, в м, разрезает только одну цепь ДНК-мишени, тем самым создавая одноцепочечный разрыв или ник. В некоторых вариантах осуществления мутантная нуклеаза Cas9, содержащая по меньшей мере мутацию D10A, представляет собой никазу Cas9. В других вариантах осуществления мутантная нуклеаза Cas9, содержащая по меньшей мере мутацию H840A, представляет собой никазу Cas9. Другие примеры мутаций, присутствующих в никазе Cas9, включают N854A и N863A. Двухцепочечный разрыв вносят, используя никазу Cas9, если используют по меньшей мере две нацеленные на ДНК РНК, которые нацелены на

противоположные цепи ДНК. Репарация индуцированного двойным ником двухцепочечного разрыва происходит посредством НГСК или ГР. Эта стратегия редактирования генов лучше работает с ГР и снижает частоту мутаций типа инделей в нецелевых сайтах ДНК. Нуклеаза или никаза Cas9, в некоторых вариантах осуществления, является кодон-оптимизированной в отношении целевой клетки или целевого организма.

[0438] В конкретных вариантах осуществления можно использовать Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9). В конкретных вариантах осуществления можно использовать SaCas9 с мутациями в одной или более из следующих позиций: E782, N968 и/или R1015. В конкретных вариантах осуществления можно использовать SaCas9 с мутациями в одной или более из следующих позиций: E735, E782, K929, N968, A1021, K1044 и/или R1015. В некоторых вариантах осуществления вариантный белок SaCas9 содержит одну или более из следующих мутаций: R1015Q, R1015H, E782K, N968K, E735K, K929R, A1021T и/или K1044N. В некоторых вариантах осуществления вариантный белок SaCas9 содержит мутации в D10A, D556A, H557A, N580A, например, D10A/H557A и/или D10A/D556A/H557A/N580A. В некоторых вариантах осуществления вариантный белок SaCas9 содержит одну или более мутаций, выбранных из E735, E782, K929, N968, R1015, A1021 и/или K1044. В некоторых вариантах осуществления варианты SaCas9 могут содержать один из следующих наборов мутаций: E782K/N968K/R1015H (вариант KKH); E782K/K929R/R1015H (вариант KRH); или E782K/K929R/N968K/R1015H (вариант KRKH).

[0439] Была идентифицирована CRISPR-Cas класса II, типа V, примером которой является Cpf1 Zetsche et al. (2015) Cell 163(3): 759-771. В частности, нуклеаза Cpf1 может обеспечить дополнительную гибкость в выборе сайта-мишени за счет короткой последовательности распознавания из трех пар оснований (TTN), известной как мотив, примыкающий к протоспейсеру, или PAM. Сайт разрезания Cpf1 находится по меньшей мере за 18 п. о. от последовательности PAM. Кроме того, ступенчатые ДЦР с липкими концами делают возможной специфическую в отношении ориентации вставку донорной матрицы, что является преимуществом в неделящихся клетках.

[0440] В конкретных вариантах осуществления можно использовать сконструированные Cpf1. Например, в US 2018/0030425 описаны сконструированные нуклеазы Cpf1 из ND2006 бактерии *Lachnospiraceae* и BV3L6 вида *Acidaminococcus* с измененной и улучшенной специфичностью к мишени. Конкретные варианты включают ND2006 бактерии *Lachnospiraceae*, например, по меньшей мере содержащий аминокислоты 19-1246 мутациями (т. е. замещением нативной аминокислоты отличной аминокислотой, например, аланином, глицином или серином) в одной или более из

следующих позиций: S202, N274, N278, K290, K367, K532, K609, K915, Q962, K963, K966, K1002 и/или S1003. Конкретные варианты Cpf1 также могут включать Cpf1 (AsCpf1) BV3L6 вида *Acidaminococcus* с мутациями (т. е. замещением нативной аминокислоты отличной аминокислотой, например, аланином, глицином или серином (за исключение случаев, когда нативной аминокислотой является серин)) в одной или более из следующих позиций: N178, S186, N278, N282, R301, T315, S376, N515, K523, K524, K603, K965, Q1013, Q1014 и/или K1054.

[0441] Другие варианты Cpf1 включают гомологи Cpf1 и ортологи полипептидов Cpf1, описанные в Zetsche et al. (2015) Cell 163: 759-771, а также полипептиды Cpf1, описанные в U.S. 2016/0208243. Другие сконструированные варианты Cpf1 известны специалистам в данной области техники и включены в объем настоящего изобретения (смотрите, например, WO/2017/184768).

[0442] Дополнительная информация в отношении систем CRISPR-Cas и их компонентов описана в US 8697359, US 8771945, US 8795965, US 8865406, US 8871445, US 8889356, US 8889418, US 8895308, US 8906616, US 8932814, US 8945839, US 8993233 и US 8999641 и родственных с ними заявках; и WO2014/018423, WO2014/093595, WO2014/093622, WO2014/093635, WO2014/093655, WO2014/093661, WO2014/093694, WO2014/093701, WO2014/093709, WO2014/093712, WO2014/093718, WO2014/145599, WO2014/204723, WO2014/204724, WO2014/204725, WO2014/204726, WO2014/204727, WO2014/204728, WO2014/204729, WO2015/065964, WO2015/089351, WO2015/089354, WO2015/089364, WO2015/089419, WO2015/089427, WO2015/089462, WO2015/089465, WO2015/089473 и WO2015/089486, WO2016/205711, WO2017/106657, WO2017/127807 и родственных с ними заявках.

[0443] В некоторых вариантах осуществления система CRISPR сконструирована для модификации последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует γ -глобин, например, для повышения экспрессии γ -глобина. Основная фетальная форма гемоглобина, гемоглобин F (HbF), образуется путем спаривания субъединиц полипептида γ -глобина с субъединицами полипептида α -глобина. Гены фетального γ -глобина человека (HBG1 и HBG2; два высокоомологичных гена, полученных за счет эволюционной дупликации) обычно становятся молчащими приблизительно в момент рождения, тогда как экспрессия взрослых генов β -глобина (HBB и HBD) повышается. Мутации, которые вызывают или обеспечивают устойчивую экспрессию фетального γ -глобина в течение жизни, могут ослаблять фенотипы дефицита β -глобина. Таким образом, повторная активация генов фетального γ -глобина может быть терапевтически полезной, в частности для субъектов с дефицитом β -глобина. Ряд мутаций, которые повышают экспрессию γ -глобина, известны в

данной области техники или описаны в данном документе (смотрите, например, Wienert, Trends in Genetics 34(12): 927-940, 2018, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки и в отношении мутаций, которые повышают экспрессию γ -глобина). Определенные такие мутации находятся в промоторе HBG1 или промоторе HBG2.

[0444] В некоторых вариантах осуществления вектор или геном содержит систему CRISPR, в которой нагрузка включает элемент интеграции, и по меньшей мере один компонент системы CRISPR присутствует в нагрузке, но за пределами элемента интеграции (например, за пределами фрагмента нагрузки, содержащего мобильный элемент интеграции, фланкируемый инвертированными повторами транспозона, или за пределами фрагмента нагрузки, содержащего плечи гомологии для гомологичной интеграции). В определенных конкретных вариантах осуществления, в которых нагрузка содержит мобильный элемент интеграции, причем мобильный элемент интеграции фланкируется инвертированными повторами транспозона, один или более ферментов CRISPR и/или одна или более гРНК системы CRISPR присутствуют в нагрузке в позиции за пределами (т. е. не присутствуют в) мобильного элемента интеграции (т. е. не присутствуют в последовательности нуклеиновой кислоты, фланкируемой инвертированными повторами транспозона). В определенных конкретных вариантах осуществления, в которых нагрузка содержит мобильный элемент интеграции, причем мобильный элемент интеграции фланкируется плечами гомологии, один или более ферментов CRISPR и/или одна или более гРНК системы редактирования CRISPR присутствуют в нагрузке в позиции за пределами (т. е. не присутствуют в) элемента интеграции (т. е. не присутствуют в последовательности нуклеиновой кислоты, фланкируемой плечами гомологии). В таких системах экспрессия и/или активность системы CRISPR является временной в том, что транспозиция мобильного элемента интеграции может разрушить вектор и снизить или прекратить экспрессию одного или более компонентов системы CRISPR, расположенных за пределами мобильного элемента интеграции. Такие векторы, которые содержат системы CRISPR, могут иногда называться «самоинактивирующимися» системами или векторами CRISPR, поскольку интеграция элемента интеграции (например, путем транспозиции или гомологичной рекомбинации) может инактивировать экспрессию и/или активность системы CRISPR. В различных вариантах осуществления самоинактивирующаяся система CRISPR присутствует в комбинированной нагрузке.

[0445] Авторы настоящего изобретения наблюдали, что аденовирусный вектор (например, аденовирусный вектор HDAd), содержащий нагрузку с

самоинактивирующей системой CRISPR, приводил к повышению частоты расщепления в генной терапии (например, *in vivo* генной терапии) и/или повышал выживаемость трансдуцированных и/или отредактированных клеток-мишеней (например, повышал выживаемость трансдуцированных ГСКП) по сравнению с нагрузками с другими системами CRISPR, например, в которых система CRISPR полностью находится в пределах элемента интеграции или в которых система CRISPR не интегрируется в геном клетки-хозяина, но инактивации экспрессии при разрушении вектора не происходит. Самоинактивация систем CRISPR сокращает экспрессию фермента CRISPR и/или гРНК, повышает выживаемость отредактированных клеток и повышает процентное содержание долгосрочных репопулирующих клеток. В качестве одного примера, генная терапия с использованием векторов HDAd, содержащих комбинированную нагрузку, содержащую самоинактивирующуюся систему CRISPR для повторной активации HBG1 и/или HGB2, и дополнительно содержащих последовательность нуклеиновой кислоты для экспрессии γ -глобина, обеспечивала значительно большие уровни γ -глобина в RBC после трансдукции, чем это делали векторы HDAd, содержащие неинактивирующуюся систему CRISPR или только последовательность нуклеиновой кислоты для экспрессии γ -глобина.

[0446] Дополнительно предложены способы, в которых донорный вектор, содержащий самоинактивирующуюся систему CRISPR, вводят, например субъекту-человеку, в комбинации с поддерживающим вектором или геномом, кодирующим транспозазу для транспозиции элемента интеграции. Настоящее изобретение включает, что в различных случаях донорный вектор вводят до поддерживающего вектора, причем период времени между введением донорного вектора и введением поддерживающего вектора обеспечивает средство регуляции длительности и/или уровня активности системы CRISPR. Например, в различных вариантах осуществления поддерживающий вектор можно вводить, например субъекту, в течение периода времени после введения донорного вектора, причем период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 или 72, 96 или 128 часов (например, период времени имеет нижнюю границу 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 или 72 часов и верхнюю границу 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 96 или 128 часов).

[0447] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая компонент системы CRISPR (например, кодирующая фермент CRISPR), сконструирована так, чтобы содержать сайт-мишень микроРНК для регуляции микроРНК экспрессии и/или активности CRISPR.

I(C)(i)(b)(2). Экспрессионные продукты нагрузки с редактором оснований

[0448] Настоящее изобретение включает, помимо прочего, агенты для редактирования оснований и кодирующие их нуклеиновые кислоты, необязательно при этом агент для редактирования оснований или кодирующая его нуклеиновая кислота находятся в векторе или геноме, таком как аденовирусный вектор или геном. Система редактирования оснований может содержать фермент для редактирования оснований и/или по меньшей мере одну гРНК в качестве компонентов. В определенных конкретных вариантах осуществления агент для редактирования оснований и/или система редактирования оснований по настоящему изобретению присутствуют в аденовирусном векторе Ad35 или Ad5/35. При этом специалистам в данной области техники понятно, что агенты для редактирования оснований по настоящему изобретению и кодирующие их последовательности нуклеиновых кислот могут присутствовать в любом контексте или любой форме, например, в векторе, который не является аденовирусным вектором, например, в плазмиде. Нуклеотидные последовательности, кодирующие описанные в данном документе системы редактирования оснований, как правило, являются слишком большими для включения во многие ограниченные по емкости векторные системы, но большая емкость аденовирусных векторов делает возможным включение таких последовательностей в аденовирусные векторы и геномы по настоящему изобретению. Действительно, как обсуждается в другом месте данного документа, аденовирусные векторы могут содержать нагрузку, которая кодирует систему редактирования оснований и дополнительно кодирует одну или более дополнительных кодирующих последовательностей. Дополнительным преимуществом описанных в данном документе аденовирусных векторов и геномов для генной терапии с нагрузкой, кодирующей редакторы оснований по настоящему изобретению, является то, что аденовирусные геномы, такие как геномы Ad35, естественным образом не интегрируются в геномы клеток-хозяев, что облегчает временную экспрессию систем редактирования оснований, что может быть желательным, например, чтобы избежать иммуногенности и/или генотоксичности.

[0449] Редактирование оснований относится к избирательной модификации последовательности нуклеиновой кислоты путем преобразования основания или пары оснований в геномной ДНК или клеточной РНК в другое основание или другую пару оснований (Rees & Liu, *Nature Reviews Genetics*, 19:770-788, 2018). Существует два общих класса редакторов оснований ДНК: (i) редакторы цитозиновых оснований (CBE), которые преобразуют пары оснований гуанин - цитозин в пары оснований тимин - аденин, и (ii) редакторы адениновых оснований (ABE), которые преобразуют пары оснований аденин - тимин в пары оснований гуанин - цитозин. В конкретных вариантах осуществления

компоненты из системы CRISPR скомбинированы с другими ферментами или их биологически активными фрагментами для прямой вставки, причинения или генерации мутаций, таких как точечные мутации, в нуклеиновые кислоты, например, в ДНК или РНК, например, без создания, причинения или генерации одного или более двухцепочечных разрывов в мутированной нуклеиновой кислоте. Определенные такие комбинации компонентов известны как редакторы оснований.

[0450] Редакторы оснований ДНК могут включать каталитически нефункциональную нуклеазу, слитую с ферментом нуклеоснований дезаминазой и, в некоторых случаях, ингибитором ДНК-гликозилазы. Редакторы оснований РНК обеспечивают аналогичные изменения с помощью компонентов, которые модифицируют основания РНК.

[0451] После связывания с целевым локусом в ДНК спаривание оснований между гидовой РНК и целевой цепью ДНК приводит к смещению небольшого сегмента одноцепочечной ДНК. Основания ДНК в этом пузыре одноцепочечной ДНК могут быть модифицированы дезаминазой. В определенных вариантах осуществления для улучшения эффективности в эукариотических клетках каталитически нефункциональная нуклеаза также генерирует ник в нередактируемой цепи ДНК, индуцируя репарацию клетками нередактируемой цепи с использованием в качестве матрицы отредактированной цепи.

[0452] В случае СВЕ редакторы на основе CRISPR можно получать путем связывания цитозиндезаминазы с нуклеазой Cas, например, нуклеазой Cas9 (nCas9). В качестве одного примера, nCas9 может создавать ник в целевой ДНК путем разрезания одной цепи, уменьшая вероятность вредного образования инделей по сравнению с методами, для которых необходим двухцепочечный разрыв. После связывания с ДНК СВЕ дезаминирует целевой цитозин (С) в основание урацила (U). Позже происходит репарация полученной в результате пары U-G посредством клеточной машинерии репарации несовпадений с преобразованием исходной пары C-G в T-A или возвращением к исходному варианту C-G за счет репарации с вырезанием оснований, опосредованной урацилгликозилазой. В различных вариантах осуществления экспрессия ингибитора урацилгликозилазы (UGI), например, UGI, присутствующего в нагрузке, снижает частоту второго варианта и повышает генерацию образования пары оснований T-A.

[0453] В случае редакторов аденозиновых оснований (ABE) типовые аденозиндезаминазы, которые могут действовать на ДНК для редактирования аденинового основания, включают мутантные аденозиндезаминазы TadA (TadA*), для которых ДНК является субстратом. TadA E. coli, как правило, действует как гомодимер для дезаминирования аденозина в транспортной РНК (тРНК). Дезаминаза TadA*

катализирует преобразование целевого «А» в «I» (инозин), который воспринимается клеточными полимеразми как «G». После этого исходная геномная пара оснований А-Т может быть преобразована в пару G-C. Так как клеточная репарация с вырезанием инозина не настолько активна, как вырезание урацила, для ABE не нужен никакой дополнительный ингибиторный белок наподобие UGI в CBE. В некоторых вариантах осуществления типичные ABE могут содержать три компонента, включая тРНК-специфический мономер аденозиндезаминазы (TadA) *E. coli* дикого типа, который может играть структурную роль во время редактирования оснований, мутантный TadA-мономер TadA*, который катализирует дезаминирование дезоксиаденозина, и нуклеазу Cas, такую как Cas9(D10A). В определенных вариантах осуществления между TadA и TadA* расположен линкер, а в определенных вариантах осуществления линкер расположен между TadA* и нуклеазой Cas. В различных вариантах осуществления один или оба линкера содержат по меньшей мере 6 аминокислот, например, по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот (например, с нижней границей 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 аминокислот и верхней границей 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот). В различных вариантах осуществления один или оба линкера содержат 32 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления один или оба линкера имеют последовательность в соответствии с (SGGS)₂-XTEN-(SGGS)₂, или иную последовательность, известную специалистам в данной области техники.

[0454] Редакторы оснований могут напрямую преобразовывать одно основание или одну пару оснований в другие, обеспечивая эффективное введение точечных мутаций в неделящихся клетках без генерации избытка нежелательных побочных продуктов редактирования, таких как вставки (инсерции) и делеции (индели). Например, редакторы оснований могут генерировать менее чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5,5%, 5%, 4,5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5% или 0,1% инделей.

[0455] Редакторы оснований ДНК могут вставлять такие точечные мутации в неделящихся клетках без генерации двухцепочечных разрывов. Вследствие отсутствия двухцепочечных разрывов редакторы оснований не приводят к избытку нежелательных побочных продуктов редактирования, таких как вставки и делеции (индели). Например, редакторы оснований могут генерировать менее чем 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5,5%, 5%, 4,5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5% или 0,1% инделей по сравнению с технологиями, которые не основаны на двухцепочечных разрывах.

[0456] Компоненты большинства систем редактирования оснований включают (1) нацеленный ДНК-связывающий белок, (2) фермент нуклеосомной дезаминазы и (3) ингибитор ДНК-гликозилазы.

[0457] Любую нуклеазу системы CRISPR можно сделать нефункциональной и использовать в системе редактирования оснований. Типовые нуклеазы Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известную как Csn1 и Csx12), Cas10, Cpf1, C2c3, C2c2 и C2clCsy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Cse1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Cpf1, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 и их мутации.

[0458] В конкретных вариантах осуществления в качестве каталитически нефункциональной нуклеазы используют нуклеазно-неактивную Cas9 (dCas9). При этом любую нуклеазу системы CRISPR (многие из которых описаны выше) можно сделать нефункциональной и использовать в системе редактирования оснований. В конкретных вариантах осуществления выбирают домен Cas9 с высокой точностью, при этом домен Cas9 демонстрирует сниженное электростатическое взаимодействие между доменом Cas9 и сахарофосфатным остовом ДНК по сравнению с доменом Cas9 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления домен Cas9 (например, домен Cas9 дикого типа) содержит одну или более мутаций, которые уменьшают ассоциацию между доменом Cas9 и сахарофосфатным остовом ДНК. Домены Cas9 с высокой точностью известны специалистам в данной области техники. Например, домены Cas9 с высокой точностью были описаны в Kleinstiver, et al., *Nature* 529, 490-495, 2016; и Slaymaker et al., *Science* 351, 84-88, 2015.

[0459] Также можно использовать нуклеазы из других систем редактирования генов. Например, в системах редактирования оснований могут использоваться цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) (Urnov et al., *Nat Rev Genet.*, 11(9):636-46, 2010) и нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN) (Joung et al., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(1):49-55, 2013). Дополнительную информацию в отношении ДНК-связывающих нуклеаз смотрите в US2018/0312825A1.

[0460] В конкретных вариантах осуществления фермент нуклеоснований дезаминаза включает домен цитидиндезаминазы или домен аденидезаминазы.

[0461] В конкретных вариантах осуществления в качестве фермента нуклеоснований дезаминазы используют домен цитидиндезаминазы. В конкретных вариантах осуществления в качестве фермента нуклеоснований дезаминазы используют домен адениндезаминазы. Кроме того, в конкретных вариантах осуществления в качестве ингибитора гликозилазы используют ингибитор урацилгликозилазы (UGI). Например, в конкретных вариантах осуществления никаза dCas9 или Cas9 может быть слита с доменом цитидиндезаминазы. Никаза dCas9 или Cas9, слитая с доменом цитидиндезаминазы, может быть слита с одним или более доменами UGI. Редакторы оснований с более чем

одним доменом UGI могут генерировать меньше инделей и более эффективно дезаминируют целевые нуклеиновые кислоты.

[0462] В конкретных вариантах осуществления домен дезаминазы (цитидин- и/или аденин-) слит с N-концом каталитически нефункциональной нуклеазы. Это связано с тем, что домен цитидиндезаминазы, слитый с N-концом Cas9, может иметь улучшенную эффективность редактирования оснований по сравнению с другими конфигурациями. В этих вариантах осуществления ингибитор гликозилазы (например, домен UGI) может быть слит с C-концом каталитически нефункциональной нуклеазы. Когда используют несколько ингибиторов гликозилазы, каждый может быть слит с C-концом каталитически нефункциональной нуклеазы.

[0463] В конкретных вариантах осуществления CBE, в котором используется домен цитидиндезаминазы, преобразует пары оснований гуанин - цитозин в пары оснований тимин - аденин путем дезаминирования экзоциклического амина цитозина с созданием урацила. Примеры ферментов цитозиндезаминазы включают APOBEC1, APOBEC3A, APOBEC3G, CDA1 и AID. В частности, APOBEC1 воспринимает одноцепочечную (оц)ДНК в качестве субстрата, но не может воздействовать на двухцепочечную (дц)ДНК.

[0464] Большинство систем редактирования оснований также содержат ингибитор ДНК-гликозилазы, который служит для блокировки естественных механизмов репарации ДНК, которые в ином случае могут осуществлять репарацию предусмотренного редактирования оснований. В конкретных вариантах осуществления ингибитор ДНК-гликозилазы включает ингибитор урацилгликозилазы, такой как белок ингибитора урацил-ДНК-гликозилазы (UGI), описанный в Wang et al. (Gene 99, 31-37, 1991).

[0465] Компоненты редакторов оснований могут быть слиты напрямую (например, с помощью прямой ковалентной связи) или посредством линкеров. Например, каталитически нефункциональная нуклеаза может быть слита посредством линкера с ферментом дезаминазой и/или ингибитором гликозилазы. Несколько ингибиторов гликозилазы также могут быть слиты посредством линкеров. Как понятно специалистам в данной области техники, линкеры можно использовать, чтобы связывать любые пептиды или их части.

[0466] Типовые линкеры включают полимерные линкеры (например, на основе полиэтилена, полиэтиленгликоля, полиамида, сложного полиэфира); аминокислотные линкеры; содержащие углерод-азотную связь амидные линкеры; циклические или ациклические, замещенные или незамещенные, разветвленные или неразветвленные алифатические или гетероалифатические линкеры; мономерные, димерные или полимерные линкеры на основе аминокислотной кислоты; линкеры на основе

аминоалкановой кислоты (например, глицина, этановой кислоты, аланина, β-аланина, 3-аминопропановой кислоты, 4-аминобутановой кислоты, 5-пентановой кислоты); мономерные, димерные или полимерные линкеры на основе аминокснсановой кислоты (Ahx); линкеры на основе карбоциклического фрагмента (например, циклопентана, циклогексана); линкеры на основе арильного или гетероарильного фрагмента; и линкеры на основе фенильного кольца.

[0467] Линкеры также включать функционализированные фрагменты для облегчения присоединения нуклеофила (например, тиола, амина) от пептида к линкеру. В качестве части линкера можно использовать любой электрофил. Типовые электрофилы включают активированные сложные эфиры, активированные амиды, акцепторы Михаэлиса, алкилгалогениды, арилгалогениды, ацилгалогениды и изотиоцианаты.

[0468] В конкретных вариантах осуществления длина линкеров находится в диапазоне 4-100 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления длина линкеров составляет 4 аминокислот, 9 аминокислот, 14 аминокислот, 16 аминокислот, 32 аминокислот или 100 аминокислот.

[0469] Были описаны многочисленные системы редактирования оснований (BE, от англ «base editing»), образуемые путем связывания нацеленных ДНК-связывающих белков с ферментами цитидиндезаминазы и ингибиторами ДНК-гликозилазы (например, UGI). Эти комплексы включают, например, BE1 ([APOBEC1-16 аминокислотный (ак) линкер-Sp dCas9 (D10A, H840A)] Komer et al., Nature, 533, 420-424, 2016), BE2 ([APOBEC1-16ак линкер-Sp dCas9 (D10A, H840A)-4ак линкер-UGI] Komer et al., 2016 выше), BE3 ([APOBEC1-16ак линкер-Sp nCas9 (D10A)-4ак линкер-UGI] Komer et al., выше), HF-BE3 ([APOBEC1-16ак линкер-HF nCas9 (D10A)-4ак линкер-UGI] Rees et al., Nat. Commun. 8, 15790, 2017), BE4, BE4max ([APOBEC1-32ак линкер-Sp nCas9 (D10A)-9ак линкер-UGI-9ак линкер-UGI] Koblan et al., Nat. Biotechnol. 10.1038/nbt.4172, 2018; Komer et al., Sci. Adv., 3, eако4774, 2017), BE4-GAM ([Gam-16ак линкер-APOBEC1-32ак линкер-Sp nCas9 (D10A)-9ак линкер-UGI-9ак линкер-UGI] Komer et al., 2017 выше), YE1-BE3 ([APOBEC1 (W90Y, R126E)-16ак линкер-Sp nCas9 (D10A)-4ак линкер-UGI] Kim et al., Nat. Biotechnol. 35, 475-480, 2017), EE-BE3 ([APOBEC1 (R126E, R132E)-16ак линкер-Sp nCas9 (D10A)-4ак линкер-UGI] Kim et al., 2017 выше), YE2-BE3 ([APOBEC1 (W90Y, R132E)-16ак линкер-Sp nCas9 (D10A)-4ак линкер-UGI] Kim et al., 2017 выше), YEE-BE3 ([APOBEC1 (W90Y, R126E, R132E)-16ак линкер-Sp nCas9 (D10A)-4ак линкер-UGI] Kim et al., 2017 выше), VQR-BE3 ([APOBEC1-16ак линкер-Sp VQR nCas9 (D10A)-4ак линкер-UGI] Kim et al., 2017 выше), VRER-BE3 ([APOBEC1-16ак линкер-Sp VRER nCas9 (D10A)-4ак линкер-UGI] Kim et al., Nat. Biotechnol. 35, 475-480, 2017), Sa-BE3 ([APOBEC1-16ак линкер-Sa nCas9 (D10A)-4ак

линкер-UGI] Kim et al., 2017 *выше*), SA-BE4 ([APOBEC1-32ак линкер-Sa nCas9 (D10A)-9ак линкер-UGI-9ак линкер-UGI] Komer et al., 2017 *выше*), SaBE4-Gam ([Gam-16ак линкер-APOBEC1-32ак линкер-Sa nCas9 (D10A)-9ак линкер-UGI-9ак линкер-UGI] Komer et al., 2017 *выше*), SaKKH-BE3 ([APOBEC1-16ак линкер-Sa KKH nCas9 (D10A)-4ак линкер-UGI] Kim et al., 2017 *выше*), Cas12a-BE ([APOBEC1-16ак линкер-dCas12a-14ак линкер-UGI], Li et al., Nat. Biotechnol. 36, 324-327, 2018), Target-AID ([Sp nCas9 (D10A)-100ак линкер-CDA1-9ак линкер-UGI] Nishida et al., Science, 353, 10.1126/science.akf8729, 2016), Target-AID-NG ([Sp nCas9 (D10A)-NG-100ак линкер-CDA1-9ак линкер-UGI] Nishimasu et al., Science, 361(6408): 1259-1262, 2018), xBE3 ([APOBEC1-16ак линкер-xCas9(D10A)-4ак линкер-UGI] Hu et al., Nature, 556, 57-63, 2018), eA3A-BE3 ([APOBEC3A (N37G)-16ак линкер-Sp nCas9(D10A)-4ак линкер-UGI] Gerkhe et al., Nat. Biotechnol., 10.1038/nbt.4199, 2018), A3A-BE3 ([hAPOBEC3A-16ак линкер-Sp nCas9(D10A)-4ак линкер-UGI] Wang et al., Nat. Biotechnol. 10.1038/nbt.4198, 2018) и BE-PLUS ([10X GCN4-Sp nCas9(D10A) / ScFv-rAPOBEC1-UGI] Jiang et al., Cell. Res, 10.1038/s41422-018-0052-4, 2018). Дополнительные примеры комплексов BE, включая редакторы оснований с адениндезаминазой, смотрите в Rees & Liu Nat. Rev Genet. 19(12): 770-788, 2018.

[0470] Дополнительную информацию в отношении редакторов оснований смотрите в US2018/0312825A1, WO2018/165629A, Urnov et al., Nat Rev Genet. 11(9):636-46, 2010; Joung et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 14(1):49-55, 2013; Charpentier et al., Nature.; 495(7439):50-1, 2013; Seo & Kim, Nature Medicine, 24, 1493-1495, 2018, и Rees & Liu, Nature Reviews Genetics, 19, 770-78, 2018, которые все включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме и конкретно в отношении редакторов оснований. Определенные конструкции редакторов оснований, которые можно использовать в различных вариантах осуществления настоящего изобретения, описаны в Zafra et al., Nat Biotech, 36(9):888-893, 2018, и Koblan et al., Nat Biotech 36(9):843-846, 2018, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме и конкретно в отношении конструкций редакторов оснований.

[0471] В некоторых вариантах осуществления система редактора оснований сконструирована для модификации последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует γ -глобин, например, для повышения экспрессии γ -глобина. Основная фетальная форма гемоглобина, гемоглобин F (HbF), образуется путем спаривания полипептидов γ -глобина с полипептидами α -глобина. Гены фетального γ -глобина человека (HBG1 и HBG2; два высокоомологичных гена, полученных за счет эволюционной дупликации) обычно становятся молчащими приблизительно в момент рождения, тогда как экспрессия взрослых генов β -глобина (HBB и HBD) повышается. Мутации, которые вызывают или

обеспечивают устойчивую экспрессию фетального γ -глобина в течение жизни, могут ослаблять фенотипы дефицита β -глобина. Таким образом, повторная активация генов фетального γ -глобина может быть терапевтически полезной, в частности для субъектов с дефицитом β -глобина. Ряд мутаций, которые повышают экспрессию γ -глобина, известны в данной области техники или описаны в данном документе (смотрите, например, Wienert Trends in Genetics 34(12): 927-940, 2018, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки и в отношении мутаций, которые повышают экспрессию γ -глобина). Определенные такие мутации находятся в промоторе HBG1 или промоторе HBG2.

[0472] В некоторых вариантах осуществления вектор или геном содержит систему редактирования оснований, в которой нагрузка включает элемент интеграции, и по меньшей мере один компонент системы редактирования оснований присутствует в нагрузке, но за пределами элемента интеграции (например, за пределами фрагмента нагрузки, содержащего мобильный элемент интеграции, фланкируемый инвертированными повторами транспозона, или за пределами фрагмента нагрузки, содержащего плечи гомологии для гомологичной интеграции). В определенных конкретных вариантах осуществления, в которых нагрузка содержит мобильный элемент интеграции, причем мобильный элемент интеграции фланкируется инвертированными повторами транспозона, один или более ферментов для редактирования оснований и/или одна или более гРНК системы редактирования оснований присутствуют в нагрузке в позиции за пределами (т. е. не присутствуют в) мобильного элемента интеграции (т. е. не присутствуют в последовательности нуклеиновой кислоты, фланкируемой инвертированными повторами транспозона). В определенных конкретных вариантах осуществления, в которых нагрузка содержит мобильный элемент интеграции, причем мобильный элемент интеграции фланкируется плечами гомологии, один или более ферментов для редактирования оснований и/или одна или более гРНК системы редактирования оснований присутствуют в нагрузке в позиции за пределами (т. е. не присутствуют в) элемента интеграции (т. е. не присутствуют в последовательности нуклеиновой кислоты, фланкируемой плечами гомологии). В таких системах экспрессия и/или активность системы редактирования оснований является временной в том, что транспозиция мобильного элемента интеграции может разрушить вектор и снизить или прекратить экспрессию одного или более компонентов системы редактирования оснований, расположенных за пределами мобильного элемента интеграции. Такие векторы, которые содержат системы редактирования оснований, могут иногда называться «самоинактивирующимися» системами или векторами редактирования оснований,

поскольку интеграция элемента интеграции (например, путем транспозиции или гомологичной рекомбинации) может инактивировать экспрессию и/или активность системы редактирования оснований. В различных вариантах осуществления самоинактивирующаяся система редактирования оснований присутствует в комбинированной нагрузке.

[0473] Настоящее изобретение включает то, что аденовирусный вектор (например, аденовирусный вектор HDAd), содержащий нагрузку с самоинактивирующейся системой редактирования оснований может обуславливать повышение частоты расщепления в генной терапии (например, *in vivo* генной терапии) и/или повышать выживаемость трансдуцированных и/или отредактированных клеток-мишеней (например, повышать выживаемость трансдуцированных ГСКП) по сравнению с нагрузками с другими системами редактирования оснований, например, в которых система редактирования оснований полностью находится в пределах элемента интеграции или в которых система редактирования оснований не интегрируется в геном клетки-хозяина, но инактивации экспрессии при разрушении вектора не происходит. Самоинактивация систем редактирования оснований сокращает экспрессию фермента для редактирования оснований и/или гРНК, повышает выживаемость отредактированных клеток и повышает процентное содержание долгосрочных репопулирующих клеток. Например, генная терапия с использованием векторов HDAd, содержащих комбинированную нагрузку, содержащую самоинактивирующуюся систему редактирования оснований для повторной активации HBG1 и/или HBG2, и дополнительно содержащих последовательность нуклеиновой кислоты для экспрессии γ -глобина, может обеспечивать значительно большие уровни γ -глобина в RBC после трансдукции, чем векторы HDAd, содержащие неинактивирующуюся систему редактирования оснований или только последовательность нуклеиновой кислоты для экспрессии γ -глобина.

[0474] Дополнительно предложены способы, в которых донорный вектор, содержащий самоинактивирующуюся систему редактирования оснований, вводят, например субъекту-человеку, в комбинации с поддерживающим вектором или геномом, кодирующим транспозазу для транспозиции элемента интеграции. Настоящее изобретение включает, что в различных случаях донорный вектор вводят до поддерживающего вектора, причем период времени между введением донорного вектора и введением поддерживающего вектора обеспечивает средство регуляции длительности и/или уровня активности системы редактирования оснований. Например, в различных вариантах осуществления поддерживающий вектор можно вводить, например субъекту, в течение периода времени после введения донорного вектора, причем период времени составляет

по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 или 72, 96 или 128 часов (например, период времени имеет нижнюю границу 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 или 72 часов и верхнюю границу 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 96 или 128 часов).

[0475] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая компонент системы редактирования оснований (например, кодирующая фермент для редактирования оснований), сконструирована так, чтобы содержать сайт-мишень микроРНК для регуляции микроРНК экспрессии и/или активности редактора оснований.

[0476] В настоящем изобретении дополнительно признается и решается проблема применения систем АВЕ. Настоящее изобретение включает признание того, что повторяемость и/или сходство последовательностей в последовательностях редактора оснований TadA и TadA* может приводить к гомологичной рекомбинации, которая снижает эффективность таких векторов в отношении экспрессии и/или активности кодируемых систем редактирования оснований, например, для *in vivo* генной терапии. Насколько известно авторам настоящего изобретения, оно представляет первое признание этой проблемы, например, согласно наблюдениям в *in vivo* генной терапии. Чтобы решить эту проблему, TadA и/или TadA* модифицировали для обеспечения снижения гомологии между последовательностями. В различных вариантах осуществления по меньшей мере 5 соответствующих кодонов последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих TadA и TadA* сконструированы так, чтобы иметь разные нуклеотидные последовательности, необязательно при этом конструирование включает замещение исходной последовательности кодона в нуклеотидной последовательности TadA или TadA* отличной последовательностью кодона, которая кодирует такую же аминокислоту, в соответствии с частотой использования кодона в релевантной системе, например, в организме человека. В различных вариантах осуществления по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 кодонов сконструированы так, чтобы отличаться между последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими соответственно TadA и TadA*. Типовые сконструированные последовательности приведены на Фиг. 132С.

[0477] В различных вариантах осуществления АВЕ содержит последовательности TadA и TadA*, которые содержат по меньшей мере одну модификацию последовательности относительно следующих последовательностей TadA и TadA*, которые могут быть, например, напрямую слиты или отделены линкером в последовательности, кодирующей АВЕ. В различных вариантах осуществления последовательность TadA представляет собой последовательность, которая имеет по

меньшей мере 80% идентичности с предыдущей последовательностью TadA (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности) и может содержать любую или все модификации TadA, предложенные в данном документе. В различных вариантах осуществления последовательность TadA* представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с предыдущей последовательностью TadA* (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности) и может содержать любую или все модификации TadA*, предложенные в данном документе. В различных вариантах осуществления последовательность TadA и/или TadA* по настоящему изобретению может содержать или не содержать линкер, такой как 32-аминокислотный линкер. В различных последовательностях и вариантах осуществления, включая те, которые включают последовательности TadA и/или TadA*, приведенные ниже, последовательность может включать 3' последовательность из 96 нуклеотидов, кодирующую 32-аминокислотный линкер. Соответственно, в различных вариантах осуществления последовательность TadA представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с нуклеотидами 1-498 (за исключением 96 3' нуклеотидов) предыдущей последовательностью TadA (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности) и может содержать любую или все соответствующие модификации TadA, предложенные в данном документе. Соответственно, в различных вариантах осуществления последовательность TadA* представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с нуклеотидами 1-498 (за исключением 96 3' нуклеотидов) предыдущей последовательностью TadA* (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности) и может содержать любую или все соответствующие модификации TadA*, предложенные в данном документе.

[0478] В различных вариантах осуществления последовательность TadA и/или TadA* ABE сконструирована для снижения процента идентичности между TadA и TadA* (или их выровненной частью, например, включающей нуклеотиды 1-579 или 1-498) до менее чем 80% (например, менее чем 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45% или 40%, или процента идентичности между 60% и 80%, 65% и 80%, 70%, и 80%, 75% и 80%, 60% и 75%, 65% и 75%, 70% и 75%, 60% и 70% или 65% и 70%). В плазмиде pCMV-ABEmax (Addgene № 112095), полученной другими, существуют 109 п. о. несовпадения между двумя 594 п. о. повторами TadA+32aa, имеющими идентичность 81,6%. Сайты для модификации TadA и/или TadA* в различных представленных вариантах осуществления включают подчеркнутые с приведенных ниже последовательностях и описанные в

следующих таблицах. В различных вариантах осуществления последовательность TadA* содержит одну или более или все модификации, соответствующие приведенным в таблице модификаций TadA* (таблица 11). В различных вариантах осуществления последовательность TadA одержит одну или более или все модификации, приведенные в таблице модификаций TadA (таблица 10), а последовательность TadA* содержит одну или более или все модификации, соответствующие приведенным в таблице модификаций TadA* (таблица 11). В определенных конкретных вариантах осуществления последовательность TadA содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 модификаций (например, 1-5, 5-10, 5-20, 5-25, 10-20, 10-25, 15-20, 15-25 или 20-25 модификаций), соответствующих приведенным в таблице модификаций TadA (таблица 10; со ссылкой на SEQ ID NO: 280), а последовательность TadA* содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 модификаций (например, 1-5, 5-10, 5-16 или 10-16 модификаций), соответствующих приведенным в таблице модификаций TadA* (таблица 11; со ссылкой на SEQ ID NO: 281).

[0479] Как понятно специалистам в данной области техники, последовательности TadA и TadA* со сниженной идентичностью в целом используются в области генетической инженерии, включая, без ограничения, *in vivo* и *ex vivo* генетическую инженерию. Последовательности TadA и TadA*, сконструированные так, чтобы иметь сниженную идентичность, также могут быть включены в нагрузку (например, нагрузку по настоящему изобретению), например, в аденовирусный вектор или геном, такой как донорный вектор или донорный геном Ad35, Ad35++, HDAd35 или HDAd35++, например, для *in vivo* генной терапии.

[0480] **Таблица 10: Таблица модификаций TadA**

Позиция	изменение нуклеотида
15	T > C
57	G > A
63	A > C
69	T > C
87	G > C
112	A > C
114	A > C
126	G > A
147	C > A
198	C > A

216	C > T
289	A > C
318	G > A
333	C > A
343	T > A
344	C > G
369	C > A
402	A > C
451	C > A
507	A > C
547	A > T
548	G > C
568	A > T
569	G > C
570	C > T

Таблица 11: Таблица модификаций TadA*

Позиция	изменение нуклеотида
321	C > T
330	C > T
345	C > T
382	C > A
384	C > A
465	C > T
498	C > T
499	T > A
500	C > G
501	C > T
504	A > C
516	A > G
537	A > C
592	T > A
593	C > G
594	A > C

Референсные последовательности:

TadA (SEQ ID NO: 280)

TadA* (SEQ ID NO: 281)

[0481] Специалистам в данной области техники также будет понятно, что число модификаций, соответствующих таковым из таблицы модификаций TadA и/или таблицы модификаций TadA*, которые присутствуют в ABE, содержащем последовательность TadA и последовательность TadA*, может быть значительным без учета конкретных выбранных модификаций, по меньшей мере в тех случаях, когда снижение идентичности между нуклеотидными последовательностями TadA и TadA* является решением идентифицированной проблемы, для которого не нужна какая-либо конкретная модификация, а скорее общее изменение идентичности между последовательностями TadA и TadA*. Таким образом, хотя в настоящем изобретении предложены типовые модификации, включение или исключение любой конкретной модификации не является критическим для представленного в данном документе решения. Следовательно, настоящее изобретение включает последовательности TadA и TadA* со сниженной идентичностью, которые содержат одну или более модификаций, представленных в таблицах модификаций TadA и TadA*, и имеют процент идентичности между TadA и TadA* (или их выровненной частью, например, включая нуклеотиды 1-579) менее 80% (например, менее 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45% или 40%).

[0482] Во избежание сомнений, предложенную последовательность можно идентифицировать как содержащую или не содержащую любую модификацию последовательности TadA или TadA*, предложенную в данном документе, путем сравнения с соответствующей нуклеотидной позицией предыдущих последовательностей TadA и TadA*. Соответственно, определение наличия или отсутствия любой модификации последовательности TadA или TadA*, предложенной в данном документе, не зависит от происхождения или истории любой предложенной последовательности и может быть определено исключительно по самой последовательности.

[0483] Специалистам в данной области техники понятно, что системы ABE по настоящему изобретению, а также их последовательности TadA и TadA* являются показателями общей применимости, не ограниченной представленным контекстом или каким-либо другим контекстом, приведенным в настоящем описании, например, не ограниченной применением в конкретном векторе, серотипе или другом контексте. Действительно, последовательности по настоящему изобретению можно использовать *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* в любой экспериментальной системе, которая может кодировать или содержать компоненты редактирования оснований. Эти последовательности применимы в качестве инструментов в различных применениях молекулярной биологии.

I(C)(i)(c). Экспрессионные продукты нагрузки с малой РНК

[0484] Малые РНК представляют собой короткие некодирующие молекулы РНК, которые играют роль в генной экспрессии. В конкретных вариантах осуществления длина малых РНК составляет менее 200 нуклеотидов. В конкретных вариантах осуществления длина малых РНК составляет менее 100 нуклеотидов. В конкретных вариантах осуществления длина малых РНК составляет менее 50, 45, 40, 35, 30, 25 или 20 нуклеотидов. В конкретных вариантах осуществления длина малых РНК составляет менее 20 нуклеотидов. В различных вариантах осуществления малая РНК имеет длину с нижней границей 5, 10, 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов и верхней границей 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или 100 нуклеотидов. Малые РНК включают, но не ограничиваются этим, микроРНК (миРНК), пиви-взаимодействующие РНК (пиРНК), малые интерферирующие РНК (миРНК), малые ядрышковые РНК (мяРНК), тРНК-полученные малые РНК (тмРНК), малые рРНК-полученные РНК (мрРНК) и малые ядерные РНК. Дополнительные классы малых РНК продолжают открывать.

[0485] В конкретных вариантах осуществления молекулы интерферирующих РНК, которые являются гомологичными целевой мРНК или с которыми интерферирующая РНК может гибридизироваться, могут приводить к деградации целевой молекулы мРНК или снижению трансляции целевой мРНК, процесс чего называется РНК-интерференцией (РНКи) (Carthew, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 244-248, 2001). РНКи происходит в клетках естественным образом для удаления чужеродных РНК (например, вирусных РНК). В некоторых случаях естественная РНКи происходит посредством фрагментов, отщепляемых от свободной двухцепочечной РНК (дцРНК), которые направляют механизм деградации на другие сходные последовательности РНК. В альтернативном варианте РНКи можно использовать, например, для сайленсинга экспрессии целевых генов. Типовые молекулы РНКи включают малую шпилечную РНК (мшРНК, также называемую короткой шпилечной РНК) и малую интерферирующую РНК (миРНК).

[0486] Не ограничиваясь изобретением и не привязываясь к теории, РНК-интерференция в природе и/или в некоторых вариантах осуществления, как правило, является двухэтапным процессом. На первом этапе, этапе инициации, поступающая дцРНК расщепляется на 21-23-нуклеотидную (нт) миРНК, возможно за счет действия Dicer, члена семейства III рибонуклеаз (РНКаз) дцРНК-специфических рибонуклеаз, который процессирует (расщепляет) дцРНК (внесенную напрямую или посредством трансгена или вируса) АТФ-зависимым образом. Успешное событие расщепления разрушает РНК до дуплексов из 19-21 пар оснований (п. о.) (миРНК), каждый с 2-нуклеотидными 3' выступами (Hutvagner & Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232,

2002; Bernstein, Nature 409:363-366, 2001).

[0487] На втором этапе, эффекторном этапе, дуплексы миРНК связываются с нуклеазным комплексом с образованием РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). Для активации RISC необходимо АТФ-зависимое раскручивание дуплекса миРНК. Затем активный RISC нацеливается на гомологичный транскрипт посредством взаимодействий спаривания оснований и, как правило, расщепляет мРНК на 12-нуклеотидные фрагменты от 3' конца миРНК (Hutvagner & Zamore, Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 225-232, 2002; Hammond et al., Nat. Rev. Gen. 2:110-119, 2001; Sharp, Genes. Dev. 15:485-490, 2001). Исследования показывают, что каждый RISC содержит одну миРНК и РНКазу (Hutvagner & Zamore, Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 225-232, 2002).

[0488] Из-за значительной активности РНКи было предположено существование этапа амплификации в пути РНКи. Амплификация может происходить посредством копирования поступающих дцРНК, которое создавало бы больше миРНК, или посредством репликации образованных миРНК. В альтернативном или дополнительном варианте амплификация может быть обусловлена множественными событиями обновления RISC (Hutvagner & Zamore, Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 225-232, 2002; Hammond et al., Nat. Rev. Gen. 2:110-119, 2001; Sharp, Genes. Dev. 15:485-490, 2001). РНКи также описана в Tuschl (Chem. Biochem. 2: 239-245, 2001); Cullen (Nat. Immunol. 3:597-599, 2002); и Brantl (Biochem. Biophys. Act. 1575:15-25, 2002).

[0489] В некоторых вариантах осуществления синтез молекул РНКи, подходящих для использования с настоящим изобретением, можно осуществлять следующим образом. Сначала последовательность мРНК можно сканировать ниже стартового кодона целевого транскрипта. Каждый случай AA и 3' смежных 19 нуклеотидов записывают как потенциальный сайты-мишени миРНК. В конкретных вариантах осуществления сайты-мишени миРНК могут быть выбраны из открытой рамки считывания, поскольку нетранслируемые области (НТО) более богаты регуляторными сайтами связывания белка. НТО-связывающие белки и/или комплексы инициации трансляции могут препятствовать связыванию эндонуклеазного комплекса миРНК (Tuschl, Chem. Biochem. 2: 239-245, 2001). Однако следует понимать, что миРНК, направленные на нетранслируемые области, также могут быть эффективными, как продемонстрировано глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (GAPDH), в случае которой миРНК, направленная на 5' НТО, опосредовала 90% снижение клеточной мРНК GAPDH и полностью устраняла уровень белка. Далее потенциальные сайты связывания можно сравнивать с соответствующей геномной базой данных, используя любое программное обеспечение для выравнивания последовательностей, такое как программа основного средства поиска локального

выравнивания (BLAST), доступное на сервере Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Предполагаемые сайты-мишени, которые демонстрируют значительную гомологию с другими кодирующими последовательностями, можно отфильтровывать.

[0490] Удовлетворяющие требованиям целевые последовательности можно отбирать в качестве матриц для синтеза миРНК. Отобранные последовательности могут включать последовательности с низким содержанием G/C, поскольку было показано, что они являются более эффективными в опосредовании сайленсинга генов по сравнению с последовательностями с содержанием G/C выше 55%. Для оценки можно выбрать несколько целевых сайтов вдоль длины целевого гена. Для лучшей оценки выбранным миРНК можно использовать отрицательный контроль. миРНК отрицательного контроля может иметь такую же нуклеотидную композицию, как и миРНК, но в ней может отсутствовать значительная гомология с геномом. Таким образом, можно использовать рандомизированную нуклеотидную последовательность миРНК, при условии, что она не демонстрирует какой-либо существенной гомологии с другими генами.

[0491] Смысловую цепь можно сконструировать на основании последовательности выбранной части. Антисмысловая цепь обычно имеет такую же длину, как и смысловая цепь, и содержит комплементарные нуклеотиды. В конкретных вариантах осуществления цепи являются полностью комплементарными и имеют тупые концы при выравнивании или отжиге. В других вариантах осуществления цепи выравнивают или отжигают так, чтобы генерировать 1-, 2- или 3-нуклеотидные выступы, т. е. 3' конец смысловой цепи простирается на 1, 2 или 3 нуклеотида дальше, чем 5' конец антисмысловой цепи, и/или 3' конец антисмысловой цепи простирается на 1, 2 или 3 нуклеотида дальше, чем 5' конец смысловой цепи. Выступы могут содержать нуклеотиды, соответствующие целевой генной последовательности (или ее комплементарной последовательности). В альтернативном варианте выступы могут содержать дезоксирибонуклеотиды, например, дезокситимины (dT), или аналоги нуклеотидов, или другой подходящий отличный от нуклеотидов материал.

[0492] Для облегчения попадания антисмысловой цепи в RISC (и, таким образом, повышения или улучшения эффективности целевого расщепления и сайленсинга) можно изменять силу спаривания оснований между 5' концом смысловой цепи и 3' концом антисмысловой цепи, например, уменьшать или снижать. В конкретных вариантах осуществления сила спаривания оснований является меньшей из-за меньшего количества пар оснований G:C между 5' концом первой или антисмысловой цепи и 3' концом второй или смысловой цепи, чем между 3' концом первой или антисмысловой цепи и 5' концом

второй или смысловой цепи. В конкретных вариантах осуществления сила спаривания оснований является меньшей из-за по меньшей мере одной несовпадающей пары оснований между 5' концом первой или антисмысловой цепи и 3' концом второй или смысловой цепи. Предпочтительно несовпадающая пара оснований выбрана из группы, включающей G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C и U:U. В другом варианте осуществления сила спаривания оснований является меньшей из-за по меньшей мере одной неоднозначной пары оснований, например, G:U, между 5' концом первой или антисмысловой цепи и 3' концом второй или смысловой цепи. В другом варианте осуществления сила спаривания оснований является меньшей из-за по меньшей мере одной пары оснований, содержащей редкий нуклеотид, например, инозин (I). В конкретных вариантах осуществления пара оснований выбрана из группы, включающей I:A, I:U и I:C. В другом варианте осуществления сила спаривания оснований является меньшей из-за по меньшей мере одной пары оснований, содержащей модифицированный нуклеотид. В конкретных вариантах осуществления модифицированный нуклеотид выбран из, например, 2-амино-G, 2-амино-A, 2,6-диамино-G и 2,6-диамино-A.

[0493] шРНК представляют собой одноцепочечные полинуклеотиды со шпилечной петлевой структурой. Одноцепочечный полинуклеотид имеет петлевой сегмент, связывающий 3' конец одной цепи в двухцепочечной области и 5' конец другой цепи в двухцепочечной области. Двухцепочечная область образуется из первой последовательности, которая может гибридизироваться с целевой последовательностью, такой как кодирующий полинуклеотид трансгена, и второй последовательности, которая является комплементарной первой последовательности, таким образом первая и вторая последовательности образуют двухцепочечную область, к которой связующая последовательность присоединяет концы с образованием шпилечной петлевой структуры. Первая последовательность может гибридизироваться с любой частью кодирующего полинуклеотид трансгена. Двухцепочечный стеблевой домен кшРНК может содержать сайт рестрикционной эндонуклеазы.

[0494] Транскрипция кшРНК инициируется в промоторе полимеразы III (Pol III), а терминация происходит, как считается, в позиции 2 сайта терминации транскрипции с 4-5 тиминами. Считается, что после экспрессии кшРНК сворачиваются в структуру типа стебель - петля с 3' UU-выступами; после этого концы этих кшРНК процессируются с преобразованием кшРНК в миРНК-подобные молекулы из 21-23 нуклеотидов (Brummelkamp et al., *Science*. 296(5567):550-553, 2002; Lee et al., *Nature Biotechnol.* 20(5):500-505, 2002; Miyagishi & Taira, *Nature Biotechnol.* 20(5):497-500, 2002; Paddison et al., *Genes & Dev.* 16(8): 948-958, 2002; Paul et al., *Nature Biotechnol.* 20(5):505-508, 2002;

Sui, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(6):5515-5520, 2002; Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(9):6047-6052, 2002).

[0495] Структура кшРНК типа стебель - петля может иметь необязательные нуклеотидные выступы, такие как 2 п. о. выступы, например, 3' UU-выступы. Хотя может иметь место вариация, стебли, как правило, имеют диапазон 15-49, 15-35, 19-35, 21-31 п. о. или 21-29 п. о., а петли могут иметь диапазон 4-30 п. о., например, 4-23 п. о. В конкретных вариантах осуществления последовательности кшРНК содержат 45-65 п. о.; 50-60 п. о.; или 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 59 п. о. В конкретных вариантах осуществления последовательности кшРНК содержат 52 или 55 п. о. В конкретных вариантах осуществления миРНК содержат 15-25 п. о. В конкретных вариантах осуществления миРНК содержат 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 п. о. В конкретных вариантах осуществления миРНК содержат 19 п. о. Однако для специалиста в данной области техники будет понятно, что миРНК, имеющие длину менее 16 нуклеотидов или более 24 нуклеотидов, также могут опосредовать РНКи. Было продемонстрировано, что более длинные агенты РНКи вызывают ответ интерферонов или протеинкиназы R (PKR) в определенных клетках млекопитающих, что может быть нежелательным. Предпочтительно агенты РНКи не вызывают ответ PKR (т. е. имеют достаточно короткую длину). При этом могут быть применимы более длинные агенты РНКи, например, в ситуациях, когда ответ PKR снижен или погашен альтернативными способами.

[0496] Малые РНК также можно использовать для активации генной экспрессии.

I(C)(i)(d). Комбинированная нагрузка

[0497] Настоящее изобретение включает аденовирусные векторы и геномы, которые содержат нагрузку, которая кодирует множество экспрессионных продуктов. Нагрузка, которая кодирует множество экспрессионных продуктов, может называться комбинированной нагрузкой. В различных вариантах осуществления комбинированная нагрузка может содержать первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый экспрессионный продукт, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй экспрессионный продукт. В различных вариантах осуществления каждый из первого и второго экспрессионных продуктов может быть независимо выбран из любого из белка (например, терапевтического белка, например, заместительного фермента), связывающего домена, антитела, CAR, TCR, системы CRISPR, системы редактирования оснований, малой РНК и/или селективного маркера, например, как описано в данной документе. Типовые варианты комбинированной нагрузки описаны в данном документе.

[0498] Специалистам в данной области техники понятно, что кодирующие

последовательности могут контролироваться и/или экспрессироваться в функциональной связи с любым из ряда промоторов и/или других регуляторных последовательностей, предложенных в данном документе или известных в данной области техники. Как известно специалистам в данной области техники и как проиллюстрировано в настоящем изобретении, последовательности, доступные для контроля и/или экспрессии кодирующей последовательности в векторе, известны в данной области техники и включают предложенные в данном документе. В различных конкретных примерах кодирующая последовательность, присутствующая в нагрузке по настоящему изобретению, может быть функционально связана с одной или более регуляторными последовательностями, необязательно выбранными из промотора, энхансера, области терминации, инсулятора, мини-LCR, сигнала терминации, сигнала полиаденилирования, сигнала сплайсинга и т. п.

[0499] В некоторых вариантах осуществления комбинированная нагрузка кодирует один или более или все компоненты системы CRISPR, включая CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу, и по меньшей мере одну гидовую РНК (гРНК), необязательно при этом по меньшей мере одна гРНК включает 1, 2, 3, 4 или 5 гРНК, и необязательно одну или более дополнительных кодирующих последовательностей, не являющихся частью системы CRISPR. Например, гРНК системы CRISPR могут включать одну или более или все гРНК, которые нацелены на последовательность нуклеиновой кислоты промотора HBG1, гРНК, которая нацелена на последовательность нуклеиновой кислоты промотора HBG2, и/или гРНК, которая нацелена на последовательность нуклеиновой кислоты эритроидного энхансера *bcl11a*. В различных вариантах осуществления (i) нацеленная на промотор HBG1 гРНК сконструирована для повышения экспрессии кодирующей последовательности γ -глобина, функционально связанной с промотором HBG1, путем инактивации сайта связывания репрессорного белка BCL11A в промоторе HBG1, (ii) нацеленная на промотор HBG2 гРНК сконструирована для повышения экспрессии кодирующей последовательности γ -глобина, функционально связанной с промотором HBG2, путем инактивации сайта связывания репрессорного белка BCL11A в промоторе HBG2, и/или (iii) нацеленная *bcl11a* гРНК сконструирована для повышения экспрессии кодирующей последовательности γ -глобина, функционально связанной с энхансером *bcl11a*, причем модификация и/или инактивация эритроидного энхансера *bcl11a* приводит к снижению экспрессии репрессорного белка BCL11A в эритроидных клетках. В различных вариантах осуществления комбинированная нагрузка, которая содержит систему CRISPR, дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок, необязательно при этом терапевтический белок выбран из одного или более из γ -глобина и β -глобина. В некоторых вариантах

осуществления терапевтический белок функционально связан с промотором β -глобина и/или LCR β -глобина.

[0500] В некоторых вариантах осуществления комбинированная нагрузка кодирует один или более или все компоненты системы редактирования оснований, включая фермент для редактирования оснований, и по меньшей мере одну гидовую РНК (гРНК), необязательно при этом по меньшей мере одна гРНК включает 1, 2, 3, 4 или 5 гРНК, и необязательно одну или более дополнительных кодирующих последовательностей, не являющихся частью системы редактирования оснований. Например, гРНК системы редактирования оснований могут включать одну или более или все гРНК, которые нацелены на последовательность нуклеиновой кислоты промотора HBG1, гРНК, которая нацелена на последовательность нуклеиновой кислоты промотора HBG2, и/или гРНК, которая нацелена на последовательность нуклеиновой кислоты эритроидного энхансера bcl11a. В различных вариантах осуществления (i) нацеленная на промотор HBG1 гРНК сконструирована для повышения экспрессии кодирующей последовательности γ -глобина, функционально связанной с промотором HBG1, путем инактивации сайта связывания репрессорного белка BCL11A в промоторе HBG1, (ii) нацеленная на промотор HBG2 гРНК сконструирована для повышения экспрессии кодирующей последовательности γ -глобина, функционально связанной с промотором HBG2, путем инактивации сайта связывания репрессорного белка BCL11A в промоторе HBG2, и/или (iii) нацеленная bcl11a гРНК сконструирована для повышения экспрессии кодирующей последовательности γ -глобина, функционально связанной с энхансером bcl11a, причем модификация и/или инактивация эритроидного энхансера bcl11a приводит к снижению экспрессии репрессорного белка BCL11A в эритроидных клетках. В различных вариантах осуществления комбинированная нагрузка, которая содержит систему редактирования оснований, дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок, необязательно при этом терапевтический белок выбран из одного или более из γ -глобина и β -глобина. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок функционально связан с промотором β -глобина и/или LCR β -глобина.

[0501] В некоторых вариантах осуществления комбинированная нагрузка содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления комбинированная нагрузка содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует первое антитело, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует второе антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело (например, первое и/или второе антитело)

представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, которое содержит тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина.

[0502] В различных вариантах осуществления по меньшей мере один экспрессионный продукт, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты комбинированной нагрузки, представляет собой селективный маркер. В различных вариантах осуществления селективный маркер представляет собой MGMT^{P140K}.

[0503] Типовые нагрузки и системы Ad35 включают:

[0504] (i) В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 содержит элемент интеграции, фланкируемый инвертированными повторами транспозазы для транспозиции SB100x, а инвертированные повторы транспозазы фланкируются прямыми повторами *flr* для рекомбинации рекомбиназой FLP, такой как FLPe. В различных вариантах осуществления элемент интеграции содержит, необязательно от 5' к 3', (a) мини-LCR β-глобина, (b) ген, содержащий промотор β-глобина, функционально связанный с кодирующей последовательностью человеческого γ-глобина, а кодирующая последовательность γ-глобина функционально связана с 3'НТО (например, 3'НТО γ-глобина), причем мини-LCR β-глобина также функционально связана с кодирующей последовательностью γ-глобина, (c) последовательность инсультатора cHS4 и (d) ген, содержащий промотор, такой как промотор PGK, функционально связанный с кодирующей последовательностью MGMT^{P140K}, саморасщепляющимся пептидом 2A, кодирующей последовательностью флуоресцентного маркера GFP и сигналом полиаденилирования, необязательно при этом любой элемент из (a)-(d) может кодироваться в ориентации от 5' к 3' в любой из двух цепей нагрузки Ad35.

[0505] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 дополнительно содержит, за пределами элемента интеграции и за пределами сайтов рекомбиназы, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую систему CRISPR. В определенных конкретных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая систему CRISPR, содержит, необязательно от 5' к 3', (a) первый ген гРНК, содержащий первый промотор U6, функционально связанный с первой гРНК-кодирующей последовательностью, причем первая гРНК нацелена на энхансер *bcl11a*, (b) второй ген гРНК, содержащий второй промотор U6, функционально связанный со второй гРНК-кодирующей последовательностью, причем вторая гРНК нацелена на промотор *HBG*, и (c) ген фермента CRISPR, содержащий промотор, такой как промотор EF1α, функционально связанный с кодирующей последовательностью CRISPR/Cas9, причем кодирующая последовательность CRISPR/Cas9 функционально связана с

последовательностью 3'НТО/miR и сигналом полиаденилирования. В различных вариантах осуществления система CRISPR нацелена на эритроидный энхансер bcl11a и сайт связывания BCL11A промотора HBG, каждый из которых способствует активации или повторной активации γ -глобина. Как описано в данном документе, система CRISPR может быть самоинактивирующейся в том, что расщепление донорного вектора путем транспозиции приводит к деградации неинтегрированных нуклеиновых кислот донорного вектора. В различных вариантах осуществления последовательность miR может представлять собой последовательность, которая подавляет экспрессию Cas9 в клетке-продуценте во время выработки донорного вектора HDAd35 (смотрите, например, Saydaminova et al., Mol. Ther. Meth. Clin. Dev. 1: 14057, 2015; Li et al., Mol. Ther. Meth. Clin. Dev. 9: 390-401, 2018).

[0506] В различных вариантах осуществления система Ad35 по настоящему изобретению дополнительно содержит поддерживающий вектор Ad35, при этом поддерживающий вектор содержит, необязательно от 5' к 3', (a) ген рекомбиназы, содержащий промотор EF1 α , функционально связанный с кодирующей последовательностью рекомбиназы FLPe, и (b) ген транспозазы, содержащий промотор PGK, функционально связанный с кодирующей последовательностью транспозазы SB100x.

[0507] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 находится в геноме донорного вектора Ad35. В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35, находящаяся в геноме донорного вектора Ad35, фланкируется ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления геном донорного вектора Ad35 находится в донорном векторе Ad35. В различных вариантах осуществления донорный вектор представляет собой вектор Ad35++.

[0508] В различных вариантах осуществления поддерживающий геном содержит ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий геном находится в векторе Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий вектор представляет собой вектор Ad35++.

[0509] В различных вариантах осуществления донорный вектор Ad35 представляет собой хелпер-зависимый донорный вектор (HDAd35). В определенных таких вариантах осуществления системы по настоящему изобретению могут содержать донорный вектор или геном HDAd35 и хелперный вектор или геном Ad35, и в различных вариантах осуществления могут дополнительно содержать поддерживающий вектор Ad35.

[0510] Определенные типовые варианты осуществления проиллюстрированы на Фиг. 164.

[0511] (ii) В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 содержит элемент интеграции, фланкируемый плечами гомологии (например, 1,8 т. о. плечами гомологии), имеющими по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности) с геномом клетки-мишени. В различных вариантах осуществления элемент интеграции содержит, необязательно от 5' к 3', (a) мини-LCR β -глобина, содержащую HS1, HS2, HS3 и HS4, но не HS5, (b) ген, содержащий промотор β -глобина, функционально связанный с кодирующей последовательностью γ -глобина, а кодирующая последовательность γ -глобина функционально связана с 3'НТО γ -глобина, причем мини-LCR β -глобина также функционально связана с кодирующей последовательностью γ -глобина, (c) последовательность инсулятора cHS4 и (d) ген, содержащий промотор PGK, функционально связанный с кодирующей последовательностью MGMT^{P140K}, причем кодирующая последовательность MGMT^{P140K} функционально связана с сигналом полиаденилирования, необязательно при этом любой элемент из (a)-(d) может кодироваться в ориентации от 5' к 3' в любой из двух цепей нагрузки Ad35.

[0512] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 дополнительно содержит, за пределами элемента интеграции и за пределами сайтов рекомбиназы, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую систему CRISPR. В определенных конкретных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая систему CRISPR, содержит, необязательно от 5' к 3', (a) ген оgPHK, содержащий промотор U6, функционально связанный с оgPHK-кодирующей последовательностью, причем оgPHK нацелена на промотор HBG2, и (b) ген фермента CRISPR, содержащий промотор EF1 α , функционально связанный с кодирующей последовательностью spCas9, причем кодирующая последовательность spCas9 функционально связана с сайтом miR, последовательностью 3'НТО β -глобина и сигналом полиаденилирования. В различных вариантах осуществления система CRISPR нацелена на сайт связывания BCL11A промотора HBG и может вызывать активацию и повторную активацию γ -глобина. Как описано в данном документе, система CRISPR может быть самоинактивирующейся в том, что расщепление донорного вектора AAVS1 CRISPR приводит к деградации неинтегрированных нуклеиновых кислот донорного вектора. В различных вариантах осуществления последовательность miR может представлять собой последовательность, которая подавляет экспрессию Cas9 в клетке-производителе во время выработки донорного вектора HDAd35 (смотрите, например, Saydaminova et al., Mol. Ther. Meth. Clin. Dev. 1: 14057, 2015; Li et al., Mol. Ther. Meth. Clin. Dev. 9: 390-401, 2018).

[0513] В различных вариантах осуществления система Ad35 по настоящему

изобретению дополнительно содержит поддерживающий вектор Ad35, причем поддерживающий вектор содержит, необязательно от 5' к 3', промотор U6, функционально связанный с кодирующей последовательностью sgAAVS1-rn.

[0514] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 находится в геноме донорного вектора Ad35. В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35, находящаяся в геноме донорного вектора Ad35, фланкируется ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления геном донорного вектора Ad35 находится в донорном векторе Ad35. В различных вариантах осуществления донорный вектор представляет собой вектор Ad35++.

[0515] В различных вариантах осуществления поддерживающий геном содержит ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий геном находится в векторе Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий вектор представляет собой вектор Ad35++.

[0516] В различных вариантах осуществления донорный вектор Ad35 представляет собой хелпер-зависимый донорный вектор (HDA35). В определенных таких вариантах осуществления системы по настоящему изобретению могут содержать донорный вектор или геном HDA35 и хелперный вектор или геном Ad35, и в различных вариантах осуществления могут дополнительно содержать поддерживающий вектор Ad35.

[0517] Определенные типовые варианты осуществления проиллюстрированы на Фиг. 165.

[0518] (iii) В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 содержит элемент интеграции, фланкируемый инвертированными повторами транспозазы для транспозиции SB100x, а инвертированные повторы транспозазы фланкируются прямыми повторами *frt* для рекомбинации рекомбиназой FLP, такой как FLPe. В различных вариантах осуществления элемент интеграции содержит, необязательно от 5' к 3', (а) мини-LCR β -глобина, (b) ген, содержащий промотор β -глобина, функционально связанный с кодирующей последовательностью γ -глобина резуса, а кодирующая последовательность γ -глобина функционально связана с 3'НТО (например, 3'НТО γ -глобина), причем мини-LCR β -глобина также функционально связана с кодирующей последовательностью γ -глобина, (c) последовательность инсультатора *cHS4* и (d) ген, содержащий промотор PGK, функционально связанный с кодирующей последовательностью MGMT^{P140K}, причем кодирующая последовательность MGMT^{P140K} функционально связана с сигналом полиаденилирования, необязательно при этом любой элемент из (a)-(d) может кодироваться в ориентации от 5' к 3' в любой из двух цепей нагрузки Ad35.

[0519] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 дополнительно

содержит, за пределами элемента интеграции и за пределами сайтов рекомбиназы, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую систему CRISPR. В определенных конкретных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая систему CRISPR, содержит, необязательно от 5' к 3', (a) ген гРНК, содержащий промотор U6, функционально связанный с гРНК-кодирующей последовательностью, причем гРНК нацелена на промотор HBG, и (b) ген фермента CRISPR, содержащий промотор EF1 α , функционально связанный с кодирующей последовательностью CRISPR/Cas9, причем кодирующая последовательность CRISPR/Cas9 функционально связана с последовательностью 3'НТО/miR и сигналом полиаденилирования. В различных вариантах осуществления система CRISPR нацелена на сайт связывания BCL11A промотора HBG, что может приводить к активации и повторной активации γ -глобина. Как описано в данном документе, система CRISPR может быть самоинактивирующейся в том, что расщепление донорного вектора путем транспозиции приводит к деградации неинтегрированных нуклеиновых кислот донорного вектора. В различных вариантах осуществления последовательность miR может представлять собой последовательность, которая подавляет экспрессию Cas9 в клетке-продуценте во время выработки донорного вектора HDAd35 (смотрите, например, Saydaminova et al., Mol. Ther. Meth. Clin. Dev. 1: 14057, 2015; Li et al., Mol. Ther. Meth. Clin. Dev. 9: 390-401, 2018).

[0520] В различных вариантах осуществления система Ad35 по настоящему изобретению дополнительно содержит поддерживающий вектор Ad35, при этом поддерживающий вектор содержит, необязательно от 5' к 3', (a) ген рекомбиназы, содержащий промотор EF1 α , функционально связанный с кодирующей последовательностью рекомбиназы FLPe, и (b) ген транспозазы, содержащий промотор PGK, функционально связанный с кодирующей последовательностью транспозазы SB100x.

[0521] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 находится в геноме донорного вектора Ad35. В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35, находящаяся в геноме донорного вектора Ad35, фланкируется ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления геном донорного вектора Ad35 находится в донорном векторе Ad35. В различных вариантах осуществления донорный вектор представляет собой вектор Ad35++.

[0522] В различных вариантах осуществления поддерживающий геном содержит ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий геном находится в векторе Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий вектор

представляет собой вектор Ad35⁺⁺.

[0523] В различных вариантах осуществления донорный вектор Ad35 представляет собой хелпер-зависимый донорный вектор (HDA35). В определенных таких вариантах осуществления системы по настоящему изобретению могут содержать донорный вектор или геном HDA35 и хелперный вектор или геном Ad35, и в различных вариантах осуществления могут дополнительно содержать поддерживающий вектор Ad35.

[0524] Определенные типовые варианты осуществления проиллюстрированы на Фиг. 166.

[0525] (iv) В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 содержит элемент интеграции, фланкируемый инвертированными повторами транспозазы для транспозиции SB100x, а инвертированные повторы транспозазы фланкируются прямыми повторами *flr* для рекомбинации рекомбиназой FLP, такой как FLP_e. В различных вариантах осуществления элемент интеграции содержит, необязательно от 5' к 3', (a) мини-LCR β-глобина, (b) ген, содержащий промотор β-глобина, функционально связанный с кодирующей последовательностью человеческого γ-глобина, а кодирующая последовательность γ-глобина функционально связана с 3'НТО (например, 3'НТО γ-глобина), причем мини-LCR β-глобина также функционально связана с кодирующей последовательностью γ-глобина, (c) последовательность инсультатора cHS4 и (d) ген, содержащий промотор, такой как промотор PGK, функционально связанный с кодирующей последовательностью MGMT^{P140K}, саморасщепляющимся пептидом 2A, кодирующей последовательностью флуоресцентного маркера GFP и сигналом полиаденилирования, необязательно при этом любой элемент из (a)-(d) может кодироваться в ориентации от 5' к 3' в любой из двух цепей нагрузки Ad35.

[0526] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 дополнительно содержит, за пределами элемента интеграции и за пределами сайтов рекомбиназы, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую систему редактирования оснований. В определенных конкретных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая систему редактирования оснований, содержит, необязательно от 5' к 3', (a) первый ген гРНК, содержащий первый промотор U6, функционально связанный с первой гРНК-кодирующей последовательностью, причем первая гРНК нацелена на энхансер *bcl11a*, (b) второй ген гРНК, содержащий второй промотор U6, функционально связанный со второй гРНК-кодирующей последовательностью, причем вторая гРНК нацелена на промотор HBG, и (c) ген фермента для редактирования оснований, содержащий промотор, такой как промотор EF1α, функционально связанный с кодирующей последовательностью фермента для

редактирования оснований, причем кодирующая последовательность фермента для редактирования оснований функционально связана с последовательностью 3'НТО/miR и сигналом полиаденилирования. В различных вариантах осуществления система редактирования оснований нацелена на эритроидный энхансер *bcl11a* и сайт связывания BCL11A промотора HBG, каждый из которых способствует активации или повторной активации γ -глобина. Как описано в данном документе, система редактирования оснований может быть самоинактивирующейся в том, что расщепление донорного вектора путем транспозиции приводит к деградации неинтегрированных нуклеиновых кислот донорного вектора. В различных вариантах осуществления последовательность miR может представлять собой последовательность, которая подавляет экспрессию Cas9 в клетке-продуценте во время выработки донорного вектора HDAd35 (смотрите, например, Saydaminova et al., *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.* 1: 14057, 2015; Li et al., *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.* 9: 390-401, 2018).

[0527] В различных вариантах осуществления система Ad35 по настоящему изобретению дополнительно содержит поддерживающий вектор Ad35, при этом поддерживающий вектор содержит, необязательно от 5' к 3', (а) ген рекомбиназы, содержащий промотор EF1 α , функционально связанный с кодирующей последовательностью рекомбиназы FLPe, и (b) ген транспозазы, содержащий промотор PGK, функционально связанный с кодирующей последовательностью транспозазы SB100х.

[0528] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 находится в геноме донорного вектора Ad35. В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35, находящаяся в геноме донорного вектора Ad35, фланкируется ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления геном донорного вектора Ad35 находится в донорном векторе Ad35. В различных вариантах осуществления донорный вектор представляет собой вектор Ad35++.

[0529] В различных вариантах осуществления поддерживающий геном содержит ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий геном находится в векторе Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий вектор представляет собой вектор Ad35++.

[0530] В различных вариантах осуществления донорный вектор Ad35 представляет собой хелпер-зависимый донорный вектор (HDAd35). В определенных таких вариантах осуществления системы по настоящему изобретению могут содержать донорный вектор или геном HDAd35 и хелперный вектор или геном Ad35, и в различных вариантах осуществления могут дополнительно содержать поддерживающий вектор Ad35.

[0531] (v) В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 содержит элемент интеграции, фланкируемый инвертированными повторами транспозазы для транспозиции SB100x, а инвертированные повторы транспозазы фланкируются прямыми повторами *frt* для рекомбинации рекомбиназой FLP, такой как FLPe. В различных вариантах осуществления элемент интеграции содержит, необязательно от 5' к 3', (a) мини-LCR β -глобина, (b) ген, содержащий промотор β -глобина, функционально связанный с кодирующей последовательностью γ -глобина резуса, а кодирующая последовательность γ -глобина функционально связана с 3'НТО (например, 3'НТО γ -глобина), причем мини-LCR β -глобина также функционально связана с кодирующей последовательностью γ -глобина, (c) последовательность инсультатора *cHS4* и (d) ген, содержащий промотор PGK, функционально связанный с кодирующей последовательностью MGMT^{P140K}, причем кодирующая последовательность MGMT^{P140K} функционально связана с сигналом полиаденилирования, необязательно при этом любой элемент из (a)-(d) может кодироваться в ориентации от 5' к 3' в любой из двух цепей нагрузки Ad35.

[0532] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 дополнительно содержит, за пределами элемента интеграции и за пределами сайтов рекомбиназы, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую систему редактирования оснований. В определенных конкретных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая систему редактирования оснований, содержит, необязательно от 5' к 3', (a) ген гРНК, содержащий промотор U6, функционально связанный с гРНК-кодирующей последовательностью, причем гРНК нацелена на промотор HBG, и (b) ген фермента для редактирования оснований, содержащий промотор EF1 α , функционально связанный с кодирующей последовательностью фермента для редактирования оснований, причем кодирующая последовательность фермента для редактирования оснований функционально связана с последовательностью 3'НТО/miR и сигналом полиаденилирования. В различных вариантах осуществления система редактирования оснований нацелена на сайт связывания BCL11A промотора HBG, что может приводить к активации и повторной активации γ -глобина. Как описано в данном документе, система редактирования оснований может быть самоинактивирующейся в том, что расщепление донорного вектора путем транспозиции приводит к деградации неинтегрированных нуклеиновых кислот донорного вектора. В различных вариантах осуществления последовательность miR может представлять собой последовательность, которая подавляет экспрессию Cas9 в клетке-производителе во время выработки донорного вектора HDAd35 (смотрите, например, Saydaminova et al., *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.* 1: 14057, 2015; Li et al., *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.* 9: 390-401, 2018).

[0533] В различных вариантах осуществления система Ad35 по настоящему изобретению дополнительно содержит поддерживающий вектор Ad35, при этом поддерживающий вектор содержит, необязательно от 5' к 3', (а) ген рекомбиназы, содержащий промотор EF1 α , функционально связанный с кодирующей последовательностью рекомбиназы FLPe, и (b) ген транспозазы, содержащий промотор PGK, функционально связанный с кодирующей последовательностью транспозазы SB100x.

[0534] В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35 находится в геноме донорного вектора Ad35. В различных вариантах осуществления нагрузка Ad35, находящаяся в геноме донорного вектора Ad35, фланкируется ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления геном донорного вектора Ad35 находится в донорном векторе Ad35. В различных вариантах осуществления донорный вектор представляет собой вектор Ad35++.

[0535] В различных вариантах осуществления поддерживающий геном содержит ИКП Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий геном находится в векторе Ad35. В различных вариантах осуществления поддерживающий вектор представляет собой вектор Ad35++.

[0536] В различных вариантах осуществления донорный вектор Ad35 представляет собой хелпер-зависимый донорный вектор (HDA35). В определенных таких вариантах осуществления системы по настоящему изобретению могут содержать донорный вектор или геном HDA35 и хелперный вектор или геном Ad35, и в различных вариантах осуществления могут дополнительно содержать поддерживающий вектор Ad35.

I(C)(ii). Нагрузочные регуляторные последовательности

I(C)(ii)(a). Промоторные регуляторные последовательности

[0537] Промотор может представлять собой некодирующую геномную последовательность ДНК, обычно выше (5') релевантной кодирующей последовательности, с которой связывается РНК-полимераза перед инициацией транскрипции. Это связывание приводит к выравниванию РНК-полимеразы таким образом, чтобы иницировать транскрипцию в конкретном сайте инициации транскрипции. Нуклеотидная последовательность промотора определяет природу фермента и других связанных белковых факторов, которые присоединяются к ней, и уровень синтеза РНК. РНК процессируется с получением матричной РНК (мРНК), которая служит в качестве матрицы для трансляции последовательности РНК в аминокислотную последовательность кодируемого полипептида. 5' нетранслируемая лидерная последовательность представляет собой область мРНК выше кодирующей области,

которая может играть роль в инициации и трансляции мРНК. 3' сигнал терминации транскрипции/полиаденилирования представляет собой нетранслируемую область ниже кодирующей области, функцией которой в растительной клетке является терминация синтеза РНК и добавление полиаденилат-нуклеотидов к 3' концу.

[0538] Промоторы могут включать общие промоторы, тканеспецифические промоторы, клеточноспецифические промоторы и/или промоторы, специфические в отношении цитоплазмы. Промоторы могут включать сильные промоторы, слабые промоторы, конститутивные экспрессионные промоторы и/или индуцибельные (кондициональные) промоторы. Индуцибельные промоторы управляют экспрессией или контролируют экспрессию в ответ на определенные условия, сигналы или клеточные события. Например, промотор может представлять собой индуцибельный промотор, для которого необходимы конкретный лиганд, малая молекула, фактор транскрипции, гормон или белок гормона, чтобы осуществлять транскрипцию с промотора. Конкретные примеры промоторов включают промотор AFP (α -фетопротейна), промотор амилазы 1С, промотор аквапорина-5 (AP5), промотор $\alpha 1$ -антитрипсина, промотор β -актина, промотор β -глобина, промотор β -Kin, промотор B29, промотор CCKAR, промотор CD14, промотор CD43, промотор CD45, промотор CD68, промотор CEA, промотор c-erbB2, промотор COX-2, промотор CXCR4, промотор десмина, промотор E2F-1, промотор фактора элонгации 1 α человека (EF1 α), промотор CMV (цитомегаловируса), промотор minCMV, немедленно-ранний промотор SV40 (вируса обезьян 40), промотор EGR1, промотор eIF4A1, промотор эластазы-1, промотор эндоглина, промотор FerH, промотор FerL, промотор фибронектина, промотор Flt-1, промотор GAPDH, промотор GFAP, промотор GPIIb, промотор GRP78, промотор GRP94, промотор HE4, промотор hGR1/1, промотор hNIS, промотор Hsp68, минимальный промотор Hsp68 (proHSP68), промотор HSP70, промотор ТК-гена вируса HSV-1, промотор hTERT, промотор ICAM-2, промотор калликреина, промотор LP, основной поздний промотор (MLP), промотор Mb, промотор Rho, промотор MT (металлотионеина), промотор MUC1, промотор NphsI, промотор OG-2, промоторы PGK (фосфоглицераткиназы), промотор PGK-1, промотор полимеразы III (Pol III), промотор PSA, промотор ROSA, промотор SP-B, промотор сурвивина, промотор SYN1, промотор гена SYT8, промотор TRP1, промотор Tug, промотор убиквитина В, промотор WASP и промотор длинного концевго повтора (ДКП) вируса саркомы Рауса (RSV).

[0539] Промоторы можно получать в виде нативных промоторов или композитных промоторов. Нативные промоторы или минимальные промоторы относятся к промоторам, которые содержат нуклеотидную последовательность из 5' области заданного гена.

Нативный промотор содержит коровый промотор и его природную 5'НТО. В конкретных вариантах осуществления 5'НТО содержит интрон. Композитные промоторы относятся к промоторам, которые получены посредством комбинации промоторных элементов разного происхождения или посредством комбинации дистального энхансера с минимальным промотором того же или отличного происхождения.

[0540] В конкретных вариантах осуществления промотор SV40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80. В конкретных вариантах осуществления промотор dESV40 (промотор SV40 с делецией энхансерной области) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81. В конкретных вариантах осуществления промотор каталитической субъединицы теломеразы человека (hTERT) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82. В конкретных вариантах осуществления промотор RSV, полученные из штамма Шмидта - Руппина А содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83. В конкретных вариантах осуществления промотор hNIS содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84. В конкретных вариантах осуществления промотор глюкокортикоидного рецептора человека 1A (hGR 1/Ar/e) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85.

[0541] В конкретных вариантах осуществления промоторы содержат промоторные последовательности дикого типа и последовательности с необязательными изменениями (включая вставки, точечные мутации или делеции) в определенных позициях относительно промотора дикого типа. В конкретных вариантах осуществления промоторы отличаются от встречающихся в природе промоторов за счет 1 изменения на участок из 20 нуклеотидов, 2 изменений на участок из 20 нуклеотидов, 3 изменений на участок из 20 нуклеотидов, 4 изменений на участок из 20 нуклеотидов или 5 изменений на участок из 20 нуклеотидов. В конкретных вариантах осуществления природная последовательность изменена в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 основаниях. Промотор может варьироваться по длине, в том числе от 50 нуклеотидов последовательности ДКП до 100, 200, 250 или 350 нуклеотидов последовательности ИКП, с или без другой вирусной последовательности.

[0542] Некоторые промоторы являются специфическими в отношении ткани или клетки, а некоторые промоторы являются неспецифическими в отношении ткани или клетки. Каждый ген в клетках млекопитающих имеет свой собственный промотор, а некоторые промоторы могут активироваться только в определенных типах клеток. Неспецифический промотор или универсальный промотор способствует инициации транскрипции гена или нуклеотидной последовательности, которые функционально связаны с последовательностью промотора, в широком диапазоне клеток, тканей и типов клеток. В конкретных вариантах осуществления промотор является неспецифическим

промотором. В конкретных вариантах осуществления неспецифический промотор включает промотор CMV, промотор RSV, промотор SV40, промотор фактора элонгации млекопитающих 1 α (EF1 α), промотор β -актина, промотор EGR1, промотор eIF4A1, промотор FerH, промотор FerL, промотор GAPDH, промотор GRP78, промотор GRP94, промотор HSP70, промотор β -Kin, промотор PGK-1, промотор ROSA и/или промотор убиквитина В.

[0543] Специфический промотор способствует клеточно-специфической экспрессии нуклеотидной последовательности, которая функционально связана с последовательностью промотора. В конкретных вариантах осуществления специфический промотор является активным в В-клетках, моноцитарных клетках, лейкоцитах, макрофагах, ацинарных клетках поджелудочной железы, эндотелиальных клетках, астроцитах и/или любом другом типе клеток или цикле клеток. В конкретных вариантах осуществления промотор является специфическим промотором. В конкретных вариантах осуществления промотор гена SYT8 регулирует генную экспрессию в островковых клетках человека (Xu, et al., *Nat Struct Mol Biol.*, 2011, 18: 372-378). В конкретных вариантах осуществления промотор калликреина регулирует генную экспрессию в специфических к протоковым клеткам слюнных желез. В конкретных вариантах осуществления промотор амилазы 1C регулирует генную экспрессию в ацинарных клетках. В конкретных вариантах осуществления промотор аквапорина-5 (AP5) регулирует генную экспрессию в ацинарных клетках (Zheng and Baum, *Methods Mol Biol.*, 434: 205-219, 2008). В конкретных вариантах осуществления промотор B29 регулирует генную экспрессию в В-клетках. В конкретных вариантах осуществления промотор CD14 регулирует генную экспрессию в моноцитарных клетках. В конкретных вариантах осуществления промотор CD43 регулирует генную экспрессию в лейкоцитах и тромбоцитах. В конкретных вариантах осуществления промотор CD45 регулирует генную экспрессию в гемопоэтических клетках. В конкретных вариантах осуществления промотор CD68 регулирует генную экспрессию в макрофагах. В конкретных вариантах осуществления промотор десмина регулирует генную экспрессию в мышечных клетках. В конкретных вариантах осуществления промотор эластазы-1 регулирует генную экспрессию в ацинарных клетках поджелудочной железы. В конкретных вариантах осуществления промотор эндоглина регулирует генную экспрессию в эндотелиальных клетках. В конкретных вариантах осуществления промотор фибронектина регулирует генную экспрессию в дифференцирующихся клетках или рубцовой ткани. В конкретных вариантах осуществления промотор Flt-1 регулирует генную экспрессию в эндотелиальных клетках. В конкретных вариантах осуществления промотор GFAP

регулирует генную экспрессию в астроцитах. В конкретных вариантах осуществления промотор GPIIb регулирует генную экспрессию в мегакариоцитах. В конкретных вариантах осуществления промотор ICAM-2 регулирует генную экспрессию в эндотелиальных клетках. В конкретных вариантах осуществления промотор Mb регулирует генную экспрессию в мышцах. В конкретных вариантах осуществления промотор NphsI регулирует генную экспрессию в подоцитах. В конкретных вариантах осуществления промотор OG-2 регулирует генную экспрессию в остеобластах, одонтобластах. В конкретных вариантах осуществления промотор SP-B регулирует генную экспрессию в клетках легких. В конкретных вариантах осуществления промотор SYN1 регулирует генную экспрессию в нейронах. В конкретных вариантах осуществления промотор WASP регулирует генную экспрессию в гемопоэтических клетках.

[0544] В конкретных вариантах осуществления промотор является тканеспецифическим промотором. В конкретных вариантах осуществления промотор AFP регулирует генную экспрессию в клетках гепатоцеллюлярной карциномы. В конкретных вариантах осуществления промотор CCKAR регулирует генную экспрессию в клетках рака поджелудочной железы. В конкретных вариантах осуществления промотор SEA регулирует генную экспрессию в клетках раковых заболеваний эпителия. В конкретных вариантах осуществления промотор c-erbB2 регулирует генную экспрессию в клетках рака молочной и поджелудочной железы. В конкретных вариантах осуществления промотор COX-2 регулирует генную экспрессию в опухолях. В конкретных вариантах осуществления промотор CXCR4 регулирует генную экспрессию в опухолях. В конкретных вариантах осуществления промотор E2F-1 регулирует генную экспрессию в опухолях. В конкретных вариантах осуществления промотор HE4 регулирует генную экспрессию в опухолях. В конкретных вариантах осуществления промотор LP регулирует генную экспрессию в опухолях. В конкретных вариантах осуществления промотор MUC1 регулирует генную экспрессию в клетках карциномы. В конкретных вариантах осуществления промотор PSA регулирует генную экспрессию в клетках рака предстательной железы. В конкретных вариантах осуществления промотор сурвивина регулирует генную экспрессию в опухолях. В конкретных вариантах осуществления промотор TRP1 регулирует генную экспрессию в меланоцитах и клетках меланомы. В конкретных вариантах осуществления промотор Туг регулирует генную экспрессию в меланоцитах и клетках меланомы.

I(C)(ii)(b). LCR-регуляторные последовательности

[0545] Области контроля локуса функционально определяют по их способности повышать экспрессию связанных генов до физиологических уровней тканеспецифическим

и численнозависимым образом в эктопических сайтах хроматина. Li et al., Blood, 2002, 100(9): 3077-3086.

[0546] LCR β -глобина является примером по меньшей мере некоторых LCR в по меньшей мере нескольких отношениях. Например, как и многие другие LCR, LCR β -глобина повышает экспрессию (например, повышает транскрипцию, повышает трансляцию и/или повышает клеточную или тканевую специфичность) функционально связанных генов или трансгенов и содержит области гиперчувствительности (HS) к ДНКазе, которые, как известно специалистам в данной области техники, опосредуют экспрессионные эффекты LCR. Кроме того, как и многие другие LCR, LCR β -глобина можно использовать полностью или частично, например, в том, что ее можно использовать в нуклеиновых кислотах, которые содержат последовательность LCR β -глобина, которая содержит все HS-области LCR β -глобина (HS1-HS5) или содержит подгруппу HS-областей LCR β -глобина (например, HS1-HS4).

[0547] Типовая последовательность нуклеиновой кислоты для области β -глобина Homo sapiens в хромосоме 11 приведена под номером доступа GenBank NG_000007. Длинная LCR β -глобина может, в некоторых случаях, представлять собой или содержать последовательность, расположенную за 6-22 т. о. 5' от первого (эмбрионального) гена глобина в локусе. Длинная LCR β -глобина может содержать пять сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I, 5'HS 1-5. Li et al., Blood, 2002, 100(9): 3077-3086. В NG_000007 приведено расположение рестрикционных сайтов, которые определяют сайты гиперчувствительности к ДНКазе I HS1, HS2, HS3 и HS4 в области контроля локуса (например, рестрикционных сайтов SnaBI и BstXI для HS2, рестрикционных сайтов HindIII и BamHI для HS3 и рестрикционных сайтов BamHI и BanII для HS4), и он в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении позиций сайтов гиперчувствительности. Последовательность и позиция HS1 описаны, например, в Pasceri et al., Ann NY Acad. Sci. 850:377-381, 1998; Pasceri et al., Blood. 92:653-663, 1998; и Milot et al., Cell. 87:105-114, 1996. В конкретных вариантах осуществления область HS2 простирается от позиции 16671 до 17058 области контроля локуса. Рестрикционные сайты SnaBI и BstXI в HS2 расположены в позициях 17093 и 16240, соответственно. Область HS3 простирается от позиции 12459 до 13097 области контроля локуса. Рестрикционные сайты BamHI и HindIII в HS3 расположены в позициях 12065 и 13360, соответственно. Область HS4 простирается от позиции 9048 до 9713 области контроля локуса. Рестрикционные сайты BamHI и BanII в HS4 расположены в позициях 8496 и 9576, соответственно.

[0548] В конкретных вариантах осуществления, описанных в данном документе,

используют мини-части LCR β -глобина. Мини-части содержат не все 5 области HS, такие как HS1, HS2, HS3, HS4 и/или HS5, при условии, что LCR не содержит все 5 сегментов LCR β -глобина. 4,3 т. о. HS1-HS4 LCR, используемая в примере 1 данного изобретения, является одним примером мини-LCR. Другие мини-LCR могут содержать, например, HS1, HS2 и HS3; HS2, HS3 и HS4; HS3, HS4 и HS5; HS1, HS3 и HS5; HS1, HS2 и HS5; и HS1, HS4 и HS5. дополнительные примеры мини-LCR смотрите в Sadelain et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 92: 6728-6732, 1995; и Lebouich et al., EMBO J. 13: 3065-3076, 1994. В конкретных вариантах осуществления можно использовать мини-LCR β -глобина в комбинации с промотором β -глобина. В конкретных вариантах осуществления эта комбинация приводит к получению 5,9 т. о. комбинации LCR-промотор. В данном документе «мини» и «микро» взаимозаменяемо используются в отношении LCR.

[0549] В конкретных вариантах осуществления, описанных в данном документе, используют длинные части области контроля локуса LCR. Длинная LCR β -глобина может содержать HS1, HS2, HS3, HS4 и HS5. В конкретных вариантах осуществления длинная LCR содержит 21,5 т. о. последовательность, содержащую HS1, HS2, HS3, HS4 и HS5 LCR β -глобина. Длинная LCR β -глобина можно сочетать с промотором β -глобина для достижения высоких уровней экспрессии белка.

[0550] Конкретные варианты осуществления могут включать позиции LCR β -глобина 5292319-5270789 (21531 п. о.) человеческой хромосомы 11 (SEQ ID NO: 185) согласно нумерации в GRCh38. В различных вариантах осуществления длинная LCR может иметь общую длину, равную или превышающую 18 т. о., 18,5 т. о., 19 т. о., 19,5 т. о., 20 т. о., 20,5 т. о., 21 т. о., 21,5 т. о. или 21,531 т. о. В различных вариантах осуществления длинная LCR может иметь общую длину, равную или превышающую 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины SEQ ID NO: 185. В различных вариантах осуществления длинная LCR может содержать по меньшей мере 18 т. о., 18,5 т. о., 19 т. о., 19,5 т. о., 20 т. о., 20,5 т. о., 21 т. о. или 21,5 т. о. SEQ ID NO: 185. В любом из предложенных в данном документе различных вариантов осуществления длинная LCR может представлять собой или содержать нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с соответствующей непрерывной частью SEQ ID NO: 185. В любом из предложенных в данном документе различных вариантов осуществления длинная LCR может содержать HS1, HS2, HS3, HS4 и HS5.

[0551] В различных вариантах осуществления векторная система Ad35 может содержать, например, мобильную трансгенную вставку, которая включает позиции 5228631-5227023 (1609 п. о.) человеческой хромосомы 11 или 5228631-5227018 (1614 п.

о.) (SEQ ID NO: 186) согласно нумерации в GRCh38 в качестве промотора β -глобина. В различных вариантах осуществления промотор β -глобина может иметь общую длину, равную или превышающую, например, 1,0 т. о., 1,1, т. о., 1,2 т. о., 1,3 т. о., 1,4 т. о., 1,5 т. о., 1,6 т. о. или 1,609 т. о. В различных вариантах осуществления промотор β -глобина может содержать по меньшей мере 1,0 т. о., 1,1, т. о., 1,2 т. о., 1,3 т. о., 1,4 т. о., 1,5 т. о., 1,6 т. о. или 1,609 т. о. SEQ ID NO: 186. В различных вариантах осуществления мобильная трансгенная вставка может включать позиции 5228631-5227023 (1609 п. о.) человеческой хромосомы 11. В различных вариантах осуществления промотор β -глобина может иметь общую длину, равную или превышающую, например, 100 п. о., 200 п. о., 300 п. о., 400 п. о., 500 п. о., 1 т. о., 1,5 т. о., 2 т. о., 2,5 т. о., 3 т. о., 4 т. о. или 5 т. о. последовательности нуклеиновой кислоты выше, например, непосредственно выше первого кодирующего нуклеотида, гена, чья экспрессия регулируется LCR β -глобина, включая, без ограничения, любой из генов эILON (HBE1), G-гамма (HBG2), A-гамма (HBG1), дельта (HBD) и бета (HBB) глобина и/или один или более генов, находящихся в локусе гемоглобина β (11:5225463-5227070, комплементарная последовательность). В различных вариантах осуществления промотор β -глобина может иметь общую длину, равную или превышающую, например, 100 п. о., 200 п. о., 300 п. о., 400 п. о., 500 п. о., 1 т. о., 1,5 т. о., 2 т. о., 2,5 т. о., 3 т. о., 4 т. о. или 5 т. о. последовательности нуклеиновой кислоты выше, например, непосредственно выше позиции 5227021 хромосомы 11 NC_000011.10. В различных вариантах осуществления промотор β -глобина может иметь общую длину, равную или превышающую 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины SEQ ID NO: 186. В любом из предложенных в данном документе различных вариантов осуществления промотор β -глобина может представлять собой или содержать нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с соответствующей непрерывной частью SEQ ID NO: 186.

[0552] В различных вариантах осуществления а LCR β -глобина, такая как длинная LCR β -глобина, обуславливает экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности в эритроцитах. В различных вариантах осуществления функционально связанная кодирующая последовательность также функционально связана с промотором β -глобина, приведенным в данном документе или известным в данной области техники.

[0553] В-клеточная LCR локуса тяжелой цепи иммуноглобулина является типовой LCR, которая повышает экспрессию (например, повышает транскрипцию, повышает трансляцию и/или повышает клеточную или тканевую специфичность) функционально

связанных кодирующих последовательностей. Экспрессия кодирующей последовательности может быть повышена при наличии функциональной связи с В-клеточной LCR локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит полную последовательность В-клеточной LCR локуса тяжелой цепи иммуноглобулина и/или содержит ее регулирующий экспрессию фрагмент. В-клеточная LCR локуса тяжелой цепи иммуноглобулина содержит сайты гиперчувствительности (HS) к ДНКазе, которые, как известно специалистам в данной области техники, опосредуют по меньшей мере некоторые из повышающих экспрессию эффектов В-клеточной LCR локуса тяжелой цепи иммуноглобулина. В-клеточная LCR локуса тяжелой цепи иммуноглобулина содержит четыре сайта гиперчувствительности к ДНКазе I (HS1, HS2, HS3 и HS4) в области 3'Ca локуса тяжелой цепи иммуноглобулина (IgH) и функционирует как энхансерная область контроля локуса (LCR). Соответственно, В-клеточная LCR локуса тяжелой цепи иммуноглобулина может представлять собой полную В-клеточную LCR локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую все HS1-HS4, или может представлять собой регулирующий экспрессию фрагмент, который содержит подгруппу сайтов гиперчувствительности HS1-HS4. Эти HS-сайты картируются на 10-30 т. о. гена IgH C и могут образовывать специфические к лимфоидным клетками и зависимые от стадии развития энхансерные элементы в анализе временной трансфекции. Согласно наблюдениям, эта последовательность нуклеиновой кислоты может обуславливать сходный профиль экспрессии, будучи связанной с генами с-тус в линиях клеток лимфомы Беркитта и плазматитомы. В клетках лимфомы Беркитта и плазматитомы контроль с-тус В-клеточной LCR возникает из-за характерных хромосомных транслокаций, которые приводят к размещению генов с-тус рядом с последовательностями IgH, что, таким образом, приводит к aberrантной транскрипции с-тус. Дополнительное описание В-клеточной LCR можно найти, например, в Madisen et al., *Mol Cell Biol.* 18(11):6281-92, 1998; Giannini et al., *J. Immunol.* 150:1772-1780, 1993; Madisen & Groudine, *Genes Dev.* 8:2212-2226, 1994; и Michaelson et al., *Nucleic Acids Res.* 23:975-981, 1995.

[0554] Экспрессионные конструкции могут дополнительно содержать элементы, которые повышают стабильность мРНК-транскриптов, например, инсуляторы и/или поли-А-хвосты.

I(C)(ii)(c). Регуляторные последовательности сайтов микроРНК

[0555] В различных вариантах осуществления система контроля микроРНК (или миРНК) может относиться к способу или композиции, в которых экспрессия гена регулируется наличием сайтов микроРНК (например, последовательностей нуклеиновых

кислот, с которыми может взаимодействовать микроРНК). В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает донорный вектор Ad35, который содержит нагрузку, в которой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая экспрессионный продукт, функционально связана с сайтом-мишенью миРНК так, чтобы экспрессия экспрессионного продукта контролировалась наличием, уровнем, активностью и/или контактом с соответствующей миРНК. В различных вариантах осуществления сайт миРНК представляет собой сайт-мишень для миРНК, выбранной из любой из miR423-5, miR423-5p, miR42-2, miR181c, miR125a, miR15a, miR187 и/или miR218. Во избежание сомнений в настоящем изобретении предусмотрено, что последовательность нуклеиновой кислоты, функционально связанная с сайтом миРНК, например, описанным в данном документе, может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует, например, любые один или более продуктов, предложенных в данном документе.

[0556] В конкретных вариантах осуществления система контроля микроРНК регулирует экспрессию гена так, чтобы ген экспрессировался исключительно в клетках-мишенях, таких как ГСКП например, опухоль-инфильтрирующих ГСКП. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота (например, терапевтический ген), кодирующая представляющие интерес белок или нуклеиновую кислоту (например, противораковый агент, такой как CAR, TCR, антитело и/или ингибитор контрольных точек, например, антитело к α PD-L1 (например, антитело к α PD-L1 γ 1), которое является ингибитором контрольных точек) содержит, связана с или функционально связана с сайтом микроРНК, множеством одинаковых сайтов микроРНК или множеством разных сайтов микроРНК. Хотя специалистам в данной области техники известны средства и технологии связывания сайта микроРНК с нуклеиновой кислотой или ее частью, имеющей последовательность, которая кодирует представляющий интерес ген, в данном документе приведены некоторые неограничивающие примеры. Например, представляющий интерес ген (например, последовательность, кодирующая антитело к α PD-L1 γ 1) может быть расположен в нуклеиновой кислоте так, чтобы экспрессия представляющего интерес гена регулировалась наличием одного или более сайтов микроРНК, которые подавляют экспрессию в клетках, которые не являются опухоль-инфильтрирующими клетками лейкоцитов, но не подавляют экспрессию в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах. В определенных конкретных примерах представляющий интерес ген (например, последовательность, кодирующая антитело к α PD-L1 γ 1) может быть расположен в нуклеиновой кислоте так, чтобы экспрессия представляющего интерес гена регулировалась наличием одного или более сайтов микроРНК miR423-5p, которые

подавляют экспрессию в клетках, которые не являются опухоль-инфильтрирующими клетками лейкоцитов, но не подавляют экспрессию в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах. В различных вариантах осуществления система контроля микроРНК может содержать нуклеиновую кислоту, которая содержит или в которой экспрессия представляющих интерес белка или нуклеиновой кислоты регулируется одним или более сайтами микроРНК, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтами микроРНК. В различных вариантах осуществления система контроля микроРНК может содержать нуклеиновую кислоту, которая содержит или в которой экспрессия представляющих интерес белка или нуклеиновой кислоты регулируется одним или более сайтами микроРНК miR423-5p, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтами микроРНК miR423-5p. В некоторых конкретных вариантах осуществления система контроля микроРНК может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело к α PD-L1 γ 1 и содержит или в которой экспрессия антитела к α PD-L1 γ 1 регулируется одним или более сайтами микроРНК miR423-5p, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтами микроРНК miR423-5p, например, сайтами микроРНК miR423-5p.

[0557] В различных вариантах осуществления сайт микроРНК может представлять собой последовательность, которая подавляет экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности в клетке-производителе во время выработки донорного вектора HDAd35, например, кодирующей последовательности, кодирующей фермент CRISPR, фермент для редактирования оснований или гРНК (смотрите, например, Saydaminova et al., *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.* 1: 14057, 2015; Li et al., *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.* 9: 390-401, 2018).

I(C)(iii). Последовательности отбора

[0558] В конкретных вариантах осуществления векторы содержат элемент отбора, включающий кассету отбора. В конкретных вариантах осуществления кассета отбора содержит промотор, кДНК, которая придает или обеспечивает резистентность к селекционному агенту, и последовательность поли-А, которая обеспечивает возможность остановки транскрипции этого независимого транскрипционного элемента.

[0559] Кассета отбора может кодировать один или более белков, которые (a) придают резистентность к антибиотикам или другим токсинам, (b) восполняют ауксотрофный дефицит или (c) поставляют важные питательные вещества, недоступные из комплексной среды, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Vacilli*. Для восстановления трансформированных линий клеток можно использовать любое число систем отбора. В конкретных вариантах осуществления кассета положительного отбора содержит гены резистентности к неомицину, гигромицину, ампициллину, пурамицину,

флеомицину, зиомицину, бластицидину, виомицину. В конкретных вариантах осуществления кассета положительного отбора содержит ген DHFR (дигидрофолатредуктазы), обеспечивающий резистентность к метотрексату, ген MGMT^{P140K}, отвечающий за резистентность к O⁶BG/BCNU, ген HPRT (гипоксантинфосфорибозилтрансферазы), отвечающий за трансформацию конкретных оснований, присутствующих в селекционной среде НАТ (аминоптерин, гипоксантин, тимидин), и другие гены для детоксификации в отношении некоторых лекарственных препаратов. В конкретных вариантах осуществления селекционный агент включает неомицин, гигромицин, пурамицин, флеомицин, зиомицин, бластицидин, виомицин, ампициллин, O⁶BG/BCNU, метотрексат, тетрациклин, аминоптерин, гипоксантин, тимидинкиназу, DHFR, Gln-синтазу или ADA.

[0560] В конкретных вариантах осуществления кассеты отрицательного отбора содержат ген для трансформации субстрата, присутствующего в культуральной среде, в токсическое вещество для клетки, которая экспрессирует этот ген. Эти молекулы включают гены детоксификации дифтерийного токсина (DTA) (Yagi et al., Anal Biochem. 214(1):77-86, 1993; Yanagawa et al., Transgenic Res. 8(3):215-221, 1999), ген тимидинкиназы вируса герпеса (HSV TK), чувствительный к присутствию ганцикловира или FIAU. Ген HPRT также можно использовать в качестве отрицательного отбора путем добавления в среду 6-тиогуанина (6TG). И как для положительного, так и для отрицательного отбора поли-А последовательность терминации транскрипции разного происхождения, в наиболее классическом варианте полученную из поли-А SV40 или эукариотического гена поли-А (бычий гормон роста, кроличий β-глобин и т. д.).

[0561] В конкретных вариантах осуществления кассета отбора содержит MGMT^{P140K}, как описано в Olszko et al. (Gene Therapy 22: 591-595, 2015). В конкретных элементах селекционный агент включает O⁶BG/BCNU.

[0562] Ген лекарственной резистентности MGMT, кодирующий человеческую алкилгуанинтрансферазу (hAGT), представляет собой белок репарации ДНК, который придает резистентность к цитотоксическим эффектам алкилирующих агентов, таких как нитрозомочевина и темозоломид (TMZ). 6-бензилгуанин (6-BG) представляет собой ингибитор AGT, который усиливает токсичность нитрозомочевина и вводится совместно с TMZ для усиления цитотоксических эффектов этого агента. Несколько мутантных форм MGMT, которые кодируют варианты AGT, обладают высокой резистентностью к инактивации 6-BG, но сохраняют способность к репарации повреждений ДНК (Maze et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 290: 1467-1474, 1999). Было показано, что генная терапия на основе резистентности к лекарственному препарату MGMT^{P140K} обеспечивает хемозащиту

клеток мышей, собак, макаков резус и человека, в частности гемопоэтических клеток (Zielske et al., J. Clin. Invest. 112: 1561-1570, 2003; Pollok et al., Hum. Gene Ther. 14: 1703-1714, 2003; Gerull et al., Hum. Gene Ther. 18: 451-456, 2007; Neff et al., Blood 105: 997-1002, 2005; Larochelle et al., J. Clin. Invest. 119: 1952-1963, 2009; Sawai et al., Mol. Ther. 3: 78-87, 2001).

[0563] В конкретных вариантах осуществления комбинация с *in vivo* кассетой отбора является важным компонентом в случае заболеваний без избирательного преимущества генно-скорректированных клеток. Например, при ТКИД и некоторых других иммунодефицитах и АФ скорректированные клетки имеют преимущество, а для терапевтической эффективности достаточно трансдукции терапевтического гена лишь в «несколько» ГСКП. В случае других заболеваний, таких как гемоглобинопатии (т. е. серповидноклеточная анемия и талассемия), при которых клетки не демонстрируют конкурентное преимущество, *in vivo* отбор генно-скорректированных клеток, например, в комбинации с *in vivo* кассетой отбора, такой как MGMT^{P140K}, будет обеспечивать отбор в отношении малого количества трансдуцированных ГСКП, обеспечивая повышение количества генно-скорректированных клеток и с целью обеспечения терапевтической эффективности. Этот подход также можно применять в случае ВИЧ путем придания ГСКП резистентности к ВИЧ *in vivo* вместо *ex vivo* генетической модификации.

I(C)(iv). Последовательности-вкладыши

[0564] В конкретных вариантах осуществления вектор содержит последовательность-вкладыш. В конкретных вариантах осуществления последовательность-вкладыш можно добавлять, чтобы обеспечить размер генома, сходный с таковым для дикого типа. Вкладыш является термином, в целом известным в данной области техники, предназначенным для определения функционально инертной последовательности, предназначенной для увеличения длины.

[0565] Последовательность-вкладыш используют для обеспечения эффективной упаковки и стабильности вектора. В конкретных вариантах осуществления последовательность-вкладыш используют для придания геному размера от 70% до 110% от такового для вируса дикого типа.

[0566] Последовательности-вкладыши могут представлять собой любую ДНК, предпочтительно млекопитающего происхождения. В предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательности-вкладыши представляют собой некодирующие последовательности млекопитающего происхождения, например, интронные фрагменты.

[0567] Последовательность-вкладыш, используемая для поддержания заданного

размера вектора, может представлять собой любую некодирующую или кодирующую последовательность или последовательность, которая позволяет геному оставаться стабильным в делящихся или неделящихся клетках. Эти последовательности могут быть получены из других вирусных геномов (например, вируса Эпштейна - Барр) или организмов (например, дрожжей). Например, эти последовательности могут быть функциональной частью центромер и/или теломер.

I(C)(v). Интеграция нагрузки и поддерживающие векторы

[0568] В генной терапии часто требуется интеграция необходимой нагрузки нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени. Для интеграции нагрузки в геном клетки-хозяина или клетки-мишени можно разработать и/или использовать ряд систем. Различные такие системы могут содержать один или более определенных элементов последовательности нагрузки и поддерживающие векторы и поддерживающие геномы (поддерживающие геномы).

[0569] Одним из способов конструирования аденовирусных векторов, которые интегрируют нагрузку в геном клетки-хозяина, является создание интегрирующихся вирусных гибридных векторов. В интегрирующихся вирусных гибридных векторах скомбинированы генетические элементы вектора, который эффективно трансдуцирует клетки-мишени, с генетическими элементами вектора, который стабильно интегрирует свою векторную нагрузку. Представляющие интерес элементы интеграции, например, для применения в комбинации с аденовирусными векторами, включают элементы интегразы РНіС31 бактериофага, ретротранспозоны, ретровирус (например, ДКП-опосредованный или интеграционно-опосредованный ретровирус), цинк-пальцевую нуклеазу, слитые белки ДНК-связывающего домена и ретровирусной интегразы, AAV (например, AAV-ИКП или опосредованный Rep-белком AAV) и транспозазу Sleeping Beauty (SB).

[0570] Описанные в данном документе векторы Ad35 могут необязательно содержать мобильные элементы, включая транспозазы и транспозоны. Транспозазы могут включать интегразы из ретротранспозонов или ретровирусного происхождения, а также фермент, который является компонентом комплекса нуклеиновой кислоты и белка, способный к транспозиции и который опосредует транспозицию. Реакция транспозиции включает транспозон и транспозазу или фермент интегразу. В конкретных вариантах осуществления эффективность интеграции, размер последовательности ДНК, которая может интегрироваться, и число копий последовательности ДНК, которые могут интегрироваться в геном, можно увеличивать, используя такие мобильные элементы. Транспозиция включает короткую последовательность нуклеиновой кислоты с последовательностями концевых повторов выше и ниже большего сегмента ДНК.

Транспозазы связывают последовательности концевых повторов и катализируют перемещение транспозона в другую часть генома.

[0571] В данной области техники был описан ряд транспозаз, которые облегчают вставку нуклеиновых кислот в геном позвоночных, включая человека. Примеры таких транспозаз включают *sleeping beauty* («SB», например, полученную из генома лососевых рыб); *piggyback* (например, полученную из клеток чешуекрылых и/или *Myotis lucifugus*); *mariner* (например, полученную из *Drosophila*); *frog prince* (например, полученную из *Rana ripiens*); *Tol1*; *Tol2* (например, полученную из рыбы оризии); *TcBuster* (например, полученную из хрущака каштанового *Tribolium castaneum*), *Helraiser*, *Himar1*, *Passport*, *Minos*, *Ac/Ds*, *PIF*, *Harbinger*, *Harbinger3-DR*, *HSmar1* и *spinON*.

[0572] Транспозаза *PiggyBac* (PB) представляет собой компактный функциональный белок транспозазы, описанный, например, в Fraser et al., *Insect Mol. Biol.*, 1996, 5, 141-51; Mitra et al., *EMBO J.*, 2008, 27, 1097-1109; Ding et al., *Cell*, 2005, 122, 473-83; и патентах США №№ 6218185; 6551825; 6962810; 7105343; и 7932088. Гиперактивные транспозазы *piggyBac* описаны в US 10131885.

[0573] В конкретных вариантах осуществления транспозаза PB имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 291 (GenBank ABS12111.1).

[0574] В конкретных вариантах осуществления транспозаза *Frog Prince* имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 292 (GenBank: AAP49009.1). Также смотрите US2005/0241007.

[0575] В конкретных вариантах осуществления транспозаза *TcBuster* имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 293 (GenBank: ABF20545.1).

[0576] В конкретных вариантах осуществления транспозаза *Tol2* имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 294 (GenBank: BAA87039.1).

[0577] Дополнительную информацию по транспозонам ДНК можно найти, например, в Muñoz-López & García Pérez, *Curr Genomics*, 11(2):115-128, 2010.

[0578] *Sleeping Beauty* описана в Ivics et al. *Cell* 91, 501-510, 1997; Izsvak et al., *J. Mol. Biol.*, 302(1):93-102, 2000; Geurts et al., *Molecular Therapy*, 8(1): 108-117, 2003; Mates et al. *Nature Genetics* 41:753-761, 2009; и патентах США №№ 6489458; 7148203; и 7160682; публикациях США №№ 2011/117072; 2004/077572; и 2006/252140. В определенных вариантах осуществления фермент транспозаза *Sleeping Beauty* имеет последовательность SEQ ID NO: 73. В конкретных вариантах осуществления гиперактивный фермент транспозаза *Sleeping Beauty* (SB100x) имеет последовательность SEQ ID NO: 74.

[0579] Проводили исследования систематического мутагенеза для повышения активности транспозазы SB. Например, Yant et al., проводили системный обмен N-

концевых 95 ак транспозазы SB на аланин (Mol. Cell Biol. 24: 9239-9247, 2004). Десять из этих замен обуславливали гиперактивность в диапазоне 200-400% по сравнению с эталонной SB10. Сообщалось, что SB16, описанная в Baus et al. (Mol. Therapy 12: 1148-1156, 2005), имеет в 16 раз большую активность по сравнению с SB10. Дополнительные гиперактивные варианты SB описаны в Zayed et al. (Molecular Therapy 9(2):292-304, 2004) и US 9840696.

[0580] Транспозоны SB необходимо циркуляризовать с целью транспозиции (Yant et al., Nature Biotechnology, 20: 999-1005, 2002). Кроме того, для транспозонов длиной от 1,9 до 7,2 т. О. существует обратная линейная взаимосвязь между длиной транспозона и частотой транспозиции. Другими словами, транспозаза SB опосредует доставку более крупных транспозонов менее эффективно, чем более мелких транспозонов (Geurts et al., Mol Ther., 8(1):108-17, 2003).

[0581] Транспозазы SB осуществляют транспозицию нагрузки нуклеиновой кислоты транспозона так, чтобы она размещалась между ИКП SB. В данной области техники известны различные ИКП SB. В некоторых вариантах осуществления ИКП SB представляет собой 230 п. о. последовательность, содержащую неидеальные прямые повторы длиной 32 п. о., которые служат сигналами распознавания для транспозазы. В данной области техники известны сконструированные ИКП SB, включая ИКП SB, известные как рТ, рТ2, рТ3, рТ2В и рТ4. В некоторых вариантах осуществления ИКП рТ4 используют, например, для фланкирования нагрузки транспозона по настоящему изобретению, например, для транспозиции транспозазой SB100х.

[0582] В конкретных вариантах осуществления последовательность, кодирующая ИП (инвертированный повтор)/ПП (прямой повтор), и хромосомная последовательность Sleeping Beauty содержит SEQ ID NO: 4. В конкретных вариантах осуществления последовательность, кодирующая ИП/ПП, и хромосомная последовательность Sleeping Beauty содержит SEQ ID NO: 5. В конкретных вариантах осуществления кодирующая ИП/ПП последовательность Sleeping Beauty содержит SEQ ID NO: 295. В конкретных вариантах осуществления последовательность, кодирующая ИП/ПП, и хромосомная последовательность Sleeping Beauty содержит SEQ ID NO: 296. В конкретных вариантах осуществления последовательность, кодирующая ИП/ПП, и хромосомная последовательность Sleeping Beauty содержит SEQ ID NO: 297. В конкретных вариантах осуществления последовательность, кодирующая ИП/ПП Sleeping Beauty содержит SEQ ID NO: 298. В конкретных вариантах осуществления последовательность, кодирующая ИП/ПП, и хромосомная последовательность Sleeping Beauty содержит SEQ ID NO: 299. В конкретных вариантах осуществления последовательность, кодирующая ИП/ПП Sleeping

Beauty содержит SEQ ID NO: 300.

[0583] В различных вариантах осуществления донорный вектор или геном Ad35 содержит нагрузку, которая содержит инвертированные повторы транспозона SB100x, которые фланкируют элемент интеграции, который содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует экспрессионный продукт β -глобина или экспрессионный продукт γ -глобина.

[0584] В различных вариантах осуществления аденовирусная система транспозиции содержит донорный вектор или геном Ad35, который содержит элемент интеграции, фланкируемый инвертированными повторами транспозона, и может дополнительно содержать аденовирусный поддерживающий вектор или поддерживающий геном. В различных вариантах осуществления поддерживающий вектор содержит (i) аденовирусный капсид; и (ii) аденовирусный поддерживающий геном, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую транспозазу, которая соответствует инвертированным повторам, которые фланкируют элемент интеграции. Соответственно, в различных вариантах осуществления по меньшей мере одна функция поддерживающего вектора или поддерживающего генома может состоять в кодировании, экспрессии и/или доставке в клетку-мишень транспозазы для транспозиции элемента интеграции, находящегося в донорном векторе, вводимом в клетку-мишень. Например, в некоторых вариантах осуществления донорный вектор или геном Ad35 содержит инвертированные повторы транспозона SB100x, которые фланкируют элемент интеграции, который содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует экспрессионный продукт β -глобина или экспрессионный продукт γ -глобина, а поддерживающий вектор или поддерживающий геном содержит кодирующую последовательность, которая кодирует транспозазу SB100x. В определенных вариантах осуществления элемент интеграции фланкируется прямыми повторами рекомбиназы, например, когда элемент интеграции фланкируется инвертированными повторами транспозона, а инвертированные повторы транспозона фланкируются прямыми повторами рекомбиназы. В определенных таких вариантах осуществления по меньшей мере одна функция поддерживающего вектора или поддерживающего генома может состоять в кодировании, экспрессии и/или доставке в клетку-мишень рекомбиназы для рекомбинации сайтов рекомбиназы, находящихся в донорном векторе, вводимом в клетку-мишень. В различных вариантах осуществления поддерживающий вектор или поддерживающий геном может кодировать, экспрессировать и/или доставлять в клетку-мишень рекомбиназу для рекомбинации сайтов рекомбиназы, находящихся в донорном векторе, вводимом в клетку-мишень, и также кодировать, экспрессировать и/или

доставлять в клетку-мишень транспозазу для транспозиции элемента интеграции, находящегося в донорном векторе, вводимом в клетку-мишень.

[0585] В конкретных вариантах осуществления, описанных в данном документе, также используют системы сайт-специфической рекомбиназы. В этих вариантах осуществления в дополнение к по меньшей мере одному терапевтическому гену транспозон, содержащий распознаваемые транспозазой инвертированные повторы, также содержит по меньшей мере один сайт, распознаваемый рекомбиназой. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложены способы интеграции терапевтического гена в геном, включающие введение: (а) транспозона, содержащего терапевтический ген, при этом терапевтический ген фланкируется (i) последовательностью инвертированных повторов, распознаваемой транспозазой, и (ii) распознаваемым рекомбиназой сайтом; и b) транспозазы и рекомбиназы, которые служат для вырезания терапевтического гена из плазмиды, эписомы или трангена и интеграции терапевтического гена в геном. В некоторых вариантах осуществления белок(ки) по (b) вводят в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей белок(ки). В некоторых вариантах осуществления транспозон и нуклеиновые кислоты, кодирующие белок(ки) по (b), находятся в отдельных векторах. В некоторых вариантах осуществления транспозон и нуклеиновая кислота, кодирующая белок(ки) по (b), находятся в одном векторе. В случае одного вектора часть вектора, кодирующая белок(ки) по (b), находится за пределами части, несущей транспозон по (a). Другими словами, область, кодирующая транспозазу и/или рекомбиназу, расположена за пределами области, фланкируемой инвертированными повторами и/или распознаваемым рекомбиназой сайтом. В вышеуказанных способах белок транспозазы распознает инвертированные повторы, которые фланкируют вставленную нуклеиновую кислоту так, чтобы нуклеиновая кислота подлежала вставке в геном клетки-мишени. Использование рекомбиназ и распознаваемых рекомбиназами сайтов может дополнительно увеличить размер транспозона, который может быть интегрирован в геном.

[0586] Примеры систем рекомбиназ включают систему Flp/Frt, систему Cre/loxP, систему Dre/rox, систему Vika/vox и систему PhiC31.

[0587] Система ДНК-рекомбиназ Flp/Frt была выделена из *Saccharomyces cerevisiae*. Система Flp/Frt включает рекомбиназу Flp (флиппазу), которая катализирует рекомбинацию ДНК в сайтах распознавания Frt. В конкретных вариантах осуществления Flp (флиппаза) содержит последовательность SEQ ID NO: 75, а сайт распознавания FRT содержит SEQ ID NO: 76.

[0588] Варианты белка Flp содержат SEQ ID NO: 77 (GenBank: ABD57356.1) и SEQ

ID NO: 78 (GenBank: ANW61888.1).

[0589] Система Cre/loxP описана, например, в EP 02200009B1. Cre представляет собой сайт-специфическую ДНК-рекомбиназу, выделенную из бактериофага P1. В конкретных вариантах осуществления Cre содержит последовательность SEQ ID NO: 79.

[0590] Сайт распознавания белка Cre представляет собой нуклеотидную последовательность из 34 пар оснований, сайт loxP (SEQ ID NO: 80). Cre рекомбинирует 34 п. о. последовательность ДНК loxP путем связывания с инвертированными повторами из 13 пар оснований и катализа расщепления цепи и повторного лигирования в спейсерную область. Ступенчатые разрезы ДНК, сделанные Cre в спейсерной области, разделены 6 парами оснований с получением области перекрытия, которая действует как датчик гомологии, чтобы гарантировать рекомбинацию только сайтов рекомбинации, имеющих одинаковую область перекрытия. Варианты сайтов распознавания lox, которые также можно использовать, включают: lox2272 (SEQ ID NO: 81); lox511 (SEQ ID NO: 82); lox66 (SEQ ID NO: 83); lox71 (SEQ ID NO: 84); loxM2 (SEQ ID NO: 85); и lox5171 (SEQ ID NO: 86).

[0591] Система рекомбиназ VCre/VloxP была выделена из плазмиды Vibrio p0908. В конкретных вариантах осуществления рекомбиназа VCre этой системы содержит SEQ ID NO: 87,

а сайт распознавания VloxP содержит SEQ ID NO: 88.

[0592] Система sCre/SloxP описана в WO 2010/143606. Система Dre/gox описана в US 7422889 и US 7915037B2. В общем случае она включает рекомбиназу Dre, выделенную из фага D6 Enterobacteria, с последовательностью SEQ ID NO: 89 и сайт распознавания gox (SEQ ID NO: 90).

[0593] Система Vika/vox описана в патенте США № 10253332. Дополнительно рекомбиназа PhiC31 распознает сайты связывания AttB/AttP.

[0594] Количество векторной нуклеиновой кислоты, содержащей транспозон (включая инвертированные повторы и/или сайты распознавания рекомбиназы), и, во многих вариантах осуществления, количество векторной нуклеиновой кислоты, кодирующей транспозазу и/или рекомбиназу, вносимое в клетку, является достаточным для обеспечения необходимых вырезания и вставки нуклеиновой кислоты транспозона в геном клетки-мишени. Следовательно, вносимое количество векторной нуклеиновой кислоты, должно обеспечивать достаточную активность транспозазы и/или активность рекомбиназы и достаточное число копий транспозона, которое необходимо вставить в геном клетки-мишени. Конкретные варианты осуществления включают отношение транспозона к транспозазе/рекомбиназе 1:1; 1:2 или 1:3.

[0595] Указанные способы приводят к стабильной интеграции нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени. Под стабильной интеграцией подразумевается то, что нуклеиновая кислота остается в геноме клетки-мишени в течение более чем временного периода времени и передается вместе с частью хромосомного генетического материала потомству клетки-мишени.

[0596] В примере 2 настоящего изобретения описан удивительный результат, что гиперактивную транспозазу *Sleeping Beauty* можно использовать для интеграции 32,4 т. о. транспозона в геном ГСКП. Эти варианты осуществления включают использование SBX100 в комбинации с системой Flp/Frt, как проиллюстрировано на Фиг. 23.

[0597] Как было указано ранее, в конкретных вариантах осуществления используют плечи гомологии для облегчения нацеленной вставки генетических конструкций с использованием обусловленной гомологией репарации. Плечи гомологии могут иметь любую длину и обладать достаточной гомологией с геномной последовательностью в сайте расщепления, например 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% гомологией с нуклеотидными последовательностями, фланкирующими сайт расщепления, например, в пределах 50 оснований или менее от сайта расщепления, например, в пределах 30 оснований, в пределах 15 оснований, в пределах 10 оснований, в пределах 5 оснований, или непосредственно фланкирующими сайт расщепления для поддержания ГР между ним и геномной последовательностью, с которой он гомологичен. Плечи гомологии в общем случае идентичны геномной последовательности, например, геномной области, в которой возникает двухцепочечный разрыв (ДЦР). При этом, как указано, абсолютная идентичность не требуется.

[0598] В конкретных вариантах осуществления можно использовать плечи гомологии с 25, 50, 100 или 200 нуклеотидами (нт) или более чем 200 нт гомологии последовательности между матрицей обусловленной гомологией репарации и целевой геномной последовательностью (или любое целое значение между 10 и 200 нуклеотидами или более). В конкретных вариантах осуществления длина плеч гомологии составляет 40-1000 нт. В конкретных вариантах осуществления плечи гомологии содержат 500-2500 пар оснований, 700-2000 пар оснований или 800-1800 пар оснований. В конкретных вариантах осуществления плечи гомологии содержат по меньшей мере 800 пар оснований или по меньшей мере 850 пар оснований. Длина плеч гомологии также может быть симметрической или асимметрической.

[0599] В конкретных вариантах осуществления можно использовать первое и/или второе плечи гомологии, каждое из которых содержит по меньшей мере 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500 или 3000 нуклеотидов или более,

имеющих идентичности или гомологию последовательности с соответствующим фрагментом целевого генома. В некоторых вариантах осуществления каждое из первого и/или второго плеч гомологии содержат число нуклеотидов, имеющих идентичности или гомологию последовательности с соответствующим фрагментом целевого генома, которое имеет нижнюю границу в 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 или 1800 нуклеотидов и верхнюю границу в 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500 или 3000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждое из первого и/или второго плеч гомологии содержат число нуклеотидов, имеющих идентичности или гомологию последовательности с соответствующим фрагментом целевого генома, которое составляет от 40 до 1000 нуклеотидов, от 500 до 2500 нуклеотидов, от 700 до 2000 нуклеотидов или от 800 до 1800 нуклеотидов, или которое имеет длину по меньшей мере 800 нуклеотидов или по меньшей мере 850 нуклеотидов. Первое и второе плечи гомологии могут иметь одинаковую, сходную или разную длину.

[0600] Дополнительную информацию в отношении плеч гомологии смотрите в Richardson et al., *Nat Biotechnol.* 34(3):339-44, 2016.

[0601] В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции (например, гены, приводящие к экспрессии терапевтического продукта в клетке) точно вставляют в безопасные геномные локусы. Сайты безопасных геномных локусов представляют собой внутригенные или внегенные области генома, которые могут обеспечить прогнозируемую экспрессию новой интегрированной ДНК без вредных эффектов на клетку-хозяина. Применимый безопасный локус должен обеспечивать возможность достаточной экспрессии трансгена для получения необходимых уровней кодируемого белка. Безопасный геномный сайт также не должен изменять клеточные функции. Методы идентификации безопасных геномных сайтов описаны в Sadelain et al., *Nature Reviews* 12:51-58, 2012; и Papapetrou et al., *Nat Biotechnol.* 29(1):73-8, 2011. В конкретных вариантах осуществления безопасный геномный сайт удовлетворяет одному или более (одному, двум, трем, четырем или пяти) из следующих критериев: (i) расстояние по меньшей мере 50 т. о. от 5' конца любого гена, (ii) расстояние по меньшей мере 300 т. о. от любого связанного с раком гена, (iii) нахождение в рамках открытой/доступной структуры хроматина (определяемой по расщеплению ДНК природными или сконструированными нуклеазами), (iv) расположение за пределами единицы генной транскрипции и (v) расположение за пределами ультраконсервативных областей (УКО), микроРНК или длинной некодирующей РНК генома.

[0602] В конкретных вариантах осуществления, чтобы соответствовать критериям безопасного геномного локуса, сайты хроматина должны находиться на >150 т. о. дальше

известного онкогена, >30 т. о. дальше известного сайта инициации транскрипции; и не перекрываются с кодирующей мРНК. В конкретных вариантах осуществления, чтобы соответствовать критериям безопасного геномного локуса, сайты хроматина должны находиться на >200 т. о. дальше известного онкогена, >40 т. о. дальше известного сайта инициации транскрипции; и не перекрываются с кодирующей мРНК. В конкретных вариантах осуществления, чтобы соответствовать критериям безопасного геномного локуса, сайты хроматина должны находиться на >300 т. о. дальше известного онкогена, >50 т. о. дальше известного сайта инициации транскрипции; и не перекрываются с кодирующей мРНК. В конкретных вариантах осуществления безопасный геномный локус соответствует предшествующим критериям (на >150 т. о., >200 т. о. или >300 т. о. дальше известного сайта инициации транскрипции и не перекрываются с кодирующей мРНК; на >40 т. о. или >50 т. о. дальше известного сайта инициации транскрипции и не перекрываются с кодирующей мРНК) и дополнительно является на 100% гомологичным между геномом животного релевантной животной модели и человека, чтобы сделать возможной быструю клиническую трансляцию релевантных результатов.

[0603] В конкретных вариантах осуществления безопасный геномный локус соответствует критериям, описанным в данном документе, и также демонстрирует 1:1 отношение прямой:обратной ориентаций лентивирусной интеграции, что дополнительно демонстрирует, что локус не влияет на окружающий генетический материал.

[0604] Конкретные безопасные геномные сайты включают CCR5, HPRT, AAVS1, Rosa и альбумин. Также смотрите, например, патенты США №№ 7951925 и 8110379; публикации США №№ 2008/0159996; 2010/00218264; 2012/0017290; 2011/0265198; 2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983 и 2013/0177960 в отношении дополнительной информации и вариантов соответствующих безопасных сайтов геномной интеграции.

[0605] Различные известные в данной области техники методики можно использовать для направления элемента интеграции на конкретные геномные локусы, такие как безопасные геномные локусы. Например, AAV-опосредованное нацеливание на гены, а также гомологичная рекомбинация, усиленная внесением двухцепочечных разрывов ДНК с использованием сайт-специфических эндонуклеаз (цинк-пальцевых нуклеаз, мегануклеаз, подобных активатору транскрипции эффекторных нуклеаз (TALE)), и системы CRISPR/Cas, все являются инструментами, которые могут опосредовать вставку чужеродной ДНК в predetermined геномные локусы, такие как безопасные геномные локусы. Схемы иммуносупрессии описаны, например, в предварительной заявке США № 63/009218, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме и, в частности, в отношении схем иммуносупрессии.

[0606] В определенных вариантах осуществления интеграция элемента интеграции в конкретные геномные локусы, такие как безопасные геномные локусы, может включать обусловленную гомологией интеграцию с использованием опосредованного ферментом CRISPR расщепления целевого генома. Фермент CRISPR (например, Cas9) расщепляет двухцепочечную ДНК в сайте, определяемом гидовой РНК (гРНК). Репарация двухцепочечного разрыва может происходить посредством гомологичной репарации (ГР), когда присутствует донорная матрица (такая как элемент интеграции нагрузки Ad35, содержащий левое и правое плечи гомологии). В различных таких способах элемент интеграции представляет собой «матрицу репарации» в том смысле, что он содержит левое и правое плечи гомологии (например, 500-3000 п. о.) для вставки в расщепленный целевой геном. CRISPR-опосредованная вставка генов может быть в несколько раз более эффективной по сравнению со спонтанной рекомбинацией матрицы ДНК, демонстрируя, что CRISPR-опосредованная вставка генов может быть эффективным инструментом для редактирования генома. Типовые способы обусловленной гомологией интеграции последовательности нуклеиновой кислоты в конкретный геномный локус известны в данной области техники например, в Richardson et al. (Nat Biotechnol. 34(3):339-44, 2016).

[0607] В различных вариантах осуществления аденовирусный донорный вектор, содержащий элемент интеграции для вставки в безопасный геномный локус генома клетки-мишени, может обуславливать интеграцию последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей длину до 15 т. о. В различных вариантах осуществления элемент интеграции для интеграции в геном клетки-мишени в безопасном геномном локусе может иметь длину по меньшей мере 1 т. о., 2 т. о., 3 т. о., 4 т. о., 5 т. о., 6 т. о., 7 т. о., 8 т. о., 9 т. о., 10 т. о., 11 т. о., 12 т. о., 13 т. о., 14 т. о. или 15 т. о., например, эта длина имеет нижнюю границу 1 т. о., 2 т. о., 3 т. о., 4 т. о. или 5 т. о. и верхнюю границу 10 т. о., 11 т. о., 12 т. о., 13 т. о., 14 т. о. или 15 т. о.

II. Популяции клеток-мишеней

[0608] В различных вариантах осуществления донорные векторы и геномы Ad35 по настоящему изобретению могут трансдуцировать клетки-мишени любого из ряда типов, включая, без ограничения, ГСК, Т-клетки, В-клетки и опухолевые клетки, описанные в данном документе.

II(A). ГСК

[0609] В конкретных вариантах осуществления типы клеток, на которые нацелен вектор, включают гемопозитические стволовые клетки (ГСК). ГСК делают мишенями для *in vivo* генетической модификации путем связывания CD46. Как указано, в рамках настоящего изобретения ГСК делают мишенями для *in vivo* генетической модификации

путем связывания CD46. Векторы могут содержать мутации, описанные в данном документе как повышающие специфичность и/или силу связывания CD46. ГСК также можно идентифицировать по следующим профилям маркеров: CD34+, Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+CD49f+ (ГСК1) и CD34+CD38-CD45RA-CD90- CD49f+ (ГСК2). Человеческие ГСК1 можно идентифицировать по следующим профилям: CD34+/CD38-/CD45RA-/CD90+ или CD34+/CD45RA-/CD90+, а мышиные LT-ГСК можно идентифицировать по Lin-Sca1+ckit+CD150+CD48-Flt3-CD34- (где Lin представляет отсутствие экспрессии любого маркера зрелых клеток, включая CD3, Cd4, CD8, CD11b, CD11c, NK1.1, Gr1 и TER119). В конкретных вариантах осуществления ГСК идентифицируют по профилю CD164+. В конкретных вариантах осуществления ГСК идентифицируют по профилю CD34+/CD164+. Дополнительную информацию в отношении профилей маркеров ГСК смотрите в WO2017/218948.

II(B). Т-клетки

[0610] Было открыто несколько подгрупп Т-клеток, каждая из которых имеет отличную функцию. Например, большинство Т-клеток имеет Т-клеточный рецептор (TCR), существующий в виде комплекса нескольких белков. Фактически Т-клеточный рецептор состоит из двух отдельных пептидных цепей, получаемых из независимых генов альфа и бета Т-клеточного рецептора (TCR α и TCR β) и называются α - и β -цепями TCR.

[0611] $\gamma\delta$ Т-клетки представляют небольшую подгруппу Т-клеток, которые имеют на поверхности отличный Т-клеточный рецептор (TCR). В $\gamma\delta$ Т-клетках TCR состоит из одной γ -цепи и одной δ -цепи. Эта группа Т-клеток является менее распространенной (2% от общего числа Т-клеток), чем $\alpha\beta$ Т-клетки.

[0612] CD3 экспрессируется на всех зрелых Т-клетках. Активированные Т-клетки экспрессируют 4-1BB (CD137), CD69 и CD25. CD5 и рецептор трансферрина также экспрессируются на Т-клетках.

[0613] Т-клетки можно дополнительно классифицировать на хелперные клетки (CD4+ Т-клетки) и цитотоксические Т-клетки (CTL, CD8+ Т-клетки), которые включают цитолитические Т-клетки. Т-хелперные клетки помогают другим белым клеткам крови в иммунологических процессах, включая созревание В-клеток в плазматические клетки и активацию цитотоксических Т-клеток и макрофагов, помимо иных функций. Эти клетки, также известны как CD4+ Т-клетки, поскольку они экспрессируют белок CD4 на своей поверхности. Хелперные Т-клетки активируются, когда они презентуются с пептидными антигенами молекулами ГКГС класса II, которые экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК). После активации они быстро делятся и секретируют малые белки, называемые цитокинами, которые регулируют активный

иммунный ответ или способствуют ему.

[0614] Цитотоксический Т-клетки разрушают инфицированные вирусами клетки и опухолевые клетки и также участвуют в отторжении трансплантата. Эти клетки, также известны как CD8⁺ Т-клетки, поскольку они экспрессируют гликопротеин CD8 на своей поверхности. Эти клетки распознают свои мишени путем связывания с антигеном, ассоциированным с ГКГС класса I, который присутствует на поверхности практически каждой клетки в организме.

[0615] В конкретных вариантах осуществления CAR генетически модифицированы для экспрессии в цитотоксических Т-клетках.

[0616] В контексте данного документа «центральные Т-клетки памяти» («TCM») относятся к «знакомым» с антигеном CTL, которые экспрессируют CD62L или CCR7 и CD45RO на своей поверхности и не экспрессируют или характеризуются сниженной экспрессией CD45RA по сравнению с наивными клетками. В конкретных вариантах осуществления центральные клетки памяти являются положительными в отношении экспрессии CD62L, CCR7, CD25, CD127, CD45RO и CD95 и характеризуются сниженной экспрессией CD45RA по сравнению с наивными клетками.

[0617] В контексте данного документа «эффektorные Т-клетки памяти» («TEM») относятся к «знакомым» с антигеном Т-клеткам, которые не экспрессируют или характеризуются сниженной экспрессией CD62L на своей поверхности по сравнению с центральными клетками памяти и не экспрессируют или характеризуются сниженной экспрессией CD45RA по сравнению с наивными клетками. В конкретных вариантах осуществления эффektorные клетки памяти являются отрицательными в отношении экспрессии CD62L и CCR7 по сравнению с наивными клетками или центральными клетками памяти и характеризуются вариабельной экспрессией CD28 и CD45RA. Эффektorные Т-клетки являются положительными в отношении гранзима В и перфорина по сравнению с Т-клетками памяти или наивными Т-клетками.

[0618] В контексте данного документа «наивные» Т-клетки относятся к «не знакомым» с антигеном Т-клеткам, которые экспрессируют CD62L и CD45RA и не экспрессируют CD45RO по сравнению с центральными или эффektorными клетками памяти. В конкретных вариантах осуществления наивные CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, включая CD62L, CCR7, CD28, CD127 и CD45RA.

II(C). В-клетки

[0619] В-клетки являются медиаторами гуморального ответа и отвечают за выработку и высвобождение антител, специфических к антигену. Существует несколько

типов В-клеток, которые можно охарактеризовать по ключевым маркерам. В общем случае В-клетки экспрессируют CD19, CD20, CD34, CD38 и CD45R, а с созреванием ключевыми экспрессируемыми маркерами являются CD19 и IgM.

II(D). Опухоли

[0620] В конкретных вариантах осуществления векторы могут быть нацелены на опухоли. В конкретных вариантах осуществления нацеливание на опухоли осуществляют путем нацеливания на рецепторы, присутствующие на опухолевых клетках, но не на здоровых клетках. Опухоли могут быть мишенями для *in vivo* генетической модификации путем связывания интегринов α v. Интегрины α v играют важную роль в ангиогенезе. Интегрины α v β 3 и α v β 5 отсутствуют или экспрессируются на низких уровнях в нормальных эндотелиальных клетках, но индуцируются в ангиогенной сосудистой системе опухолей (Brooks et al., Cell, 79: 1157-1164, 1994; Hammes et al., Nature Med, 2: 529-533, 1996). Аминопептидаза N/CD13 недавно была идентифицирована как ангиогенный рецептор для мотива NGR (Burg et al., Cancer Res, 59:2869-74, 1999). Аминопептидаза N/CD13 экспрессируется на высоком уровне в ангиогенных кровяных сосудах рака и других ангиогенных тканях.

[0621] В конкретных вариантах осуществления векторы могут быть нацелены на опухоли путем нацеливания на эпитопы антигенов раковых клеток. Антигены раковых клеток экспрессируются раковыми клетками или опухолями.

[0622] В конкретных вариантах осуществления эпитопы антигенов раковых клеток преимущественно экспрессируются раковыми клетками. Выражение «преимущественно экспрессируются» означает, что антиген раковых клеток находится на более высоких уровнях на раковых клетках по сравнению с другими типами клеток. В некоторых случаях эпитоп ракового антигена экспрессируется только целевым типом раковых клеток. В других случаях раковый антиген экспрессируется на целевом типе раковых клеток по меньшей мере на 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% больше, чем на нецелевых клетках.

[0623] В конкретных вариантах осуществления антигены раковых клеток на значительном уровне экспрессируются в раковых и здоровых тканях. В конкретных вариантах осуществления выражение «экспрессируется на значительном уровне» означает, что использование биспецифического антитела прекратили во время разработки из-за целевой/внераковой токсичности. В конкретных вариантах осуществления выражение «экспрессируется на значительном уровне» означает, что использование биспецифического антитела требует предупреждения касательно потенциальных негативных побочных эффектов из-за целевой/внераковой токсичности. В качестве одного

примера, цетуксимаб представляет собой анти-EGFR антитело, прием которого сопровождается сильной сыпью на коже, которая предположительно связана с экспрессией EGFR в коже. Другим примером является Герцептин (трастузумаб), который представляет собой анти-HER2 (ERBB2) антитело. Прием Герцептина связан с кардиотоксичностью вследствие целевой экспрессии в сердце. Кроме того, нацеливание на Her2 с помощью CAR-T было летальным для пациента вследствие целевой внеарковой экспрессии в легких.

[0624] В таблице 12 приведены примеры раковых антигенов, которые с большей вероятностью коэкспрессируются в конкретных типах рака.

[0625] **Таблица 12**

Раковые антигены с вероятностью коэкспрессии	Тип рака
CD19, CD20, CD22, ROR1, CD33, CD56, CLL-1, WT-1, CD123, PD-L1, EFGR	Лейкоз/лимфома
Антиген созревания В-клеток (BCMA), PD-L1, EFGR	Множественная миелома
PSMA, WT1, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), SV40 T, PD-L1, EFGR	Рак предстательной железы
HER2, ERBB2, ROR1, PD-L1, EFGR, MUC16, фолатный рецептор (FOLR), CEA	Рак молочной железы
CD133, PD-L1, EFGR	Рак из стволовых клеток
L1-CAM, MUC16, FOLR, Льюис Y, ROR1, мезотелин, WT-1, PD-L1, EFGR, CD56	Рак яичника
мезотелин, PD-L1, EFGR	Мезотелиома
Угольная ангидраза-IX (CAIX); PD-L1, EFGR	Почечно-клеточная карцинома
GD2, PD-L1, EFGR	Меланома
мезотелин, CEA, CD24, ROR1, PD-L1, EFGR, MUC16	Рак поджелудочной железы
ROR1, PD-L1, EFGR, мезотелин, MUC16, FOLR, CEA, CD56	Рак легкого
мезотелин, PD-L1, EFGR	Холангиокарцинома
MUC16, PD-L1, EFGR,	Рак мочевого пузыря
ROR1, глипикан-2, CD56, дисialogанглиозид, PD-L1, EFGR,	Нейробластома
CEA, PD-L1, EFGR,	Колоректальный рак

Раковые антигены с вероятностью коэкспрессии	Тип рака
CD56, PD-L1, EGFR,	Карцинома из клеток Меркеля

[0626] В более конкретных примерах антигены раковых клеток включают: мезотелин, MUC16, FOLR, PD-L1, ROR1, глипикан-2 (GPC2), дисиаialogанглиозид (GD2), HER2, EGFR, EGFRvIII, CEA, CD56, CLL-1, CD19, CD20, CD123, CD30, CD33 (полноразмерный), CD33 (вариант DeltaE2), CD33 (с С-концевым усечением), BCMA, IGFR, MUC1, VEGFR, PSMA, PSCA, IL13Ra2, FAP, EpCAM, CD44, CD133, Tro-2, CD200, FLT3, GCS и WT1. Как понятно специалисту в данной области техники, в антигенах-мишенях могут отсутствовать сигнальные пептиды.

[0627] CD56, также известный как молекула адгезии нервных клеток 1 (NCAM1), представляет собой мембранный гликопротеин I типа, участвующий в адгезии клетка - клетка и клетка - матрикс. Его внеклеточный домен содержит пять IgG-подобных доменов на N-конце и два домена фибронектина III типа в проксимальной к мембране области.

[0628] Дисиаialogанглиозид GalAcbeta1-4(NeuAcalpha2-8NeuAcalpha2-3)Galbeta1-4Glcbeta1-1Cer (GD2) экспрессируется в различных опухолях, включая нейробластому. Антиген дисиаialogанглиозида GD2 содержит остов из олигосахаридов, фланкируемых остатками сиаловой кислоты и липидов. Смотрите, например, Cheresch (Surv. Synth. Pathol. Res. 4:97, 1987) и US 5653977.

[0629] EGFR вариант III (EGFRvIII), опухолеспецифический мутант EGFR, является продуктом геномной перестройки, который часто ассоциируется с амплификацией гена EGFR дикого типа. EGFRvIII образуется за счет делеции экзонов 2-7 в рамке считывания, что приводит к делеции 267 аминокислот с заменой глицином в месте соединения. Усеченный рецептор теряет свою способность связывать лиганды, но приобретает конститутивную активность киназы. Что интересно, EGFRvIII часто коэкспрессируется с полноразмерным EGFR дикого типа в одних и тех же опухолевых клетках. Кроме того, экспрессирующие EGFRvIII клетки демонстрируют повышенные пролиферацию, инвазию, ангиогенез и резистентность к апоптозу.

[0630] EGFRvIII наиболее часто встречается при мультиформной глиобластоме (МГБ). По оценкам, 25-35% МГБ несут этот рецептор. Кроме того, его экспрессия часто отражает более агрессивный фенотип и плохой прогноз. Помимо МГБ, также сообщалось об экспрессии EGFRvIII в других солидных опухолях, таких как немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак яичника и рак предстательной железы. И наоборот, EGFRvIII не экспрессируется в здоровых тканях.

[0631] В конкретных вариантах осуществления целевой эпитоп ракового антигена

может характеризоваться высокой экспрессией целевой раковой клеткой или опухолью или низкой экспрессией целевой раковой клеткой или опухолью. В конкретных вариантах осуществления высокую и низкую экспрессию можно определить, используя проточную цитометрию или сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Как понятно специалисту в области проточной цитометрии, «выс.», «низк.», «+» и «-» относятся к интенсивности сигнала относительно негативной или других популяций. В конкретных вариантах осуществления положительная экспрессия (+) означает, что маркер может быть выявлен на клетке с помощью проточной цитометрии. В конкретных вариантах осуществления отрицательная экспрессия (-) означает, что маркер не может быть выявлен с помощью проточной цитометрии. В конкретных вариантах осуществления «выс.» означает, что положительная экспрессия представляющего интерес маркера является более яркой по данным измерения флуоресценции (с использованием, например, FACS), чем для других клеток, также положительных в отношении экспрессии. В этих вариантах осуществления специалисту в данной области техники понятно, что яркость учитывает порог выявления. В общем случае специалист в данной области техники сначала проанализирует пробирку с отрицательным контролем и установит гейт (битовую карту) вокруг представляющей интерес популяции с помощью FSC и SSC и скорректирует напряжение и коэффициент усиления фотоэлектронного умножителя для флуоресценции на необходимых длинах волн испускания, так чтобы с отрицательным контролем 97% клеток были неокрашенными в отношении маркера флуоресценции. После установления параметров анализируют окрашенные клетки и записывают флуоресценцию относительно неокрашенной популяции флуоресцентных клеток. В конкретных вариантах осуществления и как характерно для типичного графика FACS, «выс.» относится к самой дальней правой (х-линии) или наивысшей верхней линии (верхней правой или левой), тогда как «низк.» относится к левому нижнему квадранту или к области посередине между правым и левым квадрантом (но сдвинутой относительно отрицательной популяции). В конкретных вариантах осуществления «выс.» относится к более чем 20-кратному +, более чем 30-кратному +, более чем 40-кратному +, более чем 50-кратному +, более чем 60-кратному +, более чем 70-кратному +, более чем 80-кратному +, более чем 90-кратному +, более чем 100-кратному +, или более повышению выявляемой флуоресценции относительно+клеток. И наоборот, «низк.» может относиться к обратной популяции тех, кто был определен как «выс.».

II(E). Другие мишени

[0632] Помимо ГСК, Т-клеток, В-клеток и опухолей (или раковых клеток) векторы могут быть нацелены на другие антигены в случае бактерий и грибов.

[0633] Антигены-мишени бактерий могут быть получены, например, из сибирской язвы, грамотрицательных бацилл, хламидий, дифтерии, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, коклюшного токсина, пневмококков, риккетсий, стафилококков, стрептококков и столбняка.

[0634] В качестве конкретных примеров маркеров бактериальных антигенов, антигены сибирской язвы включают защитный антиген сибирской язвы; антигены грамотрицательных бацилл включают липополисахариды; антигены дифтерии включают дифтерийный токсин; антигены *Mycobacterium tuberculosis* включают миколовую кислоту, белок теплового шока 65 (HSP65), 30 кДа основной секретируемый белок и антиген 85A; антигены коклюшного токсина включают гемагглютинин, пертактин, FIM2, FIM3 и аденилатциклазу; пневмококковые антигены включают пневмолизин и пневмококковые капсулярные полисахариды; антигены риккетсий включают *gompA*; стрептококковые антигены включают протеины M; а антигены столбняка включают столбнячный токсин.

[0635] Антигены-мишени грибов могут быть получены, например, из кандид, кокцидий, криптококков, гистоплазмы, лейшмании, плазмодий, простейших, паразитов, шистосом, лишая, токсоплазмы и *Trypanosoma cruzi*.

[0636] В качестве конкретных примеров грибковых антигенов, антигены кокцидий включают сферические антигены; антигены криптококков включают капсулярные полисахариды; антигены гистоплазмы включают белок теплового шока 60 (HSP60); антигены лейшмании включают *gp63* и липофосфогликан; антигены *plasmodium falciparum* включают мерозоитные поверхностные антигены, спорозоитные поверхностные антигены, циркумспорозоитные антигены, гаметоцитные/гаметные поверхностные антигены, антигены простейших и других паразитов включают гематостадийный антиген *pf 155/RESA*; антигены шистосом включают глутатион-S-трансферазу и парамиозин; грибковые антигены лишая включают трихофитон; антигены токсоплазмы включают *SAG-1* и *p30*; и антигены *Trypanosoma cruzi* включают 75-77 кДа антиген и 56 кДа антиген.

III. Дозировки, составы и введение

[0637] Вектор может быть составлен таким образом, чтобы он был фармацевтически приемлемым для введения в клетки или животным, например, человеку. Вектор можно вводить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Описанные в данном документе вирусные векторы Ad35 могут быть составлены для введения субъекту. Составы содержат вирусный вектор Ad35, связанный с терапевтическим геном («активный ингредиент») и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

[0638] Как описано в данном документе, вектор может находиться в любой форме,

известной в данной области техники. Такие формы включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории.

[0639] Выбор или применение любой конкретной формы может частично зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Например, композиции, содержащие композицию, предназначенную для системной или местной доставки, могут быть в форме растворов для инъекций или инфузий. Соответственно, вектор может быть составлен для введения парентеральным способом (например, путем внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной или внутримышечной инъекции). В контексте данного документа парентеральное введение относится к способам введения, отличным от энтерального и местного, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, интраназальную, интраокулярную, легочную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, внутрилегочную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную, интрацеребральную, интракраниальную, интракаротидную и интрацистермальную инъекцию и инфузию. Парентеральный путь введения может представлять собой, например, введение путем инъекции, трансназальное введение, транспульмональное введение или чрескожное введение. Введение может быть системным или местным, осуществляемым путем внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, подкожной инъекции.

[0640] В различных вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению может быть составлен в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены путем включения композиции, описанной в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем случае дисперсии готовят путем включения композиции, описанной в данном документе, в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для изготовления стерильных растворов для инъекций, способы изготовления включают вакуумную сушку и сублимационную сушку, которая приводит к получению порошка

композиции, описанной в данном документе, плюс любого дополнительного необходимого ингредиента (смотрите ниже) из предварительно стерильно профильтрованного раствора. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию реагента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

[0641] Вектор можно вводить парентерально в форме инъекционной композиции, содержащей стерильный раствор или суспензию в воде или другой фармацевтически приемлемой жидкости. Например, вектор может быть составлен путем подходящего объединения терапевтической молекулы с фармацевтически приемлемыми носителями или средами, такими как стерильная вода и физиологический раствор, растительное масло, эмульгатор, суспендирующий агент, поверхностно-активное вещество, стабилизатор, ароматизирующий эксципиент, разбавитель, носитель, консервант, связующее вещество, с последующим смешиванием в форме единичной дозы, необходимой в рамках общепринятой фармацевтической практики. Количество вектора, включенное в фармацевтические препараты, является таким, чтобы обеспечить подходящую дозу в указанном диапазоне. Неограничивающие примеры масляной жидкости включают кунжутное масло и соевое масло, которые можно комбинировать с бензилбензоатом или бензиловым спиртом в качестве солюбилизующего агента. Другие элементы, которые могут быть включены в состав, включают буфер, такой как фосфатный буфер или буфер на основе ацетата натрия, успокаивающий агент, такой как гидрохлорид прокаина, стабилизатор, такой как бензиловый спирт или фенол, и антиоксидант. Состав для инъекций может быть упакован в подходящую ампулу.

[0642] В различных вариантах осуществления подкожное введение можно осуществлять с помощью устройства, такого как шприц, предварительно заполненный шприц, автоинжектор (например, одноразовый или многоразовый), шприц-ручка, трансдермальный инжектор, портативный инжектор, амбулаторный шприцевой инфузионный насос с наборами для подкожной инфузии или другое устройство для подкожной инъекции.

[0643] В некоторых вариантах осуществления вектор, описанный в данном документе, можно терапевтически доставлять субъекту путем местного введения. В контексте данного документа термины «местное введение» или «местная доставка» могут относиться к доставке, которая не зависит от переноса вектора в предполагаемые целевые

ткань или участок через сосудистую систему. Например, вектор можно доставлять путем инъекции или имплантации композиции или агента или путем инъекции или имплантации устройства, содержащего композицию или агент. В определенных вариантах осуществления после местного введения вблизи целевых ткани или участка композиция или агент, или один или более из их компонентов, могут диффундировать к предполагаемым целевым ткани или участку, которые не являются местом введения.

[0644] В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе композиции представлены в виде единичной лекарственной формы, причем единичная лекарственная форма может подходить для самостоятельного введения. Такая единичная лекарственная форма может поставляться в контейнере, как правило, например, во флаконе, картридже, предварительно заполненном шприце или одноразовом шприце-ручке. Также можно использовать дозатор, такой как дозирующее устройство, описанное в патенте US 6302855, например, с инъекционной системой, как описано в данном документе.

[0645] Фармацевтические формы векторных составов, подходящие для инъекции, могут содержать стерильные водные растворы или дисперсии. Состав может быть стерильным и должен быть жидким, чтобы обеспечивать надлежащее поступление в шприц и из него. Состав также может быть стабильным в условиях производства и хранения. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду и физиологический раствор или забуференные водные растворы. Предпочтительно в составах можно использовать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия.

[0646] Кроме того, специалист в данной области может также предусмотреть применение дополнительного способа доставки, который можно осуществлять посредством методов электропорации, сонофореза, внутрикостных инъекций или с помощью генной пушки. Векторы также могут быть имплантированы в микрочипы, наночипы или наночастицы.

[0647] Подходящая доза вектора, описанного в данном документе, может зависеть от ряда факторов, включая, например, возраст, пол и массу тела субъекта, подлежащего лечению, состояние или заболевание, подлежащее лечению, и конкретный используемый вектор. Другие факторы, влияющие на вводимую субъекту дозу, включают, например, тип или тяжесть состояния или заболевания. Другие факторы могут включать, например, другие медицинские расстройства, которые наблюдаются у субъекта одновременно или были ранее, общее состояние здоровья субъекта, генетическую предрасположенность субъекта, рацион, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных

препаратов и любых других дополнительных терапевтических средств, которые вводят субъекту. Подходящие способы введения вектора можно выбрать на основе состояния или заболевания, подлежащего лечению, а также возраста и состояния субъекта. Доза и способ введения могут варьироваться в зависимости от массы тела, возраста, состояния и т. п. пациента, и при необходимости могут быть должным образом выбраны специалистами в данной области техники. Конкретную дозировку и схему лечения для любого конкретного субъекта можно корректировать на основании мнения практикующего медика.

[0648] Раствор вектора может содержать терапевтически эффективное количество описанной в данном документе композиции. Специалист в данной области техники может легко определить такие эффективные количества, частично на основании эффекта вводимой композиции или комбинированного эффекта композиции и одного или более дополнительных активных агентов, если используют более одного агента. Терапевтически эффективное количество может представлять собой количество, при котором любые токсические или вредные эффекты композиции перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

[0649] В различных случаях вектор может быть составлен так, чтобы содержать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, без ограничения, любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Композиции по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения кислоты или соль присоединения основания.

[0650] Типовые общепринятые фармацевтически приемлемые носители включают любые и все агенты, замедляющие всасывание, антиоксиданты, связующие вещества, буферные агенты, объемобразующие агенты или наполнители, хелатирующие агенты, покрытия, разрыхляющие агенты, дисперсионные среды, гели, изотонические агенты, смазывающие вещества, консерванты, соли, растворители или со растворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества и/или средства доставки.

[0651] В различных вариантах осуществления композиция, содержащая описанный в данном документе вектор, например, стерильный состав для инъекций, может быть составлена в соответствии с традиционной фармацевтической практикой с использованием дистиллированной воды для инъекций в качестве носителя. Например, физиологический раствор или изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие добавки, такие как D-сорбит, D-манноза, D-маннит и хлорид натрия, можно использовать

в качестве водного раствора для инъекций, необязательно в комбинации с подходящим солюбилизирующим агентом, например, спиртом, таким как этанол, и полиспиртом, таким как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, и неионогенным поверхностно-активным веществом, таким как полисорбат 80™, НСО-50 и т. п.

[0652] Типовые антиоксиданты включают аскорбиновую кислоту, метионин и витамин Е.

[0653] Типовые буферные агенты включают цитратные буферы, сукцинатные буферы, тартратные буферы, фумаратные буферы, глюконатные буферы, оксалатные буферы, лактатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, гистидиновые буферы и/или соли триметиламина.

[0654] Типовым хелатирующим агентом является ЭДТА.

[0655] Типовые изотонические агенты включают многоатомные сахарные спирты, включая трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит или маннит.

[0656] Типовые консерванты включают фенол, бензиловый спирт, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен, октадецилдиметилбензиламмония хлорид, галогениды бензалкония, хлорид гексаметония, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол и 3-пентанол.

[0657] Стабилизаторы относятся к широкой категории эксципиентов, функция которых может варьироваться от объемобразующего агента до добавки, которая солюбилизирует активные ингредиенты или помогает предотвратить денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Типичные стабилизаторы могут включать многоатомные сахарные спирты; аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота и треонин; органические сахара или сахарные спирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннит, сорбит, ксилит, рибит, миоинизит, галактит, глицерин и циклиты, такие как инозит; ПЭГ; аминокислотные полимеры; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные полипептиды (т. е. <10 остатков); белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды, такие как ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза и сахароза; трисахариды, такие как рафиноза, и полисахариды, такие как декстран. Стабилизаторы, как правило, присутствуют в диапазоне от 0,1 до 10000 частей по массе в расчете на массу терапевтического средства.

[0658] Описанные в данном документе составы могут быть составлены для введения, например, путем инъекции. Для инъекции состав может быть составлен в виде водных растворов, таких как буферы, включая раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор, или в культуральной среде, такой как среда Дульбекко в модификации Искова (IMDM). Водные растворы могут содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В альтернативном варианте состав может находиться в лиофилизированной и/или порошковой форме для восстановления с помощью подходящего носителя, например, стерильной апиrogenной воды, перед применением.

[0659] Любой описанный в данном документе состав преимущественно может содержать любые другие фармацевтически приемлемые носители, включая те, которые не вызывают нежелательных, аллергических или других неблагоприятных реакций, которые перевешивают пользу от введения. Типовые фармацевтически приемлемые носители и составы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990. Кроме того, можно изготавливать составы, которые будут отвечать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, установленным Агентством по биологическим стандартам FDA США и/или другими соответствующими зарубежными регуляторными органами.

[0660] В конкретных вариантах осуществления составы содержат активные ингредиенты в количестве по меньшей мере 0,1% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 1% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 10% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 20% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 30% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 40% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 50% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 60% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 70% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 80% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 90% масс./об. или масс./масс. от состава; по меньшей мере 95% масс./об. или масс./масс. от состава; или по меньшей мере 99% масс./об. или масс./масс. от состава.

[0661] Фактические доза и количество вирусного вектора Ad35 и, в конкретных вариантах осуществления, вирусного вектора Ad35 и факторов мобилизации, вводимые конкретному субъекту, и процедура и схема конкордантной мобилизации могут быть определены врачом, ветеринаром или исследователем с учетом таких параметров, как, например, физические и физиологические факторы, включая мишень; масса тела; тип состояния; тяжесть состояния; предстоящие релевантные события при наличии такой информации; предыдущие или текущие терапевтические вмешательства; идиопатия

субъекта; и путь введения. В дополнение, можно, необязательно, использовать *in vitro* и *in vivo* анализы для определения оптимальных диапазонов дозировок.

[0662] Терапевтически эффективные количества вектора Ad35, связанного с терапевтическим геном, могут включать дозы в диапазоне, например, от 1×10^7 до 50×10^8 инфекционных единиц (ИЕ) или от 5×10^7 до 20×10^8 ИЕ. В других примерах доза может содержать 5×10^7 ИЕ, 6×10^7 ИЕ, 7×10^7 ИЕ, 8×10^7 ИЕ, 9×10^7 ИЕ, 1×10^8 ИЕ, 2×10^8 ИЕ, 3×10^8 ИЕ, 4×10^8 ИЕ, 5×10^8 ИЕ, 6×10^8 ИЕ, 7×10^8 ИЕ, 8×10^8 ИЕ, 9×10^8 ИЕ, 10×10^8 ИЕ или более. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вектора Ad35, связанного с терапевтическим геном, включает 4×10^8 ИЕ. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вектора Ad35, связанного с терапевтическим геном, можно вводить подкожно или внутривенно. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вектора Ad35, связанного с терапевтическим геном, можно вводить после введения одного или более факторов мобилизации.

[0663] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения *in vivo* генная терапия включает введение по меньшей мере одного вирусного вектора для генной терапии в комбинации с по меньшей мере одной схемой иммуносупрессии. В *in vivo* генной терапии, включающей применение более одного вида вектора, например, первого вектора, который представляет собой поддерживаемый вирусный вектор для генной терапии, в комбинации со вторым вектором, который представляет собой поддерживающий вектор, первый вектор и второй вектор можно вводить в одном составе или лекарственной форме или в двух отдельных составах или лекарственных формах. В различных вариантах осуществления первый и второй векторы можно вводить одновременно или в разное время, например, в течение одного одночасового периода или в течение не перекрывающихся одночасовых периодов. В различных вариантах осуществления первый и второй векторы можно вводить одновременно или в разное время, например, в один день или в разные дни. В различных вариантах осуществления первый и второй векторы можно вводить в одинаковой дозировке или в разных дозировках, например, когда дозировка измеряется как общее число вирусных частиц или как число вирусных частиц на килограмм массы субъекта. В различных вариантах осуществления первый и второй векторы можно вводить в predetermined соотношении. В различных вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от 2:1 до 1:2, например, 1:1.

[0664] В различных вариантах осуществления вектор вводят субъекту в одной общей дозе в один день. В различных вариантах осуществления вектор вводят в виде

двух, трех, четырех или более единичных доз, которые вместе составляют общую дозу. В различных вариантах осуществления субъекту вводят одну единичную дозу вектора в день в каждый из одного, двух, трех, четырех или более последовательных дней. В различных вариантах осуществления субъекту вводят две единичные дозы вектора в день в каждый из одного, двух, трех, четырех или более последовательных дней. Соответственно, в различных вариантах осуществления суточная доза может относиться к дозе вектора, получаемой субъектом в течение дня (суток). В различных вариантах осуществления термин «день» относится к периоду в двадцать четыре часа, такому как период в двадцать четыре часа от полуночи первой календарной даты до полуночи следующей календарной даты.

[0665] В различных вариантах осуществления единичная доза, суточная доза или общая доза вектора, такого как вирусный вектор для генной терапии или поддерживающий вектор, или общая объединенная доза вектора для генной терапии и поддерживающего вектора может составлять по меньшей мере $1E8$, $5E8$, $1E9$, $5E9$, $1E10$, $5E10$, $1E11$, $5E11$, $1E12$, $5E12$, $1E13$, $5E13$, $1E14$ или $1E15$ вирусных частиц на килограмм (вч/кг). В различных вариантах осуществления единичная доза, суточная доза или общая доза вектора, такого как вирусный вектор для генной терапии или поддерживающий вектор, или общая объединенная доза вектора для генной терапии и поддерживающего вектора может попадать в диапазон, имеющий нижнюю границу, выбранную из $1E8$, $5E8$, $1E9$, $5E9$, $1E10$, $5E10$, $1E11$, $5E11$, $1E12$, $5E12$, $1E13$, $5E13$, $1E14$ или $1E15$ вч/кг, и верхнюю границу, выбранную из $1E8$, $5E8$, $1E9$, $5E9$, $1E10$, $5E10$, $1E11$, $5E11$, $1E12$, $5E12$, $1E13$, $5E13$, $1E14$ или $1E15$ вч/кг.

[0666] В различных вариантах осуществления вирусный вектор для генной терапии вводят в единичной дозе, суточной дозе или общей дозе по меньшей мере $1E10$, $5E10$, $1E11$, $5E11$, $1E12$, $5E12$, $1E13$, $5E13$, $1E14$ или $1E15$ вч/кг, а поддерживающий вектор вводят в единичной дозе, суточной дозе или общей дозе по меньшей мере $1E8$, $5E8$, $1E9$, $5E9$, $1E10$, $5E10$, $1E11$ и $5E11$ вч/кг, необязательно при этом единичная доза, суточная доза или общая доза вирусного вектора для генной терапии находится в диапазоне, имеющем нижнюю границу, выбранную из $1E10$, $5E10$, $1E11$, $5E11$, $1E12$ и $5E12$ вч/кг, и верхнюю границу, выбранную из $1E11$, $5E11$, $1E12$, $5E12$, $1E13$, $5E13$, $1E14$ и $1E15$ вч/кг, и/или единичная доза, суточная доза или общая доза поддерживающего вектора находится в диапазоне, имеющем нижнюю границу, выбранную из $1E8$, $5E8$, $1E9$, $5E9$, $1E10$ и $5E10$ вч/кг, и верхнюю границу, выбранную из $1E9$, $5E9$, $1E10$, $5E10$, $1E11$ и $5E11$ вч/кг.

[0667] В различных вариантах осуществления поддерживающий вектор вводят в единичной дозе, суточной дозе или общей дозе по меньшей мере $1E10$, $5E10$, $1E11$, $5E11$,

1E12, 5E12, 1E13, 5E13, 1E14 или 1E15 вч/кг, а поддерживаемый вирусный вектор для генной терапии вводят в единичной дозе, суточной дозе или общей дозе по меньшей мере 1E8, 5E8, 1E9, 5E9, 1E10, 5E10, 1E11 и 5E11 вч/кг, необязательно при этом единичная доза, суточная доза или общая доза поддерживающего вектора находится в диапазоне, имеющем нижнюю границу, выбранную из 1E10, 5E10, 1E11, 5E11, 1E12 и 5E12 вч/кг, и верхнюю границу, выбранную из 1E11, 5E11, 1E12, 5E12, 1E13, 5E13, 1E14 и 1E15 вч/кг, и/или единичная доза, суточная доза или общая доза поддерживаемого вирусного вектора для генной терапии находится в диапазоне, имеющем нижнюю границу, выбранную из 1E8, 5E8, 1E9, 5E9, 1E10 и 5E10 вч/кг, и верхнюю границу, выбранную из 1E9, 5E9, 1E10, 5E10, 1E11 и 5E11 вч/кг. В различных вариантах осуществления поддерживаемый вирусный вектор для генной терапии и поддерживающий вектор вводят в predetermined соотношении. В различных вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от 2:1 до 1:2, например, 1:1.

IV. Применения

[0668] Предложенные в данном документе способы и композиции описаны, по меньшей мере частично, для применения в *in vivo* генной терапии. При этом, во избежание сомнений, настоящее изобретение явным образом включает применение предложенных в данном документе композиций и способов для *ex-vivo* конструирования клеток и/или тканей, а также *in vitro* применения, включающие конструирование клеток и/или тканей в целях исследования. Генная терапия включает применение вектора, генома или системы по настоящему изобретению в способе внесения экзогенной ДНК в клетку-хозяина (такую как клетка-мишень) и/или нуклеиновую кислоту (такую как целевая нуклеиновая кислота, такая как целевой геном, например, геном клетки-мишени). Настоящее изобретение включает описание и примеры композиций и способов, относящихся к *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo* терапии, при этом специалисты в данной области техники поймут, что различные способы и композиции, предложенные в данном документе, в общем случае применимы для внесения нагрузки на основе нуклеиновой кислоты в организм субъекта, например, клетку-хозяина или клетку-мишень. Поскольку такие композиции и способы имеют общую применимость, например, в генной терапии, они применимы как инструменты в генной терапии в общих и различных конкретных условиях, в частности, включая приведенные в данном документе.

IV(A). *In vivo* генная терапия

[0669] Исследовали варианты лечения с использованием *in vivo* генной терапии, которая включает прямую доставку вирусного вектора пациенту. *In vivo* генная терапия является привлекательным подходом, поскольку она может не требовать ни какого-либо

генотоксичного кондиционирования (или может требовать менее генотоксичного кондиционирования), *in vivo* обработки клеток, и это может быть приемлемо для многих учреждений по всему миру, включая развивающиеся страны, поскольку терапию можно осуществлять путем инъекции, аналогично тому, что уже делают по всему миру для доставки вакцин. В различных вариантах осуществления способы *in vivo* генной терапии аденовирусными векторами по настоящему изобретению могут включать один или более этапов из (i) мобилизации клетки-мишени, (ii) иммуносупрессии, (iii) введения вектора, генома, системы или состава, предложенных в данном документе, и/или (iv) отбор трансдуцированных клеток и/или клеток с интегрированным элементом интеграции нагрузки аденовирусного вектора или генома.

[0670] Составы на основе аденовирусного вектора, описанные в данном документе, можно применять для лечения субъектов (людей, ветеринарных животных (собак, кошек, рептилий, птиц и т. д.), сельскохозяйственных животных (лошадей, крупный рогатый скот, коз, свиней, кур и т. д.) и животных для исследований (обезьян, крыс, мышей, рыб и т. д.). Лечение субъектов включает доставку терапевтически эффективных количеств одного или более векторов, геномов или одной или более систем по настоящему изобретению. Терапевтически эффективные количества включают те, которые обеспечивают эффективные количества, профилактическое лечение и/или терапевтическое лечение.

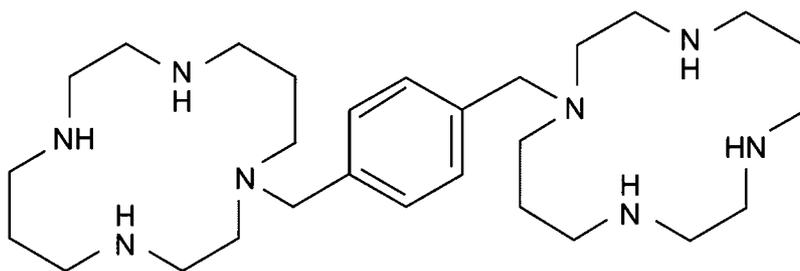
IV(A)i. Мобилизация ГСК

[0671] Описанные в данном документе векторы можно вводить скоординировано с факторами мобилизации. В определенных вариантах осуществления составы на основе аденовирусного вектора, описанные в данном документе, можно вводить в сочетании с мобилизацией ГСКП. В конкретных вариантах осуществления введение аденовирусного донорного вектора происходит одновременно с введением одного или более факторов мобилизации. В конкретных вариантах осуществления введение аденовирусного донорного вектора происходит после введения одного или более факторов мобилизации. В конкретных вариантах осуществления введение аденовирусного донорного вектора происходит после введения первых одного или более факторов мобилизации и происходит одновременно с введением вторых одного или более факторов мобилизации. Агенты для мобилизации ГСКП включают, например, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), AMD3100, SCF, S-CSF, антагонист CXCR4, агонист CXCR2 и Gro-Beta (GRO- β). В различных вариантах осуществления антагонист CXCR4 представляет собой AMD3100 и/или агонист CXCR2 представляет собой GRO- β .

[0672] G-CSF представляет собой цитокин, чьи функции в мобилизации ГСКП могут включать стимуляцию размножения гранулоцитов и как зависимое, так и независимое от протеаз ослабление молекул адгезии и разрушение оси SDF-1/CXCR4. В конкретных вариантах осуществления в описанных в данном документе способах и составах можно использовать любую коммерчески доступную форму G-CSF, известную специалисту в данной области техники, например, филграстим (Neupogen®, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) и ПЭГилированный филграстим (Pegfilgrastim, NEULASTA®, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA).

[0673] GM-CSF представляет собой мономерный гликопротеин, также известный как колониестимулирующий фактор 2 (CSF2), который действует как цитокин и естественным образом секретируется макрофагами, Т-клетками, тучными клетками, естественными клетками-киллерами, эндотелиальными клетками и фибробластами. В конкретных вариантах осуществления в описанных в данном документе способах и составах можно использовать любую коммерчески доступную форму GM-CSF, известную специалисту в данной области техники, например, сарграмостим (Leukine, Bayer Healthcare Pharmaceuticals, Seattle, WA) и молгамостим (Schering-Plough, Kenilworth, NJ).

[0674] AMD3100 (MOZOBIL™, PLERIXAFOR™; Sanofi-Aventis, Paris, France), синтетическая органическая молекула класса бицикламов, является антагонистом хемокиновых рецепторов и обратимо ингибирует связывание SDF-1 с CXCR4, стимулируя мобилизацию ГСКП. AMD3100 одобрен для применения в комбинации с G-CSF для мобилизации ГСКП у пациентов с миеломой и лимфомой. Структура AMD3100 представляет собой:



[0675] SCF, также известный как лиганд KIT, KL или стальной фактор, представляет собой цитокин, который связывается с рецептором c-kit (CD117). SCF может существовать в виде как трансмембранного белка, так и растворимого белка. Этот цитокин играет важную роль в гемопоэзе, сперматогенезе и меланогенезе. В конкретных вариантах осуществления в описанных в данном документе способах и составах можно использовать любую коммерчески доступную форму SCF, известную специалисту в данной области техники, например, рекомбинантный человеческий SCF (Ancestim, STEMGEN®, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA).

[0676] Химиотерапия, применяемая при интенсивном миелосупрессивном лечении, также мобилизует ГСКП в периферическую кровь в результате компенсаторной выработки нейтрофилов после индуцированной химиотерапией аплазии. В конкретных вариантах осуществления химиотерапевтические агенты, которые можно использовать для мобилизации ГСКП, включают циклофосфамид, этопозид, ифосфамид, цисплатин и цитарабин.

[0677] Дополнительные агенты, которые можно использовать для мобилизации клеток, включают: модуляторы CXCL12/CXCR4 (например, антагонисты CXCR4: POL6326 (Polyphor, Allschwil, Switzerland), синтетический циклический пептид, который обратимо ингибирует CXCR4; BKT-140 (4F-бензоил-TN14003; Biokine Therapeutics, Rehovit, Israel); TG-0054 (Taigen Biotechnology, Taipei, Taiwan); нейтрализатор CXCL12 NOX-A12 (NOXXON Pharma, Berlin, Germany), который связывается с SDF-1, ингибируя его связывание с CXCR4); агонистов сфингозин-1-фосфата (S1P) (например, SEW2871, Juarez et al. Blood 119: 707-716, 2012); молекулу адгезии сосудистого эндотелия 1 (VCAM) или ингибиторы очень позднего антигена 4 (VLA-4) (например, Natalizumab, рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело против субъединицы $\alpha 4$ VLA-4 (Zohren et al. Blood 111: 3893-3895, 2008); BIO5192, низкомолекулярный ингибитор VLA-4 (Ramirez et al. Blood 114: 1340-1343, 2009)); гормон паращитовидной железы (Brunner et al. Exp Hematol. 36: 1157-1166, 2008); ингибиторы протеасом (например, Bortezomib, Ghobadi et al. ASH Annual Meeting Abstracts. p. 583, 2012); Groß, член семейства хемокинов CXС, который стимулирует хемотаксис и активацию нейтрофилов путем связывания с рецептором CXCR2 (например, SB-251353, King et al. Blood 97: 1534-1542, 2001); стабилизацию фактора, индуцируемого гипоксией (HIF) (например, FG-4497, Forristal et al. ASH Annual Meeting Abstracts. p. 216, 2012); фиратеграст, ингибитор $\alpha 4\beta 1$ и $\alpha 4\beta 7$ интегрин ($\alpha 4\beta 1/7$) (Kim et al. Blood 128: 2457-2461, 2016); ведолизумаб, гуманизированное моноклональное антитело против $\alpha 4\beta 7$ интегрин (Rosario et al. Clin Drug Investig 36: 913-923, 2016); и BOP (N-(бензолсульфонил)-L-пролил-L-O-(1-пирролидинилкарбонил)тирозин), который нацелен на интегрин $\alpha 9\beta 1/\alpha 4\beta 1$ (Cao et al. Nat Commun 7: 11007, 2016). Дополнительные агенты, которые можно использовать для мобилизации ГСКП, описаны, например, в Richter R et al. Transfus Med Hemother 44:151-164, 2017, Bendall & Bradstock, Cytokine & Growth Factor Reviews 25: 355-367, 2014, WO 2003043651, WO 2005017160, WO 2011069336, US 5637323, US 7288521, US 9782429, US 2002/0142462 и US 2010/02268.

[0678] В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество G-CSF включает от 0,1 мкг/кг до 100 мкг/кг. В конкретных вариантах

осуществления терапевтически эффективное количество G-CSF включает от 0,5 мкг/кг до 50 мкг/кг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество G-CSF включает 0,5 мкг/кг, 1 мкг/кг, 2 мкг/кг, 3 мкг/кг, 4 мкг/кг, 5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 7 мкг/кг, 8 мкг/кг, 9 мкг/кг, 10 мкг/кг, 11 мкг/кг, 12 мкг/кг, 13 мкг/кг, 14 мкг/кг, 15 мкг/кг, 16 мкг/кг, 17 мкг/кг, 18 мкг/кг, 19 мкг/кг, 20 мкг/кг или более. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество G-CSF включает 5 мкг/кг. В конкретных вариантах осуществления G-CSF можно вводить подкожно или внутривенно. В конкретных вариантах осуществления G-CSF можно вводить в течение 1 дня, 2 последовательных дней, 3 последовательных дней, 4 последовательных дней, 5 последовательных дней или более. В конкретных вариантах осуществления G-CSF можно вводить в течение 4 последовательных дней. В конкретных вариантах осуществления G-CSF можно вводить в течение 5 последовательных дней. В конкретных вариантах осуществления в качестве одиночного агента G-CSF можно использовать в дозе 10 мкг/кг подкожно ежедневно, начиная за 3, 4, 5, 6, 7 или 8 дней до доставки Ad35. В конкретных вариантах осуществления G-CSF можно вводить в качестве одиночного агента с последующим одновременным введением с другим фактором мобилизации. В конкретных вариантах осуществления G-CSF можно вводить в качестве одиночного агента с последующим одновременным введением с AMD3100. В конкретных вариантах осуществления протокол лечения включает 5-дневное лечение, при этом G-CSF можно вводить на день 1, день 2, день 3 и день 4, а на день 5 G-CSF и AMD3100 вводят за 6-8 часов до введения Ad35.

[0679] Терапевтически эффективные количества GM-CSF для введения могут включать дозы в диапазоне, например, от 0,1 до 50 мкг/кг или от 0,5 до 30 мкг/кг. В конкретных вариантах осуществления доза, в которой можно вводить GM-CSF, включает 0,5 мкг/кг, 1 мкг/кг, 2 мкг/кг, 3 мкг/кг, 4 мкг/кг, 5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 7 мкг/кг, 8 мкг/кг, 9 мкг/кг, 10 мкг/кг, 11 мкг/кг, 12 мкг/кг, 13 мкг/кг, 14 мкг/кг, 15 мкг/кг, 16 мкг/кг, 17 мкг/кг, 18 мкг/кг, 19 мкг/кг, 20 мкг/кг или более. В конкретных вариантах осуществления GM-CSF можно вводить подкожно в течение 1 дня, 2 последовательных дней, 3 последовательных дней, 4 последовательных дней, 5 последовательных дней или более. В конкретных вариантах осуществления GM-CSF можно вводить подкожно или внутривенно. В конкретных вариантах осуществления GM-CSF можно вводить в дозе 10 мкг/кг подкожно ежедневно, начиная за 3, 4, 5, 6, 7 или 8 дней до доставки Ad35. В конкретных вариантах осуществления GM-CSF можно вводить в качестве одиночного агента с последующим одновременным введением с другим фактором мобилизации. В конкретных вариантах осуществления GM-CSF можно вводить в качестве одиночного

агента с последующим одновременным введением с AMD3100. В конкретных вариантах осуществления протокол лечения включает 5-дневное лечение, при этом GM-CSF можно вводить на день 1, день 2, день 3 и день 4, а на день 5 GM-CSF и AMD3100 вводят за 6-8 часов до введения Ad35. Схема введения сарграмостима может включать 200 мкг/м², 210 мкг/м², 220 мкг/м², 230 мкг/м², 240 мкг/м², 250 мкг/м², 260 мкг/м², 270 мкг/м², 280 мкг/м², 290 мкг/м², 300 мкг/м² или более. В конкретных вариантах осуществления сарграмостим можно вводить в течение 1 дня, 2 последовательных дней, 3 последовательных дней, 4 последовательных дней, 5 последовательных дней или более. В конкретных вариантах осуществления сарграмостим можно вводить подкожно или внутривенно. В конкретных вариантах осуществления схема введения сарграмостима может включать 250 мкг/м²/день внутривенно или подкожно и ее можно продолжать до достижения целевого количества клеток в периферической крови или можно продолжать в течение 5 дней. В конкретных вариантах осуществления сарграмостим можно вводить в качестве одиночного агента с последующим одновременным введением с другим фактором мобилизации. В конкретных вариантах осуществления сарграмостим можно вводить в качестве одиночного агента с последующим одновременным введением с AMD3100. В конкретных вариантах осуществления протокол лечения включает 5-дневное лечение, при этом сарграмостим можно вводить на день 1, день 2, день 3 и день 4, а на день 5 сарграмостим и AMD3100 вводят за 6-8 часов до введения Ad35.

[0680] В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 включает от 0,1 мкг/кг до 100 мкг/кг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 включает от 0,5 мкг/кг до 50 мкг/кг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 включает от 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг или более. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 включает 4 мкг/кг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 включает 5 мкг/кг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 включает от 10 мкг/кг до 500 мкг/кг или от 50 мкг/кг до 400 мкг/кг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 включает 100 мкг/кг, 150 мкг/кг, 200 мкг/кг, 250 мкг/кг, 300 мкг/кг, 350 мкг/кг или более. В конкретных вариантах осуществления AMD3100 можно вводить подкожно или внутривенно. В конкретных вариантах осуществления AMD3100 можно вводить подкожно в дозе 160-240 мкг/кг за 6-11 часов до доставки Ad35. В конкретных вариантах

осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 можно вводить одновременно с введением другого фактора мобилизации. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 можно вводить после введения другого фактора мобилизации. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество AMD3100 можно вводить после введения G-CSF. В конкретных вариантах осуществления протокол лечения включает 5-дневное лечение, при этом G-CSF вводят на день 1, день 2, день 3 и день 4, а на день 5 G-CSF и AMD3100 вводят за 6-8 часов до инъекции Ad35.

[0681] Терапевтически эффективные количества SCF для введения могут включать дозы в диапазоне, например, от 0,1 до 100 мкг/кг/день или от 0,5 до 50 мкг/кг/день. В конкретных вариантах осуществления доза, в которой можно вводить SCF, включает 0,5 мкг/кг/день, 1 мкг/кг/день, 2 мкг/кг/день, 3 мкг/кг/день, 4 мкг/кг/день, 5 мкг/кг/день, 6 мкг/кг/день, 7 мкг/кг/день, 8 мкг/кг/день, 9 мкг/кг/день, 10 мкг/кг/день, 11 мкг/кг/день, 12 мкг/кг/день, 13 мкг/кг/день, 14 мкг/кг/день, 15 мкг/кг/день, 16 мкг/кг/день, 17 мкг/кг/день, 18 мкг/кг/день, 19 мкг/кг/день, 20 мкг/кг/день, 21 мкг/кг/день, 22 мкг/кг/день, 23 мкг/кг/день, 24 мкг/кг/день, 25 мкг/кг/день, 26 мкг/кг/день, 27 мкг/кг/день, 28 мкг/кг/день, 29 мкг/кг/день, 30 мкг/кг/день или более. В конкретных вариантах осуществления SCF можно вводить в течение 1 дня, 2 последовательных дней, 3 последовательных дней, 4 последовательных дней, 5 последовательных дней или более. В конкретных вариантах осуществления SCF можно вводить подкожно или внутривенно. В конкретных вариантах осуществления SCF можно вводить подкожно в дозе 20 мкг/кг/день. В конкретных вариантах осуществления SCF можно вводить в качестве одиночного агента с последующим одновременным введением с другим фактором мобилизации. В конкретных вариантах осуществления SCF можно вводить в качестве одиночного агента с последующим одновременным введением с AMD3100. В конкретных вариантах осуществления протокол лечения включает 5-дневное лечение, при этом SCF можно вводить на день 1, день 2, день 3 и день 4, а на день 5 SCF и AMD3100 вводят за 6-8 часов до введения Ad35.

[0682] В конкретных вариантах осуществления факторы роста GM-CSF и G-CSF можно вводить для мобилизации ГСКП в нишах костного мозга в циркулирующую периферическую кровь для повышения фракции ГСКП, циркулирующей в крови. В конкретных вариантах осуществления мобилизацию можно обеспечить при введении G-CSF/филграстима (Amgen) и/или AMD3100 (Sigma). В конкретных вариантах осуществления мобилизацию можно обеспечить при введении G-CSF/сарграмостима (Amgen) и/или AMD3100 (Sigma). В конкретных вариантах осуществления мобилизацию

можно обеспечить при введении SCF/анцестима (Amgen) и/или AMD3100 (Sigma). В конкретных вариантах осуществления введение G-CSF/филграстима предшествует введению AMD3100. В конкретных вариантах осуществления введение G-CSF/филграстима происходит одновременно с введением AMD3100. В конкретных вариантах осуществления введение G-CSF/филграстима предшествует введению AMD3100 с последующим одновременным введением G-CSF/филграстима и AMD3100. В US 20140193376 описаны протоколы мобилизации с использованием антагониста CXCR4 с агентом-модулятором рецептора S1P 1 (S1PR1). В US 20110044997 описаны протоколы мобилизации с использованием антагониста CXCR4 с агонистом рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR).

[0683] Вирусные векторы Ad35 являются примером векторов, которые можно вводить вместе с мобилизацией ГСКП. В конкретных вариантах осуществления введение вирусного вектора Ad35 происходит одновременно с введением одного или более факторов мобилизации. В конкретных вариантах осуществления введение вирусного вектора Ad35 происходит после введения одного или более факторов мобилизации. В конкретных вариантах осуществления введение вирусного вектора Ad35 происходит после введения первых одного или более факторов мобилизации и происходит одновременно с введением вторых одного или более факторов мобилизации.

[0684] В конкретных вариантах осуществления агент обогащения ГСК, такой как иммунотоксин CD19 или 5-FU, можно вводить для обогащения в отношении ГСКП. Иммунотоксин CD19 можно использовать для истощения всех клеток линии дифференцировки CD19, которые составляют 30% клеток костного мозга. Истощение способствует выведению из костного мозга. Вынуждение ГСКП пролиферировать (посредством иммунотоксина CD19 или 5-FU), стимулирует их дифференцировку и выведение из костного мозга и повышает присутствие трансгена в клетках периферической крови.

[0685] Терапевтически эффективные количества можно вводить любым подходящим путем введения, например, путем инъекции, инфузии, перфузии, и, в частности, путем введения посредством костномозговой, внутривенной, интрадермальной, внутриартериальной, интранодальной, интралимфатической, внутрибрюшинно инъекции, инфузии или перфузии.

IV(A)ii. Иммуносупрессивные схемы

[0686] Вирусные векторы Ad35 можно вводить одновременно или после введения одного или более иммуносупрессивных агентов или одной или более иммуносупрессивных схем, которые могут включать введение одно или более стероидов,

антагонистов рецепторов IL-1 и/или антагонистов рецепторов IL-6. Эти протоколы могут облегчить потенциальные побочные эффекты лечения.

[0687] Антагонисты рецепторов IL-1 известны и включают ADC-1001 (Alligator Bioscience), FX-201 (Flexion Therapeutics), слитые белки, доступные от Bioasis Technologies, GQ-303 (Genequine Biotherapeutics GmbH), HL-2351 (Handok, Inc.), MBIL-1RA (ProteoThera, Inc.), анакинру (Pivot Pharmaceuticals), человеческий иммуноглобулин G или глобулин S (GC Pharma). Антагонисты рецепторов IL-6 также известны в данной области техники и включают тоцилизумаб, BCD-089 (Biocad), HS-628 (Zhejiang Hisun Pharm) и APX-007 (Apexigen).

[0688] В различных вариантах осуществления иммуносупрессивную схему применяют в отношении субъекта, который также получает по меньшей мере один вирусный вектор для генной терапии, при этом иммуносупрессивная схема включает введение субъекту по меньшей мере одного иммуносупрессивного агента (i) за одни или более дней до введения субъекту первой дозы вирусного вектора для генной терапии; (ii) в день введения первой дозы вирусного вектора для генной терапии; (iii) в день введения одной или более вторых или других последующих доз вирусного вектора для генной терапии; и/или (iv) в любой один или более или все дни между введением субъекту первой дозы вирусного вектора для генной терапии и введением одной или более или всех вторых или других последующих доз вирусного вектора для генной терапии

[0689] Схемы иммуносупрессии дополнительно описаны, например, в предварительной заявке США № 63/009218, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме и, в частности, в отношении схем иммуносупрессии.

IV(A)iii. Отбор

[0690] В конкретных вариантах осуществления способы применения включают лечение состояний, при которых скорректированные клетки имеют избирательное преимущество по сравнению с нескорректированными клетками. Вирусные векторы Ad35 являются примером векторов, которые можно вводить вместе с мобилизацией ГСКП и до введения селективных агентов, которые соответствуют кассете(ам) *in vivo* отбора. В конкретных вариантах осуществления мобилизация (например, протокол мобилизации, описанный в данном документе) скомбинирована с введением описанного в данном документе вектора Ad35 и BCNU или бензилгуанина и темозоломида в случае Ad35, содержащего кассету MGMT^{P140K}, и/или нацеленной на CD33 молекулы в случае вектора Ad35, содержащего анти-CD33 кассету.

[0691] В конкретных вариантах осуществления *in vivo* Ad35-опосредованную

доставку генов (с мобилизацией или без) можно комбинировать с *in vivo* селективным маркером. В конкретных вариантах осуществления *in vivo* селективный маркер может включать MGMT^{P140K}, как описано в Olszko et al., *Gene Therapy* 22: 591-595, 2015.

[0692] Ген лекарственной резистентности MGMT, кодирующий человеческую алкилгуанинтрансферазу (hAGT), представляет собой белок репарации ДНК, который придает резистентность к цитотоксическим эффектам алкилирующих агентов, таких как нитрозомочевина и темозоломид (TMZ). 6-бензилгуанин (6-BG) представляет собой ингибитор AGT, который усиливает токсичность нитрозомочевина и вводится совместно с TMZ для усиления цитотоксических эффектов этого агента. Несколько мутантных форм MGMT, которые кодируют варианты AGT, обладают высокой резистентностью к инактивации 6-BG, но сохраняют способность к репарации повреждений ДНК (Maze et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 1467-1474, 1999). Было показано, что генная терапия на основе резистентности к лекарственному препарату MGMT^{P140K} обеспечивает хемозащиту клеток мышей, собак, макаков резус и человека, в частности гемопоэтических клеток (Zielske et al. *J. Clin. Invest.* 112: 1561-1570, 2003; Pollok et al. *Hum. Gene Ther.* 14: 1703-1714, 2003; Gerull et al. *Hum. Gene Ther.* 18: 451-456, 2007; Neff et al. *Blood* 105: 997-1002, 2005; Larochelle et al. *Clin. Invest.* 119: 1952-1963, 2009; Sawai et al. *Mol. Ther.* 3: 78-87, 2001).

[0693] В конкретных вариантах осуществления комбинация с *in vivo* селективным маркером является важным компонентом в случае заболеваний без избирательного преимущества генно-скорректированных клеток. Например, при ТКИД и некоторых других иммунодефицитах и АФ скорректированные клетки имеют преимущество, а для терапевтической эффективности достаточно трансдукции терапевтического гена лишь в «несколько» ГСКП. В случае других заболеваний, таких как гемоглобинопатии (т. е. серповидноклеточная анемия и талассемия), при которых клетки не демонстрируют конкурентное преимущество, *in vivo* отбор генно-скорректированных клеток, например, в комбинации с *in vivo* селективным маркером, таким как MGMT^{P140K}, будет обеспечивать отбор в отношении малого количества трансдуцированных ГСКП, обеспечивая повышение количества генно-скорректированных клеток и с целью обеспечения терапевтической эффективности. Этот подход также можно применять в случае ВИЧ путем придания ГСКП резистентности к ВИЧ *in vivo* вместо *ex vivo* генетической модификации.

[0694] Также можно использовать дополнительные подходы. Например, в настоящем изобретении можно использовать системы и способы для генетической модификации клеток для обеспечения терапевтического гена, в то же время избирательно

снижая экспрессию CD33 в генетически модифицированных терапевтических клетках. Таким образом, одновременная или последующая терапия анти-CD33, которую может получать пациент, не будет вредить генетически модифицированным терапевтическим клеткам. Однако преобладающие CD33-экспрессирующие клетки в организме пациента и/или вводимые клетки, в которых отсутствует генетическая модификация, не будут защищены, что приведет к положительному отбору в отношении генноскорректированных клеток относительно нескорректированных клеток.

[0695] В конкретных вариантах осуществления этот подход осуществляют путем связывания терапевтического гена и блокирующей CD33 молекулы в одном средстве внутриклеточной доставки. В конкретных вариантах осуществления одно средство внутриклеточной доставки представляет собой вирусный вектор Ad35.

[0696] В конкретных вариантах осуществления блокирующая CD33 молекула представляет собой блокирующую CD33 молекулу на основе кшПНК или миПНК в комбинации с терапевтическим геном за счет включения в общий вирусный вектор Ad35. В конкретных вариантах осуществления блокирующая CD33 молекула представляет собой последовательность кшПНК, содержащую SEQ ID NO: 187, или последовательность, содержащую SEQ ID NO: 188.

[0697] CD33-нацеленное лечение включает анти-CD33 антитела, анти-CD33 иммунотоксины, конъюгаты анти-CD33 антитела и лекарственного препарата, конъюгаты анти-CD33 антитела и радиоактивного изотопа, анти-CD33 биспецифические антитела, анти-CD33 BiTE® антитела, анти-CD33 триспецифические антитела и/или анти-CD33 CAR.

IV(B). In vitro и ex vivo генная терапия

[0698] In vitro генная терапия включает применение вектора, генома или системы по настоящему изобретению в способе внесения экзогенной ДНК в клетку-хозяина (такую как клетка-мишень) и/или нуклеиновую кислоту (такую как целевая нуклеиновая кислота, такая как целевой геном), при этом клетка-хозяин или нуклеиновая кислота не находится в многоклеточном организме (например, в лаборатории). В некоторых вариантах осуществления целевая клетка или нуклеиновая кислота получена из многоклеточного организма, такого как млекопитающее (например, мышь, крыса, человек или отличный от человека примат). In vitro конструирование клетки, полученной из многоклеточного организма, может называться ex vivo конструированием и может использоваться в ex vivo терапии. В различных вариантах осуществления способы и композиции по настоящему изобретению используют, например, как описано в данном документе, для модификации целевой клетки или нуклеиновой кислоты, полученной из многоклеточного организма, а

затем сконструированную целевую клетку или нуклеиновую кислоту вводят во второй многоклеточный организм, такой как млекопитающее (например, мышь, крыса, человек или отличный от человека примат), например, в способе адоптивной клеточной терапии. В некоторых случаях первый и второй организмы являются одним и тем же исследуемым организмом. Возвращение *in vitro* сконструированного материала в организм субъекта, от которого этот материал был получен, может быть аутологичной терапией. В некоторых случаях первый и второй организмы являются разными организмами (например, двумя организмами одного вида, например, двумя мышами, двумя крысами, двумя людьми или двумя отличными от человека приматами одного вида). Перенос сконструированного материала, полученного от первого субъекта, второму отличному субъекту может быть аллогенной терапией.

[0699] *Ex vivo* клеточная терапия может включать выделение стволовых клеток, клеток-предшественников или дифференцированных клеток из организма пациента или нормального донора, размножение выделенных клеток *ex vivo* с генетическим конструированием или без и введение клеток субъекту для образования временного или стабильного трансплантата инфузирования клеток и/или их потомства. Такие *ex vivo* подходы можно использовать, например, для лечения наследственного, инфекционного или неопластического заболевания, для регенерации ткани или для доставки терапевтического агента в участок заболевания. В различных видах *ex vivo* терапии отсутствует прямое воздействие на субъекта вектора для переноса генов, а клетки-мишени трансдукции могут быть отобраны, размножены и/или дифференцированы до или после какого-либо генетического конструирования для улучшения эффективности и безопасности.

[0700] *Ex vivo* терапия включает трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) (ТГК). Терапия аутологичными ГСК представляет терапевтический вариант для нескольких моногенных заболеваний крови и иммунной системы, а также для болезней накопления, и может стать вариантом лечения первой линии для выбранных болезненных состояний. Другим общепринятым применением клеточной и генной терапии является адоптивная иммунотерапия, в которой используют *ex vivo* размноженные Т-клетки с генетическим конструированием или без для перенаправления их антигенной специфичности или для повышения их профиля безопасности с целью использования возможностей иммунных эффекторных и регуляторных клеток для применения против злокачественных образований, инфекций и аутоиммунных заболеваний. Ряд других типов соматических стволовых клеток, в некоторых случаях с использованием генетического конструирования, демонстрируют перспективы для

терапевтических применений, включая эпидермальные и лимбальные стволовые клетки, нейральные стволовые клетки/клетки-предшественники (НСКП), сердечные стволовые клетки и мультипотентные стромальные клетки (МСК).

[0701] Применения *ex-vivo* терапии включают восстановление дисфункциональных клеточных линий дифференцировки. В случае наследственных заболеваний, характеризующихся дефективной или отсутствующей клеточной линией дифференцировки, линию дифференцировки можно восстановить с помощью функциональных клеток-предшественников, полученных от нормальных доноров или из аутологичных клеток, которые были подвергнуты *ex vivo* генному переносу для коррекции дефицита. Примером является ТКИД, при котором дефицит в любом одном из нескольких генов блокирует развитие зрелых лимфоидных клеток. Трансплантация не подвергнутых манипуляциям нормальных донорных ГСК, которая может сделать возможной генерацию донорных функциональных гемопоэтических клеток разных линий дифференцировки, представляет терапевтический вариант для ТКИД, а также многих других заболеваний, которые поражают кровь и иммунную систему. Генная терапия аутологичными ГСК, которая может включать замещение функциональной копии дефектного гена в трансплантированных гемопоэтических стволовых клетках/клетках-предшественниках (ГСКП) и, аналогично ТГК, может обеспечить постоянное функциональное потомство, может иметь несколько преимуществ, включая сниженный риск болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), сниженный риск отторжения трансплантата и сниженную необходимость в иммуносупрессии после трансплантации.

[0702] Применения *ex-vivo* терапии включают увеличение дозировки терапевтического гена. У некоторых применениях генная терапия ГСК может повысить терапевтическую эффективность аллогенной ТГК. Дозировку терапевтического гена можно довести до уровней выше нормального в трансплантированных клетках.

[0703] Применения *ex-vivo* терапии включают привнесение новой функции и нацеленную генную терапию. *Ex vivo* генная терапия может придать ГСК или их потомству новую функцию, такую как приобретение лекарственной резистентности, чтобы сделать возможным применение высокодозовой противоопухолевой схемы химиотерапии, приобретение резистентности к предварительно установленной инфекции вирусом, таким как ВИЧ, или другим патогеном путем экспрессии агентов на основе РНК (например, рибозимов, РНК-ловушек, антисмысловых РНК, РНК-аптамеров и малых интерферирующих РНК) и агентов на основе белков (например, доминантно-негативных мутантных вирусных белков, слитых ингибиторов и сконструированных нуклеаз, нацеленных на геном патогена).

[0704] Применения *ex-vivo* терапии включают повышение иммунных ответов. При неопластических заболеваниях типы аллогенных адаптивных иммунных клеток, такие как Т-клетки, могут распознавать и уничтожать раковые клетки. К несчастью, распознавание здоровых тканей аллореактивными лимфоцитами также может приводить к вредоносной БТПХ. Перенос суицидального гена в донорные лимфоциты позволит использовать их противоопухолевый потенциал, но приглушит их токсичность. В аутологичном контексте лимфоциты со специфичностью, направленной против трансформированных или инфицированных клеток, можно выделять из тканей пациента и избирательно размножать *ex vivo*. В альтернативном варианте их можно создавать путем переноса гена для синтетического или химерного антигенного рецептора, который инициирует ответ клетки, когда она взаимодействует с трансформированной или инфицированной клеткой. Эти подходы могут усилить первоначальный ответ организма-хозяина на опухоль или инфекцию или индуцировать его *de novo*.

IV(C). Состояния, которые можно лечить с помощью генной терапии

[0705] По меньшей мере частично из-за того, что аденовирусные векторы по настоящему изобретению можно использовать *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* для модификации клеток-хозяев и/или клеток-мишеней, и дополнительно из-за того, что аденовирусный вектор может содержать нагрузку, кодирующую широкий спектр экспрессионных продуктов, из настоящего описания станет понятно, что различные представленные в данном документе технологии имеют широкую применимость и могут быть использованы для лечения широкого спектра состояний. Примеры состояний, которые можно лечить путем введения аденовирусного вектора, генома или системы по настоящему изобретению, включают, без ограничения, гемоглобинопатии, иммунодефициты, состояния, связанные с точечными мутациями, раки, дефициты белков, инфекционные заболевания и воспалительные заболевания.

[0706] В определенных вариантах осуществления векторы, геномы, системы и составы, описанные в данном документе, можно применять для лечения субъектов (людей, ветеринарных животных (собак, кошек, рептилий, птиц и т. д.), сельскохозяйственных животных (лошадей, крупный рогатый скот, коз, свиней, кур и т. д.) и животных для исследований (обезьян, крыс, мышей, рыб и т. д.). Лечение субъектов включает доставку терапевтически эффективных количеств. Терапевтически эффективные количества включают те, которые обеспечивают эффективные количества, профилактическое лечение и/или терапевтическое лечение.

[0707] В конкретных вариантах осуществления способы и составы, описанные в данном документе, можно применять для лечения заболеваний крови. В конкретных

вариантах осуществления составы вводят субъектам для лечения гемофилии, основной β -талассемии, анемии Даймонда - Блэкфана (АДБ), пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), истинной эритроцитарной аплазии (ИЭА), рефрактерной анемии, тяжелой апластической анемии и/или рака крови, такого как лейкоз, лимфома и миелома.

[0708] Гемоглинопатии представляют глобальную нагрузку на систему здравоохранения с непропорциональными результатами. Дефекты в белках гемоглобина или в экспрессии генов глобина могут приводить к заболеваниям, называемым гемоглинопатиями. Гемоглинопатии находятся среди наиболее распространенных генетических расстройств по всему миру.

[0709] Каждый год 1,1 миллиона новорожденных по всему миру имеют риск развития гемоглинопатий, с поражением порядка 25 из каждой 1000 новорожденных в географических регионах с преобладающей тропической малярией из-за естественной резистентности к малярийной инфекции, обеспечиваемой генетической вариацией гемоглобина (Hb). В развитых регионах пациенты подвержены риску перенасыщения железом из-за хронических трансфузий. В недоразвитых регионах выживаемость существенно ниже. Например, в Африке среди пациентов с гемоглинопатиями детская смертность составляет 40% по сравнению с 16% среди всех детей.

[0710] Мутации в генах глобина могут генерировать аномальную форму гемоглобина, как при серповидноклеточной анемии (СКА) и гемоглинозе С, D и E, или приводить к снижению выработки полипептидов α или β и, таким образом, нарушению баланса цепей глобина в клетке. Эти последние состояния называются α - или β -талассемиями, в зависимости от того, какая цепь глобина нарушена. 5% мирового населения несут значимый вариант гемоглобина, при этом серповидная мутация в гене β -глобина (HbV) (замена глутамата валином; исторически E6V, одновременно E7V) однозначно является наиболее распространенной (40% носителей). Высокая распространенность и тяжесть связанных с гемоглином расстройств представляет значительную нагрузку, влияющую не только на жизни больных, но также на системы здравоохранения, поскольку пожизненная поддержка пациента является дорогостоящей.

[0711] Существует две формы гемоглобина, фетальный (HbF), который содержит две альфа (α) и две гамма (γ) цепи, и взрослый (HbA), который содержит две α и две бета (β) цепи. Естественное переключение с HbF на HbA происходит вскоре после рождения и регулируется репрессией транскрипции генов γ -глобина факторами, включающими основной регулятор bcl11a. Что важно, ряд клинических наблюдений демонстрирует, что тяжесть β -гемоглинопатий, таких как серповидноклеточная анемия и β -талассемия, можно облегчить за счет повышения выработки HbF.

[0712] В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное лечение индуцирует или повышает экспрессию HbF, индуцирует или повышает выработку гемоглобина и/или индуцирует или повышает выработку β -глобина. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное лечение улучшает функцию клеток крови и/или повышает насыщение клеток кислородом.

[0713] В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает лечение заболевания крови с помощью аденовирусного донорного вектора по настоящему изобретению, который содержит длинную LCR β -глобина, промотор β -глобина и кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок или агент для лечения заболевания крови. В различных вариантах осуществления заболевание крови представляет собой талассемию, а белок представляет собой белок β -глобина или γ -глобина, или белок, который иным образом частично или полностью функционально замещает β -глобин или γ -глобин. В различных вариантах осуществления заболевание крови представляет собой гемофилию, а белок представляет собой ET3 или белок, который иным образом частично или полностью функционально замещает фактор VIII. В различных вариантах осуществления заболевание крови представляет собой заболевание, связанное с точечной мутацией, такое как серповидноклеточная анемия, а агент представляет собой белок для редактирования генов.

[0714] ET3 может иметь следующую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO 301. В различных вариантах осуществления белок-заместитель фактора VIII может иметь аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 301.

[0715] β -глобин может иметь следующую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO 302. В различных вариантах осуществления белок-заместитель β -глобина может иметь аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 302.

[0716] γ -глобин может иметь следующую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO 303. В различных вариантах осуществления белок-заместитель γ -глобина может иметь аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 303.

[0717] Всемирной организацией здоровья признаны более 80 первичных иммунодефицитных заболеваний. Эти заболевания характеризуются врожденным

дефектом иммунной системы, при котором, в некоторых случаях, организм не способен вырабатывать какие-либо антитела или достаточно антител против инфекции. В других случаях клеточная защита для борьбы с инфекцией не может работать должным образом. Как правило, первичные иммунодефициты являются наследственными заболеваниями.

[0718] Вторичные или приобретенные иммунодефициты не являются результатом наследственных генетических аномалий, а возникают у индивидов, у которых иммунная система была нарушена факторами за пределами иммунной системы. Примеры включают травмы, вирусы, химиотерапию, токсины и загрязнение. Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) является примером вторичного иммунодефицитного расстройства, вызванного вирусом, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), при котором истощение Т-лимфоцитов делает организм неспособным бороться с инфекцией.

[0719] X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД-Х1) представляет собой истощение как клеточного, так и гуморального иммунитета, вызываемое мутациями в гене общей гамма-цепи (γ C), что приводит к отсутствию Т- и естественных киллерных (НК) лимфоцитов и присутствию нефункциональных В-лимфоцитов. ТКИД-Х1 приводит к смерти на протяжении первых двух лет жизни, если не восстановить иммунную систему, например, посредством трансплантации костного мозга (ТКМ) или генной терапии.

[0720] Поскольку в случае большинства индивидов отсутствует совпадающий донор для ТКМ или неаутологичной генной терапии, часто используют гаплоидентичный родительский костный мозг, обедненный в отношении зрелых Т-клеток; однако осложнения включают болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ), невозможность вырабатывать адекватные антитела и, следовательно, необходимость в долгосрочном замещении иммуноглобулина, позднюю потерю Т-клеток вследствие невозможности прививания гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (ГСКП), хронические бородавки и нарушение регуляции лимфоцитов.

[0721] Анемия Фанкони (АФ) представляет собой наследственное заболевание крови, которое приводит к недостаточности костного мозга. Она частично характеризуется недостатком механизма репарации ДНК. По меньшей мере у 20% пациентов с АФ развиваются раковые заболевания, такие как миелоидные лейкозы и раковые заболевания кожи, печени, желудочно-кишечного тракта и гинекологической системы. Опухоли кожи и желудочно-кишечного тракта обычно представляют собой плоскоклеточные карциномы. Средний возраст пациентов, у которых развивается рак, составляет 15 лет в случае лейкоза, 16 лет в случае опухолей печени и 23 года в случае других опухолей.

[0722] Терапевтический ген может быть выбран так, чтобы обеспечивать терапевтически эффективный ответ против состояния, которое, в конкретных вариантах осуществления, является наследственным. В конкретных вариантах осуществления это состояние может представлять собой болезнь Грейвса, ревматоидный артрит, пернициозную анемию, рассеянный склероз (РС), воспалительное заболевание кишечника, системную красную волчанку (СКВ), дефицит аденозиндезаминазы (АДА-ТКИД) или тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД), синдром Вискотта - Олдрича (СВО), хроническую гранулематозную болезнь (ХГБ), анемию Фанкони (АФ), болезнь Баттена, адренолейкодистрофию (АЛД) или метахроматическую лейкодистрофию (МЛД), мышечную дистрофию, легочный альвеолярный протеиноз (ЛАП), дефицит пируваткиназы, анемию Швахмана - Даймонда - Блэкфана, врожденный дискератоз, муковисцидоз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или боковой амиотрофический склероз (болезнь Лу Герига). В конкретных вариантах осуществления, в зависимости от состояния, терапевтический ген может представлять собой ген, который кодирует белок, и/или ген, чья функция была нарушена.

[0723] В конкретных вариантах осуществления способы и составы, описанные в данном документе, можно применять для лечения рака. В конкретных вариантах осуществления составы вводят субъектам для лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого миелогенного лейкоза (ОМЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), хронического миеломоноцитарного лейкоза, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы Ходжкина, ювенильного миеломоноцитарного лейкоза, множественной миеломы, миелодисплазии и/или неходжкинской лимфомы.

[0724] Дополнительные типовые раковые заболевания, которые можно лечить, включают астроцитому, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль, рак головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), рак молочной железы, карциносаркому, хондросаркому, хордому, карциному хориоидного сплетения, папиллому хориоидного сплетения, светлоклеточную саркому мягких тканей, диффузную В-крупноклеточную лимфому, эпендимому, эпителиоидную саркому, внегонадную герминогенную опухоль, внепочечную рабдоидную опухоль, саркому Юинга, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта, глиобластому, HBV-индуцированную гепатоцеллюлярную карциному, рак головы и шеи, рак почки, рак легкого, злокачественную рабдоидную опухоль, медуллобластому, меланому, менингиому, мезотелиому, множественную миелому, нейроглиальную опухоль, не обозначенную иначе (НОИ) саркому, олигоастроцитому, олигодендроглиому, остеосаркому, рак яичника, светлоклеточную аденокарциному

яичника, эндометриоидную аденокарциному яичника, серозную аденокарциному яичника, рак поджелудочной железы, протоковую аденокарциному поджелудочной железы, эндокринную опухоль поджелудочной железы, пинеобластому, рак предстательной железы, почечно-клеточную карциному, почечную медуллярную карциному, рабдомиосаркому, саркому, шванному, плоскоклеточную карциному кожи и рак из стволовых клеток. В различных конкретных вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника. В различных конкретных вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы.

[0725] В конкретных вариантах осуществления способы и составы, описанные в данном документе, можно применять для лечения состояний, связанных с точечными мутациями. В конкретных вариантах осуществления составы вводят субъектам для лечения серповидноклеточной анемии, муковисцидоза, болезни Тея - Сакса и/или фенилкетонурии. В различных вариантах осуществления нагрузка транспозона по настоящему изобретению кодирует CRISPR-Cas для коррекционного редактирования повреждения нуклеиновой кислоты. В различных вариантах осуществления нагрузка транспозона по настоящему изобретению кодирует редактор оснований для коррекционного редактирования повреждения нуклеиновой кислоты.

[0726] В конкретных вариантах осуществления способы и составы, описанные в данном документе, можно применять для лечения дефицита конкретного фермента. В конкретных вариантах осуществления составы вводят субъектам для лечения синдрома Гурлер, изолированной недостаточности IgA-типа, гипер IgM, дефицита подкласса IgG, болезни Ниманна - Пика, болезни Тея - Сакса, болезни Гоше, болезни Фабри, болезни Краббе, глюкоземии, болезни кленового сиропа, фенилкетонурии, болезни накопления гликогена, атаксии Фридрейха, синдрома Цельвегера, адренолейкодистрофии, расстройств, связанных с комплементом, и/или мукополисахаридоза.

[0727] Терапевтически эффективные количества могут обеспечивать функционирование иммунных и других кровяных клеток и/или микроглиальных клеток или могут, в альтернативном варианте, в зависимости от состояния, лечение которого проводят, ингибировать активацию лимфоцитов, индуцировать апоптоз в лимфоцитах, элиминировать различные подгруппы лимфоцитов, ингибировать активацию Т-клеток, элиминировать или ингибировать аутореактивные Т-клетки, ингибировать активность лимфоцитов Th-2 или Th-1, антагонизировать IL-1 или TNF, уменьшать воспаление, индуцировать избирательную толерантность к провоцирующему агенту, уменьшать или элиминировать иммунно-опосредованное состояние; и/или уменьшать или элиминировать симптом иммунно-опосредованного состояния. Терапевтически эффективные количества

также могут обеспечивать функциональные механизмы репарации ДНК; поверхностную экспрессию белка; поддержание теломер; лизосомальную функцию; расщепление липидов или других белков, таких как амилоиды; обеспечение рибосомальной функции; и/или обеспечение развития линий дифференцировки зрелых клеток крови, которые в ином случае бы не развивались, таких как макрофаги и другие типы белых клеток крови.

[0728] В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут восстанавливать опосредованные Т-клетками иммунные ответы у нуждающегося в этом субъекта. Восстановление опосредованных Т-клетками иммунных ответов может включать восстановление работы вилочковой железы и/или восстановление нормального развития Т-лимфоцитов.

[0729] В конкретных вариантах осуществления восстановление работы вилочковой железы может включать восстановление частоты CD3⁺ Т-клеток, экспрессирующих CD45RA, в периферической крови до уровней, сравнимых с эталонным уровнем, полученным для контрольной популяции. В конкретных вариантах осуществления восстановление работы вилочковой железы может включать восстановление числа Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC) на 10⁶ созревающих Т-клеток до уровней, сравнимых с эталонным уровнем, полученным для контрольной популяции. Число TREC на 10⁶ созревающих Т-клеток можно определить, как описано в Kennedy et al., *Vet Immunol Immunopathol* 142: 36-48, 2011.

[0730] В конкретных вариантах осуществления восстановление нормального развития Т-лимфоцитов включает восстановление соотношения CD4⁺ клетки:CD8⁺ клетки до 2. В конкретных вариантах осуществления восстановление нормального развития Т-лимфоцитов включает выявления наличия $\alpha\beta$ TCR в циркулирующих Т-лимфоцитах. Наличие $\alpha\beta$ TCR в циркулирующих Т-лимфоцитах можно выявить, например, методом проточной цитометрии, используя антитела, которые связывают α и/или β цепь TCR. В конкретных вариантах осуществления восстановление нормального развития Т-лимфоцитов включает выявления наличия разнообразного репертуара TCR, сравнимого с эталонным уровнем, полученным для контрольной популяции. Разнообразие TCR можно оценить методом спектра типирования TCRV β , который анализирует генетическую перестройку варибельной области гена TCR β . Выраженные нормальные профили спектра типирования могут характеризоваться распределением Гаусса фрагментов, отсортированных по размеру среди 17 семейств сегментов TCRV β . В конкретных вариантах осуществления восстановление нормального развития Т-лимфоцитов включает восстановление специфических в отношении Т-клеток сигнальных путей. Восстановление специфических в отношении Т-клеток сигнальных путей можно

оценить по пролиферации лимфоцитов после воздействия фитогемагглютинина Т-клеточного митогена (РНА). В конкретных вариантах осуществления восстановление нормального развития Т-лимфоцитов включает восстановление числе белых клеток крови, числа нейтрофилов, числа моноцитов, числа лимфоцитов и/или числа тромбоцитов до уровня, сравнимого с эталонным уровнем, полученным для контрольной популяции.

[0731] В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут улучшать кинетику и/или клональное разнообразие восстановления лимфоцитов у нуждающегося в этом субъекта. В конкретных вариантах осуществления улучшение кинетики восстановления лимфоцитов может включать повышение числа циркулирующих Т-лимфоцитов до диапазона эталонного уровня, полученного для контрольной популяции. В конкретных вариантах осуществления улучшение кинетики восстановления лимфоцитов может включать повышение абсолютного числа CD3+ лимфоцитов до диапазона эталонного уровня, полученного для контрольной популяции. Диапазон может представлять собой диапазон значений, наблюдаемых у или демонстрируемых нормальными (т. е. не с ослабленным иммунитетом) субъектами для заданного параметра. В конкретных вариантах осуществления улучшение кинетики восстановления лимфоцитов может включать уменьшение времени, необходимого для достижения нормального числа лимфоцитов, по сравнению с нуждающимся в этом субъектом, которому не вводят описанную в данном документе терапию. В конкретных вариантах осуществления улучшение кинетики восстановления лимфоцитов может включать повышение частоты лимфоцитов со скорректированными генами по сравнению с нуждающимся в этом субъектом, которому не вводят описанную в данном документе терапию. В конкретных вариантах осуществления улучшение кинетики восстановления лимфоцитов может включать повышение плотности клонального репертуара лимфоцитов со скорректированными генами у субъекта по сравнению с нуждающимся в этом субъектом, которому не вводят описанную в данном документе генную терапию. Повышение плотности клонального репертуара лимфоцитов со скорректированными генами может включать повышение числа уникальных клонов ретровирусного сайта интеграции (РСИ) согласно данным анализа РСИ.

[0732] В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут восстанавливать функцию костного мозга у нуждающегося в этом субъекта. В конкретных вариантах осуществления восстановление функции костного мозга может включать улучшение репопуляции костного мозга с помощью клеток со скорректированными генами по сравнению с нуждающимся в этом субъектом, которому не вводят описанную в данном документе терапию. Улучшение репопуляции костного

мозга с помощью клеток со скорректированными генами может включать повышение процентного содержания клеток со скорректированными генами. В конкретных вариантах осуществления клетки выбраны из белых клеток крови и клеток костного мозга. В конкретных вариантах осуществления процентное содержание клеток со скорректированными генами можно измерять, используя анализ, выбранный из количественной ПЦР в реальном времени и проточной цитометрии.

[0733] В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут нормализовать ответы первичных и вторичных антител на иммунизацию у нуждающегося в этом субъекта. Нормализация ответов первичных и вторичных антител на иммунизацию может включать восстановление функционирования В-клеточных и/или Т-клеточных программ цитокиновых сигналов в переключении класса и ответе памяти на антиген. Нормализацию ответов первичных и вторичных антител на иммунизацию можно оценить с помощью анализа иммунизации бактериофагом. В конкретных вариантах осуществления восстановление функционирования В-клеточных и/или Т-клеточных программ цитокиновых сигналов можно оценить после иммунизации зависимым от Т-клеток неоантигенным бактериофагом ΨХ174. В конкретных вариантах осуществления нормализация ответов первичных и вторичных антител на иммунизацию может включать повышение уровня IgA, IgM и/или IgG у нуждающегося в этом субъекта до уровня, сравнимого с эталонным уровнем, полученным для контрольной популяции. В конкретных вариантах осуществления нормализация ответов первичных и вторичных антител на иммунизацию может включать повышение уровня IgA, IgM и/или IgG у нуждающегося в этом субъекта до уровня, большего, чем уровень нуждающегося в этом субъекта, которому не вводят описанную в данном документе генную терапию. Уровень IgA, IgM и/или IgG можно измерить, например, в иммуноглобулиновом тесте. В конкретных вариантах осуществления иммуноглобулиновый тест включает антитела, связывающие IgG, IgA, IgM, легкую цепь каппа, легкую цепь лямбда и/или тяжелую цепь. В конкретных вариантах осуществления иммуноглобулиновый тест включает электрофорез сывороточных белков, иммуноэлектрофорез, радиальную иммунодиффузию, нефелометрию и турбидиметрию. Коммерчески доступные наборы с иммуноглобулиновым тестом включают MININEPH™ (сайт связывания, Birmingham, UK) и системы иммуноглобулиновых тестов от Dako (Denmark) и Dade Behring (Marburg, Germany). В конкретных вариантах осуществления образец, который можно использовать для измерения уровней иммуноглобулина, включает образец крови, образец плазмы, образец цереброспинальной жидкости и образец мочи.

[0734] В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему

изобретению можно применять для лечения ТКИД-Х1. В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению можно применять для лечения ТКИД (например, ТКИД с дефицитом киназы JAK 3, ТКИД с дефицитом пурин-нуклеозидфосфорилазы (PNP), ТКИД с дефицитом аденозиндезаминазы (ADA), ТКИД с дефицитом ГКГС класса II или гена, активирующего рекомбиназу (RAG)). В конкретных вариантах осуществления терапевтическую эффективность можно наблюдать по восстановлению лимфоцитов, улучшению клонального разнообразия и тимопоэза, уменьшению инфекций и/или улучшению результатов пациента. Терапевтическую эффективность также можно наблюдать по одному или более из набора массы и роста, улучшения желудочно-кишечной функции (например, уменьшения диареи), уменьшения симптомов верхних дыхательных путей, уменьшения грибковых инфекций ротовой полости (кандидоза), уменьшения частоты и тяжести пневмонии, уменьшение менингита и инфекций кровотока и уменьшения ушных инфекций. В конкретных вариантах осуществления лечение ТКИД-Х1 способами по настоящему изобретению включает восстановление функциональности γ C-зависимого сигнального пути. Функциональность γ C-зависимого сигнального пути можно оценить путем измерения фосфорилирования тирозина эффекторных молекул STAT3 и/или STAT5 после *in vitro* стимуляции IL-21 и/или IL-2, соответственно. Фосфорилирование тирозина STAT3 и/или STAT5 можно измерить путем внутриклеточного окрашивания антителами.

[0735] В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению можно применять для лечения АФ. В конкретных вариантах осуществления терапевтическую эффективность можно наблюдать по восстановлению лимфоцитов, улучшению клонального разнообразия и тимопоэза, уменьшению инфекций и/или улучшению результатов пациента. Терапевтическую эффективность также можно наблюдать по одному или более из набора массы и роста, улучшения желудочно-кишечной функции (например, уменьшения диареи), уменьшения симптомов верхних дыхательных путей, уменьшения грибковых инфекций ротовой полости (кандидоза), уменьшения частоты и тяжести пневмонии, уменьшение менингита и инфекций кровотока и уменьшения ушных инфекций. В конкретных вариантах осуществления лечение АФ способами по настоящему изобретению включает повышение резистентности клеток костного мозга к митомицину С (ММС). В конкретных вариантах осуществления резистентность клеток костного мозга к ММС можно измерить с помощью анализа выживаемости клеток в метилцеллюлозе и ММС.

[0736] В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению можно применять для лечения гипогаммаглобулинемии.

Гипогаммаглобулинемия вызвана недостатком В-лимфоцитов и характеризуется низкими уровнями антител в крови. Гипогаммаглобулинемия может возникать у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), множественной миеломой (ММ), неходжкинской лимфомой (НХЛ) и другими схожими злокачественными образованиями в результате как связанной с лейкозом иммунной дисфункции, так и связанной с терапией иммуносупрессией. Пациенты с приобретенной гипогаммаглобулинемией, обусловленной такими гемобластомами, и те пациенты, которые получают трансплантацию пост-ГСКП, восприимчивы к бактериальным инфекциям. Дефицит гуморального иммунитета в значительной степени ответственен за повышенный риск связанной с инфекциями заболеваемости и смертности среди этих пациентов, в особенности в случае инкапсулированных микроорганизмов. Например, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Staphylococcus aureus*, а также виды *Legionella* и *Nocardia* являются частыми бактериальными патогенами, которые вызывают пневмонию у пациентов с ХЛЛ. Также наблюдали оппортунистические инфекции, такие как вызванные *Pneumocystis carinii*, грибами, вирусами и микобактериями. Число и тяжесть инфекций у этих пациентов можно значительно снизить путем введения иммуноглобулина (Griffiths et al. Blood 73: 366-368, 1989; Chapel et al. Lancet 343: 1059-1063, 1994).

[0737] В конкретных вариантах осуществления составы вводят субъектам для лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого миелогенного лейкоза (ОМЛ), аденолейкодистрофии, агногенной миелоидной метаплазии, амегакариоцитарной/врожденной тромбоцитопении, атаксии-телеангиэктазии, основной β -талассемии, хронического гранулематозного заболевания, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), хронического миеломоноцитарного лейкоза, общего переменного иммунодефицита (ОВИД), расстройств, связанных с комплементом, врожденной агаммаглобулинемии, синдрома Даймонда - Блэкфана, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, семейного эритрофагоцитарного лимфогистиоцитоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы Ходжкина, синдрома Гурлер, гипер IgM, дефицита подкласса IgG, ювенильного миеломоноцитарного лейкоза, метахроматической лейкодистрофии, мукополисахаридоза, множественной миеломы, миелодисплазии, неходжкинской лимфомы, ночной пароксизмальной гемоглобинурии (НПГ), первичных иммунодефицитных заболеваний с дефицитом антител, истинной эритроцитарной аплазии, рефрактерной анемии, анемии Швахмана - Даймонда - Блэкфана (АДБ), изолированной недостаточности IgA-типа, тяжелой апластической анемии, серповидноклеточной анемии, дефицита конкретных антител, синдрома Вискотта - Олдрича и/или X-сцепленной агаммаглобулинемии (XLA).

[0738] Дополнительные типовые раковые заболевания, которые можно лечить, включают астроцитому, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль, рак головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), рак молочной железы, карциносаркому, хондросаркому, хордому, карциному хориоидного сплетения, папиллому хориоидного сплетения, светлоклеточную саркому мягких тканей, диффузную В-крупноклеточную лимфому, эпендимому, эпителиоидную саркому, внегонадную герминогенную опухоль, внепочечную рабдоидную опухоль, саркому Юинга, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта, глиобластому, HBV-индуцированную гепатоцеллюлярную карциному, рак головы и шеи, рак почки, рак легкого, злокачественную рабдоидную опухоль, медуллобластому, меланому, менингиому, мезотелиому, множественную миелому, нейроглиальную опухоль, не обозначенную иначе (НОИ) саркому, олигоастроцитому, олигодендроглиому, остеосаркому, рак яичника, светлоклеточную аденокарциному яичника, эндометриоидную аденокарциному яичника, серозную аденокарциному яичника, рак поджелудочной железы, протоковую аденокарциному поджелудочной железы, эндокринную опухоль поджелудочной железы, пинеобластому, рак предстательной железы, почечно-клеточную карциному, почечную медуллярную карциному, рабдомиосаркому, саркому, шванному, плоскоклеточную карциному кожи и рак из стволовых клеток. В различных конкретных вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника. В различных конкретных вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы.

[0739] В контексте раковых заболеваний терапевтически эффективные количества могут уменьшать число опухолевых клеток, уменьшать количество метастазов, уменьшать объем опухоли, увеличивать ожидаемую продолжительность жизни, индуцировать апоптоз раковых клеток, индуцировать гибель раковых клеток, индуцировать химио- или радиочувствительность в раковых клетках, ингибировать ангиогенез вблизи раковых клеток, ингибировать пролиферацию раковых клеток, ингибировать рост опухоли, предотвращать метастазирование, продлевать жизнь субъекта, уменьшать связанную с раком боль, уменьшать количество метастазов и/или снижать рецидив или повторное появление рака после лечения.

[0740] Конкретные варианты осуществления включают лечение вторичных или приобретенных иммунодефицитов, таких как иммунодефициты, вызванные травмами, вирусами, химиотерапией, токсинами и загрязнением. Как было указано ранее, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) является примером вторичного иммунодефицитного расстройства, вызванного вирусом, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), при котором истощение Т-лимфоцитов делает организм неспособным

бороться с инфекцией. Таким образом, в другом примере ген может быть выбран так, чтобы обеспечивать терапевтически эффективный ответ против инфекционного заболевания. В конкретных вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой вирус иммунодефицита человека (ВИЧ или HIV). Терапевтический ген может представлять собой, например, ген, придающий иммунным клеткам резистентность к инфекции ВИЧ, или который делает иммунные клетки способными эффективно нейтрализовать вирус посредством иммунного восстановления, полиморфизмы генов, кодирующих белки, экспрессируемые иммунными клетками, гены, обеспечивающие преимущество в борьбе с инфекцией, которые не экспрессируются в организме пациента, гены, кодирующие инфекционный агент, рецептор или корецептор; ген, кодирующий лиганды для рецепторов или корецепторов; вирусные и клеточные гены, важные для вирусной репликации, включая ген, кодирующий рибозимы, антисмысловую РНК, малую интерферирующую РНК (миРНК) или РНК-ловушку для блокирования действия определенных транскрипционных факторов; ген, кодирующий доминантно-негативные вирусные белки, внутриклеточные антитела, интракины и суицидальные гены. Типовые терапевтические гены и генные продукты включают $\alpha 2\beta 1$; $\alpha \nu \beta 3$; $\alpha \nu \beta 5$; $\alpha \nu \beta 63$; BOB/GPR15; Bonzo/STRL-33/TYMSTR; CCR2; CCR3; CCR5; CCR8; CD4; CD46; CD55; CXCR4; аминокептидазу-N; HHV-7; ICAM; ICAM-1; PRR2/HveB; HveA; α -дистрогликан; LDLR/ $\alpha 2$ MR/LRP; PVR; PRR1/HveC; и рецептор ламинина. Терапевтически эффективное количество для лечения ВИЧ, например, может повышать иммунитет субъекта против ВИЧ, ослаблять симптом, связанный со СПИДом или ВИЧ, или индуцировать у субъекта врожденный или адаптивный иммунный ответ против ВИЧ. Иммунный ответ против ВИЧ может включать выработку антител и приводить к предотвращению СПИДа и/или ослаблять симптом СПИДа или ВИЧ-инфекции субъекта или снижать или устранять инфекционность и/или вирулентность ВИЧ.

[0741] В конкретных вариантах осуществления составы вводят субъектам для предотвращения или задержки повторного появления рака или для предотвращения или задержки появления рака у носителей связанных с высоким риском мутаций зародышевой линии. В конкретных вариантах осуществления составы вводят субъектам для получения высоких терапевтических доз темозоломида (TMZ) и бензилгуанина или BCNU. Из-за сильных миелосупрессивных нецелевых эффектов доставка эффективной дозы TMZ и бензилгуанина в опухоли остается проблематичной. Пациенты могут на данный момент получать TMZ и бензилгуанин для лечения, связанного с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), раком пищевода, раком головы и шеи, низкодифференцированной глиомой, миелодиспластическим синдромом, немелкоклеточным раком легкого, НМРЛ;

рефрактерным ОМЛ, мелкоклеточным раком легкого, анапластической астроцитомой, опухолями головного мозга, раком молочной железы (например, метастатическим), колоректальным раком (например, метастатическим), диффузной врожденной глиомой ствола головного мозга, саркомой Юинга, мультиформной глиобластомой (МГБ), злокачественной глиомой, меланомой, метастатической злокачественной меланомой, рецидивной злокачественной меланомой, раком носоглотки, метастатическим раком молочной железы и детскими раками.

[0742] Пациентам с экспрессирующими MGMT опухолями будет полезно введение вирусного вектора Ad35 с активным ингредиентом (таким как CAR, TCR или ингибитор контрольных точек) в сочетании с *in vivo* кассетой отбора MGMT^{P140K}. *Ex vivo* подходы продемонстрировали применимость этого подхода. В конкретных вариантах осуществления терапевтические количества TMZ и бензилгуанина или BCNU вводят для снижения опухолевой нагрузки или объема опухоли.

[0743] В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества могут обеспечивать функцию иммунных и других клеток крови, уменьшать или устранять иммунно-опосредованное состояние; и/или уменьшать или устранять симптом иммунно-опосредованного состояния.

[0744] В описанных в данном документе векторах, факторах мобилизации, составах и способах также можно использовать варианты белка и/или последовательностей нуклеиновых кислот. Варианты включают последовательности с по меньшей мере 70% идентичности последовательности, 80% идентичности последовательности, 85% идентичности последовательности, 90% идентичности последовательности, 95% идентичности последовательности, 96% идентичности последовательности, 97% идентичности последовательности, 98% идентичности последовательности или 99% идентичности последовательности с белком и последовательностями нуклеиновых кислот, описанными или раскрытыми в данном документе, при этом вариант демонстрирует по существу аналогичную или улучшенную биологическую функцию.

[0745] Полученные значения для параметров, связанных с *in vivo* генной терапией и/или мобилизацией ГСКП, описанными в данном документе, можно сравнивать с эталонным уровнем, полученным для контрольной популяции, а это сравнение может указать, является ли описанная в данном документе *in vivo* генная терапия эффективной для нуждающегося в этом субъекта, которому вводят генную терапию. параметры, связанные с *in vivo* генной терапией и/или мобилизацией ГСКП, могут включать, например: число общих клеток крови, нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов и/или

тромбоцитов; время, необходимое для достижения нормального числа лимфоцитов процент CD3+CD45RA+ Т-клеток; число TREC на 10^6 клеток; процент клеток, которые являются CD4+; процент клеток, которые являются CD8+; соотношение CD4/CD8; процент TCR $\alpha\beta$ + клеток в CD3+ Т-клетках; разнообразие TCR; частоту генно-скорректированных лимфоцитов; разнообразие клонового репертуара генно-скорректированных лимфоцитов; число уникальных клонов РСИ; ответы первичных и вторичных антител на инъекцию бактериофага; уровень инактивации бактериофага; процентное содержание генно-скорректированных клеток; уровень иммуноглобулинов IgA, IgM и/или IgG; резистентность клеток костного мозга к митомицину С; процент живых клеток в метилцеллюлозе и митомицине С; функциональность γ C-зависимого сигнального пути; и процент фосфорилирования STAT3 со стимуляцией клеток IL-21/митогеном. Референсные уровни можно получать из одного или более релевантных наборов данных по контрольной популяции. В контексте данного документа «набор данных» представляет собой набор числовых значений, полученных в результате оценки образца (или совокупности образцов) в необходимых условиях. Значения из набора данных могут быть получены, например, путем проведения экспериментальных измерений для образца и создания набора данных по результатам этих измерений. Как известно специалисту в данной области техники, эталонный уровень может быть основан например, на любой математической или статистической формуле, применимой и известной в данной области техники для получения значимого совокупного эталонного уровня путем получения отдельных данных; например, среднего, медианы, медианы среднего и т. д. В альтернативном варианте эталонный уровень или набор данных для создания эталонного уровня может быть получен от поставщика услуг, такого как лаборатория, или из базы данных или с сервера, на котором хранится база данных.

[0746] Референсный уровень из набора данных может быть получен из предыдущих измерений, полученных для контрольной популяции. «Контрольная популяция» представляет любую группу субъектов или образцов с подобными определенными характеристиками. Группирование может проводиться в соответствии, например, с клиническими параметрами, клиническими оценками, терапевтическими схемами, статусом заболевания, тяжестью состояния и т. д. В конкретных вариантах осуществления группирование основано на возрастном диапазоне (например, 0-2 года) и статусе наличия не ослабленного иммунитета. В конкретных вариантах осуществления нормальная контрольная популяция включает индивидов, которые находятся в одной возрастной группе с исследуемым субъектом и имеют не ослабленный иммунитет. В конкретных вариантах осуществления одна возрастная группа включает, например, 0-6

месяца; 0-1 год; 0-2 года; 0-3 года; 10-15 лет, в зависимости от того, что является клинически релевантным в данных обстоятельствах.

[0747] В конкретных вариантах осуществления релевантный эталонный уровень для значений конкретного параметра, связанного с *in vivo* генной терапией и/или мобилизацией ГСКП, описанными в данном документе, получают на основании значения конкретного соответствующего параметра, связанного с *in vivo* генной терапией и/или мобилизацией ГСКП в контрольной популяции, для определения того, была ли описанная в данном документе *in vivo* генная терапия эффективной для нуждающегося в этом субъекта, которому вводят генную терапию.

[0748] В конкретных вариантах осуществления контрольная популяция может включать тех, кто здоров и не имеет иммунодефицит. В конкретных вариантах осуществления контрольная популяция может включать тех, кто имеет иммунодефицит и кому не вводили терапевтически эффективное количество (i) состава, содержащего вирусный вектор Ad35, связанный с терапевтическим геном; и (ii) факторы мобилизации. В конкретных вариантах осуществления контрольная популяция может включать тех, кто имеет иммунодефицит и кому вводили терапевтически эффективное количество состава, содержащего вирусный вектор Ad35, связанный с терапевтическим геном, и не содержащего факторы мобилизации. Например, релевантный эталонный уровень может представлять собой значение конкретного параметра, связанного с *in vivo* генной терапией и/или мобилизацией ГСКП у контрольных субъектов.

[0749] В конкретных вариантах осуществления заключение делают на основании того, имеет ли значение для образца статистически значимую разницу с эталонным уровнем или нет. Измерение не характеризуется статистически значимой разницей, если разница находится в пределах уровня, который предположительно может возникнуть просто случайно. И наоборот, статистически значимые разница или повышение являются такими, которые превышают те, которые предположительно могут возникнуть просто случайно. Статистическую значимость или ее отсутствие можно определить любым из различных методов, хорошо известных в данной области техники. Примером обычно используемого показателя статистической значимости является р-значение. р-значение представляет вероятность получения заданного результата, эквивалентного конкретному значению, причем данное значение является результатом только случайного события. Результат считается значимым (не случайное событие) при р-значении меньшем или равном 0,05. В конкретных вариантах осуществления значение для образца является «сравнимым» с эталонным уровнем, полученным для нормальной контрольной популяции, если значение для образца и эталонный уровень не имеют статистически

значимой разницы.

[0750] В конкретных вариантах осуществления значения, полученные для параметров, связанных с *in vivo* генной терапией и/или мобилизацией ГСКП, описанными в данном документе, и/или компоненты другого набора данных можно подвергать аналитическому процессу с выбранными параметрами. Параметры аналитического процесса могут быть тем, которые описаны в данном документе, или теми, которые получены из руководств, описанных в данном документе. Аналитический процесс, используемый для получения результата, может представлять собой любой процесс, способный обеспечить результат, применимый для классификации образца, например, сравнение полученного значения с эталонным уровнем, линейный алгоритм, квадратичный алгоритм, алгоритм с деревом решений или алгоритм с выборкой. Аналитический процесс может устанавливать порог для определения вероятности того, что образец относится к заданному классу. Вероятность предпочтительно составляет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более.

[0751] Описанные в данном документе векторы Ad35 можно использовать вместо векторов Ad5/Ad35++, описанных в следующих типовых вариантах осуществления и примерах.

[0752] Приведенные ниже типовые варианты осуществления и примеры включены, чтобы продемонстрировать конкретные варианты осуществления изобретения. В свете настоящего изобретения специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в конкретных описанных в данном документе вариантах осуществления можно делать множество изменений и получать при этом сходный же или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

V. Типовые варианты осуществления

[0753] Первый набор типовых вариантов осуществления может включать следующее:

1. Система получения рекомбинантного аденовирусного вектора серотипа 35 (Ad35), содержащая: рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и прямые повторы (ПП) рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, и рекомбинантный хелпер-зависимый донорный геном Ad35, содержащий: 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

2. Рекомбинантный аденовирусный хелперный вектор серотипа 35 (Ad35), содержащий: стержень фибера Ad35; головку фибера Ad35; и геном Ad35, содержащий прямые повторы (ПП) рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35.

3. Рекомбинантный аденовирусный хелперный геном серотипа 35 (Ad35), содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и прямые повторы (ПП) рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35.

4. Рекомбинантный хелпер-зависимый аденовирусный донорный вектор серотипа 35 (Ad35), содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую: 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт, при этом геном не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вирусный структурный белок Ad35; и стержень фибера Ad35 и/или головку фибера Ad35.

5. Рекомбинантный хелпер-зависимый аденовирусный донорный геном серотипа 35 (Ad35), содержащий: 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт, при этом донорный геном Ad35 не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экспрессионный продукт, кодируемый геномом Ad35 дикого типа.

6. Способ получения рекомбинантного хелпер-зависимого аденовирусного донорного вектора серотипа 35 (Ad35), включающий выделение рекомбинантного хелпер-зависимого донорного вектора Ad35 из культуры клеток, причем клетки содержат: рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и прямые повторы (ПП) рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, и рекомбинантный хелпер-зависимый донорный геном Ad35, содержащий: 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

7. Система получения рекомбинантного аденовируса серотипа 35 (Ad35),

содержащая: рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и прямые повторы (ПП) рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35, и рекомбинантный донорный геном Ad35, содержащий: 5' ИКП Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

8. Рекомбинантный аденовирусный хелперный вектор серотипа 35 (Ad35), содержащий: стержень фибера Ad35; головку фибера Ad35; и геном Ad35, содержащий прямые повторы (ПП) рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35.

9. Рекомбинантный аденовирусный хелперный геном серотипа 35 (Ad35), содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и прямые повторы (ПП) в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35.

10. Способ получения рекомбинантного хелпер-зависимого аденовирусного донорного вектора серотипа 35 (Ad35), включающий выделение рекомбинантного хелпер-зависимого донорного вектора Ad35 из культуры клеток, причем клетки содержат: рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и прямые повторы (ПП) рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35, и рекомбинантный донорный геном Ad35, содержащий: 5' ИКП Ad35; 3' ИКП Ad35; последовательность упаковки Ad35; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

11. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном, донорный вектор или способ по любому из вариантов осуществления 1-4 или 6-10, отличающиеся тем, что: головка фибера Ad35 включает головку фибера Ad35 дикого типа или головка фибера Ad35 включает сконструированную головку фибера Ad35, причем сконструированная головка фибера содержит мутацию, которая повышает

аффинность головки фибера к CD46.

12. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 11, отличающиеся тем, что мутация включает мутацию, выбранную из Ile192Val, Asp207Gly (или Glu207Gly), Asn217Asp, Thr226Ala, Thr245Ala, Thr254Pro, Ile256Leu, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His; или включает каждую из мутаций Ile192Val, Asp207Gly (или Glu207Gly), Asn217Asp, Thr226Ala, Thr245Ala, Thr254Pro, Ile256Leu, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His.

13. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по любому из вариантов осуществления 1, 4-7 или 10-12, отличающиеся тем, что гетерологичный экспрессионный продукт включает терапевтический экспрессионный продукт, функционально связанный с регуляторной последовательностью, необязательно при этом терапевтический экспрессионный продукт включает: (a) белок β -глобина или белок γ -глобина; (b) антитело или его иммуноглобулиновую цепь, необязательно при этом антитело включает антитело к CD33; (c) первое антитело или его иммуноглобулиновую цепь и второе антитело или его иммуноглобулиновую цепь, необязательно при этом антитело включает антитело к CD33; (d) CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу и/или гидовую РНК (гРНК), необязательно при этом CRISPR-ассоциированная РНК-направляемая эндонуклеаза включает Cas9 или *crf1*; (e) редактор оснований и/или гРНК, необязательно при этом редактор оснований включает редактор цитозиновых оснований (CBE) или редактор адениновых оснований (ABE), необязательно при этом редактор оснований включает каталитически нефункциональную нуклеазу, выбранную из нефункциональной Cas9 и нефункциональной *crf1*; (f) фактор коагуляции или белок, который блокирует или уменьшает вирусную инфекцию, необязательно при этом терапевтический экспрессионный продукт включает белок-заместитель фактора VII или белок-заместитель фактора VIII; (g) ингибитор контрольных точек; (h) химерный антигенный рецептор или сконструированный Т-клеточный рецептор; или (i) белок, выбранный из группы, состоящей из γ C, JAK3, IL7RA, RAG1, RAG2, DCLRE1C, PRKDC, LIG4, NHEJ1, CD3D, CD3E, CD3Z, CD3G, PTPRC, ZAP70, LCK, AK2, ADA, PNP, WHN, CHD7, ORAI1, STIM1, CORO1A, CIITA, RFXANK, RFX5, RFXAP, RMRP, DKC1, TERT, TINF2, DCLRE1B, SLC46A1, FancA, FancB, FancC, FancD1, FancD2, FancE, FancF, FancG, FancI, FancJ, FancL, FancM, FancN, FancO, FancP, FancQ, FancR, FancS, FancT, FancU, FancV, FancW, растворимого CD40, CTLA, Fas L, антитела к PD-L1, антитела к CD4, антитела к CD5, антитела к CD7, антитела к CD52, антитела к IL-1, антитела к IL-2, антитела к IL-4,

антитела к IL-6, антитела к IL-10, антитела к TNF, антитела к TCR, специфически присутствующему на аутореактивных Т-клетках, гена семейства глобинов, WAS, phox, дистрофина, пируваткиназы, CLN3, ABCD1, арилсульфатазы А, SFTPВ, SFTPС, NLX2.1, ABCA3, GATA1, гена рибосомального белка, TERT, TERC, DKC1, TINF2, CFTR, LRRK2, PARK2, PARK7, PINK1, SNCA, PSEN1, PSEN2, APP, SOD1, TDP43, FUS, убиквитина 2 и/или C9ORF72, необязательно при этом белок включает белок FancA.

14. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 13(d) или 13(e), отличающиеся тем, что: гРНК связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты HBG1, HBG2 и/или эритроидный энхансер bcl11a, необязательно при этом гРНК сконструирована для повышения экспрессии γ -глобина; или гРНК связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует часть CD33, необязательно при этом CD33 включает CD33 человека.

15. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 13, отличающиеся тем, что терапевтический экспрессионный продукт включает: белок β -глобина или белок γ -глобина; и систему CRISPR, содержащую CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу; и одно, два или три из: гРНК, которая связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты HBG1; гРНК, которая связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты HBG2; и/или гРНК, которая связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты Bcl11a, необязательно при этом гРНК сконструирована для повышения экспрессии γ -глобина.

16. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 13, отличающиеся тем, что регуляторные последовательности включают промотор, необязательно при этом промотор включает промотор β -глобина, необязательно при этом промотор β -глобина имеет длину около 1,6 т. о. и/или содержит нуклеиновую кислоту в соответствии с позициями 5228631-5227023 хромосомы 11.

17. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 13, отличающиеся тем, что регуляторные последовательности включают область контроля локуса (LCR, от англ. «Locus Control Region»), необязательно при этом LCR включает LCR β -глобина

18. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 13, отличающиеся тем, что LCR β -глобина: содержит сайты гиперчувствительности (HS, от англ. «hypersensitive sites») к

ДНКазе I LCR β -глобина, включающие или состоящие из HS1, HS2, HS3 и HS4, необязательно при этом LCR β -глобина имеет длину около 4,3 т. о.;

содержит HS к ДНКазе I LCR β -глобина, включающие HS1, HS2, HS3, HS4 и HS5, необязательно при этом LCR β -глобина имеет длину около 21,5 т. о.; или

при этом LCR β -глобина содержит последовательность в соответствии с позициями 5292319-5270789 хромосомы 11.

19. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 13 или 14, отличающиеся тем, что регуляторные последовательности включают 3'HS1, необязательно при этом 3'HS1 содержит последовательность в соответствии с позициями 5206867-5203839 хромосомы 11.

20. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по любому из вариантов осуществления 13-19, отличающиеся тем, что регуляторные последовательности включают сайт связывания миРНК, необязательно при этом: сайт связывания миРНК включает сайт связывания для миРНК, экспрессируемой естественным образом представляющим интерес видом; миРНК демонстрирует разные профили занятости в крови и опухолевом микроокружении или целевой ткани, необязательно при этом профиль занятости в крови выше, чем в опухолевом микроокружении или целевой ткани; сайт связывания миРНК включает сайты связывания miR423-5, miR423-5p, miR42-2, miR181c, miR125a или miR15a; и/или сайты связывания миРНК включают сайты связывания miR187 или miR218.

21. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по любому из вариантов осуществления 1, 4-7 или 10-21, отличающиеся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный экспрессионный продукт, является частью нагрузки, дополнительно включающей элемент интеграции, необязательно при этом элемент интеграции включает экспрессионный продукт.

22. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 21, отличающиеся тем, что элемент интеграции сконструирован для интеграции в целевой геном посредством гомологичной рекомбинации, причем элемент интеграции фланкируется плечами гомологии, которые соответствуют непрерывно связанным последовательностям целевого генома, необязательно при этом: плечи гомологии составляют от 0,8 до 1,8 т. о.; и/или плечи гомологии гомологичным последовательностям нуклеиновых кислот целевого генома, которые фланкируют хромосомный безопасный локус, необязательно при этом

безопасный локус выбран из AAVS1, CCR5, HPRT или Rosa.

23. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 21, отличающиеся тем, что элемент интеграции сконструирован для интеграции в целевой геном посредством транспозиции, причем элемент интеграции фланкируется инвертированными повторами (ИП) транспозона, необязательно при этом ИП фланкируются ИП рекомбиназы.

24. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 23, отличающиеся тем, что: ИП транспозона представляют собой ИП Sleeping Beauty (SB), необязательно при этом ИП SB представляют собой ИП рТ4; ИП транспозона представляют собой ИП piggyback, Mariner, frog prince, Tol2, TcBuster или spinON.

25. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по любому из вариантов осуществления 21-24, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую транспозазу, которая опосредует транспозицию элемента интеграции, фланкируемого ИП транспозона, необязательно при этом нуклеиновая кислота, кодирующая транспозазу, содержится в поддерживающем векторе или поддерживающем векторном геноме.

26. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 25, отличающиеся тем, что транспозаза включает транспозазу Sleeping beauty, piggyback, Mariner, frog prince, Tol2, TcBuster или spinON, необязательно при этом транспозаза включает транспозазу Sleeping Beauty 100x (SB100x).

27. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по варианту осуществления 25 или 26, отличающиеся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая транспозазу, функционально связана с промотором PGK.

28. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по любому из вариантов осуществления 1-3 или 6-27, отличающиеся тем, что ИП рекомбиназы, которые фланкируют по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35 и/или находятся в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35 и функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' ИКП Ad35, представляют собой сайты FRT, loxP, rox, vox, AttB или AttP.

29. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по варианту осуществления 28, отличающиеся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбиназу для вырезания по меньшей мере части

последовательности упаковки Ad35, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты клетки, содержащей хелперный ген.

30. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный ген или способ по любому из вариантов осуществления 23-29, отличающиеся тем, что ПП рекомбиназы, которые фланкируют ИП транспозона, представляют собой сайты FRT, loxP, гоx, vox, AttB или AttP.

31. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный ген или способ по любому из вариантов осуществления 21-28, отличающиеся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбиназу для вырезания нуклеиновой кислоты, содержащей элемент интеграции, содержится в поддерживающем векторе или поддерживающем векторном геноме.

32. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный ген или способ по варианту осуществления 29 или 31, отличающиеся тем, что рекомбиназа включает рекомбиназу Flp, Cre, Dre, Vika или PhiC31.

33. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный ген или способ по варианту осуществления 32, отличающиеся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбиназу, функционально связана с промотором EF1 α .

34. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный ген или способ по любому из вариантов осуществления 21-33, отличающиеся тем, что нагрузка включает элемент интеграции, содержащий гетерологичный экспрессионный продукт, при этом гетерологичный экспрессионный продукт включает белок β -глобина, функционально связанный с промотором β -глобина и длинной LCR β -глобина,

при этом элемент интеграции фланкируется ИП SB, а ИП SB фланкируются ПП рекомбиназы, необязательно при этом ПП рекомбиназы представляют собой сайты FRT.

35. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный ген или способ по любому из вариантов осуществления 21-34, отличающиеся тем, что нагрузка содержит элемент интеграции, а кондиционально экспрессируемая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует экспрессионный продукт, не содержится в элементе интеграции и расположена так, чтобы интеграция элемента интеграции в целевой геном делала ее нефункциональной.

36. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный ген или способ по варианту осуществления 35, отличающиеся тем, что экспрессионный продукт, кодируемый кондиционально экспрессируемой

последовательностью нуклеиновой кислоты, включает компонент системы CRISPR или компонент системы редактора оснований, необязательно при этом компонент включает CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу, фермент редактора оснований или гРНК.

37. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по любому из вариантов осуществления 21-36, отличающиеся тем, что нагрузка содержит кассету отбора, необязательно при этом кассета отбора содержится в элементе интеграции.

38. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по варианту осуществления 37, отличающиеся тем, что кассета отбора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую $mgmt^{P140K}$, или кассета отбора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую анти-CD33 мшРНК.

39. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по любому из вариантов осуществления 1-3 или 6-38, отличающиеся тем, что по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, фланкируемой ПП рекомбиназы, соответствует нуклеотидам 138-481 последовательности Ad35 в соответствии с номером доступа GenBank № AX049983.

40. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по любому из вариантов осуществления 1-3 или 6-38, отличающиеся тем, что по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, фланкируемой ПП рекомбиназы, соответствует: нуклеотидам 179-344; нуклеотидам 366-481; нуклеотидам 155-481; нуклеотидам 159-480; нуклеотидам 159-446; нуклеотидам 180-480; нуклеотидам 207-480; нуклеотидам 140-446; нуклеотидам 159-446; нуклеотидам 180-446; нуклеотидам 202-446; нуклеотидам 159-481; нуклеотидам 180-384; нуклеотидам 180-481; или нуклеотидам 207-481.

последовательности Ad35 в соответствии с номером доступа GenBank № AX049983.

41. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по любому из вариантов осуществления 1-3 или 6-40, отличающиеся тем, что ПП рекомбиназы представляют собой сайты LoxP.

42. Хелперный вектор или хелперный геном по любому из вариантов осуществления 2, 3, 8 или 9, отличающиеся тем, что хелперный геном Ad35 содержит E4orf6 Ad5 для амплификации в клетках 293T.

43. Хелперный вектор или хелперный геном по любому из вариантов

осуществления 2, 3, 8 или 9, отличающиеся тем, что хелперный геном содержит или генерирует последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 51-65.

44. Клетка, содержащая хелперный вектор, хелперный геном, донорный вектор или донорный геном по любому из вариантов осуществления 2-5, 8 или 9, необязательно при этом клетка представляет собой клетку НЕК293.

45. Клетка, содержащая донорный геном по любому из вариантов осуществления 1, 4, 6, 7, 10, 13-27 или 44, необязательно при этом клетка представляет собой эритроцит, необязательно при этом клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку, Т-клетку, В-клетку или миелоидную клетку, необязательно при этом клетка секретирует экспрессионный продукт.

46. Способ по любому из вариантов осуществления 6 или 10-41, отличающийся тем, что клетки представляют собой клетки НЕК293.

47. Способ модификации клетки, включающий приведение клетки в контакт с донорным вектором Ad35 по любому из вариантов осуществления 5 или 11-27.

48. Способ модификации клетки субъекта, включающий введение субъекту донорного вектора Ad35 по любому из вариантов осуществления 5 или 11-27, необязательно при этом способ не включает выделение клетки из организма субъекта.

49. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту донорного вектора Ad35 по любому из вариантов осуществления 5 или 11-27, необязательно при этом введение является внутривенным.

50. Способ по варианту осуществления 49, отличающийся тем, что способ включает введение субъекту мобилизационного агента, необязательно при этом мобилизационный агент включает одно или более из гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, GM-CSF, S-CSF, антагониста CXCR4 и агониста CXCR2, необязательно при этом антагонист CXCR4 включает AMD3100 и/или агонист CXCR2 включает GRO-β.

51. Способ по варианту осуществления 49 или 50, отличающийся тем, что донорный вектор Ad35 содержит кассету отбора, необязательно при этом способ дополнительно включает введение субъекту агента для отбора, необязательно при этом кассета отбора кодирует $mgmt^{P140K}$, а агент для отбора включает O⁶BG/BCNU.

52. Способ по любому из вариантов осуществления 49-51, отличающийся тем, что способ дополнительно включает введение субъекту агента для иммунной супрессии, необязательно при этом схема иммунной супрессии включает стероид, антагонист рецептора IL-6 и/или антагонист рецептора IL-1R, необязательно при этом стероид включает глюкокортикоид или дексаметазон.

53. Способ по любому из вариантов осуществления 49-52, отличающийся тем, что донорный вектор Ad35 содержит элемент интеграции, а способ приводит к интеграции и/или экспрессии копии элемента интеграции в по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% клеток, экспрессирующих CD46, в по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% гемопоэтических стволовых клеток и/или в по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% эритроидных Ter119⁺ клеток.

54. Способ по любому из вариантов осуществления 49-53, отличающийся тем, что способ приводит к интеграции в среднем по меньшей мере 2 копий или по меньшей мере 2,5 копий элемента интеграции в геномах клеток-мишеней, содержащих по меньшей мере 1 копию элемента интеграции.

55. Способ по любому из вариантов осуществления 49-54, отличающийся тем, что способ приводит к экспрессии экспрессионного продукта, кодируемого нагрузкой или элементом интеграции, на уровне, который составляет по меньшей мере около 20% от уровня эталона или по меньшей мере около 25% от уровня эталона, необязательно при этом эталон представляет собой экспрессию эндогенного эталонного белка у субъекта или в эталонной популяции.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 49-55, отличающийся тем, что заболевание или состояние включает гемоглобинопатию, тромбоцитарное расстройство, анемию, иммунодефицит, дефицит фактора коагуляции, анемию Фанкони, дефицит альфа-1 антитрипсина, серповидноклеточную анемию, талассемию, промежуточную талассемию, гемофилию А, гемофилию В, болезнь фон Виллебранда, дефицит фактора V, дефицит фактора VII, дефицит фактора X, дефицит фактора XI, дефицит фактора XII, дефицит фактора XIII, синдром Бернара - Сулье, синдром серых тромбоцитов или мукополисахаридоз.

57. Способ по любому из вариантов осуществления 49-56, отличающийся тем, что субъект представляет собой субъекта, имеющего рак, а способ обеспечивает лечение, предотвращение или задержку повторного появления рака,

необязательно при этом субъект является носителем одной или более мутаций зародышевой линии, связанных с развитием рака, необязательно при этом рак включает анапластическую астроцитому, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, диффузную глиому ствола головного мозга, саркому Юинга, мультиформную глиобластому, злокачественную глиому, меланому, метастатическую злокачественную меланому, рак носоглотки или детский рак, необязательно при этом субъект получал или принимает O⁶BG, TMZ (темозоломид) и/или BCNU (кармустин).

58. Способ по любому из вариантов осуществления 49-57, отличающийся тем, что заболевание или состояние включает промежуточную талассемию, необязательно при этом вектор или геном содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более экспрессионных продуктов, выбранных из: экспрессионных продуктов, которые повышают или повторно активируют экспрессию эндогенного γ -глобина, необязательно при этом экспрессионные продукты, которые повышают или повторно активируют экспрессию эндогенного γ -глобина, включают CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу и редактор оснований и одно или более из: гРНК, которая связывает последовательность нуклеиновой кислоты HBG1 и сконструирована для повышения экспрессии из кодирующей последовательности, функционально связанной с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты; гРНК, которая связывает последовательность нуклеиновой кислоты HBG2 и сконструирована для повышения экспрессии из кодирующей последовательности, функционально связанной с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты; и гРНК, которая связывает последовательность нуклеиновой кислоты эритроидного энхансера bcl11a и сконструирована для снижения экспрессии BCL11A; γ -глобина; и β -глобина, необязательно при этом способ обеспечивает уменьшение симптома промежуточной талассемии, и/или лечение промежуточной талассемии, и/или повышение HbF.

[0754] Второй набор типовых вариантов осуществления может включать следующее:

1. Рекомбинантный аденовирусный вектор серотипа 35 (Ad35), нацеленный на CD46 для *in vivo* редактирования генов в гемопоэтических стволовых клетках.
2. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что белок головки фибера вектора содержит мутации, которые повышают связывание CD46.
3. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что мутации белка головки фибера выбраны из одной или более из Asn217Asp, Thr254Pro, Ile256Leu, Asp207Gly (или Glu207Gly), Thr245Ala, Thr226Ala, Ile192Val, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His.
4. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что мутации белка головки фибера включают Asn217Asp, Thr254Pro, Ile256Leu, Asp207Gly (или Glu207Gly), Thr245Ala, Thr226Ala, Ile192Val, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His.
5. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что мутации белка головки фибера состоят из Asn217Asp, Thr254Pro, Ile256Leu,

Asp207Gly (или Glu207Gly), Thr245Ala, Thr226Ala, Ile192Val, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His.

6. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий систему контроля миРНК, которая регулирует экспрессию кодируемых генов *in vivo*.

7. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что система контроля миРНК состоит из сайтов-мишеней миРНК с разными профилями занятости в крови и опухолевом микроокружении или целевой ткани.

8. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 7, отличающийся тем, что профиль занятости выше в крови, чем в опухолевом микроокружении или целевой ткани.

9. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что сайты-мишени миРНК включают miR423-5, miR423-5p, miR42-2, miR181c, miR125a и/или miR15a.

10. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что сайты-мишени миРНК контролируют экспрессию Cas9.

11. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что сайты-мишени миРНК включают miR187 и/или miR218.

12. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий нуклеотиды, кодирующие компоненты CRISPR для опосредования создания разрывов ДНК и/или активации эндогенной геновой экспрессии.

13. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что компоненты CRISPR включают нуклеазу и гидовую РНК.

14. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 13, отличающийся тем, что нуклеаза включает Cas9 или *cpf1*.

15. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что компоненты CRISPR включают каталитически нефункциональную нуклеазу.

16. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 15, отличающийся тем, что каталитически нефункциональная нуклеаза включает нефункциональную Cas9 или нефункциональную *cpf1*.

17. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 15, отличающийся тем, что каталитически нефункциональная нуклеаза слита с гидовой РНК и цитидин- или адениндезаминазой или трансаминазой.

18. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 13, отличающийся тем, что гидовые РНК связывают промотор HBG1, промотор HBG2 и/или энхансер *bcl11a*.

19. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий

положительный селективный маркер.

20. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 19, отличающийся тем, что положительный селективный маркер включает анти-CD33 кассету мшРНК и/или кассету MGMT^{P140K}.

21. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий плечи гомологии.

22. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 21, отличающийся тем, что плечи гомологии составляют от 0,8 до 1,8 т. о.

23. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 21, отличающийся тем, что плечи гомологии являются специфическими в отношении хромосомного безопасного локуса.

24. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 23, отличающийся тем, что хромосомный безопасный локус выбран из AAVS1, CCR5, HPRT или Rosa.

25. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий последовательности, распознаваемые транспозазой.

26. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую транспозазу.

27. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что транспозаза включает Sleeping beauty, piggyback, Mariner, frog prince, Tol2, TcBuster и spinON.

28. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что транспозаза включает гиперактивную транспозазу Sleeping beauty или гиперактивную транспозазу piggyBac.

29. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 28, отличающийся тем, что гиперактивная транспозаза Sleeping beauty включает SB100X.

30. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая транспозазу, находится под транскрипционным контролем промотора PGK.

31. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий последовательности распознавания рекомбиназы.

32. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 31, отличающийся тем, что последовательности распознавания рекомбиназы включают Frt, lox, rox, vox, AttB или AttP.

33. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбиназу.

34. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 33, отличающийся тем, что рекомбиназа включает Flp, Cre, Dre, Vika или PhiC31.

35. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 33, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбиназу, находится под транскрипционным контролем промотора EF1 α .

36. Рекомбинантный вектор Ad35 по любому из вариантов осуществления 1-35, содержащий терапевтическую кассету.

37. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что терапевтическая кассета содержит терапевтический ген или кодирует терапевтический генный продукт, выбранный из γ C, JAK3, IL7RA, RAG1, RAG2, DCLRE1C, PRKDC, LIG4, NHEJ1, CD3D, CD3E, CD3Z, CD3G, PTPRC, ZAP70, LCK, AK2, ADA, PNP, WHN, CHD7, ORAI1, STIM1, CORO1A, CIITA, RFXANK, RFX5, RFXAP, RMRP, DKC1, TERT, TINF2, DCLRE1B, SLC46A1, FancA, FancB, FancC, FancD1 (BRCA2), FancD2, FancE, FancF, FancG, FancI, FancJ (BRIP1), FancL, FancM, FancN (PALB2), FancO (RAD51C), FancP (SLX4), FancQ (ERCC4), FancR (RAD51), FancS (BRCA1), FancT (UBE2T), FancU (XRCC2), FancV (MAD2L2), FancW (RFWD3), растворимого CD40, CTLA, Fas L, антитела к PD-L1, антитела к CD4, антитела к CD5, антитела к CD7, антитела к CD52, антитела к IL-1, антитела к IL-2, антитела к IL-4, антитела к IL-6, антитела к IL-10, антитела к TNF, антитела к TCR, специфически присутствующему на аутореактивных Т-клетках, гена семейства глобинов, WAS, phox, дистрофина, пируваткиназы, CLN3, ABCD1, арилсульфатазы А, SFTPВ, SFTPС, NLX2.1, ABCA3, GATA1, гена рибосомального белка, TERT, TERC, DKC1, TINF2, CFTR, LRRK2, PARK2, PARK7, PINK1, SNCA, PSEN1, PSEN2, APP, SOD1, TDP43, FUS, убиквитина 2 и/или C9ORF72.

38. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что терапевтическая кассета содержит терапевтический ген, который содержит или кодирует общую гамма (γ) цепь, FancA, γ -глобин и/или FVIII.

39. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что терапевтическая кассета содержит терапевтический ген, который кодирует химерный антигенный рецептор, сконструированный Т-клеточный рецептор и/или терапевтическое антитело.

40. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 38, отличающийся тем, что терапевтический ген находится под транскрипционным контролем промотора β -глобина.

41. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 38, отличающийся

тем, что терапевтический ген находится под транскрипционным контролем области контроля локуса (LCR) β -глобина, содержащей сайты гиперчувствительности (HS) к ДНКазе I, состоящие из HS1, HS2, HS3 и HS4.

42. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что LCR β -глобина составляет приблизительно 4,3 т. о.

43. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что терапевтический ген дополнительно находится под транскрипционным контролем промотора β -глобина.

44. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 43, отличающийся тем, что промотор β -глобина составляет приблизительно 1,6 т. о.

45. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 44, отличающийся тем, что промотор β -глобина имеет последовательность позиций 5228631-5227023 хромосомы 11.

46. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 38, отличающийся тем, что терапевтический ген находится под транскрипционным контролем длинной LCR β -глобина, содержащей HS1, HS2, HS3, HS4 и HS5.

47. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 46, отличающийся тем, что длинная LCR β -глобина составляет приблизительно 21,5 т. о.

48. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 47, отличающийся тем, что длинная LCR β -глобина имеет последовательность позиций 5292319-5270789 хромосомы 11.

49. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 46, отличающийся тем, что терапевтический ген дополнительно находится под транскрипционным контролем промотора β -глобина.

50. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 49, отличающийся тем, что промотор β -глобина составляет приблизительно 1,6 т. о.

51. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 50, отличающийся тем, что промотор β -глобина имеет последовательность позиций 5228631-5227023 хромосомы 11.

52. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 46, дополнительно содержащий 3'HS1.

53. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 52, отличающийся тем, что 3'HS1 имеет последовательность позиций 5206867-5203839 хромосомы 11.

54. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий по меньшей мере 30 т. о. транспозон.

55. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий 32,4 т. о. транспозон.

56. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, созданный с использованием хелперного вируса.

57. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 56, отличающийся тем, что хелперный вирус содержит E4orf6 Ad5 для амплификации в клетках 293T.

58. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 56, отличающийся тем, что хелперный вирус содержит сигнальные последовательности и последовательности упаковки Ad35.

59. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 56, отличающийся тем, что хелперный вирус содержит анти-CRISPR (acr) экспрессионную кассету для предотвращения экспрессии компонентов CRISPR во время производства вируса.

60. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 56, отличающийся тем, что хелперный вирус содержит или генерирует последовательность SEQ ID NO: 51-64.

61. Эритроцит, генетически модифицированный для экспрессии терапевтического белка.

62. Эритроцит по варианту осуществления 61, отличающийся тем, что терапевтический белок включает фактор коагуляции или белок, который блокирует или уменьшает вирусную инфекцию.

63. Эритроцит по варианту осуществления 61, отличающийся тем, что эритроцит секретирует терапевтический белок.

64. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для повышения повторной активации HbF посредством одновременного нацеливания на области эритроидного энхансера bcl11a и промотора HBG.

65. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для комбинирования добавления гена γ -глобина и повторной активации эндогенного гена γ -глобина.

66. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для *in vivo* конструирования генома с использованием CRISPR.

67. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для обеспечения терапевтического гена.

68. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из

вариантов осуществления 1-63 для лечения (i) гемоглобинопатии, (ii) анемии Фанкони, (iii) дефицита фактора коагуляции, необязательно выбранного из гемофилии А, гемофилии В или болезни фон Виллебранда, (iv) тромбоцитарного расстройства, (v) анемии, (vi) дефицита альфа-1 антитрипсина или (v) иммунодефицита.

69. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для лечения талассемии.

70. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для лечения рака, предотвращения или задержки повторного появления рака или предотвращения или задержки появления рака у носителей связанных с высоким риском мутаций зародышевой линии, необязательно при этом рак представляет собой рак молочной железы или рак яичника.

71. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для самоинактивации CRISPR/Cas9.

72. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-3 для нацеленной интеграции с использованием HDAd в качестве донорных векторов с самовысвобождающейся кассетой.

73. Применение по любому из вариантов осуществления 64-72, включающее мобилизацию.

74. Применение по варианту осуществления 49, отличающееся тем, что мобилизация включает введение Gro-бета, GM-CSF, S-CSF и/или AMD3100.

75. Применение по любому из вариантов осуществления 64-72, включающее введение стероида, антагониста рецептора IL-6 и/или антагониста рецептора IL-1R субъекту, получающему вектор Ad35 и/или эритроцит.

76. Применение по варианту осуществления 75, отличающееся тем, что стероид включает глюкокортикоид.

77. Применение по варианту осуществления 75, отличающееся тем, что стероид включает дексаметазон.

78. Применение по любому из вариантов осуществления 64-72, включающее введение ОбВГ и TMZ (темозоломид) или BCNU (кармустин) субъекту, получающему вектор Ad35 и/или эритроцит.

79. Применение по варианту осуществления 78, отличающееся тем, что субъект получает ОбВГ и TMZ или BCNU в качестве лечения анапластической астроцитомы, рака молочной железы, колоректального рака, диффузной глиомы ствола головного мозга, саркомы Юинга, мультиформной глиобластомы (МГБ), злокачественной глиомы, меланомы, метастатической злокачественной меланомы, рака носоглотки или детского

рака.

[0755] Третий набор типовых вариантов осуществления может включать следующее:

1. Рекомбинантный аденовирусный вектор серотипа 35 (Ad35), нацеленный на CD46 для *in vivo* редактирования генов в гемопоэтических стволовых клетках.

2. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что белок головки фибера вектора содержит мутации, которые повышают связывание CD46.

3. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что мутации белка головки фибера выбраны из одной или более из Asn217Asp, Thr254Pro, Ile256Leu, Asp207Gly (или Glu207Gly), Thr245Ala, Thr226Ala, Ile192Val, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His.

4. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что мутации белка головки фибера включают Asn217Asp, Thr254Pro, Ile256Leu, Asp207Gly (или Glu207Gly), Thr245Ala, Thr226Ala, Ile192Val, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His.

5. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что мутации белка головки фибера состоят из Asn217Asp, Thr254Pro, Ile256Leu, Asp207Gly (или Glu207Gly), Thr245Ala, Thr226Ala, Ile192Val, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His.

6. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий систему контроля миРНК, которая регулирует экспрессию кодируемых генов *in vivo*.

7. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что система контроля миРНК состоит из сайтов-мишеней миРНК с разными профилями занятости в крови и опухолевом микроокружении или целевой ткани.

8. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 7, отличающийся тем, что профиль занятости выше в крови, чем в опухолевом микроокружении или целевой ткани.

9. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что сайты-мишени миРНК включают miR423-5, miR423-5p, miR42-2, miR181c, miR125a и/или miR15a.

10. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что сайты-мишени миРНК контролируют экспрессию Cas9.

11. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что сайты-мишени миРНК включают miR187 и/или miR218.

12. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий нуклеотиды, кодирующие компоненты CRISPR для опосредования создания разрывов ДНК и/или активации эндогенной геновой экспрессии.

13. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что компоненты CRISPR включают нуклеазу и гидовую РНК.

14. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 13, отличающийся тем, что нуклеаза включает Cas9 или *cpf1*.

15. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что компоненты CRISPR включают каталитически нефункциональную нуклеазу.

16. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 15, отличающийся тем, что каталитически нефункциональная нуклеаза включает нефункциональную Cas9 или нефункциональную *cpf1*.

17. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 15, отличающийся тем, что каталитически нефункциональная нуклеаза слита с гидовой РНК и цитидин- или адениндезаминазой или трансаминазой.

18. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 13, отличающийся тем, что гидовые РНК связывают HBG1, HBG2 и/или *Vc11a*.

19. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий положительный селективный маркер.

20. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 19, отличающийся тем, что положительный селективный маркер включает анти-CD33 кассету мшРНК и/или кассету MGMT^{P140k}.

21. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий плечи гомологии.

22. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 21, отличающийся тем, что плечи гомологии составляют от 0,8 до 1,8 т. о.

23. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 21, отличающийся тем, что плечи гомологии являются специфическими в отношении хромосомного безопасного локуса.

24. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 23, отличающийся тем, что хромосомный безопасный локус выбран из AAVS1, CCR5, HPRT или Rosa.

25. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий последовательности, распознаваемые транспозазой.

26. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую транспозазу.

27. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что транспозаза включает Sleeping beauty, piggyback, Mariner, frog prince, Tol2, TcBuster и spinON.

28. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что транспозаза включает гиперактивную транспозазу Sleeping beauty или гиперактивную транспозазу piggybac.

29. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 28, отличающийся тем, что гиперактивная транспозаза Sleeping beauty включает SB100X.

30. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая транспозазу, находится под транскрипционным контролем промотора PGK.

31. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий последовательности распознавания рекомбиназы.

32. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 31, отличающийся тем, что последовательности распознавания рекомбиназы включают Frt, lox, гоx, vox, AttB или AttP.

33. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбиназу.

34. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 33, отличающийся тем, что рекомбиназа включает Flp, Cre, Dre, Vika или PhiC31.

35. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 33, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбиназу, находится под транскрипционным контролем промотора EF1 α .

36. Рекомбинантный вектор Ad35 по любому из вариантов осуществления 1-35, содержащий терапевтическую кассету.

37. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что терапевтическая кассета содержит терапевтический ген или кодирует терапевтический генный продукт, выбранный из γ C, JAK3, IL7RA, RAG1, RAG2, DCLRE1C, PRKDC, LIG4, NHEJ1, CD3D, CD3E, CD3Z, CD3G, PTPRC, ZAP70, LCK, AK2, ADA, PNP, WHN, CHD7, ORAI1, STIM1, CORO1A, CIITA, RFXANK, RFX5, RFXAP, RMRP, DKC1, TERT, TINF2, DCLRE1B, SLC46A1, FancA, FancB, FancC, FancD1 (BRCA2), FancD2, FancE, FancF, FancG, FancI, FancJ (BRIP1), FancL, FancM, FancN (PALB2), FancO (RAD51C), FancP (SLX4), FancQ (ERCC4), FancR (RAD51), FancS (BRCA1), FancT (UBE2T), FancU (XRCC2), FancV (MAD2L2), FancW (RFWD3), растворимого CD40, CTLA, Fas L, антитела к PD-L1, антитела к CD4, антитела к CD5,

антитела к CD7, антитела к CD52, антитела к IL-1, антитела к IL-2, антитела к IL-4, антитела к IL-6, антитела к IL-10, антитела к TNF, антитела к TCR, специфически присутствующему на аутореактивных Т-клетках, гена семейства глобинов, WAS, phox, дистрофина, пируваткиназы, CLN3, ABCD1, арилсульфатазы А, SFTPВ, SFTPС, NLX2.1, ABCA3, GATA1, гена рибосомального белка, TERT, TERC, DKC1, TINF2, CFTR, LRRK2, PARK2, PARK7, PINK1, SNCA, PSEN1, PSEN2, APP, SOD1, TDP43, FUS, убиквитина 2 и/или C9ORF72.

38. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что терапевтическая кассета содержит терапевтический ген, который содержит или кодирует общую гамма (γ) цепь, FancA, γ -глобин и/или FVIII.

39. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что терапевтическая кассета содержит терапевтический ген, который кодирует химерный антигенный рецептор, сконструированный Т-клеточный рецептор и/или терапевтическое антитело.

40. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 38, отличающийся тем, что терапевтический ген находится под транскрипционным контролем промотора β -глобина.

41. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 38, отличающийся тем, что терапевтический ген находится под транскрипционным контролем области контроля локуса (LCR) β -глобина, содержащей сайты гиперчувствительности (HS) к ДНКазе I, состоящие из HS1, HS2, HS3 и HS4.

42. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что LCR β -глобина составляет приблизительно 4,3 т. о.

43. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что терапевтический ген дополнительно находится под транскрипционным контролем промотора β -глобина.

44. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 43, отличающийся тем, что промотор β -глобина составляет приблизительно 1,6 т. о.

45. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 44, отличающийся тем, что промотор β -глобина имеет последовательность позиций 5228631-5227023 хромосомы 11.

46. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 38, отличающийся тем, что терапевтический ген находится под транскрипционным контролем длинной LCR β -глобина, содержащей HS1, HS2, HS3, HS4 и HS5.

47. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 46, отличающийся

тем, что длинная LCR β -глобина составляет приблизительно 21,5 т. о.

48. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 47, отличающийся тем, что длинная LCR β -глобина имеет последовательность позиций 5292319-5270789 хромосомы 11.

49. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 46, отличающийся тем, что терапевтический ген дополнительно находится под транскрипционным контролем промотора β -глобина.

50. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 49, отличающийся тем, что промотор β -глобина составляет приблизительно 1,6 т. о.

51. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 50, отличающийся тем, что промотор β -глобина имеет последовательность позиций 5228631-5227023 хромосомы 11.

52. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 46, дополнительно содержащий 3'HS1.

53. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 52, отличающийся тем, что 3'HS1 имеет последовательность позиций 5206867-5203839 хромосомы 11.

54. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий по меньшей мере 30 т. о. транспозон.

55. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, содержащий 32,4 т. о. транспозон.

56. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 1, созданный с использованием хелперного вируса.

57. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 56, отличающийся тем, что хелперный вирус содержит E4orf6 Ad5 для амплификации в клетках 293T.

58. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 56, отличающийся тем, что хелперный вирус содержит сигнальные последовательности и сигналы упаковки Ad35.

59. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 56, отличающийся тем, что хелперный вирус содержит анти-CRISPR (acr) экспрессионную кассету для предотвращения экспрессии компонентов CRISPR во время производства вируса.

60. Рекомбинантный вектор Ad35 по варианту осуществления 56, отличающийся тем, что хелперный вирус содержит или генерирует последовательность любой из SEQ ID NO: 51-65.

61. Эритроцит, генетически модифицированный для экспрессии терапевтического белка.

62. Эритроцит по варианту осуществления 61, отличающийся тем, что терапевтический белок включает фактор коагуляции или белок, который блокирует или уменьшает вирусную инфекцию.

63. Эритроцит по варианту осуществления 61, отличающийся тем, что эритроцит секретирует терапевтический белок.

64. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для повышения повторной активации HbF посредством одновременного нацеливания на области эритроидного энхансера bcl11a и промотора HBG.

65. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для комбинирования добавления гена γ -глобина и повторной активации эндогенного гена γ -глобина.

66. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для *in vivo* конструирования генома с использованием CRISPR.

67. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для обеспечения терапевтического гена.

68. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для лечения (i) гемоглобинопатии, (ii) анемии Фанкони, (iii) дефицита фактора коагуляции, необязательно выбранного из гемофилии А, гемофилии В или болезни фон Виллебранда, (iv) тромбоцитарного расстройства, (v) анемии, (vi) дефицита альфа-1 антитрипсина или (v) иммунодефицита.

69. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для лечения талассемии.

70. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для лечения рака, предотвращения или задержки повторного появления рака или предотвращения или задержки появления рака у носителей связанных с высоким риском мутаций зародышевой линии, необязательно при этом рак представляет собой рак молочной железы или рак яичника.

71. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-63 для самоинактивации CRISPR/Cas9.

72. Применение рекомбинантного вектора Ad35 или эритроцита по любому из вариантов осуществления 1-3 для нацеленной интеграции с использованием HDAd в качестве донорных векторов с самовысвобождающейся кассетой.

73. Применение по любому из вариантов осуществления 64-72, включающее

мобилизацию.

74. Применение по варианту осуществления 49, отличающееся тем, что мобилизация включает введение Gro-бета, GM-CSF, S-CSF и/или AMD3100.

75. Применение по любому из вариантов осуществления 64-72, включающее введение стероида, антагониста рецептора IL-6 и/или антагониста рецептора IL-1R субъекту, получающему вектор Ad35 и/или эритроцит.

76. Применение по варианту осуществления 75, отличающееся тем, что стероид включает глюкокортикоид.

77. Применение по варианту осуществления 75, отличающееся тем, что стероид включает дексаметазон.

78. Применение по любому из вариантов осуществления 64-72, включающее введение O⁶BG и TMZ (темозоломид) или BCNU (кармустин) субъекту, получающему вектор Ad35 и/или эритроцит.

79. Применение по варианту осуществления 78, отличающееся тем, что субъект получает O⁶BG и TMZ или BCNU в качестве лечения анапластической астроцитомы, рака молочной железы, колоректального рака, диффузной глиомы ствола головного мозга, саркомы Юинга, мультиформной глиобластомы (МГБ), злокачественной глиомы, меланомы, метастатической злокачественной меланомы, рака носоглотки или детского рака.

VI. Экспериментальные примеры

[0756] Пример 1. In vivo генная терапия гемопоэтическими стволовыми клетками облегчает мышиную промежуточную талассемию.

[0757] Этот пример иллюстрирует подход in vivo генной терапии ГСКП с применением интегрирующегося вектора HDAd5/35++, экспрессирующего ген человеческого γ -глобина в организме «здоровых» трансгенных в отношении человеческого CD46 (CD46tg) мышей; в качестве подтверждения концепции этот подход проиллюстрирован в мышинной модели промежуточной талассемии (мышь CD46+/+/Hbbth-3). Это обеспечивает альтернативу традиционной ex vivo генной терапии талассемии на основе лентивирусного вектора. По меньшей мере некоторая информация из этого примера была опубликована в Wang et al., (J Clin Invest. 129(2):598-615, 2019; e-pub November 13, 2018).

[0758] Талассемия является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний по всему миру (Weatherall, Ann N Y Acad Sci. 1202:17-23, 2010), возникающего в результате отсутствия (β^0/β^0) или дефицита (β^+/β^+) синтеза цепей β -глобина. Ежегодно рождается 60000 детей с большой β -талассемией. Без лечения дети с

большой талассемией умирают в течение первого или второго десятилетия жизни. В отсутствие достаточного синтеза цепей β -глобина для образования тетрамера гемоглобина осаждаются избыток цепей α -глобина и образует включения, которые вызывают преждевременную гибель поздних эритробластов в костном мозге или снижают время полужизни циркулирующих эритроцитов, генерируя основные гематологические признаки β -талассемии, неэффективного эритропоэза и гибели эритроцитов. Причиненная этим анемия стимулирует экспансию гемопоэтического компартмента, обуславливая эритроидную гиперплазию и экстрамедуллярный гемопоэз.

[0759] Основные способы лечения основной β -талассемии включают поддерживающую терапию с пожизненным переливанием красных кровяных клеток (RBC) и хелатирующей терапией для удаления избытка железа; или радикальное лечение с трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников (ГСКП). В случае пациентов с отсутствием донора с хорошей совместимостью или имеющих риск прохождения трансплантации аллогенных ГСКП генная терапия лентивирусным вектором с β -глобином дикого типа или фетальным γ -глобином потенциально может быть вариантом лечения с избежанием иммунологического риска аллогенной трансплантации. Генная терапия ГСКП с помощью SIN-лентивирусных глобиновых векторов, содержащих кассеты мини-LCR, исправляла фенотипы β -талассемии и серповидноклеточной анемии (СКА) в животных моделях и в клетках пациентов *in vitro* (Pstaha et al., *Curr Gene Ther.* 17(5):364-378, 2017). На основании этого на данный момент в Европе, Азии и Соединенных Штатах проводят ряд клинических исследований талассемии и СКА (Pstaha et al., *Curr Gene Ther.* 17(5):364-378, 2017, Cavazanna-Calvo et al., *Nature.* 467(7313):318-322, 2010, Ferarri et al., *Hematology/Oncology Clinics of North America: Gene Therapy.* 31(5), Thompson et al., *N Engl J Med.* 378(16):1479-1493, 2018). Хотя данные этих исследований на данный момент демонстрируют долгосрочную независимость от переливания для большинства пациентов, имеющих генотип β^+ , лечение β^0/β^0 талассемии все еще остается проблематичным.

[0760] Несмотря на обнадеживающие клинические исследования, текущие протоколы генной терапии талассемии являются сложными, включая получение ГСКП от доноров/пациентов путем лейкофереза, *in vitro* культивирование, трансдукцию лентивирусными векторами, несущими экспрессионную кассету β - или γ -глобина, и повторную трансплантацию пациентам после кондиционирования посредством полной миелоабляции. Помимо технической сложности другие недостатки этого подхода включают (а) необходимость культивирования в присутствии множества цитокинов, которые могут влиять на плюрипотентность гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и

их потенциал к приживлению; (b) необходимость применения схем миелоабляции, поскольку миелоабляция у пациентов с хроническими не злокачественными заболеваниями и предсуществующим поражением органов, например у пациентов с гемоглобинопатиями, представляет критический фактор риска, связанный с существенной гемопозитической и негемопозитической, ранней или поздней токсичностью; и (c) стоимость этого подхода. Тот факт, что талассемия более распространена в бедных странах, указывает на необходимость более простого и менее затратного терапевтического подхода.

[0761] Был разработан минимально инвазивный и легко реализуемый подход для *in vivo* генной доставки ГСКП без лейкафереза, миелоабляции и трансплантации ГСКП (Richter et al., Blood. 2016;128(18):2206-2217, Richter et al., Hematol Oncol Clin North Am. 31(5):771-785, 2017, Ren et al., Blood. 128(18):2194-219, 2016). Он включает инъекции G-CSF/AMD3100 для мобилизации ГСКП из костного мозга в периферический кровоток и внутривенную инъекцию интегрирующей, хелпер-зависимой аденовирусной (HDAd5/35++) векторной системы. Векторы HDAd5/35++ нацелены на человеческий CD46, рецептор, который экспрессируется на примитивных ГСК (Richter et al., Blood. 128(18):2206-2217, 2016). В HDAd5/35++, все белки за исключением домена головки фибера и стержня получены из серотипа 5; домен головки фибера и стержень получены из серотипа 35; мутации, которые повышают аффинность к CD46 внесены в головку фибера Ad35 (смотрите WO 2010/0120541), а ИКП и сигнал упаковки получены из Ad5. В HdAd35++, все белки получены из серотипа 35; мутации, которые повышают аффинность к CD46 внесены в головку фибера, а ИКП и сигнал упаковки получены из Ad35.

[0762] Интеграция трансгена обеспечивается случайным образом гиперактивной транспозазой Sleeping Beauty (SB100X) (Mátés et al., Nat Genet. 41(6):753-761, 2009). В мышинных моделях с использованием GFP в качестве репортерного гена было продемонстрировано, что ГСКП, трансдуцированные в периферии, возвращаются в костный мозг, где они остаются и стабильно в течение длительного времени экспрессируют репортер в организме *in vivo* трансдуцированных мышей и вторичных реципиентов (Richter et al., Blood. 2016;128(18):2206-2217).

[0763] С учетом высокого уровня присутствия трансгена, необходимого для фенотипической коррекции талассемии, подход *in vivo* трансдукции ГСКП был оптимизирован за счет вставки экспрессионной кассеты MGMT^{P140K} в векторы HDAd5/35++. Это делает возможным *in vivo* отбор генно-скорректированных предшественников с низкими дозами метилирующих агентов, например, O⁶-бензилгуанина (O⁶BG) плюс бис-хлорэтилнитрозомочевина (BCNU) или темозоломид

(Beard et al., J Clin Invest. 120(7):2345-2354, 2010, Larochelle et al., J Clin Invest. 119(7):1952-1963, 2009, Trobridge et al., PLoS One. 7(9):e45173, 2012). Ранее было показано, что комбинированный подход *in vivo* трансдукции/отбора был безопасным и приводил к стабильной экспрессии GFP в до 80% клеток периферической крови, уровню, который сохранялся у вторичных реципиентов, что указывает на стабильную трансдукцию самообновляющихся, мультилинейных ГСК с долгосрочной репопуляцией (Wang et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 8:52-64, 2018).

[0764] В данном случае подход *in vivo* генной терапии ГСКП исследовали с применением интегрирующегося вектора HDAd5/35++, экспрессирующего ген человеческого γ -глобина в организме «здоровых» трансгенных в отношении человеческого CD46 (CD46tg) мышей, и в качестве подтверждения концепции, в мышинной модели промежуточной талассемии (мышь CD46+/+/Hbbth-3).

[0765] **Материалы и методы. Реагенты.** использовали следующие реагенты: G-CSF (Neupogen, Amgen), AMD3100 (Sigma-Aldrich), плериксафор (Mozobil, Genzyme Corp.), O⁶-BG и BCNU (Sigma-Aldrich), микофенолата мофетил (CellCept Intravenous, Genentech), рапамицин (Rapamune/Sirolimus, Pfizer) и метилпреднизолон (Pfizer).

[0766] **Векторы HDAd.** Создание транспозонного вектора HDAd- γ -глобин/mgmt и SB100X-экспрессирующих клеток 116, полученных из человеческих эмбриональных клеток почки 293 (Palmer et al., Gene Therapy Protocols. Volume 1: Production and In vivo Applications of Gene Transfer Vectors (Methods in Molecular Biology):33-53, 2009), было описано ранее (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 9:142-152, 2018). Уровни загрязнения хелперным вирусом составляли менее 0,05%. Титры составляли от 6×10^{12} до 12×10^{12} вч/мл. Все векторы HDAd, используемые в этом исследовании, содержали химерные фиберы, состоящие из хвоста фибера Ad5, стержня фибера Ad35 и головки фибера Ad35++ с повышенной аффинностью (Wang et al., J Virol. 82(21):10567-10579, 2008). Все препараты HDAd имели менее 1 копии вируса дикого типа на 10^{10} вч (по данным измерения кПЦР с использованием праймеров, описанных в другом месте; Haeussler et al., PLoS One. 6(8):e23160, 2011).

[0767] **Внутриклеточная проточная цитометрия для выявления экспрессии человеческого γ -глобина.** Использовали набор для пермеабилзации клеток FIX и PERM (Thermo Fisher Scientific) и придерживались протокола производителя. Вкратце, 1×10^6 клеток ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS (ФСБ, дополненный 1% ФТС), добавляли 100 мкл реагента А (среда для фиксации) и инкубировали в течение 2-3 минут при комнатной температуре, затем добавляли 1 мл предварительно охлажденного абсолютного метанола, смешивали и инкубировали на льду в темноте в течение 10 минут.

Затем образцы промывали буфером FACS и ресуспендировали в 100 мкл реагента В (среда для пермеабиллизации) и 1 мкг антитела к γ -глобину (Santa Cruz Biotechnology, каталог sc-21756 PE), инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывки клетки ресуспендировали в буфере FACS и анализировали. Для двойного окрашивания эритроида и γ -глобина клетки сначала окрашивали APC антителом к мышинному Ter119 (Ter119-APC, BioLegend, каталог 116212), а потом промывали и фиксировали средой для фиксации, как описано выше.

[0768] **ВЭЖХ глобина.** Уровни отдельных цепей глобина количественно оценивали на приборе Shimadzu Prominence с детектором на диодной матрице SPD-10AV и двухканальным насосом LC-10AT (Shimadzu). 38%-60% градиент смеси 0,1% трифторуксусной кислоты в воде/ацетонитриле применяли при скорости 1 мл/мин, используя обращенно-фазовую колонку C4 Vydac (Hichrom).

[0769] **ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени.** Общую РНК выделяли из 50-100 мкл крови, используя реагент TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, кат. № 15596026), придерживаясь метода фенольно-хлороформной экстракции по рекомендациям производителя. Использовали набор для обратной транскрипции QuantiTect (Qiagen, кат. № 205311) и мастер-микс для ПЦР Power SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4367659). Количественную ПЦР в реальном времени проводили на системе для ПЦР в реальном времени StepOnePlus (Applied Biosystems). В этой работе использовали следующие пары праймеров: мышинный прямой RPL10 (SEQ ID NO: 189) и обратный (SEQ ID NO: 190); человеческий γ -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 191) и обратный (SEQ ID NO: 192); мышинный β -основной глобиновый прямой (SEQ ID NO: 193) и обратный (SEQ ID NO: 194).

[0770] **Магнитная сортировка клеток.** Для истощения коммитированных по линии дифференцировки клеток использовали набор для истощения клеток мышинной линии дифференцировки (Miltenyi Biotec, кат. № 130-090-858) в соответствии с инструкциями производителя. Для отбора Ter119+ клеток из костного мозга первичных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 или CD46⁺ клеток из гемопоэтических тканей вторичных реципиентов C57BL/6, использовали микрогранулы с антителом к мышинному Ter119 (Miltenyi Biotec, каталог 130-049-901) или микрогранулы с антителом к PE (Miltenyi Biotec, каталог 130-048-801) после окрашивания человеческим первичным антителом к CD46-PE (Miltenyi Biotec, каталог 130-104-508), соответственно.

[0771] **Исследования на животных.** Трансгенные мыши на основе линии C57BL/6, гомозиготные в отношении геномного локуса CD46 человека (CD46tg) и обеспечивающие экспрессию CD46 с уровнем и профилем, аналогичными человеку, были описаны ранее

(Kemper et al., Clin Exp Immunol. 2001;124(2):180-189). Мыши CD46tg были предоставлены Roberto Cattaneo, Mayo Clinic (Rochester, Minnesota, USA). Талассемическую мышиную модель, восприимчивую к инфекции векторами HDAd5/35++, получали путем скрещивания самок мышей CD46tg с самцами мышей Hbbth-3 (Jackson Laboratory) и обратного скрещивания F1 с мышами CD46tg для получения мышей CD46+//Hbbth-3. Шести-десяти-недельных самок CD46tg и CD46+//Hbbth-3 использовали для исследований *in vivo* трансдукции/отбора. Шести-десяти-недельных самок мышей C57BL/6 использовали в качестве вторичных реципиентов.

[0772] **Мобилизация и *in vivo* трансдукция мышей CD46tg.** ГСКП мобилизовали у мышей путем п/к инъекций человеческого рекомбинантного G-CSF (5 мкг/мышь на день, 4 дня) с последующей п/к инъекцией AMD3100 (5 мг/кг) на день 5. Кроме того, животные получали дексаметазон (10 мг/кг) в/б за 16 и 2 часа до инъекции вируса. Через тридцать и 60 минут после AMD3100 животным инъецировали в/в HDAd- γ -глобин/mgmt плюс HDAd-SB через ретро-орбитальное сплетение с дозой 4×10^{10} вч на инъекцию (всего 2 инъекции с перерывом в 30 минут). Через четыре недели мышам инъецировали O⁶-BG (15 мг/кг, в/б), 2 раза, с перерывом в 30 минут. Через один час после второй инъекции O⁶-BG мышам инъецировали BCNU (5 мг/кг, в/б). Дозу BCNU повышали во время второго и третьего цикла до 7,5 и 10 мг/кг, соответственно.

[0773] **Мобилизация и *in vivo* трансдукция мышей CD46+// Hbbth-3.** В этих исследованиях применяли 7-дневный подход мобилизации с помощью 250 мкг/кг G-CSF в/б (1-6 дни) и 5 мг/кг плериксафора в/б (ранее AMD3100; Mozobil, Genzyme Corp.) (5-7 дни), как было описано ранее в талассемической мышиную модели (Psatha et al., Hum Gene Ther Methods. 25(6):317-327, 2014). *In vivo* трансдукцию проводили, как описано выше. После обработки применяли комбинированную иммуносупрессию. На 17 неделе мышей подвергали 4 циклам *in vivo* отбора с O⁶BG (30 мг/кг, в/б) и повышали дозы BCNU (5, 7,5, 10, 10 мг/кг) с 2-недельным интервалом между дозами. Иммуносупрессию возобновляли через 2 недели после последней дозы O⁶-BG/BCNU.

[0774] **Иммуносупрессия.** Ежедневно проводили в/б инъекцию микофенолата мофетила (20 мг/кг/д), рапамицина (0,2 мг/кг/д) и метилпреднизолона (20 мг/кг/д).

[0775] **Вторичная трансплантация костного мозга.** Реципиентами были самки мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель от Jackson Laboratory. В день трансплантации мышей-реципиентов облучали дозой 10 Гр. Клетки костного мозга от *in vivo* трансдуцированных мышей CD46tg выделяли асептически, а истощенные по линии дифференцировки клетки выделяли, используя магнитную сортировку клеток (MACS). Через четыре часа после облучения клетки инъецировали в/в при 1×10^6 клеток на мышь.

В исследованиях мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 2×10^6 цельных клеток костного мозга от *in vivo* трансдуцированных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 трансплантировали вторичным реципиентам C57BL/6 после субмиелоабляции, кондиционированным 100 мг/кг в/б бусульфана (Busilvex, Pierre Fabre), разделенного на 3 суточные дозы, или летальным ОБТ (1000 сГр). На 20 неделе вторичных реципиентов умерщвляли и выделяли CD46⁺ клетки из крови, костного мозга и селезенки методом MACS или подвергали мышей мобилизации и *in vivo* трансдукции, как описано выше. Все вторичные реципиенты получали иммуносупрессию, начиная с недели 4.

[0776] **Анализ тканей.** Срезы тканей селезенки и печени толщиной 2,5 мкм фиксировали в 4% формальдегиде в течение по меньшей мере 24 часов, дегидратировали и заливали в парафин. Окрашивание H&E использовали для гистологической оценки экстрамедуллярного гемопоэза. Гемосидерин выявляли в срезах селезенки посредством окрашивания берлинской лазурью по Перлсу. Вкратце, срезы тканей обрабатывали смесью одинаковых объемов (2%) ферроцианида калия и хлористоводородной кислоты в дистиллированной воде, а затем проводили контрокрашивание нейтральным красным. Размер селезенки оценивали как отношение массы селезенки (мг) к массе тела (г).

[0777] **Анализ крови и цитоцентрифугаты костного мозга.** Образцы крови собирали в покрытые ЭДТА пробирки и проводили анализ на приборе HemaVet 950FS (Drew Scientific) или ProCyteDx (IDEXX). Получали мазки периферической крови и окрашивали красителем Мэй - Грюнвальда/Гимза в течение 5 и 15 минут, соответственно (Merck). Суспензии клеток костного мозга центрифугировали на слайды, используя прибор для цитоцентрифугатов, и окрашивали красителем Мэй - Грюнвальда/Гимза.

[0778] **Статистика.** Данные представлены виде среднего \pm СПС. Для сравнения множества групп использовали 1-факторный и 2-факторный дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони для множественного сравнения. Разницу между группами для 1 группирующей переменной определяли с помощью неспаренного 2-стороннего t-критерия Стьюдента. Для непараметрического анализа использовали критерий Крускала - Уоллиса. Статистический анализ проводили, используя GraphPad Prism версии 6.01 (GraphPad Software Inc.). P-значение менее 0,05 считали значимым; *P \leq 0,05, **P \leq 0,0002, ***P \leq 0,00003.

[0779] **Разрешение на исследование на животных.** Все эксперименты проводили с разрешения управляющего Институционального наблюдательного совета и IACUC.

[0780] **Результаты.** Результаты *in vivo* трансдукции ГСКП с последующим *in vivo* отбором у мышей CD46tg по стабильной экспрессии γ -глобина в большинстве периферических RBC. Терапевтический вектор HDAd5/35⁺⁺ содержит ген γ -глобина

человека под управлением 5 т. о. «микро» LCR β -глобина/ β -промотора для эффективной экспрессии в эритроцитах, а также экспрессионную кассету MGMT^{P140K} (Фиг. 2А, HDAd- γ -глобин/mgmt). Мыши CD46tg являются гомозиготными в отношении локуса CD46 человека, экспрессируя HDAd5/35++ рецептор CD46 с профилем и уровнем, сходными с людьми, и, следовательно, являются моделью для исследований *in vivo* трансдукции ГСКП (Richter et al., Blood. 128(18):2206-2217, 2016, Kemper et al., Clin Exp Immunol. 124(2):180-189, 2001). Целью этих исследований «здоровых» мышей CD46tg был анализ уровня, кинетики и распределения человеческого γ -глобина в мышечных клетках и безопасности подхода. Животных мобилизовали G-CSF/AMD3100, а затем внутривенно инъецировали HDAd- γ -глобин/mgmt и SB100X-экспрессирующий вектор HDAd-SB. Три цикла обработки O⁶BG/BCNU начинали через 4 недели после инъекции вектора и наблюдали мышей до 18 недели после инъекции векторов (Фиг. 2В). Сначала анализировали экспрессию γ -глобина человека в RBC (Фиг. 2С). Уровни до начала *in vivo* отбора (4 неделя после трансдукции) только немного превышали фон. Процентное содержание γ -глобин+ клеток начинало повышаться после второго раунда отбора и достигало уровней выше 80% после третьего раунда. Процентное содержание γ -глобин-экспрессирующих клеток было в 7-10 раз выше в эритроидных Ter119+ клетках по сравнению с незритроидными Ter119- клетками в периферической крови и костном мозге (Фиг. 2D). ВЭЖХ использовали для измерения уровня белка γ -глобина в сравнении с цепями взрослого мышечного α - и β -глобина (Фиг. 2Е и Фиг. 3; дополнительный материал на <https://doi.org/10.1172/JCI122836DS1>). На 18 неделе эти уровни достигали 10%-15% от взрослого мышечного α -глобина и β -основного глобина и 25% от мышечного β -минорного глобина. Это было подтверждено на уровне мРНК с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР), согласно которой мРНК γ -глобина человека составляла 13% мРНК мышечного β -основного глобина (Фиг. 2F). Чтобы дополнительно продемонстрировать, что примитивные ГСК с долгосрочной репопуляцией были трансдуцированы, истощенные по линии дифференцировки (Lin-) клетки костного мозга от *in vivo* трансдуцированных/прошедших отбор мышей трансплантировали облученным мышам C57BL/6. Уровни приживления по результатам анализа в периферической крови, костном мозге и селезенке превышали 95% и были стабильными в течение периода наблюдения 20 недель (Фиг. 4А, 4В). Уровни γ -глобина человека (по сравнению с мышечным α -глобином) были сходными у («первичных») *in vivo* трансдуцированных мышей (которых анализировали на 18 неделе после трансдукции) и вторичных реципиентов, которых анализировали на 14 и 20 неделях после трансплантации (Фиг. 4С).

[0781] Подход *in vivo* трансдукции/отбора ГСКП не меняет профиль SB100X-

опосредованной случайной интеграции трансгена и не меняет гемопоэз. Ранее было показано, что *in vivo* трансдукция гибридной системой транспозон/SB100X HDAd5/35++ приводила к случайной интеграции трансгена в ГСКП (Richter et al., Blood. 128(18):2206-2217, 2016). Чтобы оценить эффект O⁶BG/VCNU в *in vivo* отборе анализировали интеграцию трансгена в Lin- клетках костного мозга в конце исследования, т. е. на 20 неделе, у вторичных реципиентов. Опосредованная линейной амплификацией ПЦР (ОЛА-ПЦР) с последующим глубоким секвенированием продемонстрировали случайный профиль распределения сайтов интеграции в мышинном геноме (Фиг. 5А). Данные, объединенные по 5 мышам, демонстрировали 2,23% интеграции в экзоны, 31,58% в интроны, 65,17% в межгенные области и 1,04% в нетранслируемые области (Фиг. 5В). Уровень случайности интеграции составлял 99% без преимущественной интеграции в любом заданном окне полного мышинного генома (Фиг. 5С). Это указывает на то, что *in vivo* отбор и дополнительное размножение клеток у вторичных реципиентов не приводили к появлению доминантных сайтов интеграции (Фиг. 5D). кПЦР использовали для измерения в среднем двух копий кДНК γ -глобина на клетку костного мозга в популяции, содержащей как трансдуцированные, так и нетрансдуцированные клетки. Затем оценивали число копий интегрированного трансгена на уровне одиночных клеток. Для этого Lin- клетки костного мозга от мышей с недели 18 высеивали в метил целлюлозу, выделяли отдельные колонии предшественников и проводили кПЦР на геномной ДНК. В трансген-положительных колониях (n=113), 86,7% колоний имели 2 или 3 интегрированные копии (Фиг. 5Е и Фиг. 6). По четыре копии было обнаружено в 6,2% колоний, 8 копий в 1,78%, 0,88% колоний имели 13, 10, 7, 6 или 5 интегрированных копий вектора.

[0782] В конце исследования не было обнаружено изменений в числе клеток крови (неделя 18) (Фиг. 7А). Анализ параметров RBC не показал аномалий (Фиг. 7А-7С). Композиция Lin⁺ фракций в костном мозге была сходной у мышей до и после обработки (неделя 18) (Фиг. 7D). Уровни Lin-Sca1+cKit⁺ (LSK) ГСКП (Фиг. 7D, последняя дорожка) и колониеобразующих клеток-предшественников (Фиг. 7E) также были сравнимы в обеих группах.

[0783] Создание мышинной модели CD46^{+/+}/Hbbth-3, экспрессирующей человеческий CD46 и напоминающей человеческую промежуточную талассемию. Для векторов HDAd5/35++ необходим человеческий CD46 для инфекции. Чтобы получить талассемическую мышиную модель для исследований *in vivo* трансдукции ГСКП, мышей CD46tg (CD46^{+/+}) скрещивали с мышами Hbbth-3, гетерозиготными в отношении делеции гена мышинных Hbb- β 1 и - β 2 (Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA. 92(25):11608-11612, 1995). (Гомозиготное состояние является летальным во время внутриутробного развития

или вскоре после рождения). Мыши Hbbth-3 представляют жизнеспособную форму талассемии, напоминающую человеческую промежуточную талассемию. Гибридный мышей F1 обратно скрещивали с мышами CD46^{+/+} для создания мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 (Фиг. 8). Эти мыши демонстрировали талассемический фенотип. По сравнению с родительскими мышами CD46tg мыши CD46^{+/+}/Hbbth-3 имели значительно сниженное число RBC ($7,1 \pm 0,1$ и $8,63 \pm 0,29$ М/мкл); более низкий гемоглобин ($9,7 \pm 0,18$ и $13,9 \pm 0,63$ г/дл), гематокрит ($30,7\% \pm 0,46\%$ и $41,7\% \pm 1,48\%$), средний корпускулярный гемоглобин ($13,9 \pm 0,14$ и $16,1 \pm 0,23$ г/дл) и средний корпускулярный объем ($43,03 \pm 0,22$ и $48,35 \pm 0,9$ фл); и повышенную ширину распределения RBC ($42,9\% \pm 0,29\%$ и $25,3\% \pm 0,79\%$); и демонстрировали выраженный ретикулоцитоз ($42,4\% \pm 1,43\%$ и $11,8\% \pm 3,7\%$) (Фиг. 9A), Морфология красных клеток в мазках крови характеризовалась гипохромией, сильным разбросом по размеру и форме (анизопойкилоцитоз) и клеточной фрагментацией, аналогично морфологии мазков крови мышей Hbbth-3, и резко контрастировала с нормоцитным видом красных клеток мышей CD46tg (Фиг. 9B). Аналогично, гистологический анализ печени и селезенки мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 выявил очаги экстрамедуллярного гемопоэза, содержащие кластеры эритроидных предшественников или мегакариоцитов (Фиг. 9C, нижняя левая и нижняя средняя панели), тогда как окрашивание по Перлсу демонстрировало значительное паренхимальное отложение железа (Фиг. 9C, нижняя правая панель), в противоположность отсутствующему или ограниченному экстрамедуллярному гемопоэзу и накоплению железа в срезах тканей родительских мышей CD46tg (Фиг. 9C, верхние панели). Эти характеристики мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 воспроизводят человеческое заболевание и свидетельствуют в пользу валидности такой модели для последующих экспериментов. Следует отметить, что талассемический фенотип в модели CD46^{+/+}/Hbbth-3 также характеризовался количественной разницей в линиях дифференцировки, отличных от эритроидной линии, на что указывает повышенное число общих WBC (Фиг. 10).

[0784] *In vivo* трансдукция ГСКП HDAd- γ -глобин/mgmt плюс HDAd-SB с последующим *in vivo* отбором у мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 приводила к высокой, стабильной и долгосрочной экспрессии γ -глобина. Было определено, может ли подход *in vivo* трансдукции исправлять характерные параметры заболевания в мышинной модели талассемии CD46^{+/+}/Hbbth-3. Модифицированная схема мобилизации G-CSF/AMD3100, которая ранее была подтверждена для мышей Hbbth-3 (Psatha et al., Hum Gene Ther Methods. 2014;25(6):317-327), давала высокие количества клеток LSK в периферической крови через 1 час после последней инъекции плериксафора (AMD3100) (Фиг. 11), т. е. в момент времени, когда HDAd- γ -глобин/mgmt и HDAd-SB инъецировали внутривенно.

Мыши получали иммуносупрессию, чтобы избежать ответов против белков человеческого γ -глобина и MGMT (Фиг. 12). С учетом данных, что после *ex vivo* генной терапии лентивирусным вектором генетически скорректированные эритробласты имеют преимущество в отношении выживаемости и подвергаются *in vivo* отбору у мышей Hbbth-3 (Miccio et al., Proc Natl Acad Sci USA 105(30):10547-10552, 2008), сначала планировалось проводить исследование без обработки O⁶BG/BCNU. Среднее процентное содержание γ -глобин+ RBC достигало 31,19% \pm 2,7% на 8 неделе после *in vivo* трансдукции мышей CD46+/*Hbbth-3*, но снижалось до 13,14% \pm 0,4% к 16 неделе. В это время мышей разделяли на 2 группы. Половину мышей использовали для анализа крови и костного мозга (группа 1: без *in vivo* отбора) и в качестве доноров для вторичных реципиентов, тогда как со второй группой продолжали исследование, включающее применение O⁶BG/BCNU *in vivo* отборе (группа 2: с *in vivo* отбором) (смотрите Фиг. 12). На 16 неделе группа 1 демонстрировала экспрессию γ -глобина в 13% периферических RBC (Фиг. 13А, 13В). Этот уровень присутствия γ -глобина приводил к значительному снижению процентного содержания ретикулоцитов периферической крови (Фиг. 13С, последняя дорожка). При этом его не было достаточно, чтобы улучшить другие параметры RBC, включая морфологию RBC и экстрамедуллярный гемопоэз (Фиг. 13С, 13D). Уровень первичного присутствия γ -глобина сохранялся на протяжении 20 недель у вторичных реципиентов C57BL/6, которые получали миелокондиционирование бусульфаном перед трансплантацией (Фиг. 13Е, 13F). Это указывает на трансдукцию ГСКП с долгосрочной репопуляцией.

[0785] В группе 2 4 цикла *in vivo* отбора привели к 6-кратному повышению процентного содержания γ -глобин+ RBC с достижением среднего значения 76% на неделе 29 (Фиг. 14А). Экспрессии γ -глобина была эритроид-специфической, на что указывает анализ методом проточной цитометрии экспрессии γ -глобина в гейтированных или иммуномагнитно выделенных эритроидных клетках Ter119+ по сравнению с Ter119-клетками (Фиг. 14В, Фиг. 14С). В соответствии с другими исследованиями (Miccio et al., Proc Natl Acad Sci USA. 105(30):10547-10552, 2008, Zhao et al., Blood. 113(23):5747-5756, 2009), отбор происходил на уровне (ядерных и пролиферирующих эритроидных) предшественников до того, как они покидали костный мозг (или селезенку) и теряли свои ядра. Это отражает повышение количества γ -глобин+Ter119+ клеток в костном мозге и селезенке, которое происходило преимущественно после *in vivo* отбора (Фиг. 14D). Однако общее повышение присутствия γ -глобин+ в Ter119+ клеток в периферической крови (где преобладают безъядерные RBC) (Фиг. 14В) возможно связано с аддитивным эффектом «природного» *in vivo* отбора, обусловленного талассемическим фоном.

Отношение человеческого γ -глобина и мышиноного α -глобина в RBC, измеренное методом ВЭЖХ, повысилось от практически не выявляемых уровней на 14 неделе до 10% на 29 неделе (Фиг. 14E и 15; смотрите мышь CD46^{+/+}/Hbbth-3 на исходном уровне (Фиг. 15B), неделе 16 (Фиг. 15C) и неделе 29 (Фиг. 15D, и контроль CD46tg (Фиг. 15A)). Аналогично, уровень мРНК γ -глобина в клетках крови обработанных мышей повысился с трансляцией до 10% мРНК γ -глобина человека относительно мРНК β -глобина мыши на 29 неделе (Фиг. 14F). Было обнаружено 1,5 копии гена γ -глобина на клетку у обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 на 29 неделе после *in vivo* трансдукции (Фиг. 16).

[0786] Обращение талассемического фенотипа мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 после *in vivo* трансдукции/отбора. Через шесть недель после последней дозы обработки O⁶BG/BCNU мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 умерщвляли и собирали гемопоэтические ткани для анализа. Гематологические параметры на 29 неделе после *in vivo* трансдукции были существенно улучшены по сравнению с исходным уровнем (Фиг. 17A) (RBC: $8,53 \pm 0,16$ и $7,1 \pm 0,13$ М/мкл, $P=0,01$; гемоглобин: $11,27 \pm 0,39$ и $9,7 \pm 0,18$ г/дл, $P=0,05$; гематокрит: $41,37\% \pm 0,81\%$ и $30,7\% \pm 0,46\%$, $P=0,00001$; средний корпускулярный объем: $48,63 \pm 0,36$ и $43,5 \pm 0,38$ фл, $P=0,003$; ширина распределения RBC: $39,5\% \pm 0,8\%$ и $43\% \pm 0,3\%$, $P=0,006$; ретикулоциты: $31,13\% \pm 3,17\%$ и $42,4\% \pm 1,43\%$, $P=0,05$), а в случае конкретных показателей клеток крови (гематокрит [HCT], RBC, средний корпускулярный объем) уровни были неотличимы от контрольных CD46tg, что позволяет предположить практически полную коррекцию фенотипа. Окрашивание мазков крови на ретикулоциты продемонстрировало впечатляющее 3-кратное снижение числа ретикулоцитов у обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 с наибольшим процентным содержанием γ -глобин+ RBC (Фиг. 17B). Показателем обращения талассемического фенотипа в мазках периферической крови обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 является то, что гипохромные, высокофрагментированные и анизопойкилоцитарные исходные RBC были замещены практически нормохромными хорошо сформированными RBC, менее вариабельными по размеру (Фиг. 17C, верхние панели). В отличие от блокирования созревания эритроидной линии дифференцировки в костном мозге мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3, отображаемым преобладанием проэритробластов и базофильных эритробластов, в цитоцентрифугатах от контрольных и обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 преобладали созревающие эритробласты и были представлены полихроматическими и ортохроматическими эритробластами (Фиг. 17C, средние панели). У необработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 наблюдали интенсивный паренхиматозный гемосидероз, тогда как у мышей CD46tg и обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 можно было выявить только ограниченное накопление железа (Фиг. 17C, нижние панели).

Соответственно, размер селезенки, измеримая характеристика компенсаторного гемопоэза, был значительно снижен у обработанных животных (Фиг. 17D, 17E).

[0787] Чтобы определить, приводил ли комбинированный подход *in vivo* трансдукции/отбора к генетической модификации примитивных ГСК, клетки костного мозга, полученные от обработанных мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 на 29 неделе (после трансдукции), трансплантировали вторичным реципиентам C57BL/6 после сублетальной обработки бусульфаном или летального облучения всего тела (ОВТ) (Фиг. 18A, 18B). Хотя, как и ожидалось, уровни приживания у мышей, которые получали ОВТ, были выше, чем у обработанных бусульфаном животных, уровни экспрессии, скорректированные относительно уровней приживания, не демонстрировали значимо разной частоты γ -глобин⁺ RBC. Тот факт, что более 75% полученных из трансплантата (CD46⁺) эритроцитов были γ -глобин⁺ на 20 неделе после вторичной трансплантации и характеризовались уровнем присутствия, сходным с уровнем у первично обработанных мышей на 29 неделе (Фиг. 18C, 18D) в конкурентных условиях, созданных субмиелоаблятивным кондиционированием бусульфаном при нормальном реципиентном фоне (при котором HDAd- γ -глобин/HDAd-SB-трансдуцированные CD46^{+/+}/Hbbth-3 ГСКП не имели избирательного преимущества), дополнительно свидетельствует в пользу заключения, что этот подход приводит к генетической коррекции ГСК с долгосрочной репопуляцией. Кроме того, вторичных кондиционированных бусульфаном реципиентов C57BL/6 на 20 неделе после трансплантации подвергали мобилизации и *in vivo* трансдукции и демонстрировали значительное обогащение в отношении γ -глобин-экспрессирующих клеток и существенное повышение экспрессии/СИФ (Фиг. 18E).

[0788] Безопасность *in vivo* трансдукции ГСКП с помощью HDAd- γ -глобин/mgmt плюс HDAd-SB с последующим O⁶-BG/BCNU *in vivo* отбором. В мышинных исследованиях эта процедура переносилась хорошо. Никаких выраженных гематологических аномалий не наблюдали. На момент умерщвления через 6 недель после последней дозы O⁶-BG/BCNU все гематологические значения были в пределах нормальных диапазонов, хотя общее число WBC было ниже по сравнению с уровнями до *in vivo* отбора, что позволяет предположить циторедуктивный эффект лекарственной обработки на WBC, в частности лимфоциты (Фиг. 19A, 19B). Этот эффект также отображался сниженной частотой CD3⁺, CD19⁺ и Gr-1⁺ клеток в костном мозге по сравнению с необработанными аналогами или аналогами до отбора (Фиг. 19C). Следует отметить, что даже на самом низком уровне (неделя 25-27; 2-4 недели после последней инъекции O⁶BG/BCNU), WBC и тромбоциты никогда не достигали уровней аплазии (т. е. нейтрофилы < 1000/мкл, тромбоциты < 20000/мкл), WBC начинали восстанавливаться к 30 неделе (7 недель после последней

инъекции O⁶BG/BCNU). Это, вместе с наблюдением, что в модели CD46tg число WBC и лимфоцитов возвращалось к уровням до обработки через 10 недель после последней инъекции O⁶BG/BCNU (Фиг. 7A), позволяет предположить, что циторедуктивный эффект лекарств для *in vivo* отбора является слабым и временным. Что важно, на композицию клеток костного мозга в процентном содержании LSK и Ter119+ клеток, а также колониобразующий потенциал клеток костного мозга не влияли *in vivo* трансдукция/отбор ГСКП (Фиг. 19C, 19D).

[0789] *Обсуждение.* Несмотря на неоспоримый клинический прогресс в *ex vivo* ГСКП-генной терапии гемоглинопатий, основным ограничением является миелоаблятивное кондиционирование с целью обеспечения клинически релевантных уровней приживания ГСКП. Кроме того, техническая сложность позволяет реализовывать такое лечение только в небольшом количестве специализированных и/или аккредитованных центров. Подход *in vivo* генной терапии ГСКП, который был разработан, не требует миелоабляции и трансплантации клеток ГСКП и, следовательно, делает генную терапию ГСКП для талассемии более безопасной и доступной. Основной идеей этого подхода является мобилизация ГСКП из костного мозга и, в то время как они в большом количестве циркулируют в периферии, трансдукции их внутривенно вводимой ГСКП-тропической векторной системой для генного переноса HDAd5/35⁺⁺. Новые признаки векторной системы HDAd5/35⁺⁺ включают (а) фибры с повышенной аффинностью к CD46, что обеспечивает эффективную трансдукцию примитивных ГСК и в то же время позволяет избежать инфекции негемопоэтических тканей после внутривенной инъекции, (b) систему интеграции на основе транспозазы SB100X, которая функционирует независимо от клеточных факторов и опосредует случайную интеграцию трансгена без предпочтения в отношении генов, и (c) экспрессионную кассету MGMT^{P140K}, которая опосредует избирательное выживание и размножение дочерних клеток, не оказывая влияния на пул трансдуцированных примитивных ГСК, путем кратковременной обработки низкой дозой O⁶BG/BCNU (Wang et al., Mol Ther Methods. Clin Dev. 8:52-64, 2018). Дополнительные признаки, которые отличают векторы HDAd5/35⁺⁺ от используемых на данный момент SIN-лентивирусных векторов (SIN-LV), включают их большую (30 т. е.) емкость, которую в этом исследовании использовали для включения управляемого микро-LCR/ β -промотором гена γ -глобина и управляемого промотором EF1A гена MGMT^{P140K} размером 11,8 т. о. Кроме того, получение векторов HDAd5/35⁺⁺ не требует крупномасштабной плазмидной трансфекции и дает более 3×10^{12} инфекционных частиц на литр спин-культуры. Следует отметить, что выход векторов SIN-LV, используемых в клинических исследованиях гемоглинопатий по меньшей мере на 2

порядка меньше.

[0790] Эффективность *in vivo* подхода. В отличие от генной терапии ГСКП других генетических заболеваний (т.е. X-сцепленного ТКИД, Cavazzana-Calvo et al., Science. 288(5466):669-672, 2000; ADA-SCID, Gaspar et al., Sci Transl Med. 3(97):97ra80. 2011; или синдром Вискотта - Олдрича, Aiuti et al., Science. 341(6148):1233151, 2013), при которых стабильная трансдукция менее 1% ГСКП обеспечивает существенную клиническую пользу, для фенотипической коррекции гемоглинопатий у пациентов необходимо по меньшей мере 20% скорректированных эритроидных предшественников (Persons et al., Blood. 97(10):3275-3282, 2001, Andreani et al., Blood.; 87(8):3494-3499, 1996, Negre et al., Blood. 117(20):5321-5331, 2011). В мышинных моделях гемоглинопатий экспрессии γ -глобина в 15% от общей мРНК α -глобина было достаточно для терапии (Persons et al., Blood. 2001;97(10):3275-3282, McColl et al., Blood Med. 7:263-274, 2016, Pestina et al., Mol Ther. 17(2):245-252, 2009). В этом исследовании после *in vivo* трансдукции/отбора более 60% эритробластов костного мозга экспрессировали γ -глобин в *in vivo* трансдуцированных моделях CD46tg и CD46+/+/Hbbth-3 (Фиг. 2C и 14A). Это транслировалось в 40%-97% циркулирующих экспрессирующих γ -глобин RBC (Фиг. 2D и 14B). Также важно, что в обеих животных моделях было продемонстрировано продолжительное присутствие γ -глобина в RBC у вторичных реципиентов, что позволяет предположить, что примитивные ГСК с долгосрочной репопуляцией были изначально трансдуцированы векторной системой.

[0791] Исследования кПЦР выявили от 2 до 3 копий интегрированного трансгена в подавляющем большинстве клеток костного мозга. В соответствии с более ранними исследованиями (Zhao et al., Blood. 113(23):5747-5756, 2009, Zielske et al., Mol Ther. 9(6):923-931, 2004), было обнаружено, что *in vivo* отбор осуществлялся в отношении клонов с большим числом копий. Принимая во внимание полногеномный анализ сайтов интеграции, были спроектированы 1000 изначально трансдуцированных ГСК. С учетом того, что мыши имеют от 10000 до 20000 ГСК (Abkowitz et al., Blood. 100(7):2665-2667, 2002; Chen et al., Blood. 107(9):3764-3771, 2006), это означает, что мишенью векторной системы стали 5%-10% ГСК, что является твердым основанием для поликлонального восстановления гемопоэза после *in vivo* отбора и для долгосрочного терапевтического эффекта.

[0792] В модели промежуточной талассемии была достигнута практически полная фенотипическая коррекция. Ключевые гематологические параметры (HCT, RBC, средний корпускулярный объем) были неотличимы от их аналогов у «здоровых» мышей (родительских CD46tg). Степень коррекции показателей RBC и морфологии коррелирует с

уровнем γ -глобин-экспрессирующих клеток у отбелых мышей. Периферические RBC и эритроидные клетки-предшественники костного мозга напоминают клетки здоровых мышей как по морфологии, так и по процессу созревания. Экстрamedулярный гемопоэз и паренхиматозное отложение железа снизились, и размер селезенки бы значительно уменьшен. Талассемический фенотип в модели CD46^{+/+}/Hbbth-3 также характеризовался лейкоцитозом/лимфоцитозом (Фиг. 10). (Лейкоцитоз/лимфоцитоз также часто присутствует у пациентов с талассемией/серповидноклеточной анемией с удаленной селезенкой или пациентов с функциональной связанной с заболеванием аспленией; Brousse et al., Br J Haematol. 166(2):165-176, 2014). Что интересно, число WBC у мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 возвращалось к уровням «здоровых» мышей CD46tg на 29 неделе после *in vivo* трансдукции (Фиг. 19A). Этот эффект позволяет предположить, что обращение талассемического фенотипа с помощью данного подхода выходит за рамки эритроидного компартмента, приводя к нормализации WBC и, наиболее вероятно, общей функции селезенки.

[0793] Следует отметить, что в отличие от исследования с мышами CD46tg, в контексте талассемического фона и в отсутствие обработки O⁶BG/BCNU 13% γ -глобин⁺ RBC циркулировали в периферической крови мышей CD46^{+/+}/Hbbth-3 и этот уровень сохранялся в течение длительного времени у вторичных реципиентов. Это указывает на то, что экспрессия гена γ -глобина обеспечивает преимущество в отношении выживаемости талассемическим генетически модифицированным эритроидным предшественникам аналогично результатам для *ex vivo* лентивекторной генной терапии ГСКП в мышинной модели основной талассемии (Micco et al., Proc Natl Acad Sci USA. 105(30):10547-10552, 2008). Однако для фенотипической коррекции в мышинной модели талассемии была необходима обработка O⁶BG/BCNU. Это позволяет предположить, что, если это нужно из-за низкого присутствия глобина, система индуцибельного *in vivo* отбора позволяет обеспечить терапевтическую эффективность с помощью простого фармакологического вмешательства.

[0794] Для дополнительного повышения уровня γ -глобина в мышинных моделях талассемии можно рассмотреть следующие возможности: (a) соотношение векторов HDAd-SB и HDAd- γ -глобин/mgmt можно изменить с 1:1 на 1:3, чтобы увеличить число копий интегрированного трансгена на клетку (Zhang et al., PLoS One. 8(10):e75344, 2013). (b) Также планируется использовать 26,1 т. о. версию LCR β -глобина для управления экспрессией γ -глобина, чтобы минимизировать эффекты позиции интеграции трансгена (Wang et al., J Virol. 79(17):10999-11013, 2005). (c) Помимо системы добавления гена γ -глобина на основе SB100X вектор HDAd5/35⁺⁺ может содержать CRISPR/Cas9 для

разрушения супрессорных областей γ -глобина и повторной активации генов эндогенного γ -глобина (Li et al., Blood. 131(26):2915-2928, 2018).

[0795] Чтобы оценить взаимозависимость времени и мобилизации и экспрессии вектор HDAd-mgmt/GFP+вектор HDAd-SB вводили мышам hCD46tg после мобилизации G-CSF и AMD3100. Сывороточные анти-HDAd антитела измеряли, как показано на Фиг. 20A и 20E. GFP измеряли через 4 дня или 4 недели и 4 дня после мобилизации (Фиг. 20B («B») и 20C («C»)). Второй раунд мобилизации и инъекции HDAd (4 недели после первого раунда; Фиг. 20D). Результаты приведены на Фиг. 20F. Второй раунд мобилизации (Фиг. 20D; «D») не привел к трансдукции клеток периферической крови из-за образования нейтрализующих сывороточных антител против вируса. Однако, поскольку исследования *in vivo* трансдукции у реципиентов вторичного трансплантата показали (Фиг. 18E), что, если образование анти-HDAd антител можно фармацевтически блокировать, вторая обработка может повысить как процентное содержание γ -глобин+ RBC, так и уровень экспрессии/СИФ γ -глобина.

[0796] Безопасность подхода *in vivo* трансдукции/отбора ГСКП. Этот подход устраняет необходимость в миелоабляции/кондиционировании и связанную с ними токсичность и в то же время обеспечивает эффективное нацеливание на ГСКП в некондиционированном организме-хозяине путем простой внутривенной и подкожной инъекции вещества/вектора. Что важно, все животные, участвующие в этом исследовании, хорошо переносили эту процедуру.

[0797] В связи с мобилизацией ГСКП на основании G-CSF/AMD3100 (плериксафор) этот подход был клинически подтвержден как безопасный и эффективный и обычно используется для мобилизации и сбора ГСКП методом лейкофереза во всех текущих исследованиях большой талассемии (Psatha et al., Curr Gene Ther. 17(5):364-378, 2017, Karponi et al., Blood. 126(5):616-619, 2015). В качестве альтернативы схеме мобилизации, используемой в этом исследовании, другие подходы могут включать непрерывную блокировку CXCR4 малыми синтетическими молекулами для обеспечения более эффективной мобилизации ГСКП (Karpova et al., Blood. 129(21):2939-2949, 2017).

[0798] Внутривенная инъекция векторов HDAd5/35++ не приводит к экспрессии трансгена в тканях, отличных от мобилизованных ГСКП и МКПК у мышей CD46tg на 3 день после инъекции (Richter et al., Blood. 128(18):2206-2217, 2016). Это согласовалось с более ранними исследованиями на бабуинах, которым внутривенно вводили нацеленные на CD46 векторы Ad5/35 и Ad5/11 первого поколения (Ni et al., Blood. 128(18):2206-2217, 2016). Потенциальным объяснением этого тропизма является то, что плотность и доступность рецептора CD46 являются недостаточно высокими в негемопоэтических

тканях, чтобы обеспечить эффективную вирусную трансдукцию (Richter et al., *Blood*. 128(18):2206-2217, 2016; Ong et al., *Exp Hematol*. 34(6):713-720, 2006). В данном случае число копий интегрированного трансгена на клетку измеряли в разных тканях на 18 неделе после *in vivo* трансдукции/отбора, используя транспозонный вектор (Фиг. 21А). Эффективность в сравнении с числом копий представлена на Фиг. 21В и 21С. Показано число копий интегрированного транспозона на клетку в разных тканях (Фиг. 21D). Число копий в костном мозге, МКПК и селезенке составляло 2,5. Интегрированные трансгены также были обнаружены в геномной ДНК из печени, легких и кишечника. Предыдущие исследования с векторной системой GFP показали, что источником сигналов в этих органах являются инфильтрирующие клетки крови и/или резидентные макрофаги (Richter et al., *Blood*. 2016;128(18):2206-2217).

[0799] Внутривенная инъекция векторов HDAd (но также других вирусных векторов) связана с высвобождением провоспалительных цитокинов (Atasheva et al., *Curr Opin Virol*. 21:109-113, 2016, Grieg et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*. 3:16079, 2016), что, однако, можно эффективно блокировать с помощью предварительной обработки глюкокортикоидами за день до инъекции вируса (Seregin et al., *Mol Ther*. 17(4):685-696, 2009) или дробления дозы вектора (Illingworth et al., *Mol Ther Oncolytics*. 5:62-74, 2017). Хорошие профили безопасности внутривенно вводимых онколитических аденовирусов были задокументированы в дюжинах клинических исследований, включая исследование с нацеленным на CD46 онколитическим аденовирусом (Garcia-Carbonero et al., *J Immunother Cancer*. 5(1):71, 2017).

[0800] В отношении безопасности *in vivo* отбора и опасений, что O⁶BG/BCNU-стимулируемая пролиферация может истощить резерв долгосрочных покоящихся ГСКП, исследования с моделями на крупных животных предоставили свидетельства долгосрочного мультилинейного отбора без истощения ГСКП или появления доминантных клонов (Beard et al., *J Clin Invest*. 120(7):2345-2354, 2010, Neff et al., *J Clin Invest*. 112(10):1581-1588, 2003). В этих моделях профили гемопоэтической и экстрамедуллярной токсичности были приемлемыми. В настоящем исследовании и предыдущих исследованиях на мышах (Wang et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*. 8:52-64, 2018, Li et al., *Blood*. 131(26):2915-2928, 2018) *in vivo* отбор хорошо переносился без миелосупрессии. Не наблюдали никаких изменений частоты ГСКП костного мозга после обработки O⁶BG/BCNU. Слабое снижение числа WBC, в частности, числа лимфоцитов, было временным. От трех до четырех циклов обработки низкими дозами O⁶BG, ингибитора процесса репарации ДНК, и BCNU, алкилирующего агента, приводящие к выживанию *in vivo* отобранных ГСКП, теоретически могли инициировать мутации и

опухолеобразование. Аргументом против этого риска являются долгосрочные исследования последующего наблюдения на обезьянах и собаках, которые получали такую обработку, но не демонстрировали признаков канцерогенеза (Beard et al., J Clin Invest. 120(7):2345-2354, 2010, Radke et al., Sci Transl Med. 9(414):eaan1145, 2017, Beard et al., Blood. 113(21):5094-5103, 2009). В попытке оценить этот риск в ГСКП проводили *in vitro* исследование с CD34+ клетками, трансдуцированными MGMT^{P140K}-экспрессирующим вектором HDAd и подвергнутыми обработке O⁶BG/BCNU в дозе, которая уничтожает 98% клеток, которые не были защищены экспрессией MGMT^{P140K} (Фиг. 22A-22C). На 14 день после лекарственного воздействия проводили полноэкзомное секвенирование Illumina CD34+ клеток без обработки и клеток, которые выжили после обработки, результат которого приведен в следующих таблицах. Полноэкзомное секвенирование CD34+ клеток, которые выжили после лекарственной обработки, в сравнении с необработанными CD34+ клетками. Последовательности образцов сравнивали с эталонным геномом Homo sapiens (UCSC hg19).

Образец № 1: необработанные CD34⁺ клетки

Общее число выровненных считываний	Процент выровненных считываний	Число целевых выровненных считываний	Обогащенные считываний	Дополненные целевые выровненные считывания	Дополненное обогащенные считываний
46 870 836	80,51%	38 437 631	82,01%	40 158 769	85,68%
Общее число выровненных оснований	Процент выровненных оснований	Число целевых выровненных оснований	Обогащенные оснований	Дополненные целевые выровненные основания	Дополненное обогащенные оснований
6 544 191 633	75,45%	4 308 625 487	65,64%	5 541 019 474	84,67%

Образец № 2: отобранные CD34⁺ клетки

Общее число выровненных	Процент выровненных	Число целевых выровненных	Обогащенные считываний	Дополненные целевые выровненные	Дополненное обогащенные

ых считывани й	считывани й	ых считывани й	ий	ые считывани я	е считывани й
47 858 908	81,07%	39 945 698	81,38%	40 463 838	84,555
Общее число выровненных оснований	Процент выровненных оснований	Число целевых выровненных оснований	Обогащенные оснований	Дополненные целевые выровненные основания	Дополненное обогащенные оснований
6590512869	74,93%	4 339 416 710	65,84%	5 523 089 486	83,80%

[0801] Используя программу сортировки Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT; доступную онлайн на uswest.ensemble.org) в качестве фильтра, который позволяет предсказать, будет ли аминокислотная замена влиять на функцию белка, было идентифицировано 126 de novo мутаций на 47858908 секвенированных пар оснований в обработанном образце ($2,63 \times 10^{-6}$ мутаций на основание). Используя ClinVar в качестве фильтра, было обнаружено шесть мутаций с потенциальными патологическими эффектами. В таблице 11 приведена информация, в какой хромосоме были обнаружены уникальные мутации:

Таблица 13

Число уникальных мутаций	
Хромосома 1	793
Хромосома 2	502
Хромосома 3	369
Хромосома 4	243
Хромосома 5	253
Хромосома 6	341
Хромосома 7	383
Хромосома 8	241
Хромосома 9	312
Хромосома 10	269
Хромосома 11	536
Хромосома 12	362

Хромосома 13	94
Хромосома 14	252
Хромосома 15	271
Хромосома 16	475
Хромосома 17	527
Хромосома 18	94
Хромосома 19	755
Хромосома 20	283
Хромосома 21	92
Хромосома 22	276
Хромосома М	0
Хромосома X	351
Хромосома Y	6
Всего	8080

[0802] Обнаружение того, что обработка O⁶BG/BCNU вызывает мутации, не является неожиданным; однако последствия данные секвенирования экзома неясны. Варианты с потерей функции обычны в человеческой популяции. Недавний анализ от Exome Aggregation Consortium идентифицировал 3230 генов с мутациями с потерей функции, при этом 72% на данный момент не имеют установленный фенотип заболевания человека (Lek et al., Nature. 536(7616):285-291, 2016).

[0803] Вектор HDAd-SB, который несет гены транспозазы SB100X и рекомбиназ Flpe, не интегрируется и утрачивается в процессе делений клетки (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 9:142-152, 2018). В соответствии с ранее опубликованными данными (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 9:142-152, 2018), ни интегрированный, ни эписомальный вектор HDAd-SB не подлежали выявлению методом кПЦР в конце исследований в Lin-клетках костного мозга. Транспозаза SB100X опосредует случайную интеграцию трансгена без предпочтения в отношении интеграции в гены или вблизи них (Richter et al., Blood. 128(18):2206-2217, 2016, Zhang et al., PLoS One. 8(10):e75344, 2013). Этот случайный профиль сохраняется после in vivo отбора без появления доминантных сайтов интеграции/клонов. Теоретически, случайная интеграция является более безопасной, чем предпочтительная интеграция в активные гены, которая происходит во время трансдукции лентивирусным или AAV вектором (Deyle et al., Curr Opin Mol Ther. 11(4):442-447, 2009, Bartholomae et al., Mol Ther. 19(4):703-710, 2011, Schröder et al., Cell. 110(4):521-529, 2002). Следует отметить, что в клиническом исследовании β -талассемии на основе SIN-LV интеграция в интрон протоонкогена HMGA2 инициировала доброкачественное

клональное доминирование у одного пациента (Cavazzana-Calvo et al., Nature. 467(7313):318-322, 2010).

[0804] Чтобы снизить риск потенциальной онкогенности вследствие комбинированного эффекта SB100X-опосредованной случайной интеграции трансгена и обработки мутагенными препаратами для отбора, была разработана векторная система, чтобы устранить первый фактор риска. Она опосредует нацеленную интеграцию γ -глобина в безопасный хромосомный сайт и приводит к стабильному присутствию γ -глобина в более чем 70% RBC у мышей (Li et al., 21st Annual American Society of Gene and Cell Therapy Meeting. Abstract 972).

[0805] Безопасность этого подхода может быть впервые прямо задокументирована в долгосрочных исследованиях на отличных от человека приматах. В этом контексте следует отметить, что CD34⁺ клетки костного мозга макаков и бабуинов так же эффективно трансдуцируются векторами Ad5/35, как и CD34⁺ клетки человека (Tuve et al., J Virol. 80(24):12109-12120, 2006), и была продемонстрирована прямая *in vivo* трансдукция мобилизованных CD34⁺ клеток интегрирующимся вектором HDAd5/35⁺⁺, экспрессирующим GFP, у макаков (Harworth et al., 21st Annual American Society of Gene and Cell Therapy Meeting. Abstract 995).

[0806] **Касательно перехода к клиническому применению подхода.** Производство векторов HDAd5/35⁺⁺ обычно дает 5×10^{12} вирусных частиц (вч) на литр спин-культуры. Налажено производство HDAd уровня cGMP для вектора Flexion's FX201. Протоколы для фармакологического контроля врожденной иммунной реакции на внутривенно вводимый вирус в большей степени разработаны для людей, чем для мышей, и на сегодняшний день практически используются в клинических исследованиях с внутривенно вводимыми высокими дозами rAAV векторов. При этом большинство людей имеют нейтрализующие сывороточные антитела, направленные против белков капсида Ad5, которые будут блокировать *in vivo* трансдукцию векторами HDAd5/35, т. е. векторами, которые содержат белки капсида Ad5 и химерные фибры Ad35. Альтернативный вариант, описанный в этом изобретении, включает векторы, полученные из Ad35. Ad35 представляет собой один из наиболее редких из 57 известных человеческих серотипов, с серопревалентностью менее 7% и отсутствием перекрестной реактивности с Ad5 (Vogels et al., J Virol. 77(15):8263-8271, 2003, Abbink et al., J Virol. 81(9):4654-4663, 2007, Kostense et al., AIDS. 18(8):1213-1216, 2004, Flomenberg et al., J Infect Dis. 155(6):1127-1134, 1987, Barouch et al., Vaccine. 29(32):5203-5209, 2011). Ad35 является менее иммуногенным, чем Ad5 (Johnson et al., J Immunol. 188(12):6109-6118, 2012), что частично связано с ослаблением активации Т-клеток головкой фибера Ad35

(Adams et al., J Gen Virol. 93(pt 6):1339-1344, 2012. Adams et al., Proc Natl Acad Sci USA 108(18):7499-7504, 2011, Shoji et al., PLoS One. 7(1):e30302, 2012). После внутривенной инъекции наблюдается лишь минимальная трансдукция (выявляемая только ПЦР) тканей, включая печень, у трансгенных в отношении человеческого CD46 мышей (Sakurai et al., Gene Ther. 13(14):1118-1126, 2006, Sakurai et al., Mol Ther. 16(4):726-733, 2008) и отличных от человека приматов (Sakurai et al., Mol Ther. 16(4):726-733, 2008). Векторы Ad35 первого поколения клинически использовали в целях вакцинации (Baden et al., Ann Intern Med. 164(5):313-322, 2016, Kazmin et al., Proc Natl Acad Sci USA 114(9):2425-2430, 2017). Для предстоящих исследований на людях векторы будут создавать на основе HDAd35++ для *in vivo* генной терапии ГСКП.

[0807] В целом, это обеспечивает альтернативу традиционной *ex vivo* генной терапии талассемии на основе лентивирусного вектора, что может упростить терапию и, теоретически, сделать ее доступной в бедных регионах, в который большая талассемия является эндемической, а трансплантация ГСКП нереализуема.

[0808] Пример 2. *In vivo* генная терапия гемопоэтическими стволовыми клетками мышинной талассемии с использованием 29 т. о. области контроля локуса β -глобина

[0809] В примере 1 описаны значительные преимущества в способности обуславливать генную экспрессию γ -глобина в *in vivo* модифицированных ГСКП. Также там указано, что для дополнительного повышения уровня экспрессии γ -глобина можно использовать более длинную версию (например, 26,1 т. о.) LCR β -глобина, чтобы обусловить экспрессию γ -глобина. В этом примере приведены результаты этого контрольного анализа.

[0810] Как описано в данном документе, мобилизация гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников с последующей внутривенной инъекцией интегрирующихся хелпер-зависимых аденовирусных векторов HDAd5/35++ приводила к эффективной трансдукции клеток с долгосрочной репопуляцией и уменьшению интенсивности заболевания в мышинных моделях после *in vivo* отбора трансдуцированных ГСКП. Острую природную токсичность, связанную с инъекцией HDAd5/35++ контролировали с помощью соответствующей профилактики, делая этот подход подходящим для клинической реализации. Технически это можно использовать как просто подход *in vivo* трансдукции ГСКП для генной терапии большой талассемии или серповидноклеточной анемии. Для излечения этих заболеваний необходимы высокие уровни экспрессии терапевтического белка (γ - или β -глобина), которых трудно достичь с лентивирусными векторами вследствие ограничения, связанного с размером их генома,

который не позволяет размещать более крупные регуляторные элементы. В этом примере используется 35 т. о. емкость векторов HDAd5/35++, чтобы продемонстрировать, что транскрипционные регуляторные области локуса β -глобина с общей длиной 29 т. о. можно эффективно переносить в ГСКП. *In vivo* трансдукция ГСКП приводила к стабильным уровням γ -глобина в эритроидных клетках, что обеспечивало полное излечение мышинной промежуточной талассемии. Следует отметить, что это было достигнуто с минимальной схемой *in vivo* отбора ГСКП. Это исследование демонстрирует, что векторы HDAd5/35++, которые могут включать крупные регуляторные области, могут решить проблемы в генной терапии заболеваний, при которых требуется экспрессия трансгена на высоком уровне.

[0811] **Введение.** Чтобы генная терапия гемоглобинопатий, таких как большая талассемия и серповидноклеточная анемия, была успешной, переносимый ген предпочтительно должен экспрессироваться в эритроидных клетках на высоких уровнях без позиционных эффектов интеграции и транскрипционного сайленсинга. Область контроля локуса (LCR) β -глобина считается целесообразной для такого применения. Было показано, что в случае применений генной терапии LCR β -глобина, содержащая HS1-HS5, обеспечивала экспрессию на высоком уровне для цис-связанных генов у трансгенных мышей (Grosveld et al., Cell 51: 975-985, 1987). Однако эта версия LCR является слишком большой, чтобы использовать ее в лентивирусном векторе (емкость 8 т. о.), и поэтому были разработаны усеченные «мини» или «микро» версии LCR. Например, в текущих клинических исследованиях пациентов с талассемией используется лентивирус, содержащий 2,7 т. о. мини-LCR (охватывающую HS2-HS4) и 266 т. о. промотор β -глобина (Negre et al., Curr Gene Ther 15:64-81, 2015). В примере 1, использовали 5,9 т. о. версию LCR β -глобина, которая содержала HS1-HS4 и промотор β -глобина для экспрессии γ -глобина у трансгенных мышей CD46 или талассемических мышей CD46/Hbb^{th3} (Wang et al., J Clin Invest 129:598-615, 2019). С подходом *in vivo* трансдукции/отбора ГСКП присутствие γ -глобина было достигнуто практически в 100% эритроцитов периферической крови, тогда как уровень экспрессии γ -глобина составлял 10-15% от уровня взрослого мышинного α -глобина со средним числом копий интегрированного вектора (ЧКВ) 2-3 копии на клетку.

[0812] Для полного излечения β_0/β_0 талассемии или серповидноклеточной анемии в общем случае считается необходимым 20% уровень экспрессии терапевтического глобина (γ - или β -глобина) в эритроидных клетках (Fitzhugh et al., Blood 130:1946-1948, 2017). Одним способом достижения этого уровня является увеличение ЧКВ за счет улучшения трансдукции ГСКП или увеличения дозы вектора. Однако ранее в другом контексте было

обнаружено, что такие подходы повышают риск токсичности, по меньшей мере частично, вследствие случайного профиля интеграции используемых векторных систем. В этом примере для повышения экспрессии γ -глобина в RBC после *in vivo* трансдукции ГСКП CD46-трансгенных мышей использовали более сильные транскрипционные элементы, а именно более длинную версию LCR.

[0813] Предложен новый подход *in vivo* трансдукции ГСКП, для которого не нужны лейкаферез, миелоабляция и трансплантация ГСКП (Richter et al., *Blood*, 128:2206-2217, 2016). Этот подход включает применение новой векторной платформы, подходящей для *in vivo* трансдукции ГСКП, т. е. хелпер-зависимых, капсид-модифицированных аденовирусных векторов (HDAd5/35++). Характеристики этих векторов включают фиберы с повышенной аффинностью к CD46, которые делают возможной эффективную трансдукцию примитивных ГСК и одновременно позволяют избежать инфекции не гемопоэтических тканей после в/в инъекции, и емкость до 30 т. о. Вследствие ограниченной доступности ГСКП, локализованные в костном мозге, нельзя трансдуцировать внутривенно вводимыми векторами, включая векторы HDAd5/35++, даже если вектор нацелен на рецепторы, присутствующие на клетках костного мозга (Ni et al., *Hum Gene Ther*, 16: 664-677, 2005 и Ni et al., *Cancer Gene Ther*, 13:1072-1081, 2006). Было показано, что комбинация гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и антагонистов CXCR4 AMD3100 (MOZOBILTM, PLERIXATM) эффективно мобилизует примитивные клетки-предшественники в животных моделях и у людей (Fruehauf et al., *Cytotherapy*, 11: 992-1001, 2009 и Yannaki et al., *Hum Gene Ther*, 24: 852-860, 2013). G-CSF/AMD3100 использовали для мобилизации ГСКП из костного мозга в периферический кровоток с последующей внутривенной инъекцией векторов HDAd5/35+. Ранее это было продемонстрировано у трансгенных в отношении CD46 человека мышей (Richter et al., *Blood*, 128: 2206-2217, 2016; Li et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 9: 390-401, 2018; Li et al., *Blood*, 131: 2915-2928, 2018; Wang et al., *J Clin Invest*, 129: 598-615, 2019; Wang et al., *Blood Adv*, 3: 2883-2894, 2019; и Wang et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 8: 52-64, 2018), гуманизированных мышей (Richter et al., *Blood*, 128: 2206-2217, 2016) и макаков-резус (Harworth et al., ASCGT 21th Annual meeting, 2018, DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.05.001). ГСКП, трансдуцированные в периферии, возвращаются в костный мозг, в котором они присутствуют в течение длительного периода. В отсутствие пролиферативного преимущества *in vivo* трансдуцированные ГСКП не покидают костный мозг эффективным образом и способствуют последующей дифференцировке. Краткосрочная обработка животных O⁶BG/BCNU обеспечивает стимул к пролиферации для *mgmt*^{P140K} генно-модифицированных ГСКП и последующую стабильную экспрессию трансгена в > 80%

клеток периферической крови (Wang et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 8: 52-64, 2018).

[0814] Геномы HD-Ad5/35++ не интегрируются в геном клетки-хозяина и утрачиваются после деления клетки. В целях генной терапии и для долгосрочного отслеживания *in vivo* трансдуцированных ГСКП векторы HD-Ad5/35++ модифицировали, чтобы сделать возможной интеграцию трансгена. Это осуществляли путем включения системы гиперактивной транспозазы Sleeping Beauty (SB100) (Zhang et al., *PLoS One*, 8: e75344, 2013; Hausl et al., *Mol Ther*, 18: 1896-1906, 2010; и Yant et al., *Nat Biotechnol*, 20: 999-1005, 2002). Транспозаза, коэкспрессируемая *in trans* из второго вектора, распознает конкретные последовательности ДНК (инвертированные повторы; «ИП»), фланкирующие кассету трансгена, и инициирует интеграцию в динуклеотиды ТА хромосомной ДНК. В отличие от ретровирусной интеграции, SB100x-опосредованная интеграция не зависит от транскрипционного статуса генов-мишеней (Yant et al., *Mol Cell Biol*, 25: 2085-2094, 2005). Несколько исследований продемонстрировали, что SB100x-опосредованная интеграция трансгена является случайной и не связана с активацией протоонкогенов (Richter et al., *Blood*, 128: 2206-2217, 2016; Wang et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 8: 52-64, 2018; Zhang et al., *PLoS One*, 8: e75344, 2013; Hausl et al., *Mol Ther*, 18: 1896-1906, 2010; и Yant et al., *Nat Biotechnol*, 20: 999-1005, 2002). Преимущество системы интеграции на основе SB100x состоит в том, что она не зависит от эффективной машинерии гомологичной репарации ДНК клетки. Последнее является критически важным в ГСКП, которые демонстрируют низкую активность ферментов репарации и рекомбинации ДНК (Beerman et al., *Cell Stem Cell*, 15: 37-50, 2014). Было продемонстрировано, что совместное *in vivo* инфицирование ГСК транспозонным вектором HDAd35++ и экспрессирующим SB100x/Flpe вектором у CD46-трансгенных мышей (Richter et al., *Blood*, 128: 2206-2217, 2016; Wang et al., *J Clin Invest*, 129: 598-615, 2019; Li et al., *Mol Ther*, 27: 2195-2212, 2019; Li et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 9: 142-152, 2018; и Wang et al., *J Virol*, 79: 10999-11013, 2005) и в человеческих CD34+ клетках (Li et al., *Mol Ther*, 27: 2195-2212, 2019) приводило к случайной интеграции трансгена 2 копий трансгена/клетка без предпочтения в отношении генов.

[0815] Человеческий геном упорядочен в виде 3-D структуры с взаимодействиями дальнего порядка между регуляторными областями (т. е. сайтами связывания факторов транскрипции), обычно посредством образования петель. Большинство этих взаимодействий происходят в контексте топологически соединяющихся доменов (ТСД). ТСД считаются функциональными единицами хромосомной организации, в которых энхансеры взаимодействуют с другими регуляторными областями, контролируя транскрипцию. Считается, что разделение на границе ТСД/LCR ограничивает

пространство поиска энхансеров и промоторов и предотвращает формирование нежелательных регуляторных контактов. Границы с обеих сторон этих доменов являются консервативными среди разных типов клеток млекопитающих и даже среди разных видов.

[0816] Используемые в настоящее время лентивирусные и гAAV векторы генного переноса могут вмещать только небольшие энхансеры/промоторы, что часто приводит к субоптимальному уровню и тканевой специфичности экспрессии трансгена, сайленсингу трансгена и непредусмотренным взаимодействиям с регуляторными областями, окружающими сайт интеграции вектора. При наихудшем сценарии последнее может приводить к активации протоонкогенов.

[0817] Чтобы повысить безопасность и эффективность генной терапии для стратегий добавления генов следует использовать ТСД. Медианный размер ТСД составляет 880 т. о. С учетом дополнительного усовершенствования высокопродуктивного анализа фиксации конформации хромосом (3С) и его последующих протоколов 4С, 5С и Hi-C, а также анализа секвенирования фибера, изучение регуляторного генома будет быстро прогрессировать и, в целях генной терапии, могло бы дать ТСД, которые содержат только критические коровые элементы. Область контроля локуса (LCR) β -глобина подпадает под определение ТСД.

[0818] Капсид-модифицированные векторы HDAd5/35++ использовали для *in vivo* генной терапии ГСКП (Li & Lieber, FEBS Lett. 593(24):3623-48, 2019; Richter et al., Blood. 128(18):2206-17, 2016). Этот подход включает мобилизацию ГСКП из костного мозга и, пока они циркулируют в больших количествах в периферии, внутривенно вводят векторы HDAd5/35++. Эти векторы нацелены на человеческий CD46, рецептор, который экспрессируется на примитивных ГСКП (Richter et al., Blood. 128(18):2206-17, 2016). Трансдуцированные ГСКП возвращаются в костный мозг, в котором они присутствуют в течение длительного периода. Случайная интеграция опосредуется транспозазой Sleeping Beauty с повышенной активностью (SB100x) (Boehme et al., Mol Ther Nucleic Acids. 5(7):e337, 2016). Нацеленная интеграция может быть обеспечена посредством гомологичной репарации ДНК (Li et al., Mol Ther. 27(12):2195-212, 2019). Этот подход приводил к уменьшению интенсивности мышшиной промежуточной талассемии (Wang et al., J Clin Invest. 129(2):598-615, 2019), коррекции мышшиной гемофилии (Wang et al., Blood Adv. 3(19):2883-94, 2019) и обращению спонтанного рака (Li et al., Cancer Res. 80(3):549-560, 2019). Первые данные по отличным от человека приматам показывают, что подход *in vivo* генной терапии ГСКП является безопасным в комбинации с предварительной обработкой глюкокортикоидом, антагонистом рецепторов IL6 и IL1 β для подавления врожденных иммунных ответов после внутривенной инъекции HDAd5/35++ (Li et al., 23rd

Annual ASGCT meeting. 2020; abstract № 546). Внутривенная инъекция векторов HDAd5/35++ не приводила к экспрессии трансгена в тканях, отличных от мобилизованных ГСКП и МКПК у мышей CD46tg на 3 день после инъекции (Richter et al., Blood. 128(18):2206-17, 2016; Wang et al., J Clin Invest. 129(2):598-615, 2019). Это недавно было подтверждено на отличных от человека приматах. Потенциальным объяснением этого тропизма является то, что плотность и доступность рецептора CD46 являются недостаточно высокими в негемопоезических тканях, чтобы обеспечить эффективную вирусную трансдукцию (Richter et al., Blood. 128(18):2206-17, 2016; Ni et al., Hum Gene Ther. 16(6):664-77, 2005).

[0819] В предыдущем исследовании с векторами HDAd5/35++ использовали 4,3 т. о. HS1-HS4 мини-LCR (область контроля локуса β -глобина) в комбинации с 0,66 т. о. промотором β -глобина для управления экспрессией человеческого γ -глобина после *in vivo* трансдукции ГСКП (Wang et al., J Clin Invest. 129(2):598-615, 2019; Ong et al., Exp Hematol. 34(6):713-20, 2006). У талассемических мышей Hbb^{th3}/CD46^{+/+} было достигнуто стабильное (8+ месяцев) присутствие γ -глобина практически в 100% эритроцитов периферической крови и практически полная фенотипическая коррекция (Wang et al., J Clin Invest. 129(2):598-615, 2019). Однако уровень экспрессии γ -глобина составлял только 10-15% от уровня взрослого мышиноного α -глобина со средним числом копий интегрированного вектора (ЧКВ) 2 копии на клетку, тем самым делая переход к клиническому применению этого подхода для талассемии или СКА исключительно затруднительным. В данном документе использовали большую емкость векторов HDAd5/35++ путем включения коровых элементов ТСД β -глобина, включая экспрессионную кассету γ -глобина длиной 29 т. о., для достижения полной фенотипической коррекции.

[0820] В этом контексте другим намерением было продемонстрировать, что система SB100x может опосредовать эффективную интеграцию 32,4 т. о. транспозона. На основании данных исследований с плазмидными системами SB считалось, что активность интеграции SB негативно коррелирует с длиной транспозона (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 9:142-52, 2018; Karsi et al., Mar Biotechnol (NY). 3(3):241-5, 2001). С учетом этого, первые векторы HDAd на основе SB, разработанные группами Kay и Ehrhardt, несли относительно небольшие (4 т. о. - 6 т. о.) транспозоны (Turchiano et al., PLoS One. 9(11):e112712, 2014; Yant et al., Nat Biotechnol. 20(10):999-1005, 2002).

[0821] Недавно с помощью векторов HDAd5/35++ была продемонстрирована эффективная SB100x-опосредованная интеграция 10,8 т. о. (Wang et al., Blood Adv. 3(19):2883-94, 2019) и 11,8 т. о. (Wang et al., J Clin Invest. 129(2):598-615, 2019; Ong et al.,

Exp Hematol. 34(6):713-20, 2006) транспозонов в ГСКП после ex vivo или in vivo трансдукции ГСКП. Этот пример предоставляет доказательство того, что векторная система SB100x на основе HDAd5/35++ может обеспечивать интеграцию 32,4 т. о. транспозона.

[0822] В целом эти in vivo исследования на нормальных и талассемических мышцах, а также in vitro исследования с человеческими CD34+ клетками показывают, что описанный содержащий длинную LCR вектор HDAd5/35++ может быть эффективным терапевтическим инструментом для лечения гемоглобинопатий.

[0823] *Материалы и методы.*

[0824] **Позиции компонентов:** HS5□HS1 (21,5 т. о.): Xp11, 5292319□5270789; β-промотор: Xp11, 5228631□5227023; и 3'HS1: Xp11, 5206867□5203839.

[0825] **Векторы HDAd:** Создание вектора HDAd-SB и HDAd-короткая-LCR было описано ранее (Richter et al., Blood 128: 2206-2217, 2016; Ong et al., Exp Hematol 34(6):713-20, 2006). Для создания вектора HDAd-длинная-LCR в основе соответствующих челночных плазмид лежал космидный вектор pWE15 (Stratagene, La Jolla, CA). pWE.Ad5-SB-mgmt содержит 5'ИКП Ad5 (нуклеотиды 1-436) и 3'ИКП (нуклеотиды 35741-35938), кассету промотора человеческого EF1α mgmt^{P140K}-SV40pA-cHS4, полученную из pBS-μLCR-γ-глобин-mgmt (Wang et al., J Clin Invest 129: 598-615, 2019), SB100x-специфические сайты ИП/ПП и сайты FRT. Фрагмент GFP-BGHpA в pAd.LCR-β-GFP (содержащем 21,5 т. о. LCR β-глобина человека (Hudecek et al., Crit Rev Biochem Mol Biol 52(4):355-380, 2017) был замещен геном человеческого γ-глобина и его 3'НТО областью (Xp11:5247139 → 5249804) (pAd-длинная-LCR-β-γ-глобин). Плаزمида pAd-длинная-LCR-β-γ-глобин содержит 21,5 т. о. LCR β-глобина человека и 3,0 т. о. 3'HS1 β-глобина человека. 28,9 т. о. фрагмент, содержащий LCR-β-γ-глобин-3'HS1, вставляли ниже кассеты EF1α-mgmt-SV40pA-cHS4 в pWE.Ad5-SB-mgmt (pWE.Ad5-SB-длинная-LCR-γ-глобин/mgmt). Полная кассета длинная-LCR-γ-глобин/mgmt фланкировалась SB100x-специфическими сайтами ИП/ПП и сайтами FRT. Полученные в результате плазмиды упаковывали в фаги, используя Gigapack III плюс пакующий экстракт (Stratagene, La Jolla, CA), и размножали. Для создания вируса HD-Ad-длинная-LCR-γ-глобин/mgmt вирусные геномы высвобождали из плазмиды расщеплением I-SceI для сохранения в клетках 116. В человеческой популяции существуют два известных варианта гена HBG1 с одной аминокислотной вариацией (76-изолейцин или 76-треонин). Использовали вариант 76-Пе HBG1, который имеет диапазон частоты от 13% у европейцев до 73% у восточных азиатов.

[0826] Для создания вирусов HDAd вирусные геномы высвобождали из плазмиды

расщеплением FseI для сохранения в клетках 116 (Palmer et al., Mol Ther 8: 846-852, 2003) с хелперным вирусом Ad5/35+-Acr. Это хелперный вирус является производным AdNG163-5/35++, хелперного вектора Ad5/35++, содержащего химерные фибры, состоящие из хвоста фибера Ad5, стержня фибера Ad35 и головки фибера Ad35++ с повышенной аффинностью (Richter et al., Blood 128: 2206-2217, 2016). Синтезировали человеческую кодон-оптимизированную последовательность AcrIIA4-T2A-AcrIIA2, которая, согласно недавним данным, ингибирует активность SpCas9 (Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA. 92(25):11608-12, 1995), и клонировали в челночную плазмиду pBS-CMV-pA (pBS-CMV-Acr-pA). После этого 2,0 т. о. кассету CMV-Acr-pA амплифицировали из pBS-CMV-Acr-pA и вставляли в сайты SmaI pNG163-2-5/35++ (Richter et al., Blood 128: 2206-2217, 2016) с помощью набора для клонирования In-Fusion HD (Takara). Затем вирусный геном высвобождали расщеплением PacI, а хелперный вирус Ad5/35+-Acr сохраняли и размножали в клетках 293 (HEK293). Создание HDAd-SB было описано ранее (Richter et al., Blood 128: 2206-2217, 2016). Уровни загрязнения хелперным вирусом составляли менее 0,05%. все препараты не содержали бактериальные эндотоксины.

[0827] **Культивирование клеток CD34⁺**: CD34⁺ клетки от G-CSF-мобилизованных взрослых доноров восстанавливали из замороженных материалов и инкубировали в течение ночи в среде Дульбекко в модификации Искова (IMDM), дополненной 10% термоинактивированной ФТС, 1% БСА, 0,1 ммоль/л 2-меркаптоэтанола, 4 ммоль/л глутамина и пенициллина/стрептомицина, лигандом Flt3 (Flt3L, 25 нг/мл), интерлейкином 3 (10 нг/мл), тромбопоэтином (ТРО) (2 нг/мл) и фактором стволовых клеток (SCF) (25 нг/мл). Проточная цитометрия продемонстрировала, что > 98% клеток были CD34⁺. Цитокины и факторы роста были от Peprotech (Rocky Hill, NJ). CD34⁺ клетки трансдуцировали вирусом в 12-луночных планшетах с низким присоединением.

[0828] **Эритроидная дифференцировка in vitro**: Дифференцировку человеческих ГСКП в эритроидные клетки проводили на основании протокола, описанного в Douay et al. (Methods Mol Biol 482: 127-140, 2009). Вкратце, на этапе 1 клетки при плотности 10⁴ клеток/мл инкубировали в течение 7 дней в IMDM, дополненной 5% человеческой плазмой, 2 МЕ/мл гепарина, 10 мкг/мл инсулина, 330 мкг/мл трансферрина, 1 мкМ гидрокортизона, 100 нг/мл SCF, 5 нг/мл IL-3, 3 Е/мл эритропоэтина (Еро), глутамином и пенициллином-стрептомицином. На этапе 2 клетки при плотности 1×10⁵ клеток/мл инкубировали в течение 3 дней в IMDM, дополненной 5% человеческой плазмой, 2 МЕ/мл гепарина, 10 мкг/мл инсулина, 330 мкг/мл трансферрина, 100 нг/мл SCF, 3 Е/мл Еро, глутамином и пенициллином/стрептомицином. На этапе 3 клетки при плотности 1×10⁶ клеток/мл инкубировали в течение 12 дней в IMDM, дополненной 5% человеческой

плазмой, 2 МЕ/мл гепарина, 10 мкг/мл инсулина, 330 мкг/мл трансферрина, 3 Е/мл Ерo, глутамином и пенициллином/стрептомицином.

[0829] **In vitro отбор трансдуцированных CD34+ клеток:** Отбор трансдуцированных CD34+ клеток проводили с помощью O⁶BG/VCNU на 5 день этапа 1 протокола in vitro дифференцировки. Вкратце, CD34+ клетки инкубировали с 50 мкМ O⁶BG в течение одного часа, а затем инкубировали с 35 мкМ VCNU еще в течение двух часов, затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в свежей среде с этапа 1.

[0830] **Культивирование Lin⁻ клеток:** Отрицательные по линии дифференцировки клетки выделяли из общих клеток костного мозга мышей методом MACS, используя набор для истощения клеток по линии дифференцировки от Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Lin⁻ клетки культивировали в IMDM, дополненной 10% ФТС, 10% БСА, пенициллином-стрептомицином, глутамином, 10 нг/мл человеческого ТРО, 20 нг/мл мышиного SCF и 20 нг/мл человеческого Flt-3L.

[0831] **ВЭЖХ глубина:** Уровни отдельных цепей глубина количественно оценивали на приборе Shimadzu Prominence с детектором на диодной матрице SPD-10AV и двухканальным насосом LC-10AT (Shimadzu, Kyoto, Japan). 40%-60% градиент смеси 0,1% трифторуксусной кислоты в воде/ацетонитриле применяли при скорости 1 мл/мин, используя обращенно-фазовую колонку C4 Vydac (Hichrom, UK).

[0832] **Проточная цитометрия:** Клетки ресуспендировали при 1×10^6 клеток/100 мкл в ФСБ, дополненном 1% ФТС, и инкубировали с FcR-блокирующим реагентом (Miltenyi Biotec, Auburn CA) в течение десяти минут на льду. После этого добавляли окрашивающий раствор антител в 100 мкл на 10^6 клеток и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. После инкубации клетки один раз промывали в буфере FACS (ФСБ, 1% ФБС). Этап окрашивания повторяли со вторичным окрашивающим раствором. После промывки клетки ресуспендировали в буфере FACS и анализировали, используя проточный цитометр LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA). Дебрис исключали, используя гейтинг на основе площади прямого рассеяния и площади бокового рассеяния. Затем проводили гейтинг одиночных клеток, используя высоту прямого рассеяния и ширину бокового рассеяния. Затем анализировали данные проточной цитометрии, используя FlowJo (версия 10.0.8, FlowJo, LLC). Для проточного анализа клеток LSK клетки окрашивали биотин-конъюгированным коктейлем для выявления линии дифференцировки (кат. №: 130-092-613; Miltenyi Biotec, San Diego, CA) и антителами против c-Kit (кат. №:12-1171-83) и Sca-1 (кат. №: 25-5981-82), а также APC-конъюгированным стрептавидином. Другие антитела от eBioscience (San Diego, CA) включали антитело к мышиному LY-6A/E (Sca-1)-PE-Cyanine7 (клон D7), антитело к

мышинному CD117 (c-Kit)-PE (клон 2B8), антитело к мышинному CD3-APC (клон 17A2; кат. №: 17-0032-82), антитело к мышинному CD19-PE-Cyanine7 (клон eBio1D3; кат. №: 25-0193-82) и антитело к мышинному Ly-66 (Gr-1)-PE, (клон RB6-8C5; кат. №: 12-5931-82). Антитело к мышинному Ter-119-APC (клон: Ter-119; кат. №: 116211) было от Biolegend (San Diego, CA).

[0833] **Внутриклеточная проточная цитометрия для выявления экспрессии человеческого γ -глобина:** Использовали набор для пермеабиллизации клеток FIX & PERMTM (Nordic Immunological Laboratories, Susteren, Netherlands) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и придерживались протокола производителя. Вкратце, 1×10^6 клеток ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS (ФСБ, дополненный 1% ФТС), добавляли 100 мкл реагента А (среда для фиксации) и инкубировали в течение 2-3 минут при комнатной температуре, затем добавляли 1 мл предварительно охлажденного абсолютного метанола, смешивали и инкубировали на льду в темноте в течение 10 минут. Затем образцы промывали буфером FACS и ресуспендировали в 100 мкл реагента В (среда для пермеабиллизации) и 0,3 мкг антитела к гемоглобину γ (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, кат. № sc-21756 PE), инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывки клетки ресуспендировали в буфере FACS и анализировали. Стратегия гейтинга данных проточной цитометрии приведена на Фиг. 46.

[0834] **ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени:** Общую РНК выделяли из 50-100 мкл крови, используя реагент TRIzolTM (Thermo Fisher Scientific), придерживаясь рекомендованного производителем метода фенольно-хлороформной экстракции. Использовали набор для обратной транскрипции Quantitect (Qiagen) и мастер-микс для ПЦР Power SYBRTM green (Thermo Fisher Scientific). Количественную ПЦР в реальном времени проводили на системе для ПЦР в реальном времени StepOnePlus (AB Applied Biosystems). Использовали следующие пары праймеров: мышинный RPL10 (конститутивный) прямой (SEQ ID NO: 189) и обратный (SEQ ID NO: 190); человеческий γ -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 191) и обратный (SEQ ID NO: 192); мышинный β -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 193) и обратный (SEQ ID NO: 194), мышинный α -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 212) и обратный (SEQ ID NO: 213).

[0835] **Измерение числа копий вектора:** Общую ДНК из клеток костного мозга выделяли, используя набор Quick-DNA miniprep (Zymo Research). Вирусную ДНК, выделенную из вируса HDAd-короткая LCR- γ -глобин/mgmt, серийно разводили и использовали для стандартной кривой. кПЦР проводили в трех повторах, используя мастер-микс для ПЦР power SYBR Green, на системе для ПЦР в реальном времени StepOnePlus (Applied Biosystems). 9,6 нг ДНК (9600 пг/6 пг/клетка=1600 клеток)

использовали для 10 мкл реакции. Использовали следующие пары праймеров: человеческий γ -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 195) и обратный (SEQ ID NO: 196).

[0836] **Анализ сайтов интеграции.** Описание этой процедуры смотрите на Фиг. 27. Рандомизированные данные для Фиг. 28D создавали, используя модель вставки на основе регрессии Пуассона (PRIM), чтобы рассчитать ожидаемый уровень вставки для неперекрывающихся окон по 20 тысяч оснований вдоль длины каждой хромосомы в эталонном мышинном геноме (mm9). Алгоритм PRIM генерировал статистическую модель на основании числа динуклеотидов ТА в рамках каждого окна, хромосомы, в которой находится окно, и общего числа уникальных вставок. Для каждого окна рассчитывали ожидаемое число вставок и сравнивали с наблюдаемым числом вставок для получения *p*-значения. Затем применяли поправку Бонферрони, чтобы идентифицировать окна, которые демонстрировали повышенное количество выявленных вставленных транспозонов. Затем генерировали случайные последовательности из эталонного генома, содержащие ТА, картировали, используя Bowtie2, и строили график зависимости от реальных данных по интеграции. Расчеты и графики делали, используя ggplot2 в R. Фигуры рисовали, используя HOMER и ChIPseeker.

[0837] **Анализ сайтов интеграции (инвертированная ПЦР).** Соединения в общих клетках костного мозга анализировали методом инвертированной ПЦР, описанным в другом месте, с модификациями (Hudecek et al., Crit Rev Biochem Mol Biol 52(4):355-80, 2017). Вкратце, геномную ДНК из клеток костного мозга выделяли с помощью набора Quick-DNA miniprep (Zymo Research), следуя инструкциям производителя. 5-10 мкг ДНК расщепляли SacI и повторно лигировали в условиях, которые стимулируют внутримолекулярную реакцию. Смесь для лигирования очищали методом фенольно-хлороформной экстракции и осаждения в этаноле, а затем использовали для гнездовой ПЦР (30 циклов каждого), используя ДНК-полимеразу KOD Hot Start. Использовали следующие праймеры: прямой (SEQ ID NO: 197) и обратный EF1 α p1 (SEQ ID NO: 198); прямой (SEQ ID NO: 199) и обратный EF1 α p2 (SEQ ID NO: 200); прямой (SEQ ID NO: 201) и обратный 3'HS1 p1 (SEQ ID NO: 202); и прямой (SEQ ID NO: 203) и обратный 3'HS1 p2 (SEQ ID NO: 204). В SEQ ID NO: 197-204 подчеркнутые основания используются для последующего клонирования. ПЦР-ампликоны очищали в геле, клонировали, секвенировали и выравнивали, чтобы идентифицировать сайты интеграции.

[0838] **Анализ РНК-секвенирования** был проведен Omega Bioservices (Norcross, GA). Данные были проанализированы с помощью Rosalind (доступной на rosalind.onramp.bio/) с архитектурой HyperScale, разработанной OnRamp BioInformatics, Inc. (San Diego, CA). Считывания обрезали, используя cutadapt. Оценку качества

получали, используя FastQC. Считывания отдельных образцов количественно оценивали, используя HTseq4, и нормализовали с помощью относительно логарифмической экспрессии (RLE), используя библиотеку DESeq2 R. DESeq2 также использовали для расчета кратности изменения и р-значений и проведения необязательной ковариационной коррекции. Кластеризацию генов для финальной тепловой карты дифференциально экспрессируемых генов делали, используя метод PAM (разделение вокруг медоидов), используя библиотеку fpc R. Для анализа обогащения обращались к нескольким базам данных, включая Interpro9, NCBI10, MSigDB11,12, REACTOME13, WikiPathways. Обогащение рассчитывали относительно группы фоновых генов, релевантных для этого эксперимента.

[0839] Вулканную диаграмму создавали с помощью специального скрипта Python, который строит график кратности изменения в логарифмической шкале от р-значений.

[0840] **Животные:**

[0841] **Разрешение на исследование:** Все эксперименты, включающие животных, проводили с соответствии с институциональными руководствами, установленными Университетом Вашингтона. Университет Вашингтона является аккредитованным Международной ассоциацией по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных (AALAC) исследовательским институтом, а вся работа с живыми животными, проводимая в этом университете, проводится в соответствии с политикой обеспечения общественного здравоохранения (PHS) Управления защиты лабораторных животных (OLAW), законом и нормами по благополучию животных USDA, руководством по содержанию и использованию лабораторных животных и политикой исполнительного Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC). Эти исследования были разрешены IACUC Университета Вашингтона (протокол № 3108-01).

[0842] Исследования *ex vivo* и *in vivo* трансдукции ГСКП проводили на трансгенной мышью модели на основе C57Bl/6 (hCD46tg), которая содержала полный локус CD46 человека. Эти мыши экспрессируют hCD46 с профилем и уровнем, аналогичными человеческим (Wang et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 8:52-64, 2018).

[0843] **Скращивание и скрининг мышей Hbb^{th3}/CD46^{+/+}:** После трех раундов обратного скрещивания гомозиготность мышей Hbb^{th3} в отношении CD46 подтверждали методом ПЦР на гДНК (используя праймеры CD46F-5' (SEQ ID NO: 205) и CD46R (SEQ ID NO: 206), а также методом проточной цитометрии, которая позволяла измерять СИФ CD46. Талассемический фенотип мышей Hbb^{th3}/CD46^{+/+} оценивали по мазкам периферической крови после окрашивания красителем Гимза/Мэй - Грюнвальда, как описано ниже.

[0844] **Трансплантация Lin⁻ клеток костного мозга:** Реципиентами были самки мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель. В день трансплантации мышей-реципиентов облучали дозой 1000 рад. Через четыре часа после облучения 1×10^6 Lin⁻ клеток вводили внутривенно через хвостовую вену. Этот протокол использовали для трансплантации ex vivo трансдуцированных Lin⁻ клеток и для трансплантации вторичным реципиентам.

[0845] **Мобилизация ГСКП и in vivo трансдукция:** Эта процедура была описана ранее в Richter, et al., (2016) Blood 128: 2206-2217. ГСКП мобилизовали у мышей путем п/к инъекций человеческого рекомбинантного G-CSF (5 μ г/мышь/день, 4 дня) (Amgen Thousand Oaks, CA) с последующей п/к инъекцией AMD3100 (5 мг/кг) (Sigma-Aldrich) на день 5. Кроме того, животные получали дексаметазон (10 мг/кг) в/б за 16 ч и 2 ч до инъекции вируса. Через тридцать и 60 минут после AMD3100 животным внутривенно вводили векторы HDAd через ретро-орбитальное сплетение с дозой 4×10^{10} вч для каждого вируса на инъекцию. Через четыре недели начинали in vivo отбор O⁶BG/BCNU.

[0846] **Вторичная трансплантация костного мозга:** Реципиентами были самки мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель от Jackson Laboratory. В день трансплантации мышей-реципиентов облучали дозой 1000 рад. Клетки костного мозга от in vivo трансдуцированных мышей CD46tg выделяли асептически, а истощенные по линии дифференцировки клетки выделяли, используя MACS. Через четыре часа после облучения клетки внутривенно инъецировали при 1×10^6 клеток на мышь. На 20 неделе вторичных реципиентов умерщвляли и выделяли CD46⁺ клетки из крови, костного мозга и селезенки методом MACS или подвергали мобилизации и in vivo трансдукции, как описано выше. Все вторичные реципиенты получали иммуносупрессию, начиная с недели 4.

[0847] **Гематологический анализ:** Образцы крови собирали в покрытые ЭДТА пробирки и проводили анализ на приборе HemaVet 950FS (Drew Scientific).

[0848] **Анализ тканей:** Срезы тканей селезенки и печени толщиной 2,5 мкм фиксировали в 4% формальдегиде в течение по меньшей мере 24 часов, дегидратировали и заливали в парафин. Окрашивание гематоксилином и эозином использовали для гистологической оценки экстрамедуллярного гемопоэза. Гемосидерин был выявлен в срезах тканей посредством окрашивания берлинской лазурью по Перлсу. Вкратце, срезы тканей обрабатывали смесью одинаковых объемов (2%) ферроцианида калия и хлористоводородной кислоты в дистиллированной воде, а затем проводили контрокрашивание нейтральным красным. Для количественной оценки внеклеточного гемопоэза и гемосидероза исследователи, которые не имели информации относительно групп мышей, оценивали 10 случайных участков в 5 разных срезах тканей от по меньшей мере 3 животных. Размер селезенки оценивали как отношение масса селезенки (мг)/масса

тела (г).

[0849] **Анализ крови и цитоцентрифугаты костного мозга:** Образцы крови собирали в покрытые ЭДТА пробирки и проводили анализ на приборе HemaVet 950FS (Drew Scientific, Waterbury, CT). Мазки периферической крови и цитоцентрифугаты костного мозга окрашивали красителем Гимза/Мэя - Грюнвальда/Гимза (Merck, Darmstadt, Germany) в течение 5 и 15 минут, соответственно. Ретикулоциты окрашивали бриллианткрезил синим. Исследователи, которые подсчитывали ретикулоциты в мазках крови, не имели информации о распределении групп образцов. На слайдах были только номера животных (5 слайдов на животное, 5 случайных 1 см² срезов).

[0850] **Статистический анализ:** Данные представлены в виде среднего \pm стандартная погрешность среднего (СПС). Для сравнения множества групп использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Бонферрони для множественного сравнения. Разницу между группами для одной группирующей переменной определяли с помощью неспаренного двухстороннего t-критерия Стьюдента. Для непараметрического анализа использовали критерий Крускала - Уоллиса. Статистический анализ проводили, используя GraphPad Prism версии 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 00,0001$. Р-значение менее 0,05 считали статистически значимым.

[0851] **Результаты.**

[0852] В качестве модели для исследований *in vivo* трансдукции внутривенно вводимыми векторами HDAd5/35++ использовали трансгенных мышей, которые содержат полный локус CD46 человека и, следовательно, экспрессируют hCD46 с профилем и уровнем, сходными с человеческими (мыши hCD46tg) (Kemper, et al., (2001) Clin Exp Immunol 124: 180-189).

[0853] **Вектор HDAd5/35++, содержащий длинную LCR β -глобина.** В исследованиях, описанных в примере 1, использовали вектор HDAd5/35++ (Фиг. 23, «HDAd-короткая-LCR») (Wang et al., J Clin Invest 129: 598-615, 2019), экспрессирующий γ -глобин под управлением 4,3 т. о. мини-LCR (включающей коровые элементы HS1-HS4 (Lisowski et al., Blood 110: 4175-4178, 2007)), связанной с 1,6 т. о. промотором β -глобина (Wang et al., J Clin Invest 129: 598-615, 2019; Li, et al., () Mol Ther Methods Clin Dev 9: 142-152, 2018). В данном примере конструировали вектор HDAd5/35++, который содержал следующие элементы, чтобы максимизировать экспрессию гена γ -глобина: i) 21,5 т. о. LCR, содержащую полноразмерные области HS5-HS1, ii) 1,6 т. о. промотор β -глобина, iii) 3'НТО β -глобина для стабилизации мРНК γ -глобина и iv) область 3' HS1. Этот вектор был назван HDAd-длинная-LCR (Фиг. 23, «HDAd-длинная-LCR»). Для опосредования

интеграции LCR-векторы используют в комбинации с экспрессирующими SB100x/F1ре векторами HDAd (Фиг. 23, «HDAd-SB»). Транспозонные векторы (HDAd-короткая-LCR и HDAd-длинная-LCR) содержат мотивы инвертированных/прямых повторов (ИП/ПП), которые распознаются траспозазой SB100x, и сайты *frt*, которые делают возможной циркуляризацию кассеты трансгена в присутствии рекомбиназы F1ре. Как HDAd-короткая-LCR, так и HDAd-длинная-LCR также несли ген мутантной O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*mgmt*^{P140K}) под контролем универсально активного промотора EF1a, чтобы сделать возможным отбор стабильно трансдуцированных клеток путем обработки низкой дозой O⁶BG/BCNU (Hausl et al., *B. Mol Ther* 18(11):1896-906, 2010; Neff et al., *J Clin Invest* 112(10):1581-8, 2003).

[0854] Исследование **ex vivo** трансдукции/трансплантации ГСКП. Хотя у людей CD46 экспрессируется на всех ядродержащих клетках, соответствующий ортолог у мышей присутствует только в семенниках. В качестве модели для исследований *in vivo* трансдукции внутривенно вводимыми векторами HDAd5/35++ использовали трансгенных мышей, которые содержали полный локус CD46 человека и, следовательно, экспрессировали hCD46 с профилем и уровнем, сходными с человеческими (CD46tg мыши) (Wang et al., *Mol Ther Methods Clin Dev* 8:52-64, 2018). Поскольку априори было неизвестно, может ли SB100x опосредовать интеграцию 32,4 т. о. транспозона, проводили исследования *ex vivo* трансдукции ГСКП в условиях, в которых можно было контролировать эффективность трансдукции ГСКП. Отрицательные по линии дифференцировки клетки костного мозга (Lin⁻) мышей CD46tg, фракцию клеток, обогащенную в отношении ГСКП, трансдуцировали *ex vivo*, используя HDAd-длинная-LCR+HDAd-SB (Фиг. 24А). *Ex vivo* трансдуцированные клетки затем трансплантировали мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения. Уровни приживаемости на 4 неделе составляли > 95% на основании CD46-положительных МКПК. Через один месяц после трансплантации мышей подвергали четырем раундам обработки O⁶BG/BCNU для избирательного размножения предшественников интегрированными трансгенами γ -глобин/*mgmt* (Фиг. 24А). С каждым раундом *in vivo* отбора процентное содержание γ -глобин-положительных периферических красных клеток крови (RBC) повышалось, достигая > 95% к концу исследования (Фиг. 24В). На 20 неделе животных умерщвляли и анализировали мононуклеарные клетки (МНК) костного мозга. Среднее ЧСВ, измеренное методом кПЦР, составляло 2,8 копии на клетку. Экспрессия γ -глобина была выявлена методом проточной цитометрии в 85,46(+/-5,9) % эритроидных Ter119⁺ клеток и в 14,54(+/-2,3) % неэритроидных (Ter119⁻) МНК костного мозга (Фиг. 24С).

[0855] Чтобы продемонстрировать, что источником экспрессии γ -глобина являются

интегрированные трансгены SB100x, проводили анализ методом инвертированной ПЦР (иПЦР) для геномной ДНК из мононуклеарных клеток (МНК) костного мозга на 20 неделе после трансплантации. Протокол иПЦР включает расщепление геномной ДНК SacI, этап повторного лигирования/циркуляризации, гнездовую ПЦР и секвенирование соединений вектор/хромосома (Фиг. 24D). На (Фиг. 24E) проиллюстрированы репрезентативные продукты ПЦР и расположение сайтов интеграции в хромосомах 4, 15 и X. Секвенирование продемонстрировало наличие соединений вектор/хромосома, типичных для опосредованной SB100x интеграции, включая динуклеотиды ТА в соединениях ИП/ПП вектора/хромосома (Фиг. 24F). В целом, в исследовании *ex vivo* трансдукции ГСКП длинная LCR глобина обеспечивала экспрессию γ -глобина на высоком уровне из интегрированных транспозонов SB100x.

[0856] **In vivo трансдукция ГСКП у трансгенных мышей CD46b векторами HDAd5/35++, содержащими короткие и длинные LCR.** Проводили параллельное сравнение HDAd-длинная-LCR и вектора, используемого ранее в примере 1 (Wang et al., J Clin Invest 129: 598-615, 2019; Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev 9: 142-152, 2018), содержащего мини-LCR (в данном документе называемого «HDAd-короткая-LCR») (Фиг. 23). CD46-трансгенных мышей мобилизовали G-CSF/AMD3100 и внутривенно инъецировали векторами, а через пять недель подвергали *in vivo* отбору (Фиг. 25A). Процентное содержание γ -глобин-положительных красных клеток крови (RBC) повышалось с каждым раундом *in vivo* отбора, достигая > 95% для обоих векторов на 20 неделе (Фиг. 25B). ВЭЖХ, проведенная на лизатах RBC из образцов 20 недели, не показала значительной разницы в процентном содержании γ -глобина/взрослого мышинового α -глобина между векторами (Фиг. 25C). Также это отображалось уровнем мРНК (Фиг. 25D).

[0857] Число копий вектора в мононуклеарных клетках (МНК) костного мозга, измеренное на 20 неделе методом кПЦР, составило 2,5 копии на клетку (Фиг. 25E) и значительно не отличалось между векторами. Это указывает на то, что интеграция «длинного» 32,4 т. о. транспозона была такой же эффективной, как интеграция «короткого» 11,8 т. о. транспозона. SB100x-опосредованная интеграция 32,4 т. о. транспозона после *in vivo* трансдукции ГСКП векторами не приводила к гематологическим аномалиям (неделя 20) несмотря на экспрессию γ -глобина в подавляющем большинстве эритроидных клеток (Фиг. 26B). Композиция клеток костного мозга (Фиг. 26C) и колониобразующий потенциал Lin⁻ клеток костного мозга (Фиг. 26D) не были значимо разными между группами.

[0858] Во вторичном трансплантате для демонстрации *in vivo* трансдукции и

SB100x-опосредованной интеграции в ГСКП с долгосрочной репопуляцией композиция клеток костного мозга (Фиг. 26C) и колониобразующий потенциал Lin^- клеток костного мозга (Фиг. 26D) не были значимо разными между группами. Трансплантированные Lin^- клетки костного мозга собирали на 20 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения без трансгена hCD46). Способность трансплантированных клеток обуславливать мультилинейное восстановление у вторичных реципиентов оценивали в течение периода 16 недель. Как и у «первичных» мышей с *in vivo* трансдуцированными ГСКП, эффект экспрессии глобина на высоком уровне на клеточную композицию костного мозга или гематологические параметры в периферической крови не наблюдали.

[0859] Lin^- клетки костного мозга, собранные на 20 неделе, также использовали для проведения полногеномного анализа сайтов интеграции. В этом анализе за этапом опосредованной линейной амплификацией ПЦР (ОЛА-ПЦР) следовало секвенирование интеграционных соединений (Фиг. 27). Распределение сайтов интеграции по мышиному геному проиллюстрировано на Фиг. 28A. Интегрированная кассета трансгена была должным образом обработана, а идентифицированные соединения ИП/ПП и хромосомы содержали динуклеотиды ТА (Фиг. 28B). Подавляющее большинство интеграций находились в межгенных и интронных областях с частотой 83% и 17%, соответственно (Фиг. 28C). Интеграция была случайной без преимущественной интеграции в любом заданном окне полного мышинного генома (Фиг. 28D). Не было обнаружено интеграции в протоонкогене или вблизи него. Этот профиль SB100x-опосредованной интеграции согласуется с предыдущими исследованиями (Richter et al., Blood 128(18):2206-17, 2016; Neff et al., J Clin Invest 112(10):1581-8, 2003; Kemper et al., Clin Exp Immunol. 124(2):180-9, 2001; Zhang et al., PLoS One 8(10):e75344, 2013; Yant et al., Nat Biotechnol 20(10):999-1005, 2002).

[0860] **Анализ вторичных реципиентов.** Чтобы продемонстрировать, что *in vivo* трансдукция происходила в ГСКП с долгосрочной репопуляцией, Lin^- клетки костного мозга, собранные на 20 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП, трансплантировали с HDAd-короткая-LCR и HDAd-длинная-LCR мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения (без трансгена hCD46). Способность трансплантированных клеток обуславливать мультилинейное восстановление у вторичных реципиентов оценивали в течение периода 16 недель. Уровни приживления на основании экспрессии CD46 в МКПК составляли 95% и оставались стабильными (Фиг. 29A). Присутствие γ -глобина в RBC, измеренное методом проточной цитометрии, находилось в диапазоне 90-95% и было стабильным (Фиг. 29B). Между двумя векторами не было значительной разницы в

процентном содержании γ -глобин⁺ RBC. Среднее число копий интегрированного вектора также значительно не отличалось между двумя векторами, что указывает на то, что интеграция обоих транспозонов в клетках с долгосрочной репопуляцией была одинаково эффективной (Фиг. 29С). Что интересно, процентное содержание γ -глобина относительно цепей мышинового взрослого глобина повышалось со временем для вектора HDAd-длинная-LCR, достигая 20-25% мышинового α -глобина (Фиг. 29D и 29E). В противоположность этому, процентное содержание γ -глобина/мышинового α -глобина у вторичных реципиентов трансдуцированных HDAd-короткая-LCR клеток костного мозга не повышалось. Процентное содержание экспрессирующих γ -глобин эритроидных клеток было значительно выше для HDAd-длинная-LCR (Фиг. 29F). В дополнение к обеспечению высоких уровней экспрессии γ -глобина, длинная LCR также обеспечивала более строгую эритроид-специфическую экспрессию, на что указывает значительно большее процентное содержание экспрессирующих γ -глобин клеток костного мозга в эритроидной (Ter119⁺) фракции по сравнению с незритроидной фракцией (Ter119⁻) (Фиг. 27H). Число копий вектора на клетку в МНК костного мозга не имело статистически значимой разницы между HDAd-короткая-LCR и HDAd-длинная-LCR для образцов, полученных на 16 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП (Фиг. 27I). Как и у «первичных» мышей с *in vivo* трансдуцированными ГСКП, эффект экспрессии глобина на высоком уровне на клеточную композицию костного мозга или гематологические параметры в периферической крови не наблюдали (Фиг. 30А-30D).

[0861] **Сравнение двух векторов после трансдукции человеческих CD34⁺, *in vitro* отбора и эритроидной дифференцировки.** Функция LCR человеческого β -глобина в гетерологичной системе, такой как мышинные эритроидные клетки, могла быть субоптимальной вследствие отсутствия консервативности транскрипционных факторов, которые связываются с участками в пределах LCR. Поэтому проводили *in vitro* исследование в человеческих клетках (Фиг. 31А). Человеческие CD34⁺ клетки, полученные от GCSF-мобилизованных здоровых доноров, трансдуцировали HDAd-длинная-LCR+HDAd-SB или HDAd-короткая-LCR+HDAd-SB при общей МЗ 4000 вч/клетки, т. е. МЗ, которая обеспечивает трансдукцию большинства CD34⁺ клеток (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev 9: 390-401, 2018). Затем трансдуцированные клетки подвергали эритроидной дифференцировке (ЭД) и отбору O^bBG/BCNU в отношении клеток с интегрированными трансгенами. Во время размножения трансдуцированных клеток в течение 18 дней большинство эписомальных векторов было утрачено. В конце ЭД методом проточной цитометрии было обнаружено значительно большее процентное содержание γ -глобин⁺ безъядерных клеток (т. е. ретикулоцитов, которые утратили ядра)

для условия HDAd-длинная-LCR+HDAd-SB (Фиг. 31B). Анализ ВЭЖХ также продемонстрировал значительно большие уровни цепей γ -глобина в клетках, трансдуцированных HDAd-длинная-LCR+HDAd-SB (Фиг. 31C).

[0862] **Исследования in vivo трансдукции ГСКП HDAd-короткая-LCR в сравнении с HDAd-длинная-LCR и уровней γ -глобина в мышинной модели промежуточной талассемии.** Для этих исследований (на протяжении 4 раундов) мышей (CD46^{+/+}) скрещивали с мышами Hbb^{th3}, гетерозиготными в отношении делеции мышинного гена Hbb-бета1 и -бета2 (Yoshida et al., Sci Rep 7:43613, 2017). Полученные в результате мыши Hbb^{th3}/CD46^{+/+} имели типичный фенотип промежуточной талассемии (Wang et al., J Clin Invest, 129: 598-615. 2019). Мышей Hbb^{th3}/CD46^{+/+} мобилизовали, внутривенно инъецировали векторными системами HDAd-длинная-LCR и HDAd-короткая-LCR, а через четыре недели подвергали in vivo отбору (Фиг. 32A и 32E). Что важно, присутствие γ -глобина в красных клетках периферической крови в среднем составляло 40% уже после второго цикла in vivo отбора, достигало > 90% у 9 из 10 мышей после третьего цикла и выходило на плато практически 100% у всех мышей на 12 неделе после in vivo трансдукции HDAd-длинная-LCR (Фиг. 32B и 32F). В противоположность этому, в случае мышей, трансдуцированных HDAd-короткая-LCR, было необходимо четыре цикла in vivo отбора для достижения 100% присутствия γ -глобина в RBC у 2 из 7 мышей, при этом 100% присутствие было достигнуто только на 16 неделе после трансдукции. При 100% уровне присутствия процентное содержание человеческого γ -глобина относительно цепей взрослого мышинного α -глобина (измеренное методом ВЭЖХ) повышалось со временем для обоих векторов (наиболее вероятно из-за фона заболевания), достигая среднего значения 22% (макс.: 35%) и 11% (макс: 19%) к 16 неделе после in vivo трансдукции HDAd-длинная-LCR и HDAd-короткая-LCR, соответственно (Фиг. 32G и 32H; Фиг. 32C и 32D в отношении данных недели 21). Аналогично тому, что наблюдали у мышей CD46tg, анализ мононуклеарных клеток костного мозга показал сравнимое ЧКВ для обоих векторов и более высокие уровни экспрессии глобина в эритроидных клетках для HDAd-длинная-LCR (Фиг. 33). В целом, эти данные демонстрируют преимущество HDAd-длинная-LCR над HDAd-короткая-LCR за счет i) необходимости менее интенсивного in vivo отбора для достижения 100% присутствия и ii) достижения уровней γ -глобина в RBC, которые, в теории, должны обеспечивать излечение у пациентов с СКА и большой талассемией.

[0863] **Коррекция гематологических параметров.** Фенотипическая коррекция проиллюстрирована в разные моменты времени. Приведены микрофотографии со сравнением нормализованной морфологии эритроцитов мышей C57BL6 и Townes с СКА

до обработки и на 10 неделе после обработки длинной LCR (Фиг. 34) и микрофотографии, иллюстрирующие нормализованный эритропоэз (число ретикулоцитов) для мышей Townes до обработки и мышей Townes на 10 неделе после обработки длинной LCR (Фиг. 35). Проиллюстрирована морфология клеток крови, окрашенных красителем Гимза и красителем Мэй - Грюнвальда, на 14 неделе (Фиг. 36А). На 16 неделе после обработки мышей умерщвляли. Показателем обращения талассемического фенотипа в мазках периферической крови обработанных мышей $Hbb^{th3}/CD46^{+/+}$ является то, что гипохромные, высокофрагментированные и анизопойкилоцитарные исходные RBC были замещены практически нормохромными хорошо сформированными RBC (Фиг. 37А, левые панели, смотрите Фиг. 36В в отношении данных недели 21). Уровень ретикулоцитов в периферической крови был сравнимым с нормальными мышами CD46tg (Фиг. 37А, правые панели, также смотрите Фиг. 39). Аналогичные данные для 21 недели можно найти на Фиг. 36В на правой панели. В цитоцентрифугатах костного мозга, в отличие от блокировки созревания эритроидной линии дифференцировки в костном мозге мышей $Hbb^{th3}/CD46^{+/+}$, представленной преобладанием базофильных эритробластов, в цитоцентрифугатах контрольных и обработанных $Hbb^{th3}/CD46^{+/+}$ мышей преобладали созревающие полихроматические и ортохроматические эритробласты (Фиг. 37В, смотрите Фиг. 36С в отношении данных недели 21). Приведены нормализованные параметры эритроцитов мышей, трансдуцированных векторами с длинной LCR, короткой LCR и контрольными векторами CD46tg (Фиг. 38). Гематологические параметры на 16 неделе после *in vivo* трансдукции были значительно улучшены по сравнению с параметрами до обработки для обоих векторах (Фиг. 38, 39А). В случае белых клеток крови, красных клеток крови, MCHC, MCV и RDW-CV, они были неотличимы от контроля CD46tg (Фиг. 39А). Однако была значительная разница в пользу животных, обработанных вектором HDAd-длинная-LCR в сравнении с HDAd-короткая-LCR, в частности, процентное содержание ретикулоцитов в периферической крови составляло 40,9, 26,8 и 9,2% для необработанных, обработанных HDAd-короткая-LCR и HDAd-длинная-LCR мышей $Hbb^{th3}/CD46^{+/+}$, соответственно (Фиг. 38). Кроме того, уровни гемоглобина и гематокрит были выше для группы, обработанной HDAd-длинная-LCR.

[0864] **Коррекция экстрамедуллярного гемопоэза и гемосидероза.** Размер селезенки, измеримая характеристика компенсаторного гемопоэза, был снижен до нормального у животных, обработанных обоими векторами, при этом не было значимой разницы между HDAd-длинная-LCR и HDAd-короткая-LCR (Фиг. 40А). В отличие от мышей $Hbb^{th3}/CD46^{+/+}$, в срезах селезенки и печени не наблюдали очагов экстрамедуллярного эритропоэза после обработки HDAd-длинная-LCR, а у мышей,

обработанных HDAd-короткая-LCR, был выявлен лишь ограниченный экстрамедуллярный эритропоэз (Фиг. 40B). Интенсивный гемосидероз в селезенке и печени был выраженным у необработанных мышей Hbb^{th3}/CD46^{+/+} (Фиг. 41, вторая панель). Сигналы после окрашивания тканей по Перлсу были сравнимо низкими для мышей CD46tg (Фиг. 41, первая панель) и обработанных HDAd-длинная-LCR Hbb^{th3}/CD46^{+/+} мышей (Фиг. 41, третья панель), тогда как для животных, обработанных HDAd-короткая-LCR, насчитали в 2,7(+/-0,8) раза больше синих пятен на см² ткани селезенки, чем для HDAd-длинная-LCR (N=5).

[0865] В целом, ретикулоциты, параметры крови, внеклеточный гемопоэз и гемосидероз у обработанных HDAd-длинная-LCR животных значительно не отличались от мышей CD46tg, что указывает на полную фенотипическую коррекцию. Кроме того, было доказано, что HDAd-длинная-LCR превосходит HDAd-короткая-LCR в лечении талассемических мышей по нескольким фенотипическим параметрам, наиболее вероятно благодаря более высоким уровням γ -глобина, экспрессируемым из длинной LCR.

[0866] **Сравнение двух векторов после трансдукции человеческих CD34⁺ и эритроидной дифференцировки.** Чтобы консолидировать данные по мышам проводили *in vitro* исследование в человеческих клетках (Фиг. 31A). Человеческие CD34⁺ клетки, полученные от GCSF-мобилизованных здоровых доноров, трансдуцировали HDAd-длинная-LCR+HDAd-SB или HDAd-короткая-LCR+HDAd-SB при общей МЗ 4000 вч/клетки, т. е. МЗ, которая обеспечивает трансдукцию большинства CD34⁺ клеток (Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA. 92(25):11608-12, 1995). Затем трансдуцированные клетки подвергали эритроидной дифференцировке (ЭД) и отбору O^bBG/BCNU в отношении клеток с интегрированными трансгенами. Во время размножения трансдуцированных клеток в течение 18 дней большинство эписомальных векторов было утрачено.

[0867] Костный мозг получали на 21 неделе после *in vivo* трансдукции ГСК мышей Hbb^{th3}/CD46tg. (Фиг. 42A) Число копий вектора на клетку МНК костного мозга. Разница между двумя группами не является значимой, но может стать значимой, если проводить анализ с большим размером выборки. (Фиг. 42B, 42C) Эритроидная специфичность экспрессии γ -глобина. (Фиг. 42B) Процентное содержание экспрессирующих γ -глобин эритроидных (Ter119⁺) и незритроидных (Ter119⁻) клеток. *p < 0,05. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный ANOVA.

[0868] Экстрамедуллярный гемопоэз по окрашиванию гематоксилином/эозином в срезах печени и селезенки от мышей CD46tg и CD46^{+/+}/Hbb^{th-3} до введения аденовирусного донорного вектора (Фиг. 43). Отложение железа показано по окрашиванию по Перлсу в виде цитоплазматических синих пигментов гемосидерина в селезенке.

[0869] В конце ЭД методом проточной цитометрии было обнаружено значительно большее процентное содержание γ -глобин⁺ безъядерных клеток (т. е. ретикулоцитов, которые утратили ядра) (Фиг. 31B) и также, по данным ВЭЖХ, значительно большие уровни цепей γ -глобина с HDAd-длинная-LCR по сравнению с HDAd-короткая-LCR (Фиг. 31C). Число копий вектора, измеренное на 18 день составляло 2 для обоих векторов (Фиг. 31D).

[0870] В целом, *ex vivo* и *in vivo* исследования трансдукции ГСКП с мышами, а также *in vitro* исследования с человеческими ГСКП подтвердили релевантность HDAd-длинная-LCR для генной терапии гемоглобинопатий.

[0871] *Обсуждение.* В этом примере описана работа, касающаяся клинической разработки подхода *in vivo* генной терапии ГСКП, для которого не требуются лейкаферез, миелоабляция и трансплантация ГСКП (Richter et al., Blood. 128(18):2206-17, 2016). Они являются критическими препятствиями повсеместного применения для *ex vivo* генной терапии ГСКП гемоглобинопатий, в частности у пациентов старшего возраста и пациентов с сопутствующими патологиями. Безопасность и эффективность этого подхода были продемонстрированы в нескольких мышиных моделях заболеваний (Wang et al., J Clin Invest. 129(2):598-615, 2019; Wang et al., Blood Adv. 3(19):2883-94, 2019; Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 9:390-401, 2018) и, недавно, на отличных от человека приматах (Li et al., 23rd Annual ASGCT meeting. 2020; abstract № 546). В случае обоих видов была решена основная проблема, связанная с внутривенным введением HDAd5/35⁺⁺, а именно острые врожденные иммунные ответы, с помощью профилактической схемы, которая блокировала провоспалительные цитокины.

[0872] Достижение терапевтических уровней экспрессии γ - или β -глобина у пациентов с большой талассемией или СКА в условиях *ex vivo* генной терапии ГСКП все еще остается проблематичным. Для этого требуются подходы, направленные на повышение числа копий интегрированного трансгена путем оптимизации процесса трансдукции ГСКП или путем увеличения множественности заражения. Однако увеличение ЧКВ несет риск индукции генотоксичности. Другие попытки сфокусированы на дополнительной оптимизации экспрессионных каскадов глобина (Li et al., Cancer Res. 80(3):549-60, 2020). С учетом высокой нагрузочной емкости векторов HDAd существует возможность выйти за рамки ограничений по размеру, установленные для ленти- и гAAV-векторов. Настоящее изобретение демонстрирует, что терапевтические уровни γ -глобина можно обеспечить в RBC посредством *in vivo* генной терапии ГСКП с интегрирующимся вектором HDAd5/35⁺⁺, содержащим элементы LCR//промотора β -глобина общей длиной 29 т. о.

[0873] У талассемических мышей 100% присутствие γ -глобина в RBC было достигнуто раньше и при меньшем числе циклов O⁶BG/BCNU *in vivo* отбора мышей, обработанных HDAd-длинная-LCR, по сравнению с животными, обработанными HDAd-короткая-LCR. Это важно для перехода к клиническому применению подхода. Хотя система O⁶BG/BCNU *in vivo* отбора обеспечивает контролируемое повышение процентного содержания положительных в отношении γ -глобина RBC, она также вызывает временную лейкопению и побочные эффекты в ЖК-тракте (Wang et al., J Clin Invest. 129(2):598-615, 2019). Потенциальным объяснением необходимости менее интенсивного *in vivo* отбора в случае HDAd-длинная-LCR может быть то, что длинная LCR предотвращает сайленсинг управляемой промотором EF1 α экспрессии гена *mgmt*^{P140K}, который обеспечивает резистентность к O⁶BG/BCNU. Эту гипотезу подтверждают наблюдения, что уровни мРНК *mgmt* (нормализованные относительно ЧКВ) в МНК костного мозга были значительно выше для HDAd-длинная-LCR (Фиг. 48).

[0874] Хотя это исследование было сфокусировано на терапевтических аспектах *in vivo* подхода с использованием HDAd-длинная-LCR, в будущем остается решить ряд механистических вопросов. Одним из этих открытых вопросов является то, предотвращает ли длинная LCR трансактивацию отдаленных и соседних генов. Кроме того, не до конца ясно, связаны ли более высокие уровни экспрессии γ -глобина из HDAd-длинная-LCR, которые также отражаются на уровне мРНК, с более активной инициацией транскрипции или меньшим сайленсингом интегрированных копий вектора, или с обоими этими факторами. Наблюдение, что у обработанных HDAd-длинная-LCR мышей Hbb^{th3}/CD46 процентное содержание γ -глобина относительно цепей мышинового взрослого глобина повышается со временем, явление, которое также наблюдали в модели CD46tg у вторичных реципиентов, могло указывать на то, что сайленсинг, в частности в клетках с долгосрочной репопуляцией, возникал со временем, и что длинная LCR обеспечивала защиту от него. Более высокие уровни мРНК *mgmt*^{P140K} в расчете на копию интегрированного вектора (Фиг. 48) также поддерживают гипотезу, что длинная LCR защищает от сайленсинга. Чтобы получить ответы на эти вопросы, будущие исследования будут сфокусированы на трансдуцированных клонах CD34⁺ клеток и будут включать полногеномный анализ с использованием ОЛА-ПЦР/СНП (сайты интеграции), технологий фиксации конформации хромосом и РНК-секвенирования. Предпосылкой для этих исследований является то, что опосредованная транспозазой SB100x интеграция трансгена и процессы *in vivo* отбора не инициируют нежелательных геномных изменений/перестроек. С целью оценить это проводили РНК-секвенирование на человеческих CD34⁺ клетках, которые стабильно экспрессировали трансгены *mgmt*/GFP

после SB100x-опосредованной интеграции и O⁶BG/BCNU отбора *in vitro* (Фиг. 47А). Было обнаружено умеренное изменение экспрессии только в 176 генах, преимущественно генах гистонов (Фиг. 47В). Это указывает на то, что SB100x не оказывает критической генотоксичности, что также подтверждается отсутствием клонального доминирования в анализе сайтов интеграции и отсутствием побочных гематологических эффектов в долгосрочных исследованиях.

[0875] Число копий интегрированных трансгенов, которое анализировали в МНК костного мозга через 16-23 недели после *in vivo* трансдукции/отбора ГСКП, используя систему SB100x на основе HDAd5/35⁺⁺, составляло 2 копии на клетку для транспозонов в диапазоне от 13,8 (Wang et al., *J Clin Invest.* 129(2):598-615, 2019) до 32,4 т. о. Для образования каталитически примированного комплекса транспозон/транспозаза два конца транспозона должны удерживаться вместе в физической близости молекулами транспозазы (Uchida et al., *Nat Commun.* 10(1):4479, 2019). Это ограничение было разрешено путем включения сайтов *frt* в вектор HDAd, которые распознаются коэкспрессируемой рекомбиназой *F1pe*, что приводит к циркуляризации транспозона (Turchiano et al., *PLoS One.* 9(11):e112712, 2014). Представленные в данном документе данные позволяют предположить, что этот процесс может сделать интеграцию в значительной степени независимой от размера транспозона, который несут векторы HDAd5/35⁺⁺.

[0876] Это исследование демонстрирует, что применение удлиненных коровых элементов ТСД/LCR повышает уровень экспрессии терапевтического трансгена. Хотя LCR β —глобина исследовали в течение десятилетий, коровые элементы ТСД для других генов/кластеров менее охарактеризованы. Медианный размер ТСД составляет 880 т. о. С учетом дополнительного усовершенствования высокопродуктивного анализа фиксации конформации хромосом (3C) и его последующих протоколов 4C, 5C и Hi-C, а также анализа секвенирования фибера, изучение регуляторного генома будет быстро прогрессировать и, в целях генной терапии, могло бы дать ТСД, которые содержат только критические коровые элементы (Liu et al., *BMC Genomics.* 20(1):217, 2019).

[0877] В целом, данный пример показывает, что применение крупных регуляторных элементов в контексте векторов HDAd5/35⁺⁺ для *in vivo* трансдукции ГСКП у мышей приводило к получению вектора, который обеспечивает уровни γ -глобина, которые соответствуют пороговой генной экспрессии, считающейся терапевтической для большой талассемии и серповидноклеточной анемии.

[0878] Генный кластер человеческого β -глобина находится в хромосоме 11 и занимает \sim 100 т. о. Было предположено, что локус β -глобина образует эритроид-

специфическую пространственную структуру, состоящую из цис-регуляторных элементов и активных генов β -глобина, называемых активным хроматиновым хабом (ACH) (Tolhuis et al., *Mol Cell*, 10:1453-1465, 2002). Ядро АСН является консервативным в процессе развития и состоит из вышележащих 5' областей гиперчувствительности к ДНКазе 1-5, называемых LCR глобина, и нижележащей 3'HS1, а также эритроид-специфических трансдействующих факторов (Kim et al., *Mol Cell Biol.*, 27:4551-65, 2007). Для применений в генной терапии важно, что 23 т. о. LCR β -глобина, содержащая HS1-HS5 плюс 3 т. о. 3'HS1 область, обеспечивала высокую, эритроид-специфическую, позиционно независимую экспрессию цис-связанных генов у трансгенных мышей (Grosveld, *Cell*, 51:975-985, 1987). Инструмент для доставки трансгена под контролем этой LCR доступен с 30+ т. о. векторами HDAd.

[0879] Для коррекции многих генетических заболеваний необходим высокий уровень ограниченной конкретной тканью экспрессии терапевтического гена, что можно обеспечить путем применения LCR (Li et al., *Blood* 100: 3077-3086, 2002). Для лечения большой β -талассемии и серповидноклеточной анемии считаются необходимыми около 20% присутствия гена в ГСКП и 20% выработка терапевтической цепей глобина (β - или γ -глобина) в эритроидных клетках (Fitzhugh et al., *Blood* 130: 1946-1948, 2017). Из-за ограничений по размеру в лентивирусных векторах можно использовать только усеченные формы LCR β -глобина, что затрудняет выполнение требований для корректирующих уровней генной экспрессии (Uchida, et al., *Nat Commun* 10: 4479, 2019). Стратегией повышения уровней экспрессии после лентивирусной трансдукции ГСКП является увеличение дозы вектора и, таким образом, числа копий интегрированного вектора. Однако этот подход повышает риск генотоксичности и онкогенности. Другие попытки сфокусированы на дополнительной оптимизации экспрессионных кассет глобина (Uchida, et al., (2019) *Nat Commun* 10: 4479). Векторы HDAd, имеющие емкость 30 т. о., являются идеальным инструментом для развития последней концепции. В этом примере создавали вектор HDAd5/35++, несущий 29 т. о. экспрессионную кассету γ -глобина, и исследовали после *in vitro* и *in vivo* трансдукции ГСКП у CD46-трансгенных мышей.

[0880] В векторной системе HDAd интеграция кассеты γ -глобина опосредована транспозазой SB100x. Невирусный перенос генов с использованием системы SB/транспозон клинически используется для CD19 CAR Т-клеточной терапии (Kebriaei et al., *J Clin Invest* 126: 3363-3376, 2016) возрастной макулярной дегенерации (Hudecek et al., *Crit Rev Biochem Mol Biol* 52: 355-380, 2017; Thumann et al., *Mol Ther Nucleic Acids* 6: 302-314, 2017) и болезни Альцгеймера (Eyjolfsdottir et al., *Alzheimers Res Ther* 8: 30, 2016). HD-Ad-опосредованный перенос гена SB был впервые исследован группами Kay и Ehrhardt. В

их исследованиях транспозоны были относительно небольшими; 4 т. о. - 6 т. о. (Hausl et al., *Mol Ther* 18: 1896-1906, 2010; Yant et al., *Nat Biotechnol* 20: 999-1005, 2002). Данный пример впервые демонстрирует, что SB100x способна интегрировать 32,4 т. о. транспозон с эффективностью, сравнимой с 11,8 т. о. транспозоном на основании сравнимого ЧКВ (2-3 копии на клетку). Само по себе это открытие противоречит наблюдению, что эффективность SB-опосредованной интеграции обратно коррелирует с размером транспозона SB (Karsi et al., *Mag Biotechnol (NY)* 3: 241-245, 2001). Оказалось, что эту систему можно вывести за рамки ограничения по размеру. Во-первых, для образования каталитически примированного комплекса транспозон/транспозаза два конца транспозона должны удерживаться вместе в физической близости молекулами транспозазы (Hudecek et al., *Crit Rev Biochem Mol Biol* 52: 355-380, 2017). Это ограничение было разрешено путем включения сайтов *frt* в вектор HDAd, которые распознаются коэкспрессируемой рекомбиназой Flpe, что приводит к циркуляризации транспозона (Yant et al., *Nat Biotechnol* 20: 999-1005, 2002). Вторым механизмом, ограничивающим транспозицию крупных конструкций, является суицидальный транспозиционный механизм, называемый аутоинтеграцией, т. е. интеграция в динуклеотид ТА внутри транспозона (Wang et al., *PLoS Genet* 10: e1004103, 2014). Отсутствие разницы в ЧКВ между HDAd-короткая-LCR и HDAd-длинная-LCR может быть связано с *in vivo* отбором, который обеспечивает обогащение в отношении ГСКП и предшественников с определенным уровнем экспрессии $mgmt^{P140K}$, т. е. для клеток, которые достигли порогового ЧКВ.

[0881] Из-за мощной системы *in vivo* отбора на основе O⁶BG/BCNU практически 100% эритроцитов периферической крови содержали γ -глобин. Хотя этот подход *in vivo* отбора не влияет на клеточную композицию в костном мозге, он приводит к лейкопении. Следовательно, усилия сфокусированы на альтернативных подходах, которые не включают применение цитотоксического препарата BCNU. Следует отметить, что, как подтверждается исследованиями в мышинной модели талассемии (Wang et al., *J Clin Invest* 129: 598-615, 2019), фармацевтический *in vivo* отбор может быть необязателен для пациентов с гемоглобинопатиями, поскольку генно-скорректированные ГСКП будут иметь пролиферативное преимущество по сравнению с нескорректированными клетками (Perumbeti et al., *Blood* 114: 1174-1185, 2009).

[0882] С учетом сравнимого ЧКВ для HDAd-короткая-LCR и HDAd-длинная-LCR у первичных животных и вторичных реципиентов, уровни γ -глобина (измеренные методами ВЭЖХ и КОТ-ПЦР) в RBC и эритроидных предшественниках костного мозга были значительно выше для вектора, содержащего длинную LCR. Что интересно, разница между двумя векторами была более выраженной у вторичных реципиентов. Это

подразумевает, что RBC, происходящие из трансдуцированных ГСКП с долгосрочной репопуляцией, имеют более высокие уровни γ -глобина. Кроме того, HDAd-длинная-LCR демонстрировал более сильную эритроидную специфичность. Эти эффекты могут быть связаны с дополнительными элементами LCR в HDAd-длинная-LCR, которые приводят к лучшему доступу для транскрипционных факторов вследствие способности LCR к открытию хроматина (Li et al., Blood 100: 3077-3086, 2002), и/или связыванию дополнительных транскрипционных факторов, что приводит к повышенной транскрипции гена γ -глобина. Следует отметить еще одну характеристику LCR, а именно способность действовать в качестве автономной регуляторной единицы, что подразумевает меньшую трансактивацию соседних генов после случайной интеграции. В этом контексте применение более полной версии LCR снижает потенциальную генотоксичность этого подхода.

[0883] Пример 3. In vivo генная терапия ГСК с использованием CRISPR-иницируемой повторной активации эндогенного фетального глобина и опосредованного транспозазой SB100 \times добавления гена γ -глобина обеспечивает излечение серповидноклеточной анемии в мышинной модели.

[0884] У пациентов с наследственной персистенцией фетального глобина и, по последним данным, пациентов, получающих генную терапию, степень фенотипической коррекции серповидноклеточной анемии (СКА) коррелирует с уровнем экспрессии фетального γ -глобина. Недавно сообщалось, что после in vivo трансдукции гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников векторами HDAd5/35++ опосредованное транспозазой SB100 \times добавление гена γ -глобина обеспечивало 10-15% γ -глобина относительно взрослого мышинного глобина, приводя к значительной, но неполной фенотипической коррекции в мышинной модели промежуточной талассемии. Также было показано, что редактирование генома сайта связывания репрессора γ -глобина в промоторе γ -глобина с помощью CRISPR/Cas9 приводит к эффективной повторной активации эндогенного γ -глобина. В этом примере эти два механизма объединены для получения терапевтических уровней γ -глобина после in vivo трансдукции ГСКП.

[0885] Создавали аденовирусный вектор HDAd5/35++ (HDAd-комбо), содержащий оба модуля, и исследовали in vitro и после in vivo трансдукции ГСКП у «здоровых» мышей CD46/ β -YAC и в мышинной модели СКА (CD46/Townes), в которой гены мышинного α - и β -глобина были замещены генами человеческого α -глобина и человеческого серповидного β^S /фетального γ -глобина. Представленный HDAd-комбо содержал самоактивирующийся механизм для снижения экспрессии Cas9 после завершения расщепления сайта-мишени. Это приводило к значительно большей частоте расщепления in vivo, наиболее вероятно

благодаря лучшей выживаемости CRISPR/Cas9-отредактированных ГСКП. Что важно, по сравнению с векторами HDAd, содержащими только единицу добавления γ -глобина или единицу повторной активации CRISPR/Cas9, после трансдукции HDAd-комбо было обнаружено значительно большее количество γ -глобина в RBC. На 13 неделе после *in vivo* трансдукции ГСК мышей CD46/Townes комбо-вектором уровень γ -глобина в красных клетках крови составлял 30% от уровня взрослых человеческих α - и β^S -цепей. Это приводило к полной фенотипической коррекции СКА.

[0886] **Введение:**

[0887] *Генная терапия СКА:* Как серповидноклеточная анемия, так и β -талассемия являются наиболее распространенными моногенными расстройствами по всему миру, с которыми каждый год рождается 317000 детей. СКА вызвана одной мутацией в первом экзоне гена β -глобина (аллель β^S), что приводит к образованию дефективных тетрамеров гемоглобина, которые полимеризуются при низких концентрациях кислорода, вызывая разрушение эритроцитов. СКА связана со значительной заболеваемостью, плохим качеством жизни и уменьшению ожидаемой продолжительности жизни. Клиническое течение СКА улучшается при высокой экспрессии генов фетального γ -глобина, что наблюдается у пациентов с признаками НПФГ (Conley et al., Blood 21: 261-281, 1963; Stamatoyannopoulos et al., Blood 46: 683-692, 1975). При СКА γ -глобин осуществляет эффективную направленную против выработки серповидноклеточных эритроцитов функцию, конкурируя с серповидным β -глобином за включение в тетрамеры Hb и ингибируя полимеризацию серповидного гемоглобина (HbS). Варианты фармакологического лечения, повышающие уровни HbF, не одинаково эффективны для всех пациентов. Развитие генной терапии для β -гемоглобинопатий было обосновано ограниченной доступностью совместимых доноров и узким окном применения трансплантации ГСКП в случае самых молодых пациентов. Текущие подходы генной терапии СКА включают получение ГСКП, их *in vitro* культивирование, трансдукцию лентивирусными векторами, несущими экспрессионную кассету интактного β -глобина, направленного на предотвращение выработки серповидноклеточных эритроцитов β -глобина или фетального γ -глобина, и повторную трансплантацию пациентам после миелокондиционирования. Исследования фазы I генной терапии с лентивирусными векторами для добавления гена γ -глобина являются перспективными, однако до достижения долгосрочного излечения всех симптомов СКА еще далеко (Demirci et al., Hum Mol Genet., 2020. doi: 10.1093/hmg/ddaa088). Для излечения заболевания уровни γ -глобина в RBC должны составлять по меньшей мере 20% взрослого α -глобин и, необязательно, должны быть снижены уровни β^S . Этого трудно достичь с

лентивирусными векторами из-за ограничений по размеру вставки, предотвращающих использование полноразмерных LCR глобина или мультимодальных кассет редактирования генома (Uchida et al., Nat Commun 10: 4479, 2019).

[0888] *In vivo* генная терапия ГСКП - добавление гена γ -глобина: Основной риск ex vivo генной терапии ГСКП состоит в связанной с трансплантатом заболеваемостью (Anurathapan et al., Biol Blood Marrow Transplant 20: 2066-2071, 2014; Lucarelli et al., Blood Rev 16: 81-85, 2002; Storb et al., Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 372-397, 2003). Кроме того, применение лентивирусных векторов несет риск сайленсинга экспрессии трансгена или активации хромосомных протоонкогенов. Что важно, этот подход является сложным, затратным и, следовательно, трудно реализуемым в странах с ограниченными ресурсами, в которые преобладает СКА. Был разработан простой подход in vivo генной терапии ГСКП. Он включает подкожную инъекцию G-CSF/AMD3100 для мобилизации ГСКП из костного мозга в периферический кровоток и внутривенную инъекцию интегрирующей хелпер-зависимой аденовирусной векторной системы, векторов HDAd5/35⁺⁺. Эти векторы имеют емкость 30+ т. о. и нацелены на CD46, рецептор, который экспрессируется на примитивных ГСКП (Richter et al., Blood 128: 2206-2217, 2016). Естественную токсичность, связанную с внутривенной инъекцией HDAd5/35⁺⁺, можно контролировать предварительной обработкой глюкокортикоидом, антагонистом рецепторов IL6 и IL1 β у мышей и отличных от человека приматов (Li et al., 23rd Annual ASGCT meeting. 2020; abstract № 546) Случайная интеграция трансгена опосредуется транспозазой Sleeping Beauty с повышенной активностью (SB100x) (Boehme et al., Mol Ther Nucleic Acids 5: e337, 2016). В этой системе кассета трансгена фланкируется инвертированными повторами (ИП), которые распознаются транспозазой SB100x, и сайтами *frt*, которые делают возможной циркуляризацию кассеты трансгена в присутствии рекомбиназы Flp. Второй вектор, HDAd-SB, обеспечивает рекомбиназу Flp и SB100x *in trans*, чтобы опосредовать интеграцию кассеты GFP в динуклеотид ТА геномной ДНК (Mates et al., Nat Genet 41: 753-761, 2009). В предыдущем исследовании с векторами HDAd5/35⁺⁺ использовали 4,3 т. о. HS1-HS4 мини-LCR (область контроля локуса β -глобина) в комбинации с 0,66 т. о. промотором β -глобина для управления экспрессией человеческого γ -глобина после in vivo трансдукции ГСКП (Wang et al., J Clin Invest 129: 598-615, 2019; Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev 9: 142-152, 2018). У талассемических мышей Hbb^{th3}/CD46^{+/+} было достигнуто стабильное (8+ месяцев) присутствие γ -глобина практически в 100% эритроцитов периферической крови и практически полная фенотипическая коррекция (Wang et al., J Clin Invest 129: 598-615, 2019). Однако уровень экспрессии γ -глобина составлял только 10-15% от уровня взрослого мышинового α -глобина

со средним числом копий интегрированного вектора (ЧКВ) 2 копии на клетку, тем самым делая переход к клиническому применению этого подхода для СКА исключительно затруднительным.

[0889] *In vivo* генная терапия ГСКП - повторная активация эндогенного γ -глобина: при наследственной персистенции фетального гемоглобина (НПФГ), доброкачественном генетическом состоянии, мутации снижают переключение с γ - на β -глобин, обуславливая высокие уровни фетального глобина (HbF) на протяжении жизни, облегчая клинические проявления этих расстройств (Forget, Ann N Y Acad Sci 850: 38-44, 1998). В ранних исследованиях пытались повторно активировать мутации НПФГ путем создания больших делеций в локусе β -глобина (Sankaran, Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011: 459-465, 2011) или путем внесения мутаций в промоторы HBG, чтобы повысить уровни HbF в эритроидных клетках (Wienert et al., Nat Commun 6: 7085, 2015; Traxler et al., Nat Med 22: 987-990, 2016; Lin et al., Blood 130: 284, 2017). С открытием BCL11A как репрессора фетального глобина эти попытки стали более сфокусированы, включая нацеленное разрушение сайта связывания BCL11A в промоторах HBG (Masuda et al., Science 351: 285-289, 2016) или разрушение эритроидного энхансера bcl11a для снижения экспрессии BCL11A (Wu et al., Nat Med 25: 776-783, 2019) с помощью CRISPR/Cas9 или, в последнее время, редакторов оснований (Zeng et al., Nat Med 26: 535-541, 2020). Нацеленную на промотор HBG1/HBG2 CRISPR/Cas9 использовали для повторной активации γ -глобина у трансгенных в отношении человеческого локуса β -глобина (β -YAC) мышей (Li et al., Blood 131: 2915-2928, 2018). После *in vivo* трансдукции ГСКП было продемонстрировано эффективное разрушение сайта-мишени, что приводило к выраженному переключению экспрессии с человеческого β - на γ -глобин в красных клетках крови взрослых мышей, что сохранялось после вторичной трансплантации ГСКП. В исследованиях с долгосрочным последующим наблюдением не было выявлено гематологических аномалий, что указывает на то, что редактирование промотора HBG не оказывает негативного влияния на гемопоэз.

[0890] Ранее сообщалось, что экспрессия CRISPR/Cas9 из векторов HDAd5/35++ может нарушать функцию стволовых клеток и выживаемость ГСКП, в частности человеческих ГСКП (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev 9: 390-401, 2018). Поэтому были разработаны подходы для уменьшения времени экспрессии CRISPR/Cas9 (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev 9: 390-401, 2018; Li et al., Mol Ther 27: 2195-2212, 2019).

[0891] В данном случае целью было достижение терапевтических уровней γ -глобина после *in vivo* трансдукции ГСКП посредством комбинирования SB100х-опосредованного добавления гена γ -глобина и повторной активации γ -глобина у мышей β -

УАС, а также в мышинной модели серповидноклеточной анемии, разработанной Tim Townes ($\alpha/\alpha::\beta^S/\beta^S$) (Wu et al., Blood 108: 1183-1188, 2006). В этой модели гены мышинного α -глобина были замещены человеческим α -глобином, а гены мышинного взрослого β -глобина были замещены генами человеческого серповидного β^S и фетального γ -глобина, связанными вместе. Эта модель проявляет ключевые фенотипические признаки серповидноклеточной анемии.

[0892] **Материалы и методы**

[0893] **Реагенты:** Использовали G-CSF (Neupogen™) (Amgen Thousand Oaks, CA) и AMD3100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O^6 -BG и BCNU были от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

[0894] **Векторы HDAd:** The HDAd-CRISPR («разрез»), HDAd-SB-добавление («добавление») и HDAd-SB были описаны ранее (Li et al., Blood 131(26):2915-2928, 2018; Wang et al., J Clin Invest 129: 598-615, 2019). Клонирование рНСА-комбо включало 3 этапа. Этап 1) Синтезировали sgHBG № 2 (SEQ ID NO: 258), нацеленный на сайт связывания BCL11A в промоторных областях HBG1/2, отжигали и вставляли в сайт BbsI pSPgRNA (Addgene, Cambridge, MA) с созданием pSP-sgHBG № 2. 0,4 т. о. фрагмент U6-sgHBG № 2 в pSP-sgHBG № 2 амплифицировали и клонировали в сайт BamHI pBST-sgAAVS1-miR (Li et al., Mol Ther 27: 2195-2212, 2019) с получением pBST-sgHBG № 2-miR. Этап 2) 1,5 т. о. фрагмент PGK-mgmt-bGHpolyA синтезировали как gBlock (IDT, Newark, NJ) и лигировали с ClaI-расщепленным pBS-LCR-глобин-mgmt (Li et al., Mol Ther 27: 2195-2212, 2019) с получением pBS-LCR-глобин-PGK-mgmt. После этого 4,8 т. о. последовательность, содержащую область pBS-Frt-ИП, амплифицировали из pBS-FRT-ИП-Ef1 α -mgmt (Li et al., Cancer Res 80: 549-560, 2020) и лигировали с расщепленным EcoRV-KpnI pBS-LCR-глобин-PGK-mgmt с получением pBS-Frt-ИП-LCR-глобин-PGK-mgmt. На этом этапе использовали праймеры, содержащие 15 п. о. плечи гомологии (ПГ) для дальнейшего инфузионного клонирования (Takara, Mountain View, CA). Два 15 п. о. ПГ, фланкирующие компоненты Frt-ИП, могут быть открыты после расщепления PacI для облегчения рекомбинации с модифицированной конструкцией рНСА, описанной ниже. Этап 3) 5,3 т. о. фрагмент XbaI рНСАS1S-MCS (Li et al., Mol Ther 27: 2195-2212, 2019) удаляли посредством XbaI рестрикции и повторного лигирования с созданием рНСАS1S-MCS. 7,6 т. о. кассету CRISPR, начиная с промотора U6 до сигнальной последовательности поли-А SV40, амплифицировали из pBST-sgHBG № 2-miR и клонировали в сайт NheI рНСАS1S-MCS с образованием рНСАS1S-MCS-sgHBG № 2. И наконец, 12,0 т. о. ПГ-фланкируемую кассету глобин/mgmt в pBS-Frt-IR-LCR-глобин-PGK-mgmt высвобождали путем обработки PacI и рекомбинировали с PacI-расщепленным

pHCAS1S1-MCS-sgHBG № 2 с получением рНСА-комбо. Проводили скрининг конечной конструкции с помощью нескольких рестрикционных ферментов (HindIII, EcoRI and PmeI) и подтверждали путем секвенирования полной области, содержащей трансгена.

[0895] Для получения векторов HDAd5/35++ соответствующие плазмиды линейаризовали с помощью PmeI и сохраняли в клетках 116 (Palmer & Ng, Mol Ther 8: 846-852, 2003) с AdNG163-5/35++, хелперным вектором Ad5/35++, содержащим химерные фиберы, состоящие из хвоста фибера Ad5, стержня фибера Ad35 и головки фибера Ad35++ с повышенной аффинностью (Richter et al., Blood 128: 2206-2217, 2016). Векторы HD-Ad5/35++ амплифицировали в клетках 116, как подробно описано в другом месте (Palmer & Ng, Mol Ther 8: 846-852, 2003). Уровни загрязнения хелперным вирусом составляли < 0,05%. Титры составляли $2-5 \times 10^{12}$ вч/мл.

[0896] Векторы по данному примеру проиллюстрированы на Фиг. 101 и включают комбинированный аденовирусный вектор HDAd, который содержит как (i) нуклеиновую кислоту, кодирующую трансген γ -глобина («добавление»), присутствующий в транспозоне, и (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую систему CRISPR/Cas9, нацеленную на HBG1/2 («CRISPR») для повышения экспрессии эндогенного γ -глобина, не присутствующего в транспозоне (вместе они образуют «комбинацию»). Дополнительное описание для двойных векторов также смотрите на Фиг. 96, 102, 97A-97D, 98A-98N, 99A-99U).

[0897] В частности, на Фиг. 96 приведена схема вектора HDAd-TI-комбо, в которой система CRISPR нацелена на два разных сайта (промотор HBG и эритроидный энхансер bcl11a), что приводит к повышению повторной активации гамма. На Фиг. 102 показано, как в HDAd-комбо взаимодействие рекомбиназы Flpe с сайтами frt приводит к циркуляризации транспозона, оставляя линейный фрагмент вектора, содержащий кассету CRISPR. Предыдущие исследования с системой SB100x/Flpe продемонстрировали, что эти части вектора быстро теряются, когда циркуляризованный транспозон интегрируется в геном хозяина с помощью SB100x (Yant et al., Nat Biotechnol., 20: 999-1005, 2002). Фиг. 97A показано, как после совместного инфицирования HDAd-SB и HDAd-комбо будет происходить экспрессия Flpe и высвобождение ИП-фланкируемого транспозона, который затем будет интегрироваться в геном транспозазой SB100x. Одновременно будет происходить экспрессия HBG1 и bcl11a-E CRISPR и генерация инделей ДНК, что приведет к повторной активации γ -глобина. После Flp-опосредованного высвобождения транспозона будет происходить разрушение кассеты CRISPR, позволяя, таким образом, избежать цитотоксичности. Система CRISPR нацелена на два разных сайта (промотор HBG и эритроидный энхансер bcl11a), что приводит к повышению повторной активации γ .

Также проиллюстрированы стратегия нацеливания (Фиг. 97B), эритроид-специфический энхансер BCL11A (Фиг. 97C) и сайт связывания BCL11A в промоторе HBG (Фиг. 97D).

[0898] Двойные векторы CRISPR и повторная активация γ -глобина проиллюстрированы на Фиг. 98A-98N. Проиллюстрирован дизайн векторов для HDAd-Bcl11aе-CRISPR, HDad-HBG-CRISPR, HDAd-Dual-CRISPR, рандомизированного HDAd (Фиг. 98A) и HD-Ad5/35++ CRISPR для вектора с двойной гРНК (Фиг. 98B). Трансдукция HD-Ad5/35++ CRISPR линии эритроидных клеток-предшественников человека (HUDEP-2) проиллюстрирована до и после дифференцировки на Фиг. 98C. Вектор HD-AD5/35++ с «двойной» гРНК не оказывает негативного влияния ни на жизнеспособность клеток (Фиг. 98D), ни на пролиферацию (Фиг. 98E) по сравнению с необработанными (НЕОБР), BCL11A или HBG векторами. Двойные векторы обеспечивают уровни редактирования аналогичные с наблюдаемыми для векторов на основе одиночной гРНК в отношении локусов-мишеней (Фиг. 98F), энхансера Bcl11a и (Фиг. 98G) промотора HBG. Кроме того, вектор HD-AD5/35++ с «двойной» гРНК обеспечивает уровни редактирования локусов-мишеней аналогичные с наблюдаемыми для векторов на основе одиночной гРНК (Фиг. 98H). Значительно большее процентное содержание HbF+ клеток наблюдали методом проточной цитометрии в клетках HUDEP-2, трансдуцированных вектором HD-Ad5/35 с «двойной» гРНК по сравнению с векторами на основе одиночной гРНК (Фиг. 98I). Общая экспрессия гамма-глобина, измеренная методом ВЭЖХ, была значительно выше в образцах с двойным нацеливанием (Фиг. 98J). Наблюдали значительно большую экспрессию фетального глобина в клонах с двойным нокаутом по сравнению с клонами с одинарным нокаутом, что предполагает возможный синергетический эффект двух мутаций, приводящий к большей экспрессии гамма/клетка (Фиг. 98K). На Фиг. 98L показано, что мобилизованные CD34+ клетки периферической крови были трансдуцированы векторами HDAd5/35++ CRISPR. Чтобы минимизировать цитотоксичность CRISPR/Cas9, клетки после этого трансдуцировали вектором HDAd5/35++, который экспрессирует анти-Cas9 пептиды. Клетки трансплантировали мышам NSG после сублетальной дозы облучения и анализировали. На 10 неделе после трансплантации клетки, трансдуцированные вектором HD-Ad5/35 с «двойной» гРНК, демонстрировали приживание аналогичное с клетками, трансдуцированными векторами на основе одиночной гРНК. Композиция линии дифференцировки была аналогичной во всех группах (Фиг. 98M). CD34+ клетки, трансдуцированные и отредактированные вектором на основе двойной гРНК, эффективно приживались у мышей NSG (Фиг. 98N). Кроме того, приживленные клетки с двойным нацеливанием после эритроидной дифференцировки экспрессировали более высокие уровни гамма-глобина относительно

контроля по сравнению с клетками с одинарным нацеливанием, несмотря на относительно меньшие уровни редактирования (Фиг. 98N).

[0899] Экспериментальный дизайн для *ex vivo* трансдукции нормальных и *thal* CD34+ клеток с двойным редактированием показан на Фиг. 99А. Приведены экспрессия HbF (Фиг. 99В), СИФ (Фиг. 99С) и данные проточной цитометрии, описывающие экспрессию HbF (Фиг. 99D) в колониях на 15 день для нормальных CD34+ клеток. Приведены экспрессия HbF (Фиг. 99Е) и СИФ (Фиг. 99F) после эритроидной дифференцировки для нормальных CD34+ клеток. TE71 для сайта HbG (Фиг. 99G) и TE71 для сайта BCL11A (Фиг. 99H) показаны через 48 часов после трансдукции (txd) в нормальных CD34+ клетках. Данные проточной цитометрии, описывающие экспрессию HbF в ЭК и эритроидную дифференцировку, можно найти на Фиг. 99I. На Фиг. 99J-99U приведены результаты в *Thal* CD34+ клетках. Иммунофенотип клеток на 0 день, нетрансдуцированные клетки и клетки, трансдуцированные CRISPR-двойным (Фиг. 99J), и кривая роста со сравнением нетрансдуцированных клеток и клеток, трансдуцированных CRISPR-двойным (Фиг. 99K) в течение 11 дней. Приведены экспрессия HbF (Фиг. 99L) и СИФ (Фиг. 99M) в колониях на день 15. Также приведены экспрессия HbF в ЭК (Фиг. 99P), СИФ (Фиг. 99Q) и данные проточной цитометрии, описывающие экспрессию HbF, а также P04 и P18 (Фиг. 99R). Показаны TE71 для сайта HbG эритроидной дифференцировки в p04 (Фиг. 99S) и p18 (Фиг. 99T), тогда как на Фиг. 99U показан TE71 для сайта BCL11A через 48 часов после трансдукции.

[0900] **Клетки HUDEP-2/Эритроидная дифференцировка:** Клетки HUDEP-2 (Kurita et al., PLoS One 8: e59890, 2013) культивировали в среде StemSpan SFEM (STEMCELL Technologies), дополненной 100 нг/мл SCF, 3 МЕ/мл EPO, 10^{-6} М дексаметазона и 1 мкг/мл доксицилина (DOX). Эритроидную дифференцировку индуцировали в IMDM, содержащей 5% человеческий сывороточный АВ, 100 нг/мл SCF, 3 МЕ/мл EPO, 10 мкг/мл инсулина, 330 мкг/мл трансферрина, 2 Е/мл гепарина и 1 мкг/мл DOX, в течение 6 дней.

[0901] **Анализ колониобразующих единиц (КОЕ):** Отрицательные по линии дифференцировки (Lin^{-}) клетки выделяли путем истощения коммитированных по линии дифференцировки клеток в МНК костного мозга, используя набор для истощения клеток мышинной линии дифференцировки (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ КОЕ проводили, используя ColonyGEL (Reachbio, Seattle, WA) с мышинной полной средой в соответствии с протоколом производителя. Колонии подсчитывали через 10 дней после высевания.

[0902] **Нуклеазный анализ несовпадений T7E1:** Геномную ДНК выделяли,

используя мини-набор для геномной ДНК PureLink согласно предоставленному протоколу (Life Technologies, Carlsbad, CA) (Miller et al., Nat Biotechnol 25: 778-785, 2007). Геномный сегмент, содержащий сайт-мишень промотора HBG1/2, амплифицировали с помощью ПЦР-праймеров: прямого HBG1/2 (SEQ ID NO: 270), обратного (SEQ ID NO: 271). Продукты ПЦР гибридизировали и обрабатывали 2,5 единицами T7EI (NEB) в течение 20 минут при 37 °C. Проводили разделение расщепленных продуктов ПЦР с помощью 10% TBE PAGE (Bio-Rad) и окрашивали бромидом этидия. Использовали 100 п. о. ДНК-лэддер (New England Biolabs). Интенсивность полос анализировали, используя программное обеспечение ImageJ. % расщепления = $(1 - \sqrt{\text{исходная полоса} / (\text{исходная полоса} + \text{расщепленные полосы})}) \times 100\%$.

[0903] **Проточная цитометрия:** Клетки ресуспендировали при 1×10^6 клеток/100 мкл в ФСБ, дополненном 1% ФТС, и инкубировали с FcR-блокирующим реагентом (Miltenyi Biotec, Auburn CA) в течение десяти минут на льду. После этого добавляли окрашивающий раствор антител в 100 мкл на 10^6 клеток и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. После инкубации клетки один раз промывали в буфере FACS (ФСБ, 1% ФБС). Для вторичного окрашивания этап окрашивания повторяли со вторичным окрашивающим раствором. После промывки клетки ресуспендировали в буфере FACS и анализировали, используя проточный цитометр LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA). Дебрис исключали, используя гейтинг на основе площади прямого рассеяния и площади бокового рассеяния. Затем проводили гейтинг одиночных клеток, используя высоту прямого рассеяния и ширину бокового рассеяния. Затем анализировали данные проточной цитометрии, используя FlowJo (версия 10.0.8, FlowJo, LLC). Для проточного анализа клеток LSK клетки окрашивали биотин-конъюгированным коктейлем для выявления линии дифференцировки (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) (кат. №: 130-092-613) и антителами против c-Kit (кат. №: 12-1171-83) и Sca-1 (кат. №: 25-5981-82), а также APC-конъюгированным стрептавидином. Другие антитела от eBioscience (San Diego, CA) включали антитело к мышинному LY-6A/E (Sca-1)-PE-Cyanine7 (клон D7), антитело к мышинному CD117 (c-Kit)-PE (клон 2B8), антитело к мышинному CD3-APC (клон 17A2) (кат. №: 17-0032-82), антитело к мышинному CD19-PE-Cyanine7 (клон eBio1D3) (кат. №: 25-0193-82) и антитело к мышинному Ly-6b (Gr-1)-PE, (клон RB6-8C5) (кат. №: 12-5931-82). Антитело к мышинному Ter-119-APC (клон: Ter-119) (кат. №: 116211) было от Biolegend (San Diego, CA).

[0904] **Внутриклеточная проточная цитометрия для выявления экспрессии человеческого γ -глобина:** Использовали набор для пермеабилзации клеток FIX & PERM™ (Thermo Fisher Scientific) и придерживались протокола производителя. Вкратце,

1×10^6 клеток ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS (ФСБ, дополненный 1% ФТС), добавляли 100 мкл реагента А (среда для фиксации) и инкубировали в течение 2-3 минут при комнатной температуре, затем добавляли 1 мл предварительно охлажденного абсолютного метанола, смешивали и инкубировали на льду в темноте в течение 10 минут. Затем образцы промывали буфером FACS и ресуспендировали в 100 мкл реагента В (среда для пермеабилзации) и 1 мкг антитела к гемоглобину γ (Santa Cruz Biotechnology, кат. № sc-21756 PE), инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывки клетки ресуспендировали в буфере FACS и анализировали.

[0905] **ВЭЖХ глобина:** Уровни отдельных цепей глобина количественно оценивали на приборе Shimadzu Prominence с детектором на диодной матрице SPD-10AV и двухканальным насосом LC-10AT (Shimadzu, Kyoto, Japan). Для полипептидов использовали обращенно-фазовые колонки C4 Vydac 214TP™ (колонка 214TP54, C4, 300 Å, 5 мкм, в. о. 4,6 мм x 250 мм) (Hichrom, UK). 40%-60% градиент смеси 0,1% трифторуксусной кислоты в воде/ацетонитриле применяли при скорости 1 мл/мин.

[0906] **Измерение числа копий вектора:** Для абсолютной количественной оценки копий аденовирусного генома на клетку из клеток выделяли геномную ДНК, используя мини-набор для геномной ДНК PureLink согласно предоставленному протоколу (Life Technologies), и использовали в качестве матрицы для кПЦР, проводимой с использованием мастер-микса power SYBR™ green (Thermo Fisher Scientific). Использовали следующие пары праймеров: человеческий γ -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 195) и обратный (SEQ ID NO: 196); прямой mgmt (SEQ ID NO: 220) и обратный (SEQ ID NO: 221).

[0907] **ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени:** Общую РНК выделяли из 5×10^6 дифференцированных клеток HUDEP-2 или 100 мкл крови, используя реагент TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific), придерживаясь рекомендованного производителем метода фенольно-хлороформной экстракции. Использовали набор для обратной транскрипции Quantitect (Qiagen) и мастер-микс для ПЦР Power SYBR™ green (Thermo Fisher Scientific). Количественную ПЦР в реальном времени проводили на системе для ПЦР в реальном времени StepOnePlus (AB Applied Biosystems). Использовали следующие пары праймеров: мышинный RPL10 (конститутивный) прямой (SEQ ID NO: 189) и обратный (SEQ ID NO: 190); человеческий γ -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 191) и обратный (SEQ ID NO: 192); человеческий β -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 216) и обратный (SEQ ID NO: 217); мышинный β -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 193) и обратный (SEQ ID NO: 194), мышинный α -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 212) и обратный (SEQ ID NO: 213).

[0908] **Вестерн-блоттинг Cas9:** 3×10^6 клеток HUDEP-2 собирали в разные моменты времени после трансдукции, дважды промывали ФСБ и лизировали буфером Лэммли с 5% β -меркаптоэтанола. Образцы кипятили при 95°C в течение 5 минут и осветляли путем центрифугирования при 13000 g в течение 10 минут. 10 мкл лизатов разделяли с помощью ДСН-ПААГ, используя 4-15% готовые белковые гели (Bio-Rad). Белок Cas9 в блотах зондировали анти-Cas9-HRP (клон 7A9-3A3) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Выявление хемилюминесценции на рентгеновских пленках проводили после обработки Pierce™ ECL плюс субстрат для вестерн-блоттинга (Thermo Fisher Scientific). После выявления Cas9 блоты очищали и повторно зондировали антителом к β -актину от Sigma-Aldrich (Clone AC-74) для внутреннего контроля.

[0909] **Животные:** Все эксперименты, включающие животных, проводили в соответствии с институциональными руководствами, установленными Университетом Вашингтона. Университет Вашингтона является аккредитованным Международной ассоциацией по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных (AALAC) исследовательским институтом, а вся работа с живыми животными, проводимая в этом университете, проводится в соответствии с политикой обеспечения общественного здравоохранения (PHS) Управления защиты лабораторных животных (OLAW), законом и нормами по благополучию животных USDA, руководством по содержанию и использованию лабораторных животных и политикой Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC) Университета Вашингтона. Эти исследования были разрешены IACUC Университета Вашингтона (протокол № 3108-01). Трансгенные мыши на основе линии C57Bl/6, которые содержали человеческий геномный локус CD46 и демонстрировали экспрессию CD46 с уровнем и профилем, сходными с человеческими (мыши hCD46^{+/+}), были описаны ранее (Kemper et al., Clin Exp Immunol 124: 180-189, 2001). Использовали трансгенных мышей, несущих дрожжевую искусственную хромосому с 248 т. о. локусом β -глобина дикого типа (β -YAC) (Peterson et al., Ann N Y Acad Sci 850: 28-37, 1998). Мышей β -YAC скрещивали с мышами с человеческим CD46^{+/+} для получения мышей β -YAC^{+/-}/CD46^{+/+} для исследований in vivo трансдукции ГСКП. Для генотипирования мышей использовали следующие праймеры: прямой CD46 (SEQ ID NO: 233) и обратный (SEQ ID NO: 234); прямой β -YAC (промотор γ -глобина) (SEQ ID NO: 242) и обратный (SEQ ID NO: 243).

[0910] *Мышиная модель серповидноклеточной анемии:* Самцов мышей Townes (Hbb^{tm2(HBG1,HBV*)Tow} или h α /h α :: β^S/β^S) покупали у Jackson Laboratory (сток JAX № 013071) и скрещивали с трансгенными в отношении человеческого CD46 самками мышей. Как продемонстрировано на Фиг. 109А, после трех раундов скрещивания были получены

мышь, гомозиготные в отношении CD46, HbS и HbA, которых использовали для экспериментов. Для генотипирования использовали следующие праймеры: праймеры HbB (SEQ ID NO: 246, 251 и 70) и праймеры HbA (SEQ ID NO: 272-274); и праймеры CD46, приведенные выше (SEQ ID NO: 233 и 234). Результаты ПЦР интерпретировали в соответствии с протоколами, предоставленными поставщиком.

[0911] *Мобилизация ГСКП и in vivo трансдукция:* ГСКП мобилизовали у мышей путем п/к инъекций человеческого рекомбинантного G-CSF (5 мкг/мышь/день, 4 дня) с последующей п/к инъекцией AMD3100 (5 мг/кг) на день 5. Кроме того, животные получали дексаметазон (10 мг/кг) в/б за 16 ч и 2 ч до инъекции вируса. Через тридцать и 60 минут после AMD3100 животным внутривенно вводили вирусные векторы через ретро-орбитальное сплетение с дозой 4×10^{10} вирусных частиц (вч) на инъекцию.

[0912] *In vivo отбор:* Отбор начинали на первой неделе (модель Townes) или через четыре недели (модель β -YAC) после трансдукции. Мышам инъецировали O⁶-BG (15 мг/кг, в/б), два раза, с перерывом в 30 минут. Через один час после второй инъекции O⁶-BG мышам инъецировали (в/б) 5 мг/кг кармустина (BCNU). Через две и четыре недели после первого раунда отбора проводили еще два раунда с дозами BCNU 7,5 и 10 мг/кг, соответственно.

[0913] *Иммуносупрессия:* микофенолата мофетил (CellCept, внутривенный) был от Genentech (Hillsboro, OR). Рапамицин (Рапамун/Сиролимус) и метилпреднизолон были от Pfizer (New York, NY). Ежедневно проводили внутрибрюшинную инъекцию микофенолата мофетила (20 мг/кг/день), рапамицина (0,2 мг/кг/день), метилпреднизолон (20 мг/кг/день).

[0914] *Вторичная трансплантация костного мозга:* Реципиентами были самки мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель от Jackson Laboratory. В день трансплантации мышей-реципиентов облучали дозой 1000 рад. Клетки костного мозга от in vivo трансдуцированных мышей CD46tg выделяли асептически, а истощенные по линии дифференцировки клетки выделяли, используя MACS, как описано выше. Через шесть часов после облучения клетки внутривенно инъецировали при 1×10^6 клеток на мышь. Вторичных реципиентов держали в течение 16 недель после трансплантации для анализа в конечный момент времени. Все вторичные реципиенты получали иммуносупрессию, начиная с недели 4.

[0915] **Анализ тканей:** Срезы тканей селезенки и печени толщиной 2,5 мкм фиксировали в 4% формальдегиде в течение по меньшей мере 24 часов, дегидратировали и заливали в парафин. Окрашивание гематоксилином и эозином использовали для гистологической оценки экстрамедуллярного гемопоэза. Гемосидерин был выявлен в

срезах тканей посредством окрашивания берлинской лазурью по Перлсу. Вкратце, срезы тканей обрабатывали смесью одинаковых объемов (2%) ферроцианида калия и хлористоводородной кислоты в дистиллированной воде, а затем проводили контрокрашивание нейтральным красным. Размер селезенки оценивали как отношение масса селезенки (мг)/масса тела (г).

[0916] **Анализ крови:** Образцы крови собирали в покрытые ЭДТА пробирки и проводили анализ на приборе HemaVet 950FS (Drew Scientific, Waterbury, CT). Мазки периферической крови окрашивали красителем Гимза/Мэя - Грюнвальда (Merck, Darmstadt, Germany) в течение 5 и 15 минут, соответственно. Ретикулоциты окрашивали бриллианткрезил синим. Исследователи, которые подсчитывали ретикулоциты в мазках крови, не имели информации о распределении групп образцов. На слайдах были только номера животных. (5 слайдов на животное, 5 случайных 1 см² срезов)

[0917] **Статистический анализ:** Для сравнения множества групп использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Бонферрони для множественного сравнения. Статистический анализ проводили, используя GraphPad Prism версии 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

[0918] *Результаты и обсуждение*

[0919] **Вектор HDAd-комбо для добавления гена γ -глобина и самоинактивирующаяся CRISPR/Cas9 для повторной активации γ -глобина:** 30 т. о. емкость векторов HDAd5/35++ использовали для включения двух терапевтических кассет в один вектор (Фиг. 100, верхняя панель, «HDAd-комбо»): i) кассета для добавления гена γ -глобина с помощью SB100x, состоящая из HS1-HS4 мини-LCR в комбинации с промотором β -глобина для управления экспрессией человеческого γ -глобина (Wang et al., J Clin Invest 129: 598-615, 2019). Эта кассета связана с геном для мутантной O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (mgtm^{P140K}) под контролем универсально активного промотора PGK, чтобы сделать возможным отбор стабильно трансдуцированных клеток путем обработки низкой дозой O⁶BG/BCNU (Neff et al., J Clin Invest 112: 1581-1588, 2003; Wang et al., Mol Ther Methods Clin Dev 8: 52-64, 2018). Кассета транспозона γ -глобин/mgtm^{P140K} фланкируется сайтами frt и ИП, ii) экспрессионная кассета CRISPR/Cas9, которая была размещена за пределами фланкируемого ИП/frt транспозона. Этот модуль состоит из управляемой промотором U6 оgPHK, нацеленной на сайт связывания BCL11A в пределах промоторов HBG1/2, и SpCas9 под контролем промотора EF1 α . Совместное инфицирование HDAd-комбо и HDAd-SB и экспрессия SB100x и рекомбиназы F1re будут опосредовать интеграцию ИП-фланкируемой кассеты γ -глобин/mgtm^{P140K} и одновременно разрушать вектор и прекращать экспрессию

CRISPR/Cas9 (Фиг. 101). Эта ограниченная экспрессия CRISPR/Cas9 должна повысить выживаемость клеток с отредактированным геномом и процентное содержание клеток с долгосрочной репопуляцией. Для сравнения, в исследование были включены векторы HDAd5/35⁺⁺, которые содержали два разных модуля отдельно, HDAd-CRISPR («разрез») и HDAd-SB-добавление («добавление») (Фиг. 100, средние панели- «HDAd-разрез» и «HDAd-SB-добавление»).

[0920] **Подтверждение вектора в клетках HUDEP-2:** Эту гипотезу сначала исследовали в эритроидных клетках-предшественниках, полученных из пуповинной крови человека_P (HUDEP-2) (Kurita et al., PLoS One 8: e59890, 2013), иммортализованной линии эритроидных клеток-предшественников из гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников человека, которая экспрессирует BCL11A и преимущественно β -глобин и лишь низкие уровни γ -глобина. Клетки HUDEP-2 широко использовали для исследований повторной активации γ -глобина (Canver et al., Nature 527: 192-197, 2015). Через четыре дня после инфицирования клеток HUDEP-2 HDAd-комбо +/- HDAd-SB при МЗ, которая обеспечивает трансдукцию подавляющего большинства клеток, клетки дополнительно размножали в течение 8 дней в среде для эритроидной дифференцировки, как было описано ранее (Li et al., Mol Ther 27: 2195-2212, 2019). Сигналы вестерн-блоттинга Cas9 резко снижались после того, как клетки подвергали дифференцировке/размножению, наиболее вероятно из-за утраты эписомальных копий вектора HDAd-комбо (Фиг. 103А). Схема контролируемой экспрессии Cas9 с использованием векторов HDAd-комбо приведена на Фиг. 102. При этом Cas9 была выявляемой в течение периода исследования 12 дней. Совместное инфицирование HDAd-SB снижало экспрессию Cas9 на от 35% (дифф. д3) до 50% (дифф. д8) (Фиг. 103В), что указывает на эффект механизма самоинактивации, описанного на Фиг. 101. Анализ присутствия γ -глобина методом проточной цитометрии (Фиг. 103С) позволил предположить наличие аддитивного эффекта модулей добавления гена γ -глобина и повторной активации.

[0921] *In vivo* трансдукция ГСКП у мышей CD46/ β -YAC. Ранее была продемонстрирована повторная активация человеческого γ -глобина у мышей CD46/ β -YAC после *in vivo* трансдукции ГСКП вектором HDAd5/35⁺⁺, нацеленным на промотор HBG1/2 (Li et al., Blood 131: 2915-2928, 2018). В данном случае придерживались сходного протокола, чтобы оценить новый вектор HDAd-комбо. Мышей CD46/ β -YAC мобилизовали G-CSF/AMD3100, внутривенно инъецировали векторами «разрез», «добавление» и «комбо» и через четыре недели подвергали трем раундам *in vivo* отбора (Фиг. 104А). Процентное содержание γ -глобин-положительных RBC повышалось с

каждым раундом *in vivo* отбора, достигая > 95% для вектора «комбо» через 2 недели после последнего раунда инъекций O⁶BG/BCNU (Фиг. 104B). Повторная активация вектором «разрез» была менее эффективной (60%) и более вариабельной между животными. На 18 неделе лизаты RBC анализировали методом ВЭЖХ в отношении цепей глобина. Хроматограмма демонстрирует два различимых пика человеческого β -глобина, повторно активированного человеческого G γ /A γ (HBG1/2) и добавленного варианта 76-Пе G γ (Li et al., *Mol Ther Methods Clin Dev* 9: 142-152, 2018) (Фиг. 104C, левая панель, Фиг. 105). Следует отметить, что одновременная повторная активация G γ и A γ наблюдалась только у небольшой части мышей, обработанных вектором «разрез» (Фиг. 105). Большинство мышей, обработанных векторами «разрез» и «комбо» демонстрировали только повторную активацию A γ , наиболее вероятно вследствие удаления гена HBG2 в результате одновременного расщепления CRISPR/Cas9 в обоих промоторах HBG1 и HBG2 (Li et al., *Blood* 131: 2915-2928, 2018). На Фиг. 104C (правая панель) приведены уровни белка γ -глобина относительно человеческого β -глобина. В среднем было выявлено 7%, 11% и 17% белка γ -глобина для векторов «разрез», «добавление» и «комбо», соответственно. Сходную картину наблюдали на уровне мРНК (Фиг. 104D). Хотя разница между векторами «разрез» и «добавление» не была значимой, уровень γ -глобина для вектора «комбо» был значительно выше. Процент CRISPR/Cas9-опосредованного расщепления сайта-мишени промотора HBG, измеренный на 18 неделе в МКПК и МНК костного мозга, был значительно выше для вектора «комбо» по сравнению с вектором «разрез» (Фиг. 104E, Фиг. 106). Это наиболее вероятно связано с механизмом, обуславливающим снижение экспрессии CRISPR/Cas9, и, потенциально, лучшей выживаемостью CRISPR-отредактированных ГСКП, которые затем были размножены посредством *in vivo* отбора. Число копий вектора в МНК костного мозга была сравнимым для векторов «добавление» и «комбо», за исключением того, что повышенные уровни γ -глобина в случае «комбо» были связаны с лучшей трансдукцией и интеграцией вектора (Фиг. 104F). При анализе в отдельных колониях предшественников у разных мышей ЧКВ находилось в диапазоне от 1 до 6 копий на клетку (Фиг. 104G). Чтобы продемонстрировать, что добавление гена γ -глобина и опосредованная расщеплением CRISPR повторная активация γ -глобин происходила в ГСК с долгосрочной репопуляцией, Lin⁻ клетки костного мозга, собранные на 18 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП мышей β -YAC/CD46 векторами «разрез» и «комбо», трансплантировали мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения. Способность трансплантированных клеток обуславливать мультилинейное восстановление у вторичных реципиентов оценивали в течение периода 16 недель. Уровни приживления на основании экспрессии CD46 в МКПК составляли 95% и

оставались стабильными. Присутствие γ -глобина в RBC, измеренное методом проточной цитометрии, также было стабильным в диапазоне от 70% до 95% на 16 неделе для векторов «разрез» и «комбо», соответственно (Фиг. 107A). Уровни экспрессии γ -глобина (относительно мышинового β -основного), измеренные методом ВЭЖХ (Фиг. 107B) или кОТ-ПЦР (Фиг. 107C) были сравнимыми с первичными мышами. На Фиг. 107B показан уровень белка γ -глобина относительно человеческого β -глобина на 16 неделе после трансплантации. На Фиг. 107C и 107D показан уровень белка γ -глобина относительно мышинового $\beta_{\text{основного}}$ -глобина и человеческого β -глобина.

[0922] Не наблюдали никакого эффекта генетических манипуляций с ГСКП или экспрессии γ -глобина из эритроидных клеток на клеточную композицию крови, селезенки и костного мозга. Фиг. 107E Композиция положительных по линии дифференцировки клеток в МНК крови, селезенки и костного мозга на 16 неделе после трансдукции вектором «комбо» (залитые символы) по сравнению с нетрансдуцированными контрольными мышами (незалитые символы). На Фиг. 107F приведено число интегрированных копий транспозона на клетку в крови, селезенке и костном мозге.

[0923] *Исследования in vivo трансдукции ГСКП у мышей с СКА (Townes)*. В этой модели гены мышинового α -глобина были замещены человеческим α -глобином, а гены мышинового взрослого β -глобина были замещены генами человеческого серповидного β^S и фетального γ -глобина, связанными вместе. Ген β -глобина (*HBG1*) содержит 1400 п. о. 5' фланкирующей последовательности, которая содержит сайт-мишень BCL11A, расщепляемый CRISPR/Cas9. Это должно приводить к повторной активации гена β -глобина. Геном модели Townes изучен лучше, чем для другой мышинной модели СКА, модели Berkeley ($Hba^{0/0} Hbb^{0/0} Tg(\text{Hu-мини-LCR}\alpha 1^G \gamma^A \gamma \delta \beta^S)$), которая имеет более двух копий трансгенов человеческого глобина (Paszty et al., Science 278: 876-878, 1997).

[0924] Чтобы сделать Townes моделью, подходящей для генной терапии ГСКП с помощью HDAd5/35++, мышей Townes скрещивали с трансгенными в отношении человеческого CD46 мышами. После трех раундов обратного скрещивания мышей, гомозиготных в отношении человеческого CD46 и двух генов человеческого глобина (α , β^S/γ), использовали для экспериментов (Фиг. 108A). Трижды гомозиготные мыши CD46/Townes демонстрировали серповидные эритроциты (Фиг. 108B), тяжелую анемию, 40% ретикулоцитов в периферической крови, а также лейкоцитоз и тромбоцитоз (Фиг. 108C). Последнее указывает на то, что нарушение гемопоэза выходит за рамки эритроидной линии дифференцировки. Другим характерным признаком было увеличение селезенки в результате экстрамедуллярного гемопоэза (Фиг. 108D).

[0925] Мышей CD46/Townes мобилизовали GCSF/AMD3100 и внутривенно

инъекцировали векторами HDAd-комбо+HDAd-SB. *In vivo* отбор с O^bBG/BCNU начинали через одну неделю после трансдукции и повторяли на 4 и 6 неделях с повышением доз BCNU (5 □ 7,5 □ 10 мг/кг). На исходном уровне в среднем 5% RBC были γ -глобин-положительными с низкой СИФ, что указывает на неполную репрессию фетального глобина у мышей CD46/Townes. После трех раундов *in vivo* отбора процентное содержание глобин-положительных RBC повышалось и достигало > 95% к концу исследования (13 неделя после *in vivo* трансдукции) (Фиг. 109А). ВЭЖХ-анализ лизатов RBC показал уровни γ -глобина, которые составляли 30% от человеческого α -глобина или β^S -глобина (Фиг. 109В, левая панель). Были четко видны пики для добавленного γ -глобина повторно активированного A γ (Фиг. 109В, правая панель). Как видно в модели CD46/ β -YAC, повторно активированный γ -глобин обеспечивал меньший вклад, чем добавленный γ -глобин в общие уровни γ -глобина (Фиг. 109С). Низкий исходный уровень γ -глобина, выявленный методом проточной цитометрии, был ниже предела обнаружения ВЭЖХ. Анализ мРНК глобина в RBC отражал значения, наблюдаемые на белковом уровне по данным ВЭЖХ (Фиг. 109D). Уровень γ -глобина после *in vivo* генной терапии ГСК с помощью HDAd-комбо был выше в модели СКА CD46/Townes, чем у «здоровых» мышей CD46/ β -YAC.

[0926] Обе предусмотренные геномные модификации были выявлены в образцах костного мозга с 13 недели. В среднем было обнаружено 2,5 интегрированных генов γ -глобина на клетку (Фиг. 109Е). Эффективность расщепления сайта-мишени, измеренная в анализе T7EI, была сравнимой, в диапазоне 25-30% в общих МНК костного мозга, Lin⁻ клетках, МКПК и спленоцитах (Фиг. 109F). Чтобы продемонстрировать стабильную генетическую модификацию ГСКП CD46/Townes, Lin⁻ клетки, собранные на 13 неделе после *in vivo* трансдукции, трансплантировали вторичным реципиентам C57Bl/6 после летальной дозы облучения. Присутствие γ -глобина в RBC было стабильным в течение 16 недель (Фиг. 110А) на уровне 30% от взрослого человеческого глобина (Фиг. 110В).

[0927] **Фенотипическая коррекция СКА в мышинной модели:** На 13 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП вектором комбо анализировали фенотипические признаки серповидноклеточной анемии у мышей CD46/Townes. Среднее процентное содержание ретикулоцитов в мазках периферической крови составляло 5, 39 и 5% для родительских («здоровых») CD46-трансгенных мышей, мышей CD46/Townes до обработки и мышей CD46/Townes на 13 неделе после обработки, соответственно (Фиг. 111А и 111С). У обработанных мышей морфология красных клеток в мазках крови мышей CD46/Townes, характеризовавшаяся гипохромией, широким разбросом по размеру/форме (серповидные клетки) и клеточной фрагментацией (смотрите Фиг. 108В), возвращалась к

нормоцитарному внешнему виду красных клеток, наблюдаемому у мышей CD46 (Фиг. 111B). Гематологические параметры, включая число RBC, WBC и тромбоцитов, а также эритроидные характеристики (например гемоглобин и гематокрит) были сходными у мышей CD46 и обработанных мышей CD46/Townes (Фиг. 111C). Аналогично, гистологический анализ печени и селезенки от обработанных мышей CD46/Townes показал нормализацию, включая отсутствие паренхиматозного отложения железа и экстрамедуллярного гемопоэза (Фиг. 112A). Размер селезенки, измеримая характеристика компенсаторного гемопоэза, у обработанных мышей CD46/Townes был сравнимым с родительскими мышами CD46 (Фиг. 112B).

[0928] В целом, эти данные указывают на полное излечение серповидноклеточной анемии у мышей CD46/Townes. Предположительно, это напрямую связано с высокими уровнями γ -глобина (> 20%), обеспечиваемыми опосредованным траспозазой SB100× добавлением гена γ -глобина (основной вклад) и CRISPR/Cas9-инициируемой повторной активацией эндогенного γ -глобина. Кроме того, эти результаты демонстрируют снижение экспрессии Cas9 за счет опосредованного Flpe/SB100x вырезания экспрессионной кассеты CRISPR/Cas9 из генома HDAd-комбо, что приводит к повышению безопасности и процентного содержания CRISPR-отредактированных ГСКП. Дополнительные усовершенствования этой системы могут включать подхода для снижения количества β^S в RBC, например, путем включения основных редакторов, которые корректируют мутацию СКА, в вектор HDAd-комбо.

[0929] **Пример 4. Получение векторов Ad35**

[0930] В этом примере описано получение векторов Ad35 и продемонстрирована эффективность трансдукции CD34+ клеток. Получали три типовых вектора Ad35 с разными структурами (включая разное расположение LoxP).

[0931] Левый конец репрезентативного хелперного вирусного генома Ad5/35 проиллюстрирован на Фиг. 113. Последовательности, затененные темно-серым цветом, соответствуют нативной последовательности Ad5, т. е. незатененные или выделенные светло-серым последовательности были внесены искусственно. Последовательности, выделенные светло-серым цветом, представляют две копии (тандемно повторенных) последовательностей loxP. При наличии белка «рекомбиназы cre» происходит удаление нуклеотидной последовательности между двумя последовательностями loxP (оставляя одну копию loxP). Поскольку последовательность Ad5 между сайтами loxP важна для упаковки аденовирусной ДНК в капсиды (в ядре клетки-производителя), это удаление делает неупаковываемой геномную ДНК хелперного аденовируса. Следовательно, эффективность процесса удаления имеет прямое влияние на уровень упаковки хелперной

геномной ДНК (нежелательному «загрязнению» хелперным вирусом). Ввиду вышесказанного, чтобы транслировать такую же схему на серотипы аденовируса, отличные от Ad5, необходимо обеспечить следующее: 1. Идентифицировать последовательности, важные для упаковки, так, чтобы они могли фланкироваться вставками последовательности loxP и удаляться в присутствии рекомбиназы cge. Идентификация этих последовательностей не является простой, если эти последовательности имеют слабое сходство. 2. Определить, где в нативной последовательности ДНК вставка последовательности loxP будет иметь эффект на размножение и упаковку хелперного вируса (в отсутствие рекомбиназы cge). 3. Определить расстояние между последовательностями loxP, чтобы обеспечить эффективное удаление последовательностей упаковки и свести упаковку хелперного вируса к минимуму во время выработки хелпер-зависимого аденовируса (т. е. в экспрессирующей рекомбиназу cge линии клеток, такой как линия клеток 116).

[0932] На Фиг. 114 приведено выравнивание сигналов упаковки Ad5 и Ad35 (SEQ ID NO: 49 и 50). Выравнивание левых концевых последовательностей Ad5 с Ad35 помогает идентифицировать сигналы упаковки. Мотивы в последовательности Ad5, важные для упаковки (от AI до AV) указаны линиями (смотрите также Фиг. 1B в Schmid et al., *J Virol.*, 71(5):3375-4, 1997). Расположение типовых сайтов вставки loxP указано черными стрелками. Эти вставки фланкируют AI-AIV и разрушают AV. Дополнительный сигнал упаковки AVI и AVII, указанный в Schmid et al., был удален в хелперном вирусе Ad5 как часть удаления E1 этого вектора.

[0933] На Фиг. 115 приведена схематическая иллюстрация вектора Ad35 pAd35GLN-5E4. Этот вектор Ad35 первого поколения (с удалением E1/E3) получен из векторизованного генома Ad35 (штамм Holden от ATCC) с использованием технологии рекомбинационной инженерии (PMID: 28538186). Затем векторную плазмиду использовали для вставки сайтов loxP.

[0934] Сайты вставки LoxP сайта упаковки (PS)1 находятся за нуклеотидами 178 и 344; этот вектор Ad35 проиллюстрирован в SEQ ID NO: 286. Ожидается, что такое размещение LoxP приведет к удалению AI-AIV. Оставшаяся часть сигнала упаковки, включая AVI и AVII (после 344), была удалена (как часть удаления E1 в позициях от 345 до 3113). Сайты вставки LoxP PS2 находятся за нуклеотидами 178 и 481; этот вектор Ad35 проиллюстрирован в SEQ ID NO: 51. Кроме того, были удалены нуклеотиды 179-365, поэтому участок от AI до AV отсутствует. Оставшиеся мотивы упаковки AVI и AVII могут быть удалены рекомбиназой cge во время выработки HDAd. Удаление E1 находится от 482 до 3113. Сайты вставки LoxP PS3 находятся за нуклеотидами 154 и 481; этот вектор

Ad35 проиллюстрирован в SEQ ID NO: 52. Структура сигнала упаковки этих трех векторов приведена на Фиг. 116.

[0935] Можно сохранить три сконструированных вектора. Процентное содержание вирусных геномов с перестроенными сайтами loxP составляло 50, 20 и 60% для PS1, PS2 и PS3, соответственно. Перестройка происходит, когда на сайты loxP оказывают сильное влияние вирусная репликация и генная экспрессия.

[0936] Эта платформа HDAd35 в сравнении с настоящей платформой HDAd5/35 проиллюстрирована на Фиг. 117. Оба вектора содержат каскету CMV-GFP. Вектор Ad35 не содержит иммуногенный капсидный белок Ad5. Эти два вектора демонстрировали сравнимую эффективность трансдукции CD34+ клеток *in vitro*. Связующее исследование демонстрирует сравнимую эффективность трансдукции CD34+ клеток *in vitro*. Человеческие ГСК, периферические CD34+ клетки от G-CSF-мобилизованных доноров, трансдуцировали HDAd35 (полученным с Ad35-хелпером P-2) или химерным вектором, содержащим капсид Ad5 с фибром из Ad35, при МЗ 500, 1000, 2000 вч/клетка. Процентное содержание GFP-положительных клеток измеряли через 48 часов после добавления вируса в трех независимых экспериментах.

[0937] Хелперный вектор PS2 был переделан (как проиллюстрировано на Фиг. 118) для применения в исследованиях на обезьянах. Были предприняты следующие действия для создания этой версии: удаление области E1, мутантного сигнала упаковки, фланкируемого Loxr, мутантной последовательности упаковки, удаление области E3 (27435-30540), замещение Ad5E4orf6, вставка ДНК-вкладыша, фланкирующей каскету sorGFP, и внесение мутации в головку для создания Ad35K++.

[0938] На Фиг. 119 приведена последовательность мутированного сигнала упаковки. Остатки 1-137 представляют ИКП Ad35. Жирным шрифтом представлены сайты SwaI, сайт Loxr выделен курсивом, а мутантный сигнал упаковки подчеркнут. В целях ясности эти последовательности отдельно представлены на Фиг. 119.

[0939] Были созданы варианты сигналов упаковки хелперного вектора Ad35 (Фиг. 120A). Область E3 (27388 - 30402) была удалена, а касета CMV-eGFP была расположена в рамках удаления E3, Ad35K++, и eGFP использовали вместо sorGFP. Сайты LoxP в этих четырех вариантах по сигналу упаковки находятся в проиллюстрированных позициях (Фиг. 120A). Все четыре хелперных вектора можно сохранить.

[0940] На Фиг. 120B приведено схематическое представление восьми дополнительных вариантов по сигналу упаковки с указанными сайтами LoxP.

[0941] В некоторых дополнительных вариантах хелперного вектора и сигналов упаковки были сделаны изменения в хелперном векторе на Фиг. 120A, такие как

уменьшение делеции E3 (27609□30402).

[0942] Пример 5. Нацеленная интеграция и экспрессия трансгена на высоком уровне у трансгенных мышей AAVS1 после ex vivo и in vivo трансдукции гемопоэтических стволовых клеток векторами HDAd5/35++.

[0943] По меньшей мере некоторая информация из этого примера была опубликована в Li et al. (*Mol Ther.*, 27(12): 2195-2212, 2019; e-pub August 19, 2019).

[0944] На сегодня в генной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками у пациентов для доставки генов используют лентивирусные векторы (Nadini, *EMBO Mol Med*, 11, 2019; Wang et al., *Genome Res*, 17, 1186-1194, 2007). Лентивирусные векторы эффективно интегрируются в человеческий геном с сильным уклоном в сторону активно транскрибируемых генов. Профиль полуслучайной интеграции несет риск нарушения экспрессии соседних генов, включая связанные с раком гены. Следовательно, основной целью в данной области является нацеливание интеграции трансгена на предварительно выбранные сайты. Был предложен ряд «безопасных локусов» для нацеленной интеграции в человеческий геном (например, AAVS1 и CCR5) (Papapetrou et al., *Nat Biotechnol*, 29, 73-78, 2011). К критериям безопасного сайта относятся: (i) расстояние > 50 т. о. от 5' конца любого гена, (ii) расстояние > 300 т. о. от связанных с раком генов, (iii) расстояние > 300 т. о. от любой микроРНК, (iv) за пределами единицы генной транскрипции (v) за пределами ультраконсервативных областей. Локус AAVS1 в хромосоме 19 используется AAV дикого типа для интеграции, опосредованной кодируемым вирусом белком Rep78, который распознает конкретный мотив (RBS) в сайте AAVS1 (Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158, 97-129, 1992, Huser et al., *PLoS Pathog*, 6, e1000985, 2010). Поскольку большая часть человеческого населения имела контакт с AAV, на что указывает наличие выявляемых антител к некоторым серотипам AAV, но без какой-либо ярко выраженной патологии, заключили, что интеграция в AAVS1 может быть безопасной (Henckaerts et al., *Future Virol*, 5, 555-574, 2010). Кроме того, этот локус содержит сайт гиперчувствительности к ДНКазе I и инсулятор, который поддерживает открытую конформацию хроматина в CD34+ и иПС клетках (van Rensburg et al., *Gene Ther*, 20, 201-214, 2013, Lombardo et al., *Nat Methods*, 8, 861-869, 2011, Ogata et al., *J Virol*, 77, 9000-9007, 2003). Это позволяет лучше оценить инструменты редактирования генома и, с другой стороны, должно поддерживать экспрессию трансгена на высоком уровне (van Rensburg et al., *Gene Ther*, 20, 201-214, 2013, Voigt et al., *J Mol Med*, 86, 1205-1219, 2008).

[0945] Нацеленную интеграцию трансгена можно обеспечить путем гомологичной репарации (ГР) (Lombardo et al., *Nat Med*, 20, 1101-1103, 2014). После расщепления сконструированной сайт-специфической нуклеазой двухцепочечные разрывы ДНК

исправляются посредством негомологичного соединения концов (НГСК), подверженного ошибкам пути репарации ДНК, который, как правило, приводит к переменным вставкам или делециям (инделям), или ГР, которая осуществляет репарацию ДНК путем копирования гомологичной донорной матрицы. Доставка экзогенной ДНК, фланкируемой ДНК, гомологичной геномной последовательности вокруг сайта разрыва, может привести к включению экзогенной последовательности сайт-специфическим образом.

[0946] Современные подходы для обеспечения нацеленной интеграции основаны на электропорации ГСК *in vitro* кодирующей эндонуклеазу мРНК и донорной ДНК-плазмидой (Blair et al., *J Vis Exp*, e53583, 2016, Dreyer et al., *Biomaterials*, 69, 191-200, 2015; Kuhn et al., *Sci Rep*, 7, 15195 2017; Li et al., *Mol Med Rep*, 15, 1313-1318, 2017), дефицитными по интеграции лентивирусными векторами (IDLV) (Lombardo et al., *Nat Med*, 20, 1101-1103, 2014; Rio et al., *EMBO Mol Med*, 6, 835-848, 2014) или векторами rAAV6 (De Ravin et al., *Nat Biotechnol*, 34:424-429, 2016, Hung et al., *Mol Ther*, 26, 46-467, 2018; Johnson et al., *Sci Rep*, 8:12144, 2018). Хелпер-зависимые аденовирусные (HDAd5/35++) векторы были разработаны для доставки сконструированных интеграз (Li et al., *Blood*, 1431, 2915-2928, 2018, Saydaminova et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 1, 14057, 2015) и, в этом исследовании, донорных матриц. Векторы HDAd5/35++ нацелены на человеческий CD46, рецептор, который экспрессируется на примитивных ГСК (Richter et al., *Blood*, 128, 2206-2217, 2016). Способность векторов HDAd5/35++ эффективно доставлять свои геномы в ядра неделящихся клеток позволяет доставлять большие количества донорной ДНК, что является необходимым условием для эффективной нацеленной интеграции. Поскольку векторы HDAd5/35++ и HDAd35 могут нести до 30 п. о. чужеродной ДНК, они могут вмещать длинные участки донорных последовательностей, гомологичных заданному сайту-мишени. Это должно повысить эффективность генного нацеливания посредством гомологичной рекомбинации, что прямо коррелирует с длиной области гомологии (Balamotis et al., *Virology*, 324, 229-237, 2004, Ohbayashi et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 13628-13633, 2005, Suzuki et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 13781-13786, 2008). Поскольку эти векторы легко получать с высоким выходом и они характеризуются сильным ГСК-тропизмом, их применяли для *in vivo* трансдукции ГСК (Richter et al., *Blood*, 128, 2206-2217, 2016). Основной идеей этого подхода является мобилизация ГСК из костного мозга с использованием G-CSF/AMD3100 и, в то время как они в большом количестве циркулируют в периферии, трансдукция их с внутривенно вводимыми векторами HDAd5/35++. Трансдуцированные клетки возвращаются в костный мозг, в котором они присутствуют в течение длительного периода. Безопасность и эффективность этого подхода была ранее продемонстрирована на CD46-трансгенных

мышинных моделях гемоглобинопатий посредством CRISPR/Cas9-опосредованной повторной активации эндогенного фетального глобина (Li et al., *Blood*, 1431, 2915-2928, 2018) или посредством добавления гена фетального глобина с помощью гиперактивной транспозазы Sleeping Beauty (SB100x), которая опосредует эффективную случайную временную интеграцию (Wang et al., *J Clin Invest*, 129, 598-615, 2019). Хотя SB100x-опосредованная интеграция трансгена теоретически является более безопасной, чем квазислучайная интеграция лентивирусных векторов, она все еще вызывает сомнения в отношении сайленсинга трансгена, нежелательных эффектов на соседние гены и геномных перестроек. Поэтому целью этого исследования была модификация подхода *in vivo* трансдукции ГСК на основе HDAd5/35⁺⁺ для нацеленной интеграции в AAVS1.

[0947] Последовательность, гомологичная человеческому локусу AAVS1, отсутствует у грызунов (Samulski et al., *EMBO J*, 10, 3941-3950, 1991). Ранее сообщалось о двух трансгенных моделях на грызунах, которые содержали 3,5 т. о. фрагмент локуса AAVS1 (7 копий голова-к-хвосту у крыс) в крысином или мышинном геноме (X-хромосома) (Rizzuto et al., *J Virol*, 73, 2517-2526, 1999). Это исследование показало, что открытая структура хроматина AAVS1 сохраняется у трансгенных мышей (Young et al., *J Virol*, 74, 3953-3966, 2000). Jackson Laboratories поставляет трансгенных мышей AAVS1 (Bakowska et al., *Gene Ther*, 10, 1691-1702, 2003). На сайте Jackson Labs указано, что эти мыши содержат пять копий 8,2 т. о. фрагмента человеческого локуса AAVS1, вставленного в один геномный сайт. Для получения трансгенных мышей AAVS1, подходящих для трансдукции векторами HDAd5/35⁺⁺, их скрещивали с мышами, которые были трансгенными в отношении локуса человеческого CD46 (Kemper et al., *Clin Exp Immunol*, 124, 180-189, 2001). Все исследования на животных проводили с мышами AAVS1/CD46^{+/+}.

[0948] **Материалы и методы.**

[0949] **Клетки:** Получали CD34⁺ клетки от G-CSF-мобилизованных взрослых доноров. Клетки восстанавливали из замороженного материала и инкубировали в течение ночи в StemSpan H3000 (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) с пенициллином/стрептомицином, лигандом Flt3 (Flt3L, 25 нг/мл), интерлейкином 3 (10 нг/мл), тромбопоэтином (TPO) (2 нг/мл) и фактором стволовых клеток (SCF) (25 нг/мл). Клетки трансдуцировали векторами HDAd при МЗ 2000 вч/клетка и анализировали как указано. *Клетки* HUDEP-2. Также получали Клетки HUDEP-2 (Kurita et al., *PLoS One*, 8, e59890, 2013). Клетки HUDEP-2 культивировали в присутствии SCF, EPO, доксицилина и дексаметазона, как было описано ранее (Canver et al., *Nature*, 527, 192-197, 2015). Эти клетки трансдуцировали векторами HDAd при МЗ 500-1000 вч/клетка и анализировали

как указано.

[0950] **Векторы HDAd5/35++:** HDAd-SB, HDAd-IR-GFP/mgmt и HDAd-IR- γ -глобин/mgmt были описаны ранее (Li et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 9, 142-152, 2018, Wang et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 8, 52-64, 2018). Для клонирования вектора HDAd-CRISPR синтезировали орPHK (SEQ ID NO: 207) (Mali et al., *Science*, 339, 823-826, 2013), нацеленную на локус AAVS1 человека, отжигали и вставляли в сайт BbsI pSPgRNA (Addgene, Cambridge, MA) с созданием pSP-sgAAVS1. Кодирующую последовательность Cas9 амплифицировали из pLentiCRISPRv2 (Addgene), фрагменты U6sgAAVS1 высвобождали путем расщепления BamHI pSP-sgAAVS1, а ранее описанную область нацеливания микроPHK (miR-183/218) (Saydaminova et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 1, 14057, 2015) последовательно клонировали в EcoRV-NotI, сайты BamHI и NotI pBS-T-EF1 α (Saydaminova et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 1, 14057, 2015) с образованием pBST-sgAAVS1-miR. Для получения рекомбинантных аденовирусных плазмид 8 т. о. кассету, начиная с промотора U6 и до последовательности сигнала поли-А SV40, амплифицировали из pBST-sgAAVS1-miR и лигировали с расщепленным NheI-XmaI pHCA (Sandig et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 1002-1007, 2000) посредством клонирования по Гибсону (New England Biolabs) с созданием соответствующей плазмиды pHCA-sgAAVS1-miR.

[0951] Для конструирования вектора HDAd-GFP-донор два 0,8 т. о. плеча гомологии (ПГ), непосредственно фланкирующие сайт разрезания CRISPR AAVS1, синтезировали как gBlocks (IDT, San Jose, CA). Один 23 п. о. sgAAVS1 с последовательностью PAM был включен выше 5'ПГ и ниже 3'ПГ, соответственно, чтобы опосредовать высвобождение донорной кассеты. Фрагмент EF1 α -mgmt-2A-GFP-pA синтезировали с помощью GenScript (Nanjing, China) и лигировали с двумя 5'ПГ с помощью ПЦР с перекрытиями с образованием sgAAVS1-5'HA-Ef1 α -mgmt-2A-GFP-pA-3'HA-sgAAVS1, который впоследствии вставляли в сайт XmaI pHCA (Sandig et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 1002-1007, 2000) с созданием GFP-донорного вектора pHCA-AAVS1-GFP-mgmt.

[0952] Клонирование вектора HDAd-глобин-донор включало 3 этапа. Этап 1) 11,8 т. о. кассету LCR-глобин-mgmt высвобождали из pHM5-FR-IR-LCR-глобин-mgmt (Li et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 9, 142-152, 2018) путем расщепления EcoRV-KpnI и лигировали с 2,8 т. о. плазмидным остовом, амплифицированным из pBS-Z (Saydaminova et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 1, 14057, 2015), с получением pBS-LCR-глобин-mgmt. Два 1,8 т. о. ПГ, непосредственно примыкающие к сайту разрезания CRISPR AAVS1, амплифицировали методом ПЦР из геномной ДНК, выделенной из клеток костного мозга

мышей AAVS1-tg, с использованием праймеров, содержащих 23 п. о. sgAAVS1 с последовательностью PAM. ПГ с 5' и 3' стороны последовательно вставляли в сайты EcoRV и KpnI, соответственно, pBS-LCR-глобин-mgmt с созданием pBS-AAVS1-глобин-mgmt. Этап 2) Область нт 1588-12121 pHCA удаляли посредством расщепления EcoRI и самолигирования с созданием pHCAS1. Оригинальный сайт PacI в pHCAS1 был разрушен за счет вставки двух отождженных олиго-последовательностей. Новый сайт клонирования PacI был создан в сайте BstBI с получением pHCAS1-MCS. Сайт клонирования был спроектирован так, чтобы две 15 п. о. гомологичные области становились открытыми после расщепления PacI. Размер pHCAS1-MCS дополнительно уменьшали путем удаления 1,5 т. о. фрагментаNheI с получением pHCAS1S-MCS. Этап 3) После расщепления PacI двух конечных конструкций с двух описанных выше этапов продукты рекомбинировали посредством клонирования по Гибсону с созданием глобинового донорного вектора pHCA-AAVS1-глобин-mgmt.

[0953] Для получения векторов HDAd5/35++ соответствующие плазмиды линеаризовали с помощью PmeI и сохраняли в клетках 116 (Palmer et al., Mol Ther, 8, 846-852, 2003) с хелперным вектором Ad5/35++-Acr (Li et al., 2018. Blood, 1431, 2915-2928), как подробно описано в другом месте (Palmer et al., Mol Ther, 8, 846-852, 2003). Уровни загрязнения хелперным вирусом составляли < 0,05%. Титры составляли $6-12 \times 10^{12}$ вч/мл. Все векторы HDAd, используемые в этом исследовании, содержали химерные фиберы, состоящие из хвоста фибера Ad5, стержня фибера Ad35 и головки фибера Ad35++ с повышенной аффинностью (Wang et al., J Virol, 82, 10567-10579, 2008).

[0954] **Чувствительный к несовпадениям нуклеазный анализ T7E1.** Геномную ДНК выделяли, как было описано ранее (Miller et al., Nat Biotechnol, 25, 778-785, 2007). Геномные сегменты, включающие сайт-мишень AAVS1, амплифицировали с помощью ДНК-полимеразы KOD Hot Start (MilliporeSigma, Burlington, MA), используя следующие праймеры: прямой AAVS1 (SEQ ID NO: 208); обратный (SEQ ID NO: 209). Продукты ПЦР гибридизировали и обрабатывали 2,5 единицами T7E1 (NEB) в течение 20 минут при 37 °С. Расщепленные продукты ПЦР разделяли в 6% TBE PAGE (Bio-Rad) и окрашивали бромидом этидия. Интенсивность полос анализировали, используя программное обеспечение ImageJ. % расщепления = $(1 - \sqrt{\text{исходная полоса} / (\text{исходная полоса} + \text{расщепленные полосы})}) \times 100\%$

[0955] **Секвенирование нового поколения:** Для глубокого секвенирования инсерций/делений (инделей) амплифицировали 250 п. о. область, окружающую предсказанный сайт расщепления AAVS1, и секвенировали продукты, используя систему Illumina. Геномную ДНК выделяли, как было описано ранее (Saydaminova et al., Mol Ther

Methods Clin Dev, 1, 14057, 2015). 249 п. о. геномную область, включающую сайт-мишень AAVS1, амплифицировали, используя следующие праймеры: прямой AAVS1 (SEQ ID NO: 210); обратный (SEQ ID NO: 211). После очистки ампликона с помощью гранул AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) проводили dA-наращивание, используя фрагмент Klenow. Illumina-совместимые адапторы лигировали с продуктами с помощью лигазы T4 (New England Biolabs). Методом ПЦР вносили уникальную баркод-последовательность, чтобы сделать возможным секвенирование множества образцов за один этап секвенирования. За каждым этапом следовала очистка с помощью гранул AMPure XP. Конечные библиотеки количественно оценивали с помощью Qubit (Invitrogen) и исследовали на биоанализаторе Agilent 2100, чтобы определить средний размер ампликонов. Ампликоны объединяли при одинаковой молярности и проводили глубокое секвенирование на системе Illumina MiSeq. Создавали 10^5 считываний на ампликон, чтобы должным образом выяснить типы мутаций. Данные секвенирования выравнивали с эталонной последовательностью AAVS1, используя онлайн-инструмент Cas-Analyzer (доступный на [rgenome.net/cas-analyzer/№ !](http://rgenome.net/cas-analyzer/)) (Park et al., Bioinformatics, 33, 286-288, 2017, реализация на основе JavaScript для анализа данных СНП).

[0956] **Проточная цитометрия:** Клетки ресуспендировали при 1×10^6 клеток/100 мкл в буфере FACS (ФСБ, дополненный 1% термоинактивированной ФТС) и инкубировали с FcR-блокирующим реагентом (Miltenyi Biotec, Auburn CA) в течение десяти минут на льду. После этого добавляли окрашивающий раствор антител в 100 мкл на 10^6 клеток и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. После инкубации клетки один раз промывали в буфере FACS. Для вторичного окрашивания этап окрашивания повторяли со вторичным окрашивающим раствором. После промывки клетки ресуспендировали в буфере FACS и анализировали, используя проточный цитометр LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA). Дебрис исключали, используя гейтинг на основе площади прямого рассеяния и площади бокового рассеяния. Затем проводили гейтинг одиночных клеток, используя высоту прямого рассеяния и ширину бокового рассеяния. Затем анализировали данные проточной цитометрии, используя FlowJo (версия 10.0.8, FlowJo, LLC). Для проточного анализа клеток LSK клетки окрашивали биотин-конъюгированным коктейлем для выявления линии дифференцировки (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) и антителами против c-Kit и Sca-1, а также APC-конъюгированным стрептавидином. Другие антитела от eBioscience (San Diego, CA) включали антитело к мышиному LY-6A/E (Sca-1)-PE-Cyanine7 (клон D7), антитело к мышиному CD117 (c-Kit)-PE (клон 2B8), антитело к мышиному CD3-APC (клон 17A2), антитело к мышиному CD19-PE-Cyanine7 (клон eBio1D3) и антитело к мышиному Ly-6b (Gr-1)-PE, (клон RB6-

8C5). Другие антитела от Miltenyi Biotec включали антитело к человеческому CD46-APC (клон: REA312). Антитело к мышинному Ter-119-APC (клон: Ter-119) было от BioLegend (San Diego, CA).

[0957] Внутриклеточное окрашивание человеческого γ -глобина проводили, используя PE-конъюгированное антитело к человеческому γ -глобину от Santa Cruz (клон 51.7). Набор для пермеабилзации клеток Fix & Perm от Invitrogen использовали в соответствии с инструкциями производителя.

[0958] *ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени*: Общую РНК выделяли из 50-100 мкл крови, используя реагент TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific), придерживаясь рекомендованного производителем метода фенольно-хлороформной экстракции, затем проводили обратную транскрипцию для создания кДНК, используя набор для обратной транскрипции Quantitect от Qiagen. Потенциальное загрязнение геномной ДНК устраняли путем обработки образцов РНК реагентами для удаления гДНК, поставляемыми в наборе. Сравнительную ПЦР в реальном времени проводили, используя мастер-микс Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems), на системе для ПЦР в реальном времени StepOnePlus (Applied Biosystems). Использовали следующие пары праймеров: мышинный RPL10 (конститутивный) прямой (SEQ ID NO: 189) и обратный (SEQ ID NO: 190); человеческий γ -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 214) и обратный (SEQ ID NO: 215); мышинный β -основной глобиновый прямой (SEQ ID NO: 193) и обратный (SEQ ID NO: 217).

[0959] *ВЭЖХ глобина*:: Уровни отдельных цепей глобина количественно оценивали на приборе Shimadzu Prominence с детектором на диодной матрице SPD-10AV и двухканальным насосом LC-10AT (Shimadzu, Kyoto, Japan). 38%-58% градиент смеси 0,1% трифторуксусной кислоты в воде/ацетонитриле применяли при скорости 1 мл/мин, используя обращенно-фазовую колонку C4 Vydac (Hichrom, UK).

[0960] *Анализ колониеобразующих единиц*. 2500 Lin- клеток высевали в трех повторах в мышиную полную среду ColonyGEL 1202 (ReachBio, Seattle WA) и инкубировали в течение 12 дней при 37 °C в 5% CO₂ и при максимальной влажности. Колонии нумеровали, используя препаративный микроскоп Leica MS 5 (Leica Microsystems). В случае колоний, полученных от мышей, трансдуцированных HDAd-GFP-донор, подсчитывали GFP-положительные колонии, собирали и анализировали.

[0961] *Измерение числа копий вектора*: Общую ДНК из клеток костного мозга или одиночных колоний выделяли с помощью мини-набора для геномной ДНК PureLink (Invitrogen). Вирусную ДНК, выделенную из HDAd-GFP-донор или HDAd-глобин-донор, серийно разводили и использовали для стандартной кривой. кПЦР проводили в двух

повторах, используя мастер-микс для ПЦР power SYBR Green PCR на системе для ПЦР в реальном времени StepOnePlus (Applied Biosystems). 5 нг ДНК использовали для 10 мкл реакции. Использовали следующие пары праймеров: прямой GFP (SEQ ID NO: 218) и обратный (SEQ ID NO: 219); и прямой mgmt (SEQ ID NO: 220) и обратный (SEQ ID NO: 221). Праймеры человеческого γ -глобина были описаны в параграфе по ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени.

[0962] **Расположение локуса AAVS1 у AAVS1-трансгенных мышей.** Библиотеку TLA получали, как было описано ранее (de Vree et al., Nat Biotechnol, 32, 1019-1025, 2014). Вкратце, перекрестно сшитую формальдегидом ДНК из клеток костного мозга расщепляли NlaIII. После лигирования и обратного перекрестного сшивания ДНК очищали. Этот продукт дополнительно расщепляли NspI и лигировали с получением кольцевой химерной ДНК размером 2 т. о. Химерную ДНК амплифицировали методом ПЦР, используя AAVS1-специфические праймеры TLA: прямой (SEQ ID NO: 222) и обратный (SEQ ID NO: 223). Библиотеки TLA из ПЦР-амплифицированного продукта получали, используя набор для СНП Illumina Nextera XT NGS в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование спаренных концов проводили на NovaSeq. Протоколы TLA приводят к повторной перетасовке ДНК, поэтому считывания выравнивали, используя инструмент для выравнивания, совместимый с расщепленными считываниями, BWA (Li et al., Bioinformatics, 26, 589-595, 2010), используя установки: `bwasw -b 7`, как было предложено ранее (смотрите онлайн на github.com/Cergentis/Cergentis_common) (Vain-Hom et al., 2017. Nucleic Acids Res, 45, e62). Эти выровненные файлы `bam` преобразовывали в RPKM-нормализованные файлы `bigwig`, используя `deepTools` (Ramirez et al., Nucleic Acids Res, 42, W187-191, 2014). Полногеномное распределение визуализировали, используя эпигеномный браузер WashU (Zhou et al., Nat Methods, 8, 989-990, 2011).

[0963] **Саузерн-блоттинг.** Геномную ДНК из мышинового костного мозга расщепляли EcoRI или BlnI и проводили Саузерн-блоттинг с AAVS1- или GFP-специфическим зондом, меченным ^{32}P , используя набор для мечения случайных праймеров Prime-It RmT (Agilent Technologies). Невключенный ^{32}P dCTP удаляли путем центрифугирования на колонках MicroSpin G25 (GE Healthcare). Гибридизацию проводили в буфере для гибридизации PerfectHyb Plus (Sigma). Блоты наносили на пленки Amersham Hybond-XL (GE Healthcare).

[0964] **Инвертированная ПЦР:** Соединения в общих клетках костного мозга, одиночных колониях, смеси клеток HUDEP-2 или клонах анализировали методом инвертированной ПЦР, описанным в другом месте, с модификациями (Wang et al., J Virol,

79, 10999-11013, 2005). Вкратце, геномную ДНК выделяли путем инкубации с буфером для лизиса геномной ДНК (100 мМ Трис-Cl (pH 8,0), 50 мМ ЭДТА, 1% (масс./об.) ДСН и 400 мкг/мл протеиназы К) при 55 °С в течение ночи со встряхиванием с последующей фенольно-хлороформной экстракцией, осаждением с изопропанолом и промывкой 70% этанолом. Образцы ДНК растворяли в 10 мМ буфера Трис/HCL (pH 8,5). 5 мкг ДНК расщепляли 30 Е NcoI в 50 мкл реакции при 37 °С в течение 5 часов. После термоинактивации и очистки расщепленную ДНК обрабатывали 2,5 мкл лигазы T4 (New England Biolabs, M0202L) в 500 мкл реакционного буфера при 16 °С в течение ночи для внутримолекулярного лигирования. После термоинактивации и очистки повторно лигированный продукт использовали для инвертированной ПЦР, используя ДНК-полимеразу KOD Hot Start. использовали следующие праймеры: прямой EF1 α (SEQ ID NO: 224) и обратный (SEQ ID NO: 225); прямой pA (SEQ ID NO: 226) и обратный (SEQ ID NO: 227); прямой HS4 (SEQ ID NO: 228); и обратный (SEQ ID NO: 229). Пару праймеров Ef1 α и pA использовали для анализа 5' и 3' соединений обработанных GFP-донорным вектором образцов, соответственно. Пару праймеров HS4 и EF1 α использовали для анализа 5' и 3' соединений обработанных глобин-донорным вектором образцов, соответственно. ПЦР-ампликоны очищали в геле, клонировали, секвенировали и выравнивали, чтобы идентифицировать сайты интеграции.

[0965] **Инвертированная ПЦР:** Геномную ДНК выделяли, как описано в разделе по инвертированной ПЦР. 5 нг геномной ДНК непосредственно использовали в качестве матрицы для инвертированной ПЦР с ДНК-полимеразой KOD Hot Start в 25 мкл реакции. Использовали следующую программу ПЦР: 94°C 2 мин; 5 циклов 98°C 10 с, 66°C 30 с и 68°C 1,5 мин; 5 циклов 98°C 10 с, 63°C 30 с и 68°C 1,5 мин; 15 циклов 98°C 10 с, 60°C 30 с и 68°C 1,5 мин; 68°C 5 мин. Используемые праймеры: инвертированный P1 (SEQ ID NO: 230), инвертированный P2 (SEQ ID NO: 231) и инвертированный P3 (SEQ ID NO: 232). Продукты разделяли в 1% агарозном геле. Одна одиночная 1,6 т. о. полоса указывает на биаллельную нацеленную интеграцию; одна 1,6 т. о. плюс одна 2,0 т. о. полоса указывает на моноаллельную нацеленную интеграцию; одна одиночная 2,0 т. о. полоса указывает на потенциальную ненацеленную интеграцию.

[0966] **In silico предсказание нецелевых сайтов расщепления:** Нецелевые сайты расщепления гидовой последовательности AAVS1 в человеческом или мышинном геноме предсказывали, используя онлайн-инструмент: доступный на sanger.ac.uk/htgt/wge/find_off_targets_by_seq.

[0967] **Исследования на животных:** Все эксперименты проводили с разрешения управляющего Институционального наблюдательного совета и IACUC. Мышей держали в

специальных беспатогенных вивариях. AAVS1-трансгенных мышей (C3; B6-Tg(AAVS1)A1Xob/J) (The Jackson Laboratory) получали из криоконсервированных эмбрионов мышей, как описано в Bakowska et al. (Gene Ther, 10, 1691-1702, 2003). Мыши являются гемизиготными в отношении локуса AAVS1 человека. AAVS1-трансгенных мышей скрещивали с ^{+/+} мышами в отношении CD46 человека для получения мышей AAVS1^{+/-}CD46^{+/-} для ex vivo исследований и мышей AAVS1^{+/-}CD46^{+/+} для исследований in vivo трансдукции ГСК. Для генотипирования мышей CD46 использовали следующие праймеры: прямой (SEQ ID NO: 233) и обратный (SEQ ID NO: 234). Мышей, гомозиготных и гетерозиготных в отношении CD46, идентифицировали по разной интенсивности экспрессии CD46 на МКПК, выявляемой методом проточной цитометрии. Генотипирование трансгена AAVS1 проводили методом ПЦР в соответствии с протоколом, рекомендованным Jackson Labs.

[0968] **Трансплантация Lin⁻ клеток костного мозга:** Реципиентами были самки мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель. В день трансплантации мышей-реципиентов облучали дозой 1000 рад. Через четыре часа после облучения 1×10^6 Lin⁻ клеток вводили внутривенно через хвостовую вену. Этот протокол использовали для трансплантации ex vivo трансдуцированных Lin⁻ клеток и для трансплантации вторичным реципиентам.

[0969] **Мобилизация ГСК и in vivo трансдукция:** Эта процедура была описана ранее в (Richter et al., Blood, 128, 2206-2217, 2016). Вкратце, ГСК мобилизовали у мышей путем п/к инъекций человеческого рекомбинантного G-CSF (5 мкг/мышь/день, 4 дня) (Amgen Thousand Oaks, CA) с последующей п/к инъекцией AMD3100 (5 мг/кг) (Sigma-Aldrich) на день 5. Кроме того, животные получали дексаметазон (10 мг/кг) в/б за 16 ч и 2 ч до инъекции вируса. Через тридцать и 60 минут после AMD3100 животным внутривенно вводили векторы HDAd-CRISPR и HDAd-GFP-донор или HDAd-глобин-донор через ретро-орбитальное сплетение с дозой 4×10^{10} вч для каждого вируса на инъекцию. Через четыре недели мышам инъецировали O⁶-BG (15 мг/кг, в/б), два раза, с перерывом в 30 минут. Через один час после второй инъекции O⁶-BG мышам инъецировали BCNU (5 мг/кг, в/б). Дозу BCNU повышали во время второго цикла до 10 мг/кг. Как BCNU, так и O⁶-BG были от Sigma-Aldrich.

[0970] **Статистический анализ:** Для сравнения множества групп использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Бонферрони для множественного сравнения. Статистический анализ проводили, используя GraphPad Prism версии 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

[0971] **Результаты**

[0972] **Дизайн векторов HDAd-CRISPR и HDAd-донор.** создавали вектор

HDAd5/35⁺⁺, экспрессирующий CRISPR/Cas9. Этот вектор способен создавать дц разрывы ДНК в локусе AAVS1 (Фиг. 55A). Предыдущие исследования продемонстрировали, что сайт-специфическая интеграция в этот локус обеспечивала устойчивую экспрессию трансгена без побочных эффектов в первичных человеческих клетках (Lombadro et al., Nat Methods, 8, 861-869, 2011). Чтобы исследовать активность соответствующего вектора HDAd-CRISPR трансдуцировали человеческие CD34⁺ клетки, клеточную фракцию, богатую на ГСК. Сайт-специфическое расщепление AAVS1 на 3 день после инфицирования с частотой 42% было продемонстрировано чувствительным к несопадениям нуклеазным анализом T7E1 (Фиг. 55B). Для глубокого секвенирования инсерций/делеций (инделей) HDAd-CRISPR проводили ПЦР-амплификацию 250 п. о. области, окружающей предсказанный сайт расщепления AAVS1, и секвенировали продукты, используя систему Illumina (Фиг. 55C). 80% инделей были делециями в диапазоне 1-20 п. о. и только 10% были 1-2 п. о. микроинсерциями.

[0973] Вектор HDAd5/35⁺⁺ использовали в качестве донорного вектора. Первый вектор HDAd-донор содержал экспрессионную кассету для GFP и *mgmt*^{P140K}, фланкируемую с двух сторон областями длиной 0,8 т. о., которые являются гомологичными участкам, непосредственно примыкающим к сайту-мишени CRISPR/Cas9 (Фиг. 55D). Линейные двухцепочечные аденовирусные геномы ковалентно связаны с вырабатываемым вирусом «концевым белком - КБ», когда они попадают в клетки и транслоцируются в ядро (Shenk, Fields Virology, 2:2111-2148, 1996). То же самое происходит с геномами HDAd5/35⁺⁺, где КБ получен из хелперного вируса. Считается, что отсутствие свободных концов ДНК в доноре сильно снижает ГР (Cristea et al., Biotechnol Bioeng, 110, 871-880, 2013). В донорный вектор были включены сайты-мишени оГРНК для CRISPR AAVS1, фланкирующие кассету донорного трансгена (Фиг. 55D). Следовательно, совместное инфицирование HDAd-CRISPR и HDAd-GFP-донор должно одновременно создавать разрывы дцДНК в хромосомном сайте-мишени AAVS1 и высвободить донорную кассету из прибывающего генома HDAd-донор внутри ядра. Было продемонстрировано IA HDAd-CRISPR-опосредованное высвобождение донорной кассеты из совместно инфицированного вектора HDAd-GFP-донор с эффективностью 13,2 и 18,1% в CD34⁺ клетках на 2 день после инъекции при общей МЗ 1000 и 2000 вч/клетка, соответственно (Фиг. 55E). Это наблюдение также указывает на то, что CRISPR/Cas9 способна расщеплять двухцепочечную линейную аденовирусную ДНК, что имеет последствия для противовирусной терапии.

[0974] *Нацеленная интеграция in vitro*. Сначала векторную систему HDAd-CRISPR+HDAd-донор исследовали в отношении нацеленной интеграции *in vitro* при

прямом сравнении с векторной системой SB100x, которая опосредует случайную интеграцию (Фиг. 56А). Использовали клетки HUDEP-2, человеческие эритроидные клетки-предшественники. Эта линия клеток является диплоидной и допускает размножение одиночных колоний, характеристика, которая облегчает анализ сайтов интеграции. Проточная цитометрия GFP, проведенная на 2 день после трансдукции клеток HUDEP-2, продемонстрировала сходное процентное содержание GFP-положительных клеток для SB100x-опосредованной системы и системы нацеленной интеграции, что указывает на сходные уровни трансдукции (Фиг. 56В, верхняя панель). Источником экспрессии GFP на 2 день вероятно являются эписомальные геномы, поскольку трансдукция одним HDAd-GFP-донор приводила к аналогичному присутствию GFP. После культивирования трансдуцированных клеток в течение 21 дня вследствие пролиферации клеток эписомальные геномы исчезали, на что указывает отсутствие экспрессии GFP в применении только HDAd-GFP-донор. На 21 день 4,52% и 1,82% клеток были GFP-положительными в случае SB100x-опосредованной системы и системы нацеленной интеграции, соответственно (Фиг. 56В, нижняя панель). Это позволяет предположить, что система SB100x обеспечивает более высокие уровни стабильной экспрессии. Однако уровень экспрессии GFP, отображаемый средней интенсивностью флуоресценции (СИФ), был выше в клетках, трансдуцированных обоими HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор в популяции клеток на день 21 (Фиг. 56С) и на уровне одиночных клонов (Фиг. 56D). Анализ интеграции вектора проводили на одиночных клонах. Из-за длинных областей гомологии, фланкирующих кассету трансгена, было невозможно использовать обычно применяемые инструменты для анализа сайтов интеграции вектора (например, ОЛА-ПЦР). Чтобы продемонстрировать наличие векторно-клеточных ДНК-соединений, использовали метод инвертированной ПЦР (иПЦР), который включает эндонуклеазное расщепление геномной ДНК на 4 т. о. фрагменты, их циркуляризацию и последующую ПЦР с трансген-специфическими праймерами (Wang et al., J Virol, 79, 10999-11013, 2005). Результаты показали, что все исследуемые 36 колоний, полученные из трансдуцированных HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор клеток HUDEP-2, содержали трансгены, интегрированные в сайт AAVS1 (Фиг. 57А). Это согласуется с однородным высоким уровнем экспрессии трансгена в клонах с нацеленной интеграцией. Инвертированная ПЦР с AAVS1- и трансген-специфическими праймерами выявила, что интеграция в 3 из 36 колоний происходила в обоих аллелях; 31 из 36 характеризовались моноаллельной интеграцией, а 2 очевидно содержали конкатемерные интегранты (Фиг. 57В). В противоположность этому, SB100x-опосредованная случайная интеграция без предпочтительного нацеливания на конкретный

локус (Wang et al., 2019. J Clin Invest, 129, 598-615, Boehme et al., Mol Ther Nucleic Acids, 5, e337, 2016) приводили к различным уровням сайленсинга генов (Фиг. 56E). Сходные уровни числа копий вектора были выявлены в клонах с SB100× и нацеленной интеграцией (Фиг. 56F).

[0975] В целом, *in vitro* показали, что система HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор обеспечивала нацеленную интеграцию с высокой эффективностью и приводила к более высоким уровням экспрессии GFP, чем SB100x-опосредованная система. Эффективность стабильной интеграции была на 40% ниже для нацеленной системы.

[0976] *Ex vivo* трансдукция AAVS1/CD46 ГСК HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор и последующая трансплантация реципиентам после летальной дозы облучения. После этого систему нацеленной интеграции исследовали в ГСК от мышей AAVS1/CD46tg. Частота расщепления сайта-мишени после *ex vivo* трансдукции отрицательных по линии дифференцировки (Lin⁻) клеток, фракции клеток костного мозга, богатой на ГСК, составляла 25% после трансдукции вектором HDAd-CRISPR при МЗ 1000 вч/клетка (Фиг. 58A). Процентное содержание инсерций/делаций приведено на Фиг. 58B при 0% и 50% расщепления. Типовые последовательности приведены на Фиг. 58C. Lin⁻ клетки AAVS1/CD46, трансдуцированные *ex vivo* только HDAd-CRISPR, только HDAd-GFP-донор и комбинацией обоих, трансплантировали мышам C57Bl/6 после летальной дозы облучения, которых затем наблюдали в течение 16 недель (Фиг. 59A). Приживление трансплантированных клеток на основе экспрессии человеческого CD46 на МКПК измеряли по проценту CD46⁺ МКПК в указанные моменты времени. Трансдуцированные донорные клетки экспрессировали CD46 (Фиг. 60B), тогда как реципиентные мыши C57Bl/6 - нет. Процентное содержание CD46⁺ клеток в МКПК (крови), селезенке и костном мозге приведено на Фиг. 60C и 60D. Экспрессию маркера GFP также анализировали в колониях и объединенных клетках колоний.

[0977] Уровни приживания донорных клеток были сравнимыми для всех трех условий (Фиг. 60), что позволяет предположить, что геномная модификация, внесенная в ГСК векторами HDAd-CRISPR и HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор, не оказывала вредного воздействия на биологию ГСК, в частности на мультилинейную репопуляцию реципиентов после летальной дозы облучения. Уровни присутствия GFP, достигавшие 100%, появлялись в МКПК после трех раундов O⁶BG/BCNU отбора ГСК/предшественников, которые стабильно экспрессировали трансгены (Фиг. 59B, 59C). Перед отбором (4 недели после трансплантации) процентное содержание GFP⁺ МКПК составляло 1,1%, что указывает на то, что нацеленная интеграция является редким событием. GFP⁺ МКПК составляли в среднем менее 0,2% у мышей, которым

трансплантировали Lin⁻ клетки, трансдуцированные только HDAd-GFP-донор. Это указывает на необходимость CRISPR/Cas9-опосредованных разрывов дцДНК для достижения стабильной экспрессии трансгена. Мыши, которых анализировали на 16 неделе после трансплантации, демонстрировали присутствие GFP во всех линиях дифференцировки, анализируемых в костном мозге, селезенке и МКПК (Фиг. 59D). Присутствие GFP сохранялось в течение 16 недель у реципиентов вторичных трансплантатов, демонстрируя, что примитивные ГСК были генетически модифицированы векторной системой HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор (Фиг. 61A), в том числе в крови, селезенке и костном мозге (Фиг. 61B, 61C), и как показано для колоний и объединенных клеток колоний (Фиг. 61D). Процент CD46 человека⁺ клеток и процентное содержание в крови, селезенке и костном мозге дополнительно приведены на Фиг. 61E и 61F.

[0978] *In vivo* трансдукция ГСК мышей AAVS1/CD46tg с помощью HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор. Для *in vivo* трансдукции ГСК AAVS1/CD46-трансгенных мышей ГСК мобилизовали из костного мозга в периферический кровоток посредством подкожных инъекций G-CSF/AMD3100 и трансдуцировали *in vivo* с помощью внутривенно вводимых векторов HDAd-CRISPR+HDAd-GFP-донор (Фиг. 62A). После *in vivo* отбора с тремя циклами O⁶BG/BCNU 60% мышей демонстрировали экспрессию GFP в МКПК в диапазоне от 35 до 95% GFP⁺ МКПК у отдельных животных (Фиг. 62B). На 16 неделе после *in vivo* трансдукции аналогичное присутствие наблюдалось в мононуклеарных клетках в крови, селезенке и костном мозге (Фиг. 62C). Присутствие GFP наблюдалось в клетках линий дифференцировки CD3⁺, CD19⁺ и Gr-1⁺ в крови, селезенке и костном мозге (Фиг. 62D). В костном мозге «демонстрирующих ответ» более 50% клеток LSK (фракция, богатая на ГСК) были GFP-положительными (Фиг. 62D, последняя группа). Это также отображалось функциональным анализом для ГСК, способности образовывать колонии предшественников (Фиг. 62E). Кроме того, трансдукция примитивных ГСК с долгосрочной репопуляцией была продемонстрирована у вторичных реципиентов (смотрите процентное содержание GFP⁺ МКПК в указанные моменты времени (Фиг. 63A), процентное содержание GFP⁺ клеток в крови, селезенке и костном мозге (Фиг. 63B, 63C); процентное содержание CD46 человека⁺ клеток (Фиг. 63D) и процентное содержание в крови, селезенке и костном мозге (Фиг. 63E)). Процедура *in vivo* трансдукции/отбора ГСК не оказывала негативного влияния на композицию клеток костного мозга и гемопоэз (Фиг. 62F).

[0979] *Ex vivo* и *in vivo* трансдукция ГСК вектором HDAd-CRISPR и HDAd-глобин-донор. Хотя исследования с вектором HDAd-GFP-донор позволяют предположить

стабильную трансдукцию ГСК у большинства животных, желателен более высокий уровень демонстрирующих ответ животных. Для этого необходимо повысить эффективность ГР-опосредованной интеграции, что можно обеспечить путем увеличения длины плеч гомологии (Balamotis et al., *Virology*, 324, 229-237, 2004, Ohbayashi et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 13628-13633, 2005, Suzuki et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 13781-13786, 2008). Создавали новый вектор HDAd-донор с 1,8 т. о. областями, которые были гомологичными геномным последовательностям AAVS1, окружающим сайт расщепления CRISPR/Cas9 (Фиг. 64А). Для применения в генной терапии гемоглобинопатий использовали ген человеческого γ -глобина (HBG1) под контролем мини-LCR γ -глобина. Вектор HDAd-глобин-донор исследовали по протоколам как *ex vivo*, так и *in vivo* трансдукции ГСК. В условиях *ex vivo* трансдукции (Фиг. 64В) наблюдали, что все демонстрировавшие ответ мыши экспрессировали γ -глобин в 80% красных клеток периферической крови (RBC) (Фиг. 64С). Процентное содержание γ -глобин-положительных эритроидных (Ter119⁺) клеток в крови и костном мозге было значительно выше, чем незрелых (Ter119⁻) клеток (Фиг. 64D). То же самое было в случае СИФ γ -глобина (Фиг. 64Е). Это позволяет предположить, что мини-LCR обеспечивает преимущественную экспрессию в эритроидных клетках. На 16 неделе уровень γ -глобина составлял 20,52(+/-5,66) % от уровня взрослого мышинового γ -глобина по данным ВЭЖХ (Фиг. 64F) и 22,33(+/-6,21) % по данным кОТ-ПЦР (Фиг. 64G). В предыдущем исследовании, проводимом в таком же режиме с системой SB100x, уровни экспрессии γ -глобина составляли 15,74(+/-2,69) % по данным ВЭЖХ и 15,40(+/-9,21) % по данным кОТ-ПЦР (Li et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 9, 142-152, 2018). Это подразумевает, что уровень экспрессии γ -глобина выше для системы нацеленной интеграции по сравнению с системой SB100x. Действительно, для системы нацеленной он находился бы в диапазоне терапевтических уровней, которые, как полагают, составляют 20% γ -глобина от взрослого глобина для пациентов с β_0/β_0 талассемией или серповидноклеточной анемией (Wang et al., *J Clin Invest*, 129, 598-615, 2019). В соответствии с предыдущими исследованиями (Wang et al., *J Clin Invest*, 129, 598-615, 2019) в среднем были обнаружены две копии интегрированного вектора на геном на 16 неделе в полученных из одиночных Lin⁻ клеток колониях (Фиг. 64H). *Ex vivo* трансдукция ГСК Lin⁻ клеток не влияла на их способность в отношении мультилинейного приживления и полного гемопоэтического восстановления у реципиентов после летальной дозы облучения (смотрите процентное содержание человеческих CD46⁺ клеток в указанные моменты времени (Фиг. 65А), процентное содержание в крови, селезенке и костном мозге (Фиг. 65В)). Анализ вторичных реципиентов трансплантата ГСК показал, что *ex vivo* трансдукция вектором HDAd-

CRISPR+HDAd-глобин-донор с последующим *in vivo* отбором не влияли на пул ГСК, способных к долгосрочной репопуляции (смотрите процентное содержание γ -глобин человека+ клеток в RBC (Фиг. 66A), процентное содержание CD46 человека+ клеток (Фиг. 66B) и процентное содержание в крови и костном мозге (Фиг. 66C)).

[0980] В исследованиях *in vivo* трансдукции ГСК вектором HDAd-CRISPR+HDAd-глобин-донор (Фиг. 67A), после *in vivo* отбора 4 из 5 мышей демонстрировали стабильную экспрессию γ -глобина в RBC в диапазоне от 40 до 97% γ -глобин⁺ RBC у отдельных мышей (Фиг. 67B). Экспрессия γ -глобина была обнаружена преимущественно в эритроидных клетках (Фиг. 67C, 67D). Уровни экспрессии γ -глобина в RBC составляли 23,97(+/-7,22) % по данным ВЭЖХ (Фиг. 67E, 67H) и 24,53(+/-7,34) % по данным КОТ-ПЦР (Фиг. 67F) от уровней взрослого мышинового γ -глобина. Число копий вектора на клетку находилось в диапазоне от 1,5 до 2,5 у отдельных мышей (Фиг. 67G). В таких же условиях *in vivo* трансдукции/отбора ГСК с использованием векторов γ -глобина на основе SB100x, уровни γ -глобина составляли 10,5(+/-3,1) % по данным ВЭЖХ и 12,17(+/-3,38) % по данным КОТ-ПЦР в среднем с 2 интегрированными копиями вектора на геном (Wang et al., J Clin Invest, 129, 598-615, 2019). Трансплантация Lin⁻ клеток костного мозга, собранных на 16 неделе после *in vivo* трансдукции HDAd-CRISPR+HDAd-глобин-донор реципиентам после летальной дозы облучения, показала 100% приживление и стабильную экспрессию γ -глобина в RBC в течение 16 недель со средним уровнем 24% γ - от взрослого β -глобина (смотрите процентное содержание CD46 человека+ клеток в МКПК в указанные моменты времени (Фиг. 68A); процентное содержание γ -глобин+ клеток в периферической крови в указанные моменты времени (Фиг. 68B); человеческий γ -глобин в виде процента от мышинового β -основного белка (Фиг. 68C); и процентное содержание в крови, селезенке и костном мозге (Фиг. 68D)).

[0981] В целом, исследования трансдукции ГСК HDAd-CRISPR+HDAd-глобин-донор привели к стабильной экспрессии γ -глобина на уровнях, значительно больших тех, которые были достигнуты в предыдущих исследованиях с системой на основе SB100x.

[0982] *Расположение локуса AAVS1 у AAVS-трансгенных мышей.* Для инвертированной ПЦР (иПЦР) для анализ сайтов интеграции необходимо знать расположение локуса AAVS1 в геноме AAVS1/CD46-трансгенных мышей. Чтобы определить его, технологию нацеленной амплификации локуса (НАЛ)/ПЦР, которая включает перекрестное шивание физически близких последовательностей (de Vree et al., Nat Biotechnol, 32, 1019-1025 2014; смотрите Материалы и методы). Данные НАЛ, полученные для клеток костного мозга мышей AAVS1/CD46-tg затем выравнивали с эталонным мышинным геномом (Фиг. 69). Результаты НАЛ показывают, что 18 т. о. локус

AAVS1 интегрирован в хромосому 14 в положении (Xp14:110443871-110461834) (Фиг. 55B). Используя эту информацию, применяли праймеры для секвенирования в локус (Фиг. 70). Были обнаружены повторы локуса AAVS1, обращенные слева направо и справа налево. Оба концевых повтора (№ 1 и № 5) были усечены и имели длину 4,5 и 2,8 т. о., соответственно. В повторе № 5 отсутствует полная 5' область гомологии. Эта комбинация сайтов-мишеней усложняла анализ сайтов интеграции. Некоторые теоретические результаты для интеграции системой HDAd-CRISPR+HDAd-донор приведены на Фиг. 70.

[0983] *Хромосомная интеграция после ex vivo и in vivo трансдукции ГСК с помощью HDAd-CRISPR+HDAd-донор.* Первый геномный Саузерн-блоттинг проводили на ДНК из клеток костного мозга, собранных на неделе 16. Гибридизация EcoRI-расщепленной геномной ДНК с AAVS1-специфическим зондом показала у всех анализируемых мышей наличие 3,9 т. о.-специфической полосы, указывающей на интеграцию донорной кассеты в один (или более) из повторов локуса AAVS1 (Фиг. 71A). Гибридизация BlnI-расщепленной ДНК с GFP-зондом приводила к появлению 5,8 т. о. сигналов у 5 из 10 мышей, репрезентативных в отношении интеграции в полноразмерные повторы № 2-4 (Фиг. 71B). 5 и 6 т. о. сигналы могли быть результатом интеграции в повторы № 1 и 5, соответственно. У двух из десяти мышей обнаружили интеграции в нескольких повторах мотива AAVS1. Чтобы продемонстрировать наличие соединений трансген/хромосома, проводили иПЦР на геномной ДНК от мышей (Фиг. 72A, 72B). Шесть из восьми мышей демонстрировали наличие ПЦР-продуктов, соответствующих ГР-опосредованной интеграции в сайт AAVS1 (Фиг. 72B). Несколько из этих мышей имели дополнительные полосы в результате интеграции в нецелевые сайты CRISPR/Cas9 в хромосоме 5 (Фиг. 72B). Также были обнаружены полосы в результате интеграции полноразмерного генома HDAd, включая ИКП в качестве соединений. Что интересно эти интегрированные полноразмерные геномы HDAd находились в хромосоме 14, хромосоме, содержащей сайт-мишень CRISPR AAVS1 (Фиг. 72B). В попытке расшифровать эти результаты, полученные для пула клеток костного мозга, высеивали GFP⁺ Lin⁻ клетки костного мозга для создания колоний предшественников, полученных из одиночных клеток (Фиг. 72C). Анализ колоний от мышей с только одной полосой, специфической для ГР-интеграции в AAVS1 (например, мышь № 943), показал однородные сигналы во всех колониях, тогда как колонии от мышей с дополнительной нецелевой интеграцией (например № 946) демонстрировали химерный профиль: девять из десяти колоний только с целевой интеграцией, одна колония, содержащая как целевую, так и нецелевую интеграцию, что возможно, потому что среднее число интегрированных трансгенов на геном составляет 2. Анализ сайтов интеграции клеток костного мозга в ex vivo и in vivo

исследованиях трансдукции векторами HDAd-CRISPR и HDAd-глобин-донор выявил сходные результаты (Фиг. 73А & 73В, демонстрирующие нецелевую интеграцию (Фиг. 73А) и образцы с целевой и/или нецелевой интеграцией (Фиг. 73В)). В условиях *ex vivo* трансдукции ГСК с помощью HDAd-CRISPR+HDAd-глобин-донор было обнаружено большее относительное число животных с нацеленными интеграциями по сравнению с исследованием *in vivo* трансдукции ГСК только вектором HDAd-GFP-донор. Это может быть связано с более высокой эффективностью ГР на основе более длинных областей гомологии.

[0984] В целом, эти исследования интеграции показывают высокую частоту целевых интеграций в локусы AAVS1. Часть интеграций находилась в нецелевых сайтах CRISPR и, возможно, в областях, которые содержали большие обусловленные CRISPR делеции в хромосоме, которая содержала сайт-мишень.

[0985] **Обсуждение.** Самоинактивирующиеся лентивирусные векторы, в отличие от гамма-ретровирусных векторов, не были связаны со связанной с сайтом вставки злокачественной клональной экспансией в клинических исследованиях генной терапии ГСК. Однако этот риск нельзя полностью исключить, как показывает недавнее исследование на отличных от человека приматах (Espinoza et al., *Mol Ther*, 6, 1074-1086, 2019). Теоретически случайный профиль интеграции, опосредованный SB100x, и отсутствие предпочтительности в отношении интеграции в активные гены и промоторы должны быть более безопасными, но сомнения относительно генотоксичности остаются. Следовательно, основное усилие в данной области направлено на нацеленную интеграцию трансгена в предварительно выбранные сайты, такие как сайт AAVS1. Опосредованная мРНК цинк-пальцевой нуклеазы и донорной матрицей AAV6 доставка в ГСК человека приводила к > 50% нацеленной интеграции в локус AAVS1 (De Ravin et al., *Nat Biotechnol*, 34, 424-429, 2016). В других исследованиях, в которых применяли AAVS1-специфический РНП CRISPR/Cas9 и AAV6 для доставки донорной матрицы, частота сайт-специфической интеграции составляла 25% (Johnson et al., 2018. *Sci Rep*, 8, 12144). Сходные уровни были достигнуты для нацеленной интеграции в CCR5 (Hung et al., *Mol Ther*, 26, 456-467, 2018).

[0986] Этот подход для нацеленной интеграции AAVS1 имеет ряд новых аспектов. (i) Применение хелпер-зависимого, капсид-модифицированного вектора HDAd для доставки донорной матрицы. Соответствующие геномы представляют собой двухцепочечную линейную ДНК, ковалентно связанную на обоих концах с вирусным белком TP. Считается, что в отличие от одноцепочечных донорных векторов AAV6 двухцепочечная линейная аденовирусная ДНК не является оптимальной матрицей для ГР.

Чтобы компенсировать этот потенциальный недостаток, сайты расщепления CRISPR/Cas9 AAVS1 включали в векторы HDAd-донор для создания свободных «рекомбиногенных» концов ДНК. (ii) Поскольку емкость векторов HDAd составляет 30 т. о., было возможным включение плеч гомологии, которые превышали бы паковую емкость векторов rAAV6 или IDLV. Предыдущие исследования (Balamotis et al., *Virology*, 324, 29-237, 2004, Ohbayashi et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 13628-13633, 2005, и Suzuki et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 13781-13786, 2008) и сравнение векторов HDAd-донор в 0,8 и 1,8 т. о. областями гомологии позволяют предположить, что повышение гомологии увеличивало число демонстрирующих ответ мышей с высоким уровнем экспрессии трансгена, а также часть мышей с нацеленной интеграцией. (iii) Большая емкость HDAd5/35++ также позволила включать кассету *in vivo* отбора на основе $mgmt^{P140K}$ в донорную матрицу, опосредуя, таким образом, избирательную выживаемость и размножение дочерних клеток, не влияя на пул трансдуцированных примитивных ГСК, посредством краткосрочной обработки низкой дозой O⁶BG/BCNU (Wang et al., *Mol Ther Methods Clin Dev*, 8, 52-64, 2018). С учетом низкой эффективности ГР и, следовательно, нацеленной интеграции в ГСК (Genovese et al., *Nature*, 510, 235-240, 2014), *in vivo* отбор ГСК имеет критически важное значение для достижения высоких уровней присутствия трансгена в клетках периферической крови. (iv) И наконец, из-за простоты получения высокого выхода векторов HDAd5/35++ и их тропизма в отношении примитивных ГСК их можно использовать для *in vivo* трансдукции ГСК посредством внутривенной инъекции мобилизованным животным. Следовательно, можно было проводить контрольно-проверочное исследование *in vivo* генной терапии ГСК гемоглинопатий с целевой интеграцией трансгена.

[0987] Для достижения стабильной экспрессии трансгена (GFP или γ -глобина) важным было совместное инфицирование HDAd-донор и HDAd-CRISPR, что позволяет предположить, что CRISPR-опосредованные разрывы геномной ДНК, наиболее вероятно, высвобождают донорную матрицу из вектора HDAd-донор в большой степени стимулировали интеграцию. Показателем интеграции трансгена в ГСК после *in vivo* трансдукции HDAd-донор+HDAd-CRISPR была доля мышей, которые демонстрировали стабильную экспрессию трансгена на высоком уровне после завершения *in vivo* отбора (т. е. «демонстрирующих ответ»). Таких было 6 из 16 (37,5%) в случае HDAd-GFP-донор+HDAd-CRISPR и 4 из 5 (80%) в случае HDAd-глобин-донор+HDAd-CRISPR. Следует отметить, что уровень «демонстрирующих ответ» с высокой частотой нацеленной интеграции составлял 100% для обоих векторов в условиях *ex vivo* трансдукции. Это показывает, что ограничивающим фактором для подхода нацеленной *in vivo* трансдукции

ГСК является эффективностью инфицирования ГСК. Теоретически, начальный этап инфицирования можно улучшить за счет оптимизированной схемы мобилизации ГСК (Psatha et al., Hum Gene Ther Methods, 25, 317-327, 2014) и двух раундов инъекции HDAd с интервалом в день.

[0988] Эти данные показывают, что векторная система является эффективным инструментом для обеспечения нацеленной интеграции в ГСК в условиях *ex vivo* и *in vivo* трансдукции. В значительной степени этот может быть связано с высокой эффективностью доставки вектора HDAd-донор в ядро неделящихся клеток, способностью к высвобождению донорной кассеты из векторного остова и емкостью векторов HDAd для включения крупных областей гомологии.

[0989] Важным открытием этого исследования было то, что система нацеленной интеграции обеспечивала более высокие уровни экспрессии трансгена, чем система на основе SB100x в условиях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* трансдукции. Это, в частности, важно для терапии гемоглинопатий (β_0/β_0 талассемии серповидноклеточной анемии), для которой необходим γ -глобин на уровнях, составляющих > 20% от уровней взрослого глобина. У «демонстрирующих ответ» мышей, которые были *ex vivo* или *in vivo* трансдуцированы HDAd-CRISPR+HDAd-глобин-донор, были достигнуты эти теоретически терапевтические уровни. это является важным улучшением по сравнению с предыдущим исследованием мышинной модели талассемии, в котором использовали систему транспозазы SB100x для добавления гена γ -глобина (Wang et al., J Clin Invest, 129, 598-615, 2019). Эпигеномные эффекты на экспрессию трансгена могут быть менее выражены после интеграции в локус AAVS1, который, как известно, поддерживает открытую конфигурацию хроматина в ГСК (Wang et al., Genome Res, 17, 1186-1194, 2007, Huser et al., PLoS Pathog, 6, e1000985, 2010, van Rensburg et al., Gene Ther, 20, 201-214, 2013) и у AAVS1-трансгенных мышей. С другой стороны, нельзя исключить, что случайная SB100x-опосредованная интеграция помещает трансгены в области, которые подвергаются сайленсингу.

[0990] Анализ сайтов интеграции позволяет предположить практически 100% эффективность нацеленной интеграции после *in vitro* трансдукции клеток HUDEP-2. В исследованиях *ex vivo* и *in vivo* трансдукции ГСК как Саузерн-блоттинг, так и иПЦР геномной ДНК костного мозга показали наличие эффективной нацеленной интеграции в ГСК костного мозга. Например, иПЦР интеграционных соединений показала наличие нацеленной интеграции у 75% мышей, при этом большинство из этих мышей не имели нецелевой интеграции. Это было дополнительно подтверждено анализом колоний, полученных из одиночных КОЕ. При низкой частоте интеграции также обнаружили в

двух из предсказанных *in silico* нецелевых сайтов CRISPR Cas9. Кроме того, были обнаружены полноразмерные геномы HDAd-донор, интегрированные в хромосому 14, хромосому, которая несет локусы AAVS1. Ранее было обнаружено, что ИКП HDAd предрасположены к разрывам ДНК, и это может приводить к неэффективной интеграции в геномные сайты, в которых происходят разрывы ДНК (Wang et al., J Virol, 79, 10999-11013, 2005, Wang et al., J Virol, 80, 11699-11709, 2006). С учетом недавних исследований по CRISPR/Cas9-индуцированным нежелательным крупным делециям/транслокациям (7-8 т. о.) вокруг сайта-мишени (Kosicki et al., Nat Biotechnol, 36, 765-771, 2018), возможно, что разрывы ДНК CRISPR-Cas9 вдалеке от сайта-мишени могут влиять на интеграцию полных геномов HDAd. В целом, данные по крупным делециям/транслокациям ставят под вопрос безопасность CRISPR/Cas9. С другой стороны, поскольку до сих пор не сообщалось о влиянии CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования зародышевой линии у животных на развитие, вероятно, что клетки с такими вредоносными хромосомными изменениями отбраковываются во время развития. Подтверждение этой гипотезы можно найти в недавнем исследовании на ОЧП, в котором трансплантировали CRISPR Cas9-отредактированные ГСК, а 9 т. о. делеция в области HBG1/2 со временем исчезала в МКПК (Humbert et al., 23rd Annual Meeting of the ASGCT, abstract № 974, 2019).

[0991] Из этих исследований можно заключить, что мышинная модель AAVS1tg является субоптимальной для исследований нацеленной интеграции, включающих CRISPR/Cas9 из-за наличия множества целевых локусов AAVS1, некоторые из которых были усечены до такой степени, что они утрачивали участки гомологии с вектором HDAd-донор. Наличие усеченных локусов AAVS1 также позволяет предположить, что у AAVS1-трансгенных мышей может происходить перестройка, как сообщалось ранее (Linden et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93, 7966-7972, 1996).

[0992] Пример 6. Профилактическая *in vivo* генная терапия гемопоэтическими стволовыми клетками с ингибитором иммунных контрольных точек обращает рост опухолей в сингенной мышинной модели опухоли.

[0993] По меньшей мере некоторая информация из этого примера была опубликована в Li et al. (Cancer Res. 80(3):549-560, 2020; опубликована онлайн 14 ноября 2019 г.).

[0994] Популяционное исследование ассоциированных с раком мутаций зародышевой линии позволило установить, что одна пятая карцином яичника и молочной железы связаны с наследственным риском. Сальпингоовариэктомия и/или мастэктомия на сегодняшний день являются единственными эффективными вариантами, предлагаемыми женщинам с несущими высокий риск мутациями. Целью является разработка

долгосрочного подхода, который бы обеспечивал иммунопрофилактику для носителей наследственных мутаций. В этом подходе используется тот факт, что на ранних стадиях опухоль рекрутирует гемопоэтические клетки/клетки-предшественники (ГСКП) из костного мозга и дифференцирует их в поддерживающие опухоль клетки. Была разработана технически простая технология для генетической модификации ГСКП *in vivo*. Эта технология включает мобилизацию ГСКП и внутривенную инъекцию интегрирующегося вектора HDAd5/35++. *In vivo* трансдукция ГСКП с помощью GFP-экспрессирующего вектора и последующая имплантация сингенных опухолевых клеток продемонстрировали > 80% присутствие GFP в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах. Для контроля экспрессии трансгенов была разработана система регуляции на основе миРНК, которая активируется только в случае, когда ГСКП рекрутируются в опухоль и дифференцируются ею. Этот подход исследовали, используя ингибитор иммунных контрольных точек α PD-L1- γ_1 в качестве эффекторного гена. У *in vivo* ГСКП-трансдуцированных мышей с имплантированным опухолью карциномы молочной железы мышей (ММС, от англ. «mouse mammary carcinoma») после начального роста опухолей опухоли регрессировали и повторно не появлялись на протяжении периода наблюдения. Эта регрессия была опосредована Т-клетками. «Традиционная» обработка анти-PD-L1 моноклональным антителом не имела значительного противоопухолевого эффекта, что указывает на то, что ранняя самоактивирующаяся экспрессия α PD-L1- γ_1 может преодолевать иммуносупрессивное окружение в опухолях ММС. Эффективность и безопасность этого подхода дополнительно подтверждали в модели рака яичника с типичными мутациями зародышевой линии (ID8 p53^{-/-} brca2^{-/-}), как в профилактическом, так и в терапевтическом контексте.

[0995] *Материалы и методы.*

[0996] **Векторы HDAd5/35++:** HDAd-SB описан в Richter et al., Blood. 128: 2206-2217, 2016. Трансген мышиноного α PD-L1- γ_1 описан в Engeland et al., Mol Ther. 22: 1949-1959, 2014); а получение векторов HDAd5/35++ в клетках 116 описано в Palmer et al., Methods in Molecular Biology, 33-53, 2009. Уровни заражения хелперным вирусом составляли < 0,05%. Титры составляли 6-12×10¹² вч/мл. Все векторы HDAd, используемые в этом исследовании, содержали химерные фиберы, состоящие из хвоста фибера Ad5, стержня фибера Ad35 и головки фибера Ad35++ с повышенной аффинностью (Wang et al., J Virol. 82: 10567-10579, 2008). Все препараты HDAd имели менее одной копии вируса дикого типа на 1010 вч по данным измерения кПЦР с использованием праймеров, описанных в другом месте (Haussler et al., PLoS One. 6: e23160, 2011).

[0997] **Конструирование векторов HDAd-GFP/mgmt и HDAd- α PD-L1 γ_1 miR423.**

Этап 1: Промотор PGK, 3' НТО β-глобина и фрагменты поли-А BGH ПЦР-амплифицировали из рHCA-HBG-CRISPR/mgmt (Li et al., Blood. 2018;131: 2915-2928) с последующей вставкой в сайт BstBI рBS-Z-Ef1α (Saydaminova et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 1: 14057, 2015) посредством клонирования по Гибсону (New England Biolabs) с созданием рBS-PGK-3'НТО. Кодировующую последовательность GFP ПЦР-амплифицировали из рHM5-frt-IR-Ef1α-mgmt-2a-GFP (Wang et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 8: 52-64, 2018) и лигировали с EcoRI линейризованным рBS-PGK-3'НТО с созданием рBS-PGK-GFP. Этап 2: Кассету инсулятора Ef1α-mgmt^{P140K}-SV40pA-cHS4 амплифицировали из рHM5-T/μLCR-γ-глобин-mgmt-FRT2 (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev 9: 142-152, 2018) и лигировали с PacI-расщепленным рHM5-T/μLCR-γ-глобин-mgmt-FRT2 с образованием рHM5-FRT-IR-Ef1α-mgmt. Сайт BsrGI с 3' стороны cHS4 вносили с помощью праймера для последующего использования. Остов бактериальной плазмиды рHM5-FRT-IR-Ef1α-mgmt переключали на остов из рBS-Z-Ef1α, используя праймеры, содержащие 15 п. о. плечо гомологии (ПГ), для последующего инфузионного клонирования (Takara, Mountain View, CA) с созданием рBS-FRT-IR-Ef1α-mgmt. Два 15 п. о. ПГ, фланкирующие компоненты Frt-ИП, могут быть открыты после расщепления PacI для облегчения рекомбинации с модифицированной конструкцией рHCA, описанной ниже. Затем фрагмент PGK-GFP-3'НТО-BGHpA перемещали из рBS-PGK-GFP с этапа 1 в сайт BsrGI рBS-FRT-IR-Ef1α-mgmt с созданием рBS-FRT-IR-GFP/mgmt. Этап 3: Оригинальный сайт PacI в рHCA был разрушен за счет вставки двух отожденных олиго-последовательностей. новый сайт PacI вместе с двумя ПГ были созданы в сайте BstBI. И наконец, после расщепления PacI как рBS-FRT-IR-GFP/mgmt, так и модифицированного рHCA, продукты рекомбинировали посредством инфузионного клонирования с созданием рHCA-FRT-IR-GFP/mgmt, который использовали для последующего сохранения вируса. HDAd-αPD-L1γ1 конструировали аналогично HDAd-GFP/mgmt, описанным в другом месте в этом примере, за исключением того, что вместо последовательности, кодирующей GFP, вставляли трансген анти-PD-L1-γ1 в EcoRI рBS-PGK-3'НТО с этапа 1. Для регулируемой микроРНК генной экспрессии синтезированные 4 × miR423-олиго (прямой (SEQ ID NO: 24); обратный (SEQ ID NO: 25)) отжигали и вставляли в сайты AvrII-XhoI рBS-PGK-3'НТО с созданием рBS-PGK-miR423-3'НТО, который затем использовали для вставки анти-PD-L1-γ1.

[0998] HDAd-GFP-423 конструировали аналогично путем вставки 4 сайтов-мишеней × miR423 в 3'НТО HDAd-GFP/mgmt.

[0999] **Проточная цитометрия:** Клетки ресуспендировали при 1×10^6 клеток/100 мкл в ФСБ, дополненном 1% ФТС, и инкубировали с FcR-блокирующим реагентом

(Miltenyi Biotec, Auburn CA) в течение десяти минут на льду. После этого добавляли окрашивающий раствор антител при 100 мкл на 10^6 клеток и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. После инкубации клетки один раз промывали в буфере FACS (ФСБ, 1% ФБС). Для вторичного окрашивания этап окрашивания повторяли со вторичным окрашивающим раствором. После промывки клетки ресуспендировали в буфере FACS и анализировали, используя проточный цитометр LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA). Дебрис исключали, используя гейтинг на основе площади прямого рассеяния и площади бокового рассеяния. Затем проводили гейтинг одиночных клеток, используя высоту прямого рассеяния и ширину бокового рассеяния. Затем анализировали данные проточной цитометрии, используя FlowJo (версия 10.0.8, FlowJo, LLC). Во все эксперименты были включены совпадающие изотипические контроли.

[01000] **Проточная цитометрия для иммунофенотипирования:** Для проточной цитометрии использовали лимфоцитарную панель 8с (CD45-APC/Cy7, клон 30-F11, кат. № 103116; CD3-APC, клон 17A2, кат. № 100236; CD4-PE/Cy7, клон GK1.5, кат. № 100422; CD8a-PE, клон 53-6.7, кат. № 100708; CD25-BV421, клон PC61, кат. № 102043; CD19-BV510, клон 6D5, кат. № 115546; все эти антитела были от BioLegend) и миелоидную панель 9с (CD45-APC/Cy7, клон 30-F11, BioLegend, кат. № 103116; CD11c-APC, клон N418, BioLegend, кат. № 117310; F4/80-PE, клон C1:A3-1, Cedarlane, кат. № CL8940PE; МНСII-BV510, клон M5/114.15.2, BioLegend, кат. № 107635; Siglec F-PerCP, клон 1RNM44N, eBioscience, кат. № 46-1702-82; Ly6C-BV421, клон AL-21, BD Biosciences, кат. № 562727; CD11b-PE/Cy7, клон M1/70, eBioscience, кат. № 25-0112-82; Ly6G-BV605, клон 1A8, BioLegend, кат. № 127639). Стратегия гейтинга приведена на Фиг. 76. Характеристики клеток LSK (линия дифференцировки⁻ /Sca-1⁺/c-Kit⁺) были описаны ранее в Richter et al., Blood. 2016;128: 2206-2217. Также использовали следующие антитела: биотин-конъюгированный коктейль для выявления линии дифференцировки (Miltenyi Biotec, San Diego, кат. № 130-092-613); антитело к мышинному LY-6A/E (Sca-1)-PE-Cyanine7 (клон D7, eBioscience, San Diego, кат. № 25-5981-82); антитело к мышинному CD117 (c-Kit)-PE (Clone 2B8, eBioscience, San Diego, кат. № 12-1171-83); антитело к мышинному CD3-APC (клон 17A2, Invitrogen, Waltham, MA, кат. № 17-0032-82); антитело к мышинному CD19-PE-Cyanine7 (клон eBio1D3, eBioscience, San Diego, кат. № 25-0193-82); антитело к мышинному Ly-6G (Gr-1)-PE, (клон RB6-8C5, eBioscience, San Diego, CA, кат. № 12-5931-82); антитело к человеческому CD46-APC (клон E4.3, BD Pharmingen, San Diego, CA, кат. № 564253).

[1001] **Проточная цитометрия IFN γ :** Спленоциты выделяли путем пропускания свежеполученной ткани селезенки через 70 мкм сито, присоединенной к 50 мл пробирке

Falcon. После центрифугирования при $300 \times g$ в течение 10 минут красные клетки крови удаляли путем ресуспендирования клеток в 1 мл $1 \times$ раствора для лизиса BD Pharm Lyse™ (BD Pharmingen, San Diego, CA, кат. № 555899) и инкубировали в течение 30 секунд. Чтобы остановить реакцию лизиса добавляли 20 мл среды RPMI-1640. После центрифугирования и ресуспендирования в среде RPMI-1640 с 10% термоинактивированной ФБС, 100 единиц/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина, полученные спленоциты культивировали при 5×10^6 клеток/мл (200 мкл/лунка) в 96-луночных планшетах для тканевого культивирования в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂. $1 \times$ Коктейль для стимуляции клеток и ингибиторы транспорта белков (eBioscience, San Diego, кат. № 00-4975-93) присутствовали в культуральной среде для индукции и накопления выработки IFN- γ в клетках. После стимуляции в течение 12 часов клетки собирали, сначала окрашивали маркерами клеточной поверхности, как описано выше, а затем подвергали внутриклеточному окрашиванию в отношении IFN- γ (BioLegend, San Diego, CA, кат. № 505842) в соответствии с инструкциями производителя.

[1002] **Проточная цитометрия тетрамеров Neu:** PE-меченый H-2Dq/RNEU420-429 (H-2D(q) PDSLRDLSVF) (SEQ ID NO: 290) тетрамер получали от Центральной лаборатории по производству тетрамеров ГКГС Национального института по изучению аллергических и инфекционных заболеваний (Atlanta, GA) и использовали в соответствии с инструкциями производителя.

[1003] **Выделение опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов для проточной цитометрии, FACS и вестерн-блоттинга:** Мышей умерщвляли, когда объем опухолей достигал 500 мм³. Опухоли собирали, нарезали кубиками и расщепляли 300 Е/мл коллагеназы I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, кат. № C0130) и 1 мг/мл диспазы II (Sigma-Aldrich, кат. № 4942078001) в 5 мл RPMI 1640 в течение 30 минут при 37°C с аккуратным перемешиванием. После расщепления добавляли 2000 Е/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich, кат. № 260913) для снижения вязкости путем удаления высвобожденной ДНК. Суспензии отдельных клеток получали путем пропускания расщепленной ткани через 70 мкм клеточное сито, используя поршень шприца. После этого опухоль-инфильтрирующие лейкоциты очищали из суспензии отдельных клеток, используя микрогранулы с мышинным CD45 (TIL) (Miltenyi Biotec, Auburn CA, кат. № 130-110-618).

[1004] **Исследования иммунофлуоресценции:** Опухолевые слайды фиксировали ацетоном/метанолом (10 мин) и дважды промывали ФСБ. Слайды блокировали в течение 20 мин при комнатной температуре, используя ФСБ с 5% молоком для блоттинга (Bio-Rad, Hercules, CA) с последующей инкубацией с первичными антителами в ФСБ в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем слайды дважды промывали ФСБ и инкубировали со

вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей промывкой ФСБ три раза. Слайды дважды промывали ФСБ, заключали в среду для заключения для флуоресценции (Vector Laboratories Burlingame, CA) и затем анализировали, используя флуоресцентный микроскоп. Ламинин выявляли, используя поликлональное (первичное) антитело к ламинину (1:200; № Z0097; Dako, Carpinteria, CA) и козье антитело (вторичное) к кроличьему IgG Alexa Fluor568 (1:200; Molecular Probes, Carlsbad, CA).

[1005] **Иммуногистохимия мышечных тканей:** Ткани фиксировали в 10% формалине и обрабатывали для окрашивания гематоксилином и эозином. Все образцы изучали два опытных патолога в отношении типичных признаков воспаления «заслепленным» образом.

[1006] **Анализ Т-клеток:** Клетки ММС (Neu-положительные) и спленоциты от сингенных neu/CD46-трансгенных мышей (Neu-отрицательные) обрабатывали митомицином С в конечной концентрации 50 $\mu\text{g}/\text{m}$ в течение 20 мин, а затем интенсивно промывали. Спленоциты от исследуемых животных (обработанных HDAd- $\alpha\text{PD-L1-}\gamma_1$) и необработанных контрольных животных (наивных) смешивали 1:1 с обработанными митомицином С клетками и инкубировали в течение 1 дня в присутствии 10 Е/мл IL-2. Контрольные спленоциты также обрабатывали PMA/иономицином. Концентрации IFN γ в супернатанте измеряли с помощью IFN γ ELISA (InVitrogen, кат. № 88-7214-22)

[1007] Матричный анализ микроРНК проводили в UW Functional Genomics, Proteomics & Metabolomics Facility Core с использованием 4.0 матриц миРНК Affymetrix.

[1008] **ПЦР в реальном времени:** Общую РНК выделяли из опухолеинфильтрирующих лейкоцитов, МКПК, спленоцитов и клеток костного мозга, используя TRIzol™ согласно инструкциям производителя (Invitrogen), затем проводили обратную транскрипцию для создания кДНК, используя набор для обратной транскрипции QuantiTect от Qiagen (кат. № 205311). Реагент для удаления гДНК, поставляемый в наборе, использовали для устранения потенциального загрязнения геномной ДНК. Сравнительную ПЦР в реальном времени проводили, используя мастер-микс Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems). Использовали следующие праймеры: прямой мышечного PDL1 (SEQ ID NO: 238) и обратный (SEQ ID NO: 239); прямой мышечного PPIA (SEQ ID NO: 240) и обратный (SEQ ID NO: 241); прямой мышечного RPL10 (SEQ ID NO: 189) и обратный (SEQ ID NO: 190).

[1009] В качестве внутреннего контроля использовали мышечный PPIA. Также была включена вторая мышца внутреннего контроля RPL10, для которой наблюдали сходные результаты. Результаты рассчитывали по методу $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ и представляли в виде процента

относительной экспрессии с уровнем кДНК соответствующих образцов опухолей установленным как 100%.

[1010] **Выделение истощенных по линии дифференцировки (Lin⁻) клеток костного мозга:** Для истощения коммитированных по линии дифференцировки клеток использовали набор для истощения клеток мышинной линии дифференцировки (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) в соответствии с инструкциями производителя.

[1011] **Анализ колониеобразующих единиц.** Всего 2500 Lin⁻клеток высевали в трех повторах в мышиную полную среду ColonyGEL 1202 (ReachBio, Seattle WA) и инкубировали в течение 12 дней при 37 °C в 5% CO₂ и при максимальной влажности. Колонии нумеровали, используя препаровальный микроскоп Leica MS 5 (Leica Microsystems).

[1012] **Клетки:** Клетки карциномы молочной железы мышей (ММС) адаптировали из спонтанной опухоли у мыши neu/CD46-tg. Аутентификацию клеток ММС проводили с помощью иммунофлуоресценции, используя Neu-специфическое моноклональное антитело 7.16.4 (Knutson et al., Cancer Res. 2004;64: 1146-1151). Клетки TC-1 были получены от Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA). Клетки TC-1 представляют собой иммортализованные мышинные эпителиальные клетки, которые стабильно экспрессируют белки E6 и E7 HPV-16. Клетки происходящего от C57Bl/6 рака яичника ID8 p53^{-/-} brca2^{-/-} были описаны ранее. Walton et al., Cancer Res. 2016;76: 6118-6129. Эта линия клеток была создана путем CRISPR/Cas9-нокаута p53 и brca2 в клетках ID8. Клетки ММС и TC-1 поддерживали в RPMI-1640, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой, 1 ммоль/л пирувата натрия, 10 ммоль/л ГЭПЭС, 2 ммоль/л L-глутамина, 100 единиц/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина. Клетки ID8 p53^{-/-} brca2^{-/-} культивировали в DMEM, дополненной 4% фетальной телячьей сывороткой, 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и ITS (5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферрина и 5 нг/мл селенита натрия). Отсутствие микоплазмы подтверждали, используя набор для выявления микоплазмы методом ПЦР от abm (Richmond, BC, Canada). Для амплификации криоконсервированные клетки размораживали и четыре раза пассировали.

[1013] Образцы биопсии рака яичника были предоставлены Репозитарием образцов Pacific Ovarian Cancer Research Consortium (POCRC) без какой-либо конфиденциальной информации, которая могла бы послужить для идентификации пациента (Fred Hutchinson Cancer Research Center IRB, протокол № 6289). Опухолевые ткани из биопсий иссекали на 4 мм кусочки и расщепляли в течение 2 часов при 37°C с коллагеназой/диспазой (Roche), как было описано ранее в Strauss et al. (PLoS One. 6: e16186, 2011). Лейкоциты выделяли

методом магнитно-активируемой сортировки клеток, используя микрогранулы с человеческим CD45 (Miltenyi Biotec, кат. № 130-045-801). Опухлеассоциированные лейкоциты из двух биопсий низкодифференцированного серозного рака яичника объединяли и анализировали РНК с помощью миРНК-секвенирования в сравнении с совпадающей РНК МКПК в LC Sciences, LLC (Houston, TX).

[1014] **Анализ микроРНК: миРНК-секвенирование:** Секвенирование малых РНК проводили, как было описано ранее (Valdmanis et al., Nat Med. 2016;22: 557-562.). РНК выделяли, используя мини-набор miRNeasy (Qiagen, кат. № 1071023). 1 мкг РНК на образец лигировали к 3' универсальному линкеру для клонирования миРНК (New England Biosciences, кат. № S1315), используя РНК-лигазу T4 1 (New England Biosciences, кат. № M0204), в отсутствие АТФ. Лигированные образцы анализировали в 15% мочевино-полиакриламидном геле. Фрагменты, соответствующие малым РНК (17-28 нт) вырезали из геля и лигировали к 5' баркодам, снова используя РНК-лигазу T4 1. Снабженные баркодами образцы затем мультиплексировали и секвенировали на приборе Illumina MiSeq с получением 50 п. о. одноконечных считываний, в Центре точной медицины УВ. Баркоды и адапторы обрезали с последовательности и после этого проводили выравнивание с мышинными микроРНК на miRBase, используя Bowtie версии 0.12.7, с допущением 2 несовпадений (Langmead et al., Genome Biol. 10: R25, 2009).

[1015] **Нозерн-блоттинг малых РНК.** Этот протокол описан в Valdmanis et al., Nat Med. 2016;22: 557-562. использовали следующие меченые ^{32}P - γ -АТФ зонды: для миРНК 423-5p (SEQ ID NO: 235); для мяРНК U6 (SEQ ID NO: 236). Радиоактивные маркеры молекулярной массы РНК были от Ambion.

[1016] **Вестерн-блоттинг:** Тканевые лизаты разделяли в ДСН-ПААГ и инкубировали блоты с куриным анти-НА-tag-HRP (Abcam, ab1190). Выявление хемилюминесценции на рентгеновских пленках проводили после обработки Pierce™ ECL плюс субстрат для вестерн-блоттинга (Thermo Fisher Scientific, кат. № 34029).

[1017] **ELISA α PD-L1- γ_1 :** Рекомбинантный мышинный белок PD-L1 (Sino Biological Inc, кат. № 50010-M08H) при 2 мкг/мл использовали для покрытия планшетов ELISA. Сыворотку от исследуемых животных добавляли в разведении 1:10, а α PD-L1- γ_1 измеряли, используя куриное анти-НА-tag-HRP (Abcam, ab1190).

[1018] **Животные:** Все эксперименты, включающие животных, проводили с разрешения управляющего Институционального наблюдательного совета и IACUC.

[1019] **hCD46-трансгенные мыши:** Трансгенные мыши на основе линии C57Bl/6, содержащие геномный локус человеческого CD46 и экспрессирующие CD46 с уровнем и профилем, аналогичными человеческим, описаны в Kemper et al. (Clin Exp Immunol. 124:

180-189, 2001). Их использовали в исследованиях трансплантации с полученными от C57Bl/6 клетками TC-1. *Neu-трансгенные мыши*: Мышей Neu-tg (название линии: FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul) получали от Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Эти мыши несут немутированный, неактивированный крысиный ген *neu* под контролем промотора вируса опухоли молочной железы мышей (одна копия трансгена на геном). Для исследований *in vivo* трансдукции мышей CD46tg и *neu*-tg скрещивали для получения мышей CD46^{+/+}/*neu*⁺.

[1020] *In vivo* трансдукция/отбор ГСКП: смотрите Фиг. 74А.

[1021] *Истощение клеток CD8*: Истощение CD8-Т-клеток проводили с помощью внутрибрюшинной инъекции 200 мкг крысиного антитела к мышиному CD8 IgG (169.4; ATCC). Инъекцию повторяли каждые 3 дня для поддержания истощения.

[1022] *Статистика*: Статистическую значимость *in vivo* данных анализировали по кривым выживаемости Каплана - Мейера и логранговому критерию (GraphPad Prism версии 4). Статистическую значимость *in vitro* данных рассчитывали по двустороннему t-критерию Стьюдента (Microsoft Excel). Р-значения > 0,05 не считали статистически значимыми (н. з.).

[1023] *Результаты и обсуждение*.

[1024] Женщин, которые имеют по меньшей мере одного родственника первой степени родства с раком молочной железы до 50-летнего возраста или с раком яичника в любом возрасте, сейчас направляют на генетическое тестирование. С помощью нацеленного захвата и массивно-параллельного геномного секвенирования был утвержден ряд мультигенных тестов, которые позволяют выявлять мутации зародышевой линии и прогнозировать риск появления рака. К этим исследовательским платформам относится BROCA (Walsh et al., Proc Natl Acad Sci USA. 108: 18032-18037, 2011, Shirts et al., Genet Med. 18: 974-981, 2016). С помощью BROCA было установлено, что более одной пятой случаев карцином яичника и молочной железы связаны с наследственным риском (Tung et al., Cancer. 121: 25-33, 2015). Проблема состоит в том, что современные варианты предотвращения у подверженных высокому риску носителей отстают от постоянно улучшающейся генетической диагностики. Побочные эффекты профилактической сальпингоовариэктомии и мастэктомии, включая бесплодность, сердечно-сосудистые заболевания, остеопороз, менопаузальные симптомы и физиологические эффекты ожидаются в течение все жизни такой женщины. Применение сывороточных маркеров, таких как СА125 и НЕ4, не показало существенного снижения смертности от рака яичника (Jacobs et al., Lancet. 387: 945-95, 2016). Профилактические вакцины от опухолеассоциированных антигенов, таких как Her2/*neu*, HIF1 α или MUC1, зависят от наличия этих антигенов на всех опухолевых клетках и сталкиваются с проблемой

развития мутантов с утраченным антигеном (Knutson et al., *Cancer Res.* 64:1146-1151, 2004).

[1025] Целью является разработка долгосрочного и технически простого подхода, который обеспечивает иммунопрофилактику рака у пациентов с высоким риском повторного появления опухоли и, в конечном итоге, у носителей предрасполагающих к раку наследственных мутаций. Во время прогрессирования опухоли злокачественные клетки секретируют ряд специфических хемокинов, которые активируют и мобилизуют ГСКП так, что они попадают в кровоток и локализуются в опухоли, где они дифференцируются в поддерживающие опухоль клетки (Hanahan et al., *Cell.* 144: 646-674, 2011, Mantovani et al., *Trends Immunol.* 23: 549- 555, 2002). Получаемые из ГСКП миелоидные и лимфоидные клетки присутствуют на ранних стадиях развития рака (Okla et al., *Front Immunol.* 10: 691, 2019; Colvin, *Front Oncol.* 4: 137, 2014; Baert et al., *Front Immunol.* 10: 1273, 2019), например при серозной трубной интраэпителиальной карциноме (СТИК). Sarkar et al., *Genes Dev.* 31: 1109-1121, 2017. Этот подход основан на генетической модификации гемопоэтических стволовых клеток. Поскольку эти клетки способны к самообновлению, одноразовое вмешательство должно иметь пожизненный терапевтический эффект. Была разработана минимально инвазивная и экономически выгодная технология, которая делает возможной *in vivo* доставку генов в ГСКП без лейкафереза, миелоабляции и трансплантации (Richter et al., *Blood.* 128: 2206-2217, 2016, Wang et al., *J Clin Invest.* 129: 598-615, 2019). Основной идеей этого подхода является мобилизация ГСКП из костного мозга с использованием G-CSF/AMD3100 и, в то время как они в большом количестве циркулируют в периферии, трансдукция их внутривенно вводимой ГСКП-тропической хелпер-зависимой аденовирусной векторной системой для генного переноса HDAd5/35⁺⁺. В этих векторах используется CD46, рецептор, который экспрессируется на примитивных гемопоэтических стволовых клетках. Трансдуцированные клетки возвращаются в костный мозг, в котором они присутствуют в течение длительного периода. Новые признаки векторной системы HDAd5/35⁺⁺, используемой в этом исследовании, включают: (i) фибры с повышенной аффинностью к CD46, что обеспечивает эффективную трансдукцию примитивных ГСКП и в то же время позволяет избежать инфекции негемопоэтических тканей после в/в инъекции (включая печень), (ii) систему интеграции на основе транспозазы SB100X, которая функционирует независимо от клеточных факторов и опосредует случайную интеграцию трансгена без предпочтения в отношении генов, с одной-двумя копиями интегрированного вектора на клетку (Фиг. 74А), и (iii) экспрессионную кассету MGMT^{P140K}, которая опосредует избирательное выживание и размножение дочерних клеток, не оказывая влияния на пул

трансдуцированных примитивных ГСКП, путем кратковременной обработки низкой дозой O⁶BG/BCNU (Wang et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 8: 52-64, 2018). Недавно была продемонстрирована эффективность и безопасность метода *in vivo* генной терапии НСКП в мышинных моделях гемоглобинопатий (Wang et al., J Clin Invest. 129: 598-615, 2019, Li et al., Blood. 131: 2915-2928, 2018). В данном случае этот подход используют для предотвращения ракового роста.

[1026] *Экспрессия GFP в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах после in vivo трансдукции ГСКП.* Использовали две трансгенные в отношении человеческого CD46 мышинные модели с сингенными опухолями. (CD46 необходим для трансдукции ГСКП векторами HDAd5/35++). Первая модель включала трансгенных в отношении человеческого CD46/крысиного neu мышей, которые сверхэкспрессируют крысиный neu в ткани молочной железы из промотора вируса опухоли молочной железы мышей. У мышей Neu-tg развивается активная иммунная толерантность в отношении Neu, которая зависит от Treg и сходна с наблюдаемой у пациентов с раком молочной железы (Knuston et al., J Immunol. 177: 84-91, 2006). Клетки карциномы молочной железы мышей (ММС) представляют собой линию Neu-положительных клеток рака молочной железы, полученную из спонтанной опухоли neu/CD46-трансгенной мыши (Фиг. 75). ГСКП мобилизовали у мышей neu/CD46 tg и инъецировали интегрирующий GFP-экспрессирующий вектор HDAd5/35++ (Фиг. 74А). Аналогично предыдущим исследованиям (Wang et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 8: 52-64, 2018), три раунда обработки низкой дозой O⁶BG/BCNU приводили к стабильной экспрессии GFP в 80% МКПК (Фиг. 74). На 17 неделе после *in vivo* трансдукции ГСКП сингенные клетки ММС имплантировали в жировое тело молочной железы и отслеживали рост опухолей. Когда опухоли достигали объема 700 мм (Palmer et al., Methods in Molecular Biology, 2009:33-53), животных умерщвляли и анализировали экспрессию GFP. 80% клеток костного мозга, спленоцитов, МКПК и опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов экспрессировали GFP (Фиг. 74В). В опухоли GFP⁺ клетки были обнаружены преимущественно в опухолевой строме (Фиг. 74С). Иммунофенотипирование показало, что GFP⁺ опухоль-инфильтрирующие клетки были лимфоцитами (преимущественно Treg), нейтрофилами, ДК/МСК и макрофагами (Фиг. 74D, 76). Этот профиль отличается от GFP⁺ клеток в периферической крови (Фиг. 74D), костном мозге и селезенке (Фиг. 77), что указывает на то, что опухоли активно дифференцируют ГСКП в специализированные проопухолевые клетки. Эффективное рекрутирование *in vivo* трансдуцированных ГСКП было дополнительно подтверждено во второй модели, состоящей из мышей CD46tg и клеток TC-1, линии HPV16 E6/E7-положительных клеток рака легкого мышей (Фиг. 78А-78С).

[1027] *миРНК-регулируемая экспрессия трансгена в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах*. Фиг. 74В и Фиг. 78С иллюстрируют, что GFP (под контролем универсально активного промотора EF1 α) экспрессируется не только в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах, но также в других тканях, включая костный мозг, селезенку, МКПК и покоящиеся макрофаги. Чтобы минимизировать аутоиммунные реакции в терапевтическом подходе необходимо, чтобы терапевтический трансген (i) экспрессировался преимущественно в опухоли, (ii) автоматически активировался, только когда опухоль начинает развиваться, и (iii) прекращал функционирование, когда опухоль исчезает. Эти требования можно выполнить посредством миРНК-регуляции. Во время гемопоэза профиль миРНК меняется в зависимости от стадии дифференцировки и клеточной линии дифференцировки (Chen et al., Science. 2004;303: 83-86). Опухольассоциированные миелоидные клетки имеют отличимый профиль экспрессии мРНК и миРНК (Thorsson et al., Immunity. 48: 812-830 e814, 2018). И наконец, существует высокая степень консервативности миРНК в миелоидных и лимфоидных клетках, обнаруженных в разных типах опухолей у людей (Thorsson et al., Immunity. 48: 812-830 e814, 2018). Принцип миРНК-регуляции трансгена проиллюстрирован на Фиг. 79А. Используя *in vivo* ГСКП-трансдуцированные мышинные модели, проводили сортировку GFP+/CD45+ клеток из костного мозга, селезенки, МКПК и опухоли (Фиг. 74В, 78С) и анализировали их профиль экспрессии миРНК. Целью было обнаружение миРНК, которые экспрессировались на высоких уровнях в клетках костного мозга, крови и селезенки, но отсутствовали в опухольассоциированных лейкоцитах. Общую РНК (объединенную для пяти мышей) подвергали секвенированию миРНК нового поколения (Фиг. 79В, 79С). Идентифицировали ряд миРНК, которые удовлетворяли вышеуказанным критериям. Сфокусировались на miR423-5p, миРНК, которая была вверху списка, как в модели neu/CD46tg-ММС (Фиг. 79В), так и в модели CD46tg-ТС-1 (Фиг. 79С). miR-423-5p является консервативной для людей и мышей, и, следовательно, ее можно использовать в будущей разработке подхода в направлении клинического применения. Профиль экспрессии миРНК-423-5p в GFP+ фракциях от *in vivo* трансдуцированных мышей с опухолями ММС и ТС-1 был подтвержден матричным анализом миРНК (не показан) и нозерн-блоттингом (Фиг. 81).

[1028] Чтобы оценить, можно ли использовать регуляцию miR-423-5p у людей, изучали уровни miR-423-5p в опубликованных данных, в которых оценивали микроРНК в ряде тканей человека. Ludwig et al., Nucleic Acids Res. 2016;44: 3865-3877. Было обнаружено, что miR-423-5p входит в 20% наиболее экспрессируемых микроРНК и имеет равномерное распределение по тканям, включая костный мозг и селезенку (Фиг. 82А).

Сопоставимые МКПК и образцы опухолевой биопсии были получены от двух пациентов с низкодифференцированным серозным раком яичника. На РНК из опухолеинфильтрирующих (CD45⁺) лейкоцитов проводили миРНК-секвенирование в сравнении с РНК из сопоставимых МКПК (Фиг. 82В). Этот анализ подтвердил высокий уровень экспрессии miR423-5p в МКПК и низкий уровень экспрессии в опухолеинфильтрирующих лейкоцитах. Эти данные демонстрируют, что результаты, наблюдаемые у мышей, имеют большой потенциал транслироваться в исследования с участием людей.

[1029] **Эффект HDAd-опосредованной экспрессии сайта-мишени miR-423 на ГСКП.** миРНК-423-5p экспрессируется во всех нормальных тканях и, следовательно, наиболее вероятно, вовлечена в регуляцию генной экспрессии. Поиск мРНК-мишеней для miR-423-5p в базе «mirtarbase» позволил идентифицировать мРНК циклин-зависимого ингибитора киназы 1A (CDKN1A) в качестве первичной мишени (база доступна на [mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/detail.php?mirtid= MIRT000589№ target](http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/detail.php?mirtid=MIRT000589№target)). Другие мРНК-мишени включают мРНК белка 1, подобного фактору элонгации транскрипции A (TCEAL1), bcl2-подобного белка 11 (bcl2L11) и ассоциированного с пролиферацией белка 2G4 (PA2G4). Чтобы оценить, влияет ли добавленная экспрессия сайтов-мишеней miR-423-5p из векторов HDAd на экспрессию CDKN1A, конструировали два вектора HDAd-GFP с и без сайтов-мишеней, связанных с GFP-содержащей мРНК (Фиг. 80А). Мышиные и человеческие ГСКП, т. е. типы клеток с высоким уровнем экспрессии miR-423-5p, инфицировали при МЗ, которая приводила бы к трансдукции подавляющего большинства клеток (Li et al., Mol Ther. 27(12):2195-2212, 2019), и анализировали уровни белка CDKN1A через три дня методом вестерн-блоттинга (Фиг. 80В). Значительной разницы между двумя векторами HDAd в обоих типах клеток обнаружено не было. Кроме того, не наблюдали никаких вредоносных эффектов сверхэкспрессии сайта-мишени miR-423-5p в анализе колоний предшественников (Фиг. 80С). Как отмечено в другом месте данного документа, *in vivo* трансдукция ГСКП терапевтическим вектором, который содержал сайты-мишени miR423-5p, не приводила к аномалиям в гемопоэзе. Вместе это позволяет предположить, что описанная система регуляции на основе miR-423-5p является безопасной в ГСКП.

[1030] **Исследование иммунопрофилактики.** При наследственном раке молочной железы и яичника генетические варианты нарушают механизмы репарации ДНК, что приводит к большей мутационной нагрузке и присутствию неоантигенов. Это делает опухоли более восприимчивыми к иммунотерапии, чем ненаследственные раковые заболевания молочной железы и яичника, которые часто характеризуются aberrantным

числом копий и низкой иммуногенностью (Thorsson et al., *Immunity*. 2018;48: 812-830 e814). В данном случае в качестве иммунотерапевтического трансгена был выбран ингибитор контрольных точек α PD-L1- γ 1. Ранее было показано, что внутриопухолевая экспрессия α PD-L1- γ 1 после вирусного генного переноса приводила к уменьшению роста опухоли (Engeland et al., *Mol Ther.* 22: 1949-1959, 2014, Reul et al., *Front Oncol.* 9: 52, 2019). В культурах клеток ММС наблюдали сильную экспрессию PD-L1 (Фиг. 83А), что должно сделать опухоли ММС восприимчивыми к терапии α PD-L1- γ 1. Четыре копии сайтов-мишеней miR423-5p интегрировали в 3' НТО глобина, связанную с геном α PD-L1- γ 1 (Фиг. 83В). Экспериментальная схема была такой же, как показанная на Фиг. 74А. У мышей, которые были *in vivo* трансдуцированы контрольным вектором HDAd-GFP/mgmt, имплантированные опухоли ММС росли быстро и достигали конечного объема к 35 дню после трансплантации опухолевых клеток (Фиг. 83С, левая панель). В модели α PD-L1- γ 1 после начального роста опухолей 6 из 7 опухолей регрессировали и повторно не появлялись на протяжении периода наблюдения (100 дней). У обработанных мышей наблюдали отторжение после другой стимуляции клетками ММС, проведенной через 11 недель после первой инъекции. Истощение CD8 клеток инъекциями анти-CD8 mAb нивелировало терапевтический эффект. Противоопухолевые ответы Т-клеток измеряли в конце периода наблюдения (день 100). Анализ спленоцитов методом проточной цитометрии показал значительно большее процентное содержание интерферон- γ (IFN γ)-вырабатывающих CD4 и CD8 клеток, а также большую частоту CD8 клеток с положительным окрашиванием Neu-тетрамером (Фиг. 83D). Спленоциты от обработанных HDAd- α PD-L1- γ 1 животных демонстрировали в 30 раз большую секрецию IFN γ после стимуляции (Neu-положительными) клетками ММС по сравнению с Neu-отрицательными клетками (Фиг. 83Е). Как и ожидалось, наивные мыши CD46/neu-tg имели Neu-специфические Т-клетки, которые, однако, не могли контролировать рост опухолей из-за присутствия иммуносупрессивных Т-клеток в опухоли (Knutson et al., *J Immunol.* 2006;177: 84-91).

[1031] **Кинетика и специфичность экспрессии α PD-L1- γ 1 в ММС/neu-трансгенной мышинной модели.** В отдельной группе обработанных HDAd- α PDL1 γ 1miR423 животных опухоли получали на 17 день после имплантации перед тем, как они начинали уменьшаться. В случае этих опухолей (300-400 мм³) наблюдали в 10 раз большие уровни α PD-L1- γ 1 в опухоли, чем в МКПК, костном мозге и селезенке, по данным вестерн-блот-анализа 8 (Фиг. 84А). Преимущественную экспрессию мРНК α PD-L1- γ 1 в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах подтверждали методом кОТ-ПЦР (Фиг. 84В). Этот профиль экспрессии позволяет предположить, что miR-423-регуляция

подавляет экспрессию $\alpha PD-L1-\gamma_1$ в потомстве ГСКП, отличном от опухоль-инфильтрирующих миелоидных и лимфоидных клеток. Сывороточный $\alpha PD-L1-\gamma_1$ становился выявляемым после инъекции клеток ММС и снижался после исчезновения опухолей, что указывает на функциональную авторегуляцию экспрессии $\alpha PD-L1-\gamma_1$ (Фиг. 84В), т. е. экспрессия трансгена начиналась только после того, как ГСКП дифференцировали в опухолеассоциированные лейкоциты. Начиная с недели 2 после инъекции клеток ММС наблюдали аутоиммунные реакции, отражаемые обесцвечиванием меха и воспалительными инфильтратами в тканях (Фиг. 87, иллюстрирующая мышей на Фиг. 87А и образцы почки, печени и легкого на Фиг. 87В). Что важно, у животных, умерщвленных через 4 недели после исчезновения опухолей, гистология всех органов вернулась к норме. Это наблюдение показывает, что пока $\alpha PD-L1-\gamma_1$ экспрессируется и высвобождается в кровоток, могут возникать временные аутоиммунные реакции (наиболее вероятно против *neu*-экспрессирующих тканей/типов клеток). Следует отметить, что исследование с вектором HDAd $\alpha PD-L1-\gamma_1$ без сайтов-мишеней miR-423-5p пришлось прекратить из-за > 20% потери массы у обработанных животных через две недели после последней обработки O⁶BG/BCNU. Это подчеркивает необходимость в регулируемой экспрессии $\alpha PD-L1-\gamma_1$. Наблюдаемые аутоиммунные реакции можно минимизировать путем физического привязывания $\alpha PD-L1-\gamma_1$ к опухоли или путем использования внутриклеточных иммуномодулирующих эффекторов (например, миРНК, которые реполяризуют поддерживающие опухоль лейкоциты в уничтожающие опухоль клетки). Кроме того, векторы также могут содержать усеченный рецептор EGFR, который обеспечивает разрушение всех трансдуцированных клеток за счет антитело (Эрбитукс)-зависимой цитотоксичности (Wang et al., Blood. 2011;118: 1255-1263).

[1032] Эффективность подхода *in vivo* генной терапии ГСКП и $\alpha PD-L1-\gamma_1$ является значительной с учетом того, что в модели *neu*-tg/ММС другие иммунотерапевтические подходы не предотвращали повторное появление опухоли (Knutson et al., Cancer Res. 64:1146-1151, 2004, Burgents et al., J Immunother. 33: 482-491, 2010). В этом контексте четыре раунда внутрибрюшинных инъекций моноклонального антитела к мышинному PD-L1 не оказывали значительного эффекта на рост опухолей (Фиг. 88А, 88В). Эти данные показывают, что внутриопухолевая экспрессия $\alpha PD-L1-\gamma_1$ 1 на ранних стадиях развития опухоли (как только клетки-потомки ГСКП инфильтрируют опухоль) может смещать баланс между супрессорными и эффекторными иммунными клетками в сторону уничтожения опухоли.

[1033] **Исследования иммунопрофилактики и терапии в модели рака яичника с мутациями *p53* и *brca2*.** Полученные от C57Bl/6 клетки рака яичника мышей ID8 не

содержат типичные ассоциируемые с раком мутации зародышевой линии (*brca1*, *brca2*, *p53*, *Nf1*, *Rb1*, *Pten*...) и плохо образуют опухоли после внутрибрюшинной инъекции. Walton et al., *Cancer Res.* 76: 6118-6129, 2016. В более новых усовершенствованных моделях на основе ID8, созданные посредством CRISPR/Cas9-нокаута генов-супрессоров опухоли, эти недостатки разрешены. Walton et al., *Cancer Res.* 2016;76: 6118-6129; Walton et al., *Sci Rep.* 2017;7: 16827. К этим моделям относятся клетки ID8-*p53*^{-/-}-*brca2*^{-/-}. Внутрибрюшинная инъекция 2×10⁶ ID8-*p53*^{-/-}-*brca2*^{-/-} клеток CD46-трансгенным мышам приводила к росту опухолей и появлению асцитов (или смерти) в течение 6-8 недель (Фиг. 84С и 85А). Внутрибрюшинные опухоли были широко распространены по мезентерию с инвазией в другие органы (селезенка, печень, лимфатические узлы). Иммунофенотипирование опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов во внутрибрюшинных ID8-*p53*^{-/-}-*brca2*^{-/-} опухолях показало явное наличие Treg, а также иммуносупрессивных ДК/МСК и ТАМ (Фиг. 85В). Опухоль-инфильтрирующие Т-клетки (ТП), макрофаги (ТАМ) и нейтрофилы (ТАН) выделяли из брюшных ID8 *p53*^{-/-} *brca2*^{-/-} опухолей и анализировали уровни miРНК-423-5p методом нозерн-блоттинга. Как наблюдалось и в моделях ММС и ТС-1, miR-423-5p экспрессировалась в мононуклеарных клетках костного мозга, но была невыявляема в опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах, включая ТП, ТАН и ТАМ), что указывает на то, что все три типа были специфически перепрограммированы опухолью (Фиг. 85С).

[1034] Сначала модель ID8-*Trp53*^{-/-}-*brca2*^{-/-} использовали в режиме профилактики (Фиг. 85D). После *in vivo* трансдукции/отбора ГСКП с помощью HDAd- α PDL1 γ 1miR423+HDAd-SB или HDAd-GFP-miR423+HDAd-SB (контроль), внутрибрюшинно инъецировали ID8-*p53*^{-/-}-*brca2*^{-/-} клетки и отслеживали сывороточные уровни α PDL1 γ 1 и появление заболевания и асцитов. Хотя все контрольные мыши достигли конечной точки к 70 дню после *in vivo* трансдукции, 100% обработанных HDAd- α PDL1 γ 1miR423+HDAd-SB животных были живыми в конце периода наблюдения (11 недель после инокуляции опухолевых клеток) (Фиг. 85E). Повышенные сывороточные уровни α PDL1 γ 1 приблизительно на 6 неделе (после инъекции клеток) позволяют предположить, что опухоли росли и активировали сывороточную экспрессию α PDL1 γ 1 (Фиг. 85F). К 11 неделе сывороточный α PDL1 γ 1 возвращался к фоновым уровням, указывая на то, что опухоли были уничтожены. В этом исследовании признаки аутоиммунных реакций (например, обесцвечивание меха) не наблюдали, наиболее вероятно из-за отсутствия антигенов, общих для опухоли и нормальных тканей (например, Neu). В контексте оценки безопасности описанного подхода также было показано, что *in vivo* трансдукция ГСКП с помощью HDAd- α PDL1 γ 1miR423 не приводила к аномалиям

гемопоза (Фиг. 88С, 88D). У мышей, которым имплантировали сингенные опухолевые клетки, измеряли процентное содержание GFP-положительных клеток в МКПК в указанные моменты времени и собирали GFP-положительные клетки для миРНК-секвенирования (Фиг. 88E). Результаты идентифицированных миРНК с представляющими интерес профилями экспрессии (Фиг. 58E). Проиллюстрирован вестерн-блоттинг для PDL1 в опухоли (TIL), МКПК, костном мозге и селезенке и количественно оценен как экспрессия относительно мРНК на Фиг. 88F. ОП₄₅₀ сывороточного αPDLA по данным ELISA до имплантации опухоли и в указанные моменты времени после имплантации также приведены на Фиг. 88F. Схематические представления приведены на Фиг. 88G и 88H.

[1035] Хотя профилактический подход обладает преимуществом автоматической инициации на очень ранней стадии развития опухоли, его незамедлительное применение в случае здоровых женщин, несущих связанные с высоким риском мутации, вероятно столкнется с регуляторными препятствиями в отношении перехода к клиническому применению. Поэтому более реалистичной целью является применение этого подхода для предотвращения повторного проявления рака после терапии первой линии. В этом случае *in vivo* отбор ГСКП можно напрямую включить в химиотерапевтическое лечение пациентов. На Фиг. 86А показано, как в клинических условиях *in vivo* трансдукция ГСК начинается после хирургической циторедукции опухоли или, если хирургическое вмешательство не является вариантом, вместе с химиотерапией. О⁶BG/BCNU *in vivo* отбор можно объединять с химиотерапией. В результате *in vivo* трансдукции/отбора ГСКП готовые к действию ГСКП будут находиться в состоянии покоя до повторного появления рака, которое инициирует дифференцировку ГСКП и активацию экспрессии эффекторного гена. Преимуществом этого режима также является то, что опухолеспецифические неоантигены и иммунофенотип опухоли будут известны из анализа хирургической биопсии, что позволит выбрать надлежащие иммунотерапевтические эффекторные гены. С другой стороны предотвращение повторного появления рака с полным набором признаков рака (Hanahan et al., Cell. 2011;144: 646-674) является более проблематичным, чем нацеливание на опухоль на ранних стадиях развития.

[1036] Чтобы симулировать этот «терапевтический» режим CD46-трансгенных мышей инфицировали ID8-Trp53^{-/-}-brca2^{-/-} клетками с последующей *in vivo* трансдукцией/отбором ГСКП через две недели (Фиг. 86B). Хотя все мыши в контрольном режиме (HDAd-GFP-miR423+HDAd-SB трансдуцированные ГСКП) достигали конечной точки к 12 неделе после инъекции опухолевых клеток, все мыши, обработанные αPDL1-γ1-экспрессирующим вектором, были здоровыми на 15 неделе (Фиг. 86C). Как и в

исследовании профилактики, повышенные сывороточные уровни α PDL1- γ 1 на 11 неделе позволяют предположить, что опухоли сначала росли, но исчезли после активации саморегулируемого механизма α PDL1- γ 1 (Фиг. 86D). Эти данные показывают, что описанный подход может предотвращать повторное проявление рака после хирургии/химиотерапии первой линии.

[1037] Проводили профилирование мРНК/нозерн-блот-анализ для опухолеинфильтрирующих лейкоцитов, присутствующих в опухолях TC-1 (рак легкого мышей) (Фиг. 78A-81), опухолях ММС (рак молочной железы мышей) (Фиг. 79A-79C и 81), и опухолях ID8-p53^{-/-}/brca2^{-/-} (рак яичника мышей) (Фиг. 85C). Было обнаружено, что во всех трех типах опухолей miR423-5p не подлежит выявлению, но присутствует на высоких уровнях в нормальных гемопоэтических компартментах. Вместе с данными по биопсии рака яичника человека (Фиг. 82A, 82B) это указывает на то, что систему на основе miR423-5p можно широко использовать для разных типов опухолей среди видов для регуляции экспрессии эффекторного гена.

[1038] С учетом ограниченных вариантов профилактики, которые на сегодняшний день предлагают женщинам с мутациями зародышевой линии, связанными с высоким риском появления рака, и возрастающим числом этих носителей вследствие популяционного скрининга, этот подход *in vivo* генной терапии ГСКП является перспективной стратегией, которая позволит решить большую медицинскую проблему.

[1039] Пример 7. *In vivo* генная терапия ГСК с использованием эритроидных клеток в качестве фабрики для получения секретируемого терапевтического белка на высоком уровне.

[1040] В этом примере проиллюстрирована экспрессия неэритроидного белка в эритроидных клетках и сохранение этого экспрессируемого белка в зрелых красных клетках крови после *in vivo* трансдукции/отбора ГСК. Эту систему можно использовать для обеспечения пожизненной терапевтической коррекции после единственного внутривенного вмешательства. По меньшей мере некоторая информация, представленная в этом примере, была опубликована в Wang et al. (Blood Adv 3(19): 2883-2894, 2019; e-pub October 4, 2019).

[1041] У взрослых людей вырабатывается 2,4 миллиона новых эритроцитов в секунду. Практически четверть клеток в организме человека являются красными клетками крови (Pierige et al., Adv Drug Deliv Rev. 60(2):286-295, 2008). В процессе гемопоэза ГСК дифференцируют от общих миелоидных предшественников и пре-эритробластов в ортохроматические эритробласты (на основании окрашивания по Райту). На этой стадии происходит удаление ядра и клетки попадают из костного мозга в циркуляцию в виде

ретикулоцитов. От 0,5% до 2,5% циркулирующих красных клеток крови у взрослых (1×10^5 /мкл) и от 2% до 6% у детей являются ретикулоцитами. Ретикулоциты все еще способны вырабатывать гемоглобин из мРНК. Через один-два дня они окончательно утрачивают все органеллы и становятся зрелыми красными клетками крови, которые более не способны к биосинтезу белка. Дифференцировка из коммитированных эритроидных предшественников в эритроциты занимает 7 дней. Срок жизни эритроцитов составляет 120 дней. Старые и умирающие эритроциты удаляются фагоцитарной системой селезенки.

[1042] После того, как ГСК дифференцировали в коммитированные эритроидные клетки, вырабатываются огромные количества α - и β -цепей глобина, которые позже сохраняются в эритроцитах в виде тетрамерного гемоглобина. Здоровый индивид имеет от 12 до 20 граммов гемоглобина на 100 мл крови и 95% массы эритроцита составляет гемоглобин (270×10^6 молекул Hb на клетку). Основой для этого эффективного биосинтеза являются сильные эритроид-специфические области контроля локуса (LCR), которые обеспечивают высокий уровень транскрипции и стабильную мРНК, которая эффективно транслируется.

[1043] Огромную скорость и эффективность эритропоэза и мощную машинерию выработки гемоглобина использовали для получения незритроидных секретируемых белков из клеток-предшественников эритроцитов (включая стадии дифференцировки из проэритробластов в ретикулоциты). Трансгены находились под контролем мини-LCR β -глобина и содержали 5'НТО области гена β -глобина для стабилизации мРНК. Чтобы обеспечить долгосрочную пожизненную выработку терапевтических белков, использовали векторы генного переноса, нацеленные на примитивные ГСК. Подход *in vivo* трансдукции ГСК включает G-CSF/AMD3100-инициируемую мобилизацию ГСК из костного мозга в периферический кровоток и внутривенную инъекцию интегрирующей, хелпер-зависимой аденовирусной векторной системы. Интеграцию трансгена обеспечивают (случайным образом), используя гиперактивную транспозазу Sleeping Beauty (SB100x), однако, в конкретных вариантах осуществления ее можно обеспечить посредством гомологичной репарации.

[1044] В качестве доказательства или принципа, что эритроидные клетки можно использовать для выработки на высоком уровне терапевтических белков, которые секретируются в кровоток, в данном случае исследования были сфокусированы на биосконструированной форме фактора коагуляции VIII. Результат исследования является релевантным для лечения гемофилии А. Недавно были достигнуты клинические успехи с применением генной терапии на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса

(гAAV) для направленного на печень переноса гена фактора IX для гемофилии В (High et al., *Methods Mol Biol.* 2011;807:429-457). Доклинические исследования также продемонстрировали реализуемость лечения гемофилии А с помощью экспрессирующих FVIII векторов гAAV в животных моделях (Brown et al., *Mol Ther Methods Clin Dev.* 1:14036, 2014, Callan et al., *PLoS One.* 11(3):e0151800, 2016, Greig et al., *Hum Gene Ther.* 28(5):392-402, 2017). Однако широкое распространение применения направленной на печень генной терапии гемофилии А с помощью гAAV может столкнуться с несколькими препятствиями: (i) преимущественно эписомальная природа геномов гAAV в гепатоцитах и их утрата вследствие клеточного деления, в особенности у детей. (ii) высокая стоимость получения вектора гAAV, (iii) ограниченная пакующая емкость гAAV, который не может вмещать крупные транскрипционные регуляторные элементы, часто необходимые для предотвращения сайленсинга генов или генотоксичности (Grieger et al., *J Virol.* 79(15):9933-9944, 2005, Chandler et al., *J Clin Invest.* 125(2):870-880, 2015), и (iv) повышенный риск онкогенности вследствие потенциальной интеграции гAAV вблизи протоонкогенов (Russell et al., *Nat Genet.* 2015;47(10):1187-1193), в особенности у пациентов с первопричинным заболеванием печени, таким как вирусные гепатиты, или у детей с активно делящимися гепатоцитами, которые представляют большую часть пациентов с гемофилией (Nault et al., *Mol Cell Oncol.* 3(2):e1095271, 2016, Nault et al., *Nat Genet.* 47(10):1187-1193, 2015).

[1045] Подход экспрессии FVIII из эритроидных клеток с использованием векторов HDAd решает эти проблемы. В этом исследовании показано, с использованием GFP в качестве репортерного гена под контролем мини-LCR, что возможно обеспечить экспрессию неэритроидного белка в эритроидных клетках и сохранение GFP в зрелых красных клетках крови после *in vivo* трансдукции/отбора ГСК (смотрите Фиг. 89А-89Н). Затем было продемонстрировано у «здоровых» hCD46-трансгенных мышей, что этот подход приводит к физиологическим уровням биосконструированной формы FVIII и фенотипической коррекции в мышинной модели гемофилии А, несмотря на присутствие плазменных антител к FVIII.

[1046] Предложенный подход может обеспечить пожизненную терапевтическую коррекцию после одного внутривенного вмешательства. Колоссальная амплификация геномодифицированных ГСК после дифференцировки в красные клетки крови и высокоэффективная машинерия синтеза белка этих клеток создают основание для выработки FVIII на терапевтических уровнях. Кроме того, генетическая модификация только части ГСК может привести к толерантности к трансгенному продукту. Этот новый разработанный подход *in vivo* генной доставки в ГСК не требует миелоабляции и

трансплантации ГСК. Он включает инъекции G-CSF/AMD3100 для мобилизации ГСК из костного мозга в периферический кровоток и внутривенную инъекцию интегрирующей, хелпер-зависимой аденовирусной (HDA_d) векторной системы (Фиг. 90B). Векторы HDA_d5/35⁺⁺ и HDA_d35 нацелены на CD46, рецептор, который экспрессируется в примитивных ГСК. Интеграцию трансгена обеспечивают (случайным образом), используя гиперактивную транспозазу Sleeping Beauty (SB100x) (Фиг. 90A). После *in vivo* трансдукции/отбора ГСК у CD46-трансгенных мышей, были продемонстрированы супрафизиологические сывороточные концентрации и активность биосконструированной версии человеческого фактора VIII (ET3) (Фиг. 90C-90I; 91A-91D; 92A-92G). Ген ET3 находился под контролем мини-LCR β -глобина, что ограничивает экспрессию ET3 эритроцитами. Несмотря на высокий уровень выработки ET3 из эритроидных клеток никаких эффектов на гемопоз не наблюдали. После начального появления ингибирующих антител к ET3 сывороточные уровни антител сильно снижались у 50% обработанных мышей, наиболее вероятно вследствие низкого уровня экспрессии ET3 в тимусе и развитию толерантности. После *ex vivo* и *in vivo* трансдукции ГСК от мышей CD46-tg/гемофилия А и последующей трансплантации мышам с гемофилией А после летальной дозы облучения была достигнута фенотипическая коррекция на основании сывороточной активности фактора VIII, нормального aPTT и нормальной продолжительности кровотечения после отрезания хвоста.

[1047] **Обсуждение.** Помимо FVIII применение этого подхода можно использовать для других секретируемых белков, например: (i) других факторов коагуляции, в частности FXI, FVII (Binny et al., *Blood*. 119(4):957-966, 2012), фактора фон Виллебранда (VWF) (De Meyer et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28(9):1621-1626, 2008), но также редких факторов свертывания крови (т. е. факторов I, II, V, X, XI или XIII); (ii) ферментов, которые в настоящее время используются для заместительной ферментной терапии (ЗФТ) для лизосомных болезней накопления (с преимуществом механизма перекрестной коррекции) (Penati et al., *J Inherit Metab Dis*. 40(4):543-554, 2017), таких как болезнь Помпе (кислая α -глюкозидаза), болезнь Гоше (глюкоцереброзидаза), болезнь Фабри (α -галактозидаза А) и мукополисахаридоз типа I (α -L-идуронидаза); (iii) иммунодефицитов, например, ТКИД-АДА (Cicalese et al., *Mol. Ther*. 26(3):917-931 2018) (аденозиндезаминаза); (iv) сердечно-сосудистых заболеваний, например, наследственного дефицита аполипопротеина Е и атеросклероза (АpoЕ) (Wacker et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 38(1):206-217, 2018); (v) вирусных инфекций за счет экспрессии вирусных рецепторов-ловушек (например, для ВИЧ - растворимого CD4 (Falkenhagen et al., *Mol Ther Nucleic Acids*. 9:132-144, 2017) или нейтрализующих антител широкого спектра действия

(bNAb) для ВИЧ (Kuhlmann et al., Mol Ther. 27(1):164-177, 2019), хронических инфекций HCV (Quadeer et al., Nat Commun. 10(1):2073, 2019) или HBV (Kuciinskaite-Kodze et al., Virus es. 211:209-221, 2016); и (vi) рака (например, контролируемой экспрессии моноклональных антител (например, трастузумаба (Zafir-Lavie et al., J Control Release. 291:80-89, 2018) или ингибиторов контрольных точек (например, aPDL1 (Engeland et al., Mol Ther. 22(11):1949-1959, 2014))).

[1048] Пример 8. Подтверждение SB100x-опосредованного добавления гена и BE-опосредованной повторной активации эндогенного γ -глобина у отличных от человека приматов после *in vivo* трансдукции ГСК.

[1049] В этом примере описаны исследования, которые подтверждают, что как SB100x-опосредованное добавление гена, так и BE-опосредованная повторная активация эндогенного γ -глобина являются эффективными у отличных от человека приматов после *in vivo* трансдукции ГСК.

[1050] **Вектор для переноса генов:** Будут использовать вектор для переноса генов HDAd-комбо: этот вектор содержит опосредованную транспозазой SB100x случайную геномную интеграцию следующих трансгенов: i) ген γ -глобина резуса под контролем мини-LCR для эффективной экспрессии в красных клетках крови, ii) $\text{mgmt}^{\text{P140K}}$ резуса под контролем универсально активного промотора EF1a для *in vivo* отбора трансдуцированных клеток с помощью $\text{O}^{\text{b}}\text{BG/BCNU}$, iii) GFP под контролем универсально активного промотора EF1a для анализа трансдукции Т-клеток периферической крови и исследований биораспределения вектора. Дополнительно он будет содержать редакторы адениновых оснований: для повторной активации эндогенного γ -глобина посредством инактивации сайтов связывания белка-репрессора BCL11a в промоторах HBG и одновременной инактивации эритроидного энхансера bcl11a (что приводит к снижению экспрессии белка-репрессора BCL11a в эритроидных клетках). Кроме того, экспрессионная кассета редактора оснований будет удалена после опосредованного рекомбиназой Flp вырезания транспозона с получением только временной экспрессии iCas-BE. И наконец, вектор, содержащий транспозазу SB100x и рекомбиназу Flp, не будет интегрироваться и будет утрачен во время пролиферации клеток ГСК (Фиг. 121).

[1051] **Протокол обработки:** Шестимесячное исследование будет проводиться с тремя *Musca mulatta* с использованием ранее протестированных протоколов мобилизации ГСК и $\text{O}^{\text{b}}\text{BG/BCNU}$ *in vivo* отбора (Фиг. 122). Протокол начнут с исследования одного животного. Исследования повторят на оставшихся двух животных, если к 8 неделе (конец последнего цикла *in vivo* отбора) не возникнет серьезных осложнений.

[1052] **Мобилизация:** На протяжении 5 дней будут по утрам подкожно вводить GCSF и SCF (50 мкг/кг каждого). В последние два дня подкожное введение GCSF/SCF+AMD3100 будет происходить во второй половине дня (5 мг/кг).

[1053] **Предварительная обработка:** Дексаметазон в дозе 4 мг/кг будут вводить внутривенно за 16 часов до инъекции HDAd5/35++. Метилпреднизолон в дозе 20 мг/кг плюс дексаметазон в дозе 4 мг/кг будут вводить внутривенно, тогда как анакинру в дозе 100 мг будут вводить подкожно за 30 минут до инъекции HDAd5/35++.

[1054] **Инъекция HDAd:** Будут проводить два раунда внутривенных инъекций HDAd: 1) низкая доза (3×10^{11} вч/кг в 20 мл фосфатно-солевого буфера при 2 мл/мин) на день -1, 2), две полные дозы (1×10^{12} вч/кг в 20 мл фосфатно-солевого буфера при 2 мл/мин) будут вводить с интервалом в 30 минут на день 0.

[1055] **Временная иммуносупрессия:** Иммуносупрессию будут применять, начиная с дня 1 и до первой дозы O⁶BG/BCNU (неделя 4), и, при необходимости, продолжать 2 недели после последней дозы O⁶BG/BCNU. Иммуносупрессия будет включать 0,2 мг/кг/день рапамицина, 30 мг/кг/день микофенолата мофетила и 0,25 мг/кг/день такролимуса, которые все вводят ежедневно, перорально с пищей.

[1056] **In vivo отбор с O⁶BG/BCNU:** O⁶BG: Животные будут получать 120 мг/м² O⁶BG в 200 мл физиологического раствора, инфузируемого внутривенно в течение по меньшей мере 30 мин. BCNU будут вводить через 60 минут после начала инфузии O⁶BG. Затем животные будут получать еще одну дозу O⁶BG в 200 мл физиологического раствора, инфузируемого внутривенно в течение по меньшей мере 30 мин, через шесть-восемь часов после введения BCNU. Первую обработку будут проводить через четыре недели после инъекции HDAd; вторая и третья обработки с 2-недельными интервалами (необязательно), в зависимости от присутствия γ -глобина и гематологии.

[1057] **Данные, которые планируется получать:** Образцы крови будут брать, как указано на Фиг. 122. Будут проводить ежедневный физический осмотр и еженедельные измерения массы тела.

[1058] **Образцы крови:** Для двух- и шестичасовых образцов крови будут проводить следующие анализы: процентное содержание GFP+ клеток в CD34+ и процент GFP+ клеток в CD38-/Cd45RA, CD90+ клетки будут количественно оценивать, анализ колониеобразующих единиц будут использовать для оценки процента % GFP+ колоний, миграции в направлении SDF1-а и процент экспрессии CXCR4 и/или VLA-4 (например, Фиг. 93В-93Е). Для всех остальных образцов будут измерять число клеток крови, химию, с-реактивный белок и провоспалительные цитокины. Экспрессию γ -глобина будут измерять методом проточной цитометрии (эритроидные/неэритроидные клетки), тогда как

ВЭЖХ и кОТ-ПЦР будут использовать для измерения уровней повторно активированного и добавленного γ -глобина. Цитоцентрифугаты будут использовать для оценки иммунофлуоресценции γ -глобина. Будут измерять число копий вектора и уровни мРНК Cas9, SB100x и Flpe. Будут измерять экспрессию GFP в белых клетках крови (CD4⁺, CD8⁺, CD25, CD45RO, CD45RA, CCR-7, CD62L, FOXP3, интегрин $\alpha\epsilon\beta 7$).

[1059] **Образцы костного мозга:** Образцы костного мозга будут получать на четвертый день, а затем ежемесячно (смотрите Фиг. 122). Композицию линии дифференцировки в образцах костного мозга будут оценивать методом проточной цитометрии. Также будут измерять число копий векторов в CD34⁺ клетках. γ -глобин будут оценивать, используя проточную цитометрию путем сортировки с маркерами Ter119⁺/Ter119⁻. ВЭЖХ и кОТ-ПЦР будут использовать для измерения уровней повторно активированного и добавленного γ -глобина. Помимо этих анализов после вскрытия будут проводить полногеномное секвенирование на CD34⁺ клетках, чтобы идентифицировать SB100-опосредованную интеграцию и нецелевые эффекты редактора оснований. Также будут проводить РНК-секвенирование на CD34⁺ клетках для сравнения профилей мРНК и миРНК до и после обработки.

[1060] **Полученные после вскрытия ткани (включая герминальные ткани и сперму):** Будут проводить рутинную гистологию и измерять число копий вектора в основных группах тканей. Иммунофлуоресценцию γ -глобина GFP будут оценивать на тканевых срезах.

[1061] **Результат:** Этот эксперимент подтвердит, что как SB100x-опосредованное добавление гена, так и VE-опосредованная повторная активация эндогенного γ -глобина являются эффективными у отличных от человека приматов после *in vivo* трансдукции ГСК. Он продемонстрирует, что вектор будет обеспечивать уровни экспрессии γ -глобина в красных клетках крови, которые были бы терапевтическими для пациентов с СКА (т. е. > 80% γ -глобин⁺ RBC с уровнями γ -глобина > 20% от взрослого глобина резуса). Также он продемонстрирует отсутствие долгосрочных гематологических побочных эффектов и отсутствие нежелательных геномных перестроек и изменений в транскриптом ГСК. И наконец, он продемонстрирует, что внутривенно вводимый вектор HDAd5/35⁺⁺ трансдуцирует Т-клетки памяти.

[1062] **Пример 9. Трансдукция ГСК человека и макак-резус векторами HDAd5/35⁺⁺, экспрессирующими редакторы оснований для повторной активации экспрессии эндогенного γ -глобина.**

[1063] Неактивная Cas9, слитая с цитидин- или адениндезаминазой или трансаминазой, может служить инструментом для повторной активации фетального

глобина. Вектор HDAd, экспрессирующий редактор цитидиновых оснований (HDAd-C-BE), сравнивали с вектором HDAd-CRISPR/Cas9, нацеленным на эритроидный энхансер *bcl11a* и разрушающим важный GATA-связывающий мотив (Фиг. 123). Конструировали вектор HDAd, экспрессирующий CRISPR дикого типа к той же самой области. Оба вектора исследовали на человеческих CD34+ клетках, которые после трансдукции HDAd подвергали эритроидной дифференцировке в течение 18 дней (Фиг. 124A). Для HDAd-wtCRISPR-трансдуцированных клеток наблюдали постепенное снижение процентного содержания отредактированных сайтов-мишеней, наиболее вероятно вследствие связанной с CRISPR цитотоксичности (Фиг. 124B). Хотя эффективность редактирования генома была ниже для вектора HDAd-C-BE, уровень редактирования оставался стабильным, приводя к сравнимой повторной активации γ -глобина (Фиг. 124C). После трансплантации приживление HDAd-C-BE-трансдуцированных CD34+ клеток было таким же эффективным, как и для нетрансдуцированных контрольных клеток (Фиг. 125). В целом, эти данные показывают, что векторы редакторов оснований потенциально являются лучшим инструментом для редактирования генома в ГСК, чем wtCRISPR-экспрессирующие векторы. Недавно был разработан ряд векторов HDAd, экспрессирующих редакторы аденина, для трех разных областей в промоторах HBG1/2. Ожидается, что повторная активация γ -глобина может быть значительно повышена за счет одновременного нацеливания на уровни нескольких репрессоров векторами редакторов оснований. С этой целью исследовали векторы HDAd, экспрессирующие редакторы оснований, нацеленные на эритроидный энхансер *bcl11a* (Фиг. 126, верхняя панель) или сайт связывания белка BCL11a в HBG1/2 (Фиг. 126, нижняя панель). Повторная активация γ -глобина в *in vitro* исследовании составляла 9 и 53% для двух векторов, соответственно.

[1064] **Данные в мышинной модели СКА (модель Townes):** B6;129-Nbb^{tm2(HBG1,HBV*)Tow}/Nbb^{tm3(HBG1,HBV)Tow} Hba^{tm1(HBA)Tow}/J; $ha/ha::\beta^A/\beta^S$, $ha/ha::-383 \gamma-\beta^A/-1400 \gamma-\beta^S$.

[1065] Эти мыши содержат человеческий α -глобин, γ -глобин (включая -383 и -1400 области, содержащие промоторы), β^{87} -SCA глобин вместо соответствующих мышинных генов и демонстрируют фенотип тяжелой СКА (Фиг. 127A) с 40% ретикулоцитов в периферической крови, низким гематокритом, низкими уровнями гемоглобина и лейкоцитозом (Фиг. 127B). Этих мышей скрещивали для достижения гомозиготности в отношении CD46 и трех замен гена глобина (мыши CD46/Townes). Проводили исследования, чтобы определить, будет ли ранее разработанный вектор HDAd-HBG-CRISPR активировать γ -глобин после *in vivo* трансдукции ГСК мышей CD46/Townes (Фиг. 128A). Без отбора O^bBG/BCNU присутствие γ -глобина в RBC достигало 60%, что

указывает на то, что функциональный недостаток эритропоэза мышей Townes обеспечивает сильный пролиферационный стимул для ГСК/эритроидных клеток-предшественников с отредактированным геномом (Фиг. 128В). Терапевтический эффект вектора HDAd-HBG-CRISPR отражался на сильно улучшенном фенотипе эритроцитов и 5-кратным снижением количества периферических ретикулоцитов (Фиг. 128С). Это указывает на то, что лечение в этой модели (и потенциально у пациентов с СКА) можно обеспечить без необходимости в O⁶BG/BCNU *in vivo* отборе ГСК.

[1066] **In vivo перенос генов ГСК у отличных от человека приматов (ОЧП):** Эти данные получены от двух ОЧП (*Macaca nemestrina*), которые получали мобилизацию с помощью G-CSF, SCF и AMD3100 с последующей инъекцией HDAd-GFP (Фиг. 129А; Фиг. 93А; Фиг. 94Е-94G). Образцы периферической крови брали непосредственно перед инъекцией вектора и через 2 и 6 часов после инъекции. Выделенные CD34+ клетки культивировали *ex vivo* и высевали для анализа колониеобразования. В среднем 3% CD34+ клеток, выделенных после введения вектора, были GFP+ (Фиг. 129В; Фиг. 93В, 93С; Фиг. 94Н), что позволяет предположить, что мобилизованные CD34+ клетки в периферической крови можно трансдуцировать одним внутривенным введением вектора HDAd5/35++. Чтобы исследовать, сохраняли ли эти CD34+ клетки колониеобразующий потенциал, проводили анализы колоний и определяли процентное содержание колоний, которые несли трансген GFP, методом ПЦР. До 55% колоний, полученных из CD34+ клеток в момент времени после инъекции, были трансдуцированы вектором (Фиг. 129С; Фиг. 93D; также смотрите Фиг. 94I-94М). И наконец, чтобы исследовать способность *in vivo* клеток-мишеней вектора возвращаться обратно в компартмент костного мозга после периферической мобилизации, от одного из животных получали аспираты костного мозга через 3 дня после введения вектора. 3,7% или 2,9% находящихся в костном мозге CD34+ клеток были GFP+, и никакой существенной разницы в колониеобразующем потенциале не наблюдали в клетках, собранных до или после *in vivo* доставки (Фиг. 129D; Фиг. 93Е). Эти исследования на отличных от человека приматах (проводимые с дозой вектора, которая была 10х ниже, чем для мышей) демонстрируют, что описанный подход *in vivo* доставки является реализуемым и безопасным в подтвержденной доклинической модели.

[1067] **Пример 10. In vivo генная терапия с редакторами оснований обеспечивает эффективную повторную активацию γ -глобина у мышей β -YAC**

[1068] Этот пример демонстрирует, что редакторы оснований, доставляемые векторами HDAd5/35++ *in vivo*, являются полезной и эффективной стратегией для точного конструирования генома, например, для лечения гемоглобинопатий.

[1069] Редакторы оснований способны вставлять точные нуклеотидные мутации в

геномных локусах-мишенях и обеспечивать преимущество недопущения двухцепочечных разрывов ДНК. В данном случае критически важные мотивы, регулирующие повторную активацию γ -глобина, были мишенями редакторов оснований, доставляемых векторами HDAd5/35⁺⁺. Благодаря оптимизированному дизайну была успешно создана панель редакторов цитидиновых и адениновых оснований (CBE и ABE), нацеленных на энхансер BCL11A или воспроизводящих мутации природной наследственной персистенции фетального гемоглобина (НПФГ) в промоторе HBG1/2. В клетках HUDEP-2 все пять исследуемых векторов эффективно обеспечивали преобразование оснований-мишеней и приводили к значительной повторной активации γ -глобина. Наблюдала значительную выработку белка γ -глобина (23% превышения относительно β -глобина), используя ABE-вектор HDAd-ABE-sgHBG № 2, специфический к мутации с -113A на G НПФГ в промоторе HBG1/2. Поэтому этот вектор был выбран для последующих исследований на животных. Использовали мышей, которые несут 248 т. о. локус человеческого β -глобина (мышь β -YAC) и поэтому точно отображают переключение глобина. В вектор была включена экспрессионная кассета EF1 α -MGMT^{P140K}, фланкируемая FRT и сайтами транспозона, чтобы сделать возможным *in vivo* отбор трансдуцированных клеток. После *in vivo* трансдукции HDAd-ABE-HBG № 2+HDAd-SB и низких доз химиоотбора было обнаружено в среднем более 40% HbF-положительных клеток в периферических красных клетках крови. Это соответствует 21% превышению выработки γ -глобина по сравнению с человеческим β -глобином. Преобразование с -113 A на G в общих клетках костного мозга в среднем составляло 20%. По сравнению с нетрансдуцированными мышами после лечения не наблюдали никаких изменений в гематологических параметрах, эритропозе и клеточной композиции костного мозга, что демонстрирует хороший профиль безопасности этого подхода. Не было обнаружено выявляемого редактирования в наиболее вероятных потенциальных нецелевых геномных сайтах. Отрицательные по линии дифференцировки костного мозга клетки выделяли от первичных мышей на 16 неделе после трансдукции и инфузироваи мышам C57BL/6J после летальной дозы облучения. Процентное содержание HbF-положительных клеток сохранялось у вторичных реципиентов в течение 16 недель, что указывает на то, что редактирование генома происходило в мышинных ГСК с долгосрочной репопуляцией. Эти наблюдения демонстрируют, что редакторы оснований, доставляемые векторами HDAd5/35⁺⁺, представляют перспективную стратегию для точного *in vivo* конструирования генома для лечения гемоглобинопатий.

[1070] Стратегии конструирования генома на основе нуклеаз, таких как CRISPR/Cas9, позволили достичь значительных успехов, при этом некоторое количество

исследований генной терапии перешли к фазе клинической оценки. CRISPR/Cas9-опосредованное редактирование генов основано на двухцепочечных разрывах ДНК (ДЦР), которые инициируют эндогенные механизмы репарации, включая классическое негомологичное соединение концов (НГСК). В присутствии донорной ДНК-матрицы гомологичная репарация происходит, как правило, с меньшей частотой. Последние исследования продемонстрировали высокоэффективное разрушение представляющего интерес гена в гемопоэтических клетках и клетках-предшественниках (ГСКП), которые важны для генной терапии для заболеваний крови (Martin et al., *Cell Stem Cell* 24: 821-828.e825, 2019; Wu et al., *Nature Medicine* 25: 776-783, 2019). Однако в исследованиях сообщалось, что индуцированные нуклеазами ДЦР могут (Haapaniemi et al., *Nature Medicine*, 24(7):927-903, 2018; Ihry et al., *Nature Medicine*, 24(7):939-946, 2018; Kosicki et al., *Nature Biotechnology* 36: 765, 2018) приводить к побочным эффектам для клеток-хозяев путем генерации нежелательной делеции крупного фрагмента и p53-зависимых ответов на повреждение ДНК (Haapaniemi et al., *Nature Medicine*, 24(7):927-903, 2018; Ihry et al., *Nature Medicine*, 24(7):939-946, 2018; Kosicki et al., *Nature Biotechnology* 36: 765, 2018).

[1071] Редактор оснований (BE) способны обеспечивать точные нуклеотидные замены в целевых геномных локусах без создания ДЦР. Они содержат каталитически нефункциональную нуклеазу, такую как нуклеаза Cas9 (nCas9), которая неспособна создавать ДЦР, слитую с ферментом нуклеос оснований дезаминазой и, в некоторых случаях, ингибитор ДНК-гликозилазы. На сегодняшний день существует две основные категории: редакторы цитидиновых оснований (CBE) и редакторы адениновых оснований (ABE), которые обеспечивают преобразования C > T и A > G, соответственно, в узком окне-мишени (обычно около 5 пар оснований), определяемом одиночной гидовой РНК (огРНК), сопряженной с nCas9 (Gaudelli et al., *Nature* 551: 464-471, 2017; Komor et al., *Nature* 533: 420-424, 2016; Nishida et al., *Science* 353, 2016). Ключевая разница между CBE и ABE находится в области дезаминазы, при этом CBE содержат цитидиндезаминазу (например, APOBEC1), в ABE используются разработанные в лаборатории дезоксиаденозиндезаминазы TadA. Несколько групп сообщали об эффективном редактировании в ряде эукариотических клеток (Zhang et al., *Genome Biology* 20: 101, 2019; Chadwick et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37: 1741-1747, 2017; Zeng et al., *Nature Medicine* 26: 535-541, 2020; Lim et al., *Mol Ther*, 82(4):1177-1189, 2020; Gao et al., *Nature* 553: 217-221, 2018). По прогнозам 60% всех известных патогенных однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) у людей потенциально можно обратить с помощью известных на сегодня BE (Rees et al., *Nature Reviews Genetics* 19: 770-788, 2018).

[1072] β-гемоглобинопатии являются распространенной группой генетических

расстройств с отсутствием или недостатком выработки нормального β -глобина, в основном включая β -талассемию и серповидноклеточную анемию (СКА). В зависимости от конкретных генетических эффектов, пациенты с β -талассемией и СКА демонстрируют различную тяжести проявлений этих заболеваний. Хотя с появлением новых методов скрининга и профилактического лечения смертность среди детей с СКА сильно снизилась, большинство пациентов с большой β -талассемией (β^0) и СКА страдают от пожизненных острых и хронических осложнений (Ware et al., Lancet 390: 311-323, 2017; Higgs et al., Lancet 379: 373-383, 2012). Однако у некоторых взрослых пациентов с высокими уровнями фетального гемоглобина (HbF), который преобладает во время большей части стадии внутриутробного развития и обычно подвергается сайленсингу вскоре после рождения, симптомы значительно слабее. Это явление наследственной персистенции фетального гемоглобина (НПФГ) демонстрирует сильный защитный эффект HbF и обеспечивает хорошее обоснование для повторной активации γ -глобина в качестве стратегии генной терапии для пациентов со связанными с β -глобином расстройствами.

[1073] Был описан ряд мутаций НПФГ (обзор Orkin & Bauer, Annual Review of Medicine 70: 257-271, 2019 и Wienert et al., Trends in Genetics: TIG 34: 927-940, 2018). Существует три основных кластера ОНП НПФГ, расположенных в области сайтов -150, -175 и -200 в промоторе HBG1/2. Внесение мутаций НПФГ в эти сайты может разрушать сайты связывания репрессоров HbF (например, BCL11A и ZBTB7A) или создавать сайты связывания с приобретением функции для активаторов (например, TAL1 and KLF1), приводя к подавлению экспрессии HbF (Traxler et al., Nature Medicine 22: 987-990, 2016; Martyn et al., Nature Genetics 50: 498-503, 2018). Повторную активацию HbF также можно обеспечить, модулируя экспрессию регуляторов HbF, таких как BCL11A, основной репрессор HbF (Sankaran et al., Science 322: 1839-1842, 2008). Хотя прямой нокаут BCL11A не является вариантом вследствие его незаменимой роли в развитии, частичное снижение регуляции BCL11A путем редактирования его эритроид-специфических энхансеров делает возможной эффективную индукцию HbF с сохранением жизнеспособности животных (Wu et al., Nature Medicine 25: 776-783, 2019; Canver et al., Nature 527: 192-197, 2015). С помощью электропорации BE:онРНК-рибонуклеопротеин (РНП) в недавнем исследовании было продемонстрировано, что разрушение критически важных мотивов в энхансере +58 BCL11A редакторами оснований приводит к терапевтической индукции HbF в полученных от пациентов CD34⁺ ГСКП.

[1074] Недавно был создан упрощенный подход генной терапии путем *in vivo* трансдукции ГСК. Хелпер-зависимые векторы HDAd5/35⁺⁺ использовали благодаря их многочисленным преимущественным свойствам, включая химерный фибер для тропизма

в отношении ГСК, более 32 т. о. нагрузку для размещения наиболее часто используемых трансгенов и т. д. В этом исследовании с использованием оптимизированного дизайна была успешно создана панель BE-векторов, нацеленных на энхансер BCL11A или промотор HBG1/2. В трансгенной мышинной модели показано, что *in vivo* редактирование оснований ГСК с помощью вектора HDAD-ABE воспроизводило мутация НПФГ и приводило к эффективной индукции HbF.

[1075] *Материалы и методы.*

[1076] **Реагенты для *in vivo* трансдукции и отбора:** Использовали G-CSF (Neupogen™) (Amgen, Thousand Oaks, CA), AMD3100 (MilliporeSigma, Burlington, MA) и дексаметазона натрия сульфат (Fresenius Kabi USA, Lake Zurich, IL). O⁶-бензилгуанин (O⁶-BG) и кармустин (BCNU) были от MilliporeSigma.

[1077] **Создание векторов HDAd:** Использовали системы редактирования оснований, разработанные лабораторией David R. Liu's в Гарварде (Koblan et al., Nature Biotechnology 36: 843-846, 2018). Плазмиды pCMV_AncBE4max и pCMV_ABEmax были приобретены у Addgene (Watertown, MA). Также использовали следующие плазмиды от Addgene: BE4, ABE7.10, pLenti-BE3RA-PGK-Puro и pLenti-FNLS-PGK-Puro и BE3RA на Фиг. 131A и 131B (Zafra et al., Nature Biotechnology 36: 888-893, 2018). Олиго и gBlock, описанные ниже, были синтезированы Integrated DNA Technologies (IDT) (Coralville, IA) и перечислены в таблице 14.

Таблица 14: Гидовые последовательности для редакторов оснований.

Редактор	Название	Последовательность (от 5' к 3')*	Сайт-мишень/примечание
BCL11A			
CBE	sgBCL № 1	TTTAT <u>C</u> ACAGGCTCCAG	Мотив GATAA GAA
CBE	sgBCL № 2	TTTTAT <u>C</u> ACAGGCTCCA	Мотив GATAA GGA
ABE	sgBCL № 3	TTT <u>A</u> TCACAGGCTCCAG	Мотив GATAA GAA
ABE	sgBCL № 4	TTTT <u>A</u> TCACAGGCTCCA	Мотив GATAA GGA
ABE- xCas9	sgBCL № 5	CTGTGAT <u>A</u> AAAGCAAC	Мотив GATAA, NGC PAM TGTT
ABE-	sgBCL № 6	GATA <u>A</u> AAGCAACTGTT	Мотив GATAA, NGC PAM

т. о. фрагменты, амплифицированные из pBST-sgBCL11Ae1 (Li et al., Blood 131: 2915-2928, 2018) с использованием № 4FR и № 5FR, соответственно, и 9,6 т. о. фрагмент pBST-sgBCL11Ae1, высвобождаемый путем расщепления BsaI-BamHI. Промежуточную плазмиду pBS-U6-Ef1 α составляли путем соединения следующих трех фрагментов, используя инфузию: 3,6 т. о. последовательность остов U6-филлер-гРНК-Ef1 α и 2,9 т. о. векторный каркас, амплифицированный из pBST-CRISPR с использованием праймеров № 6FR и № 7FR, соответственно, и 0,5 т. о. gBlock, содержащий сайт клонирования BseRI (№ 8). Эту промежуточную конструкцию расщепляли BseRI и рекомбинировали с 5,5 т. о. фрагментом BE4- Δ BsmBI после обработки EagI-PmeI с созданием pBS-BE4. 6,6 т. о. последовательность каркас pBS-остов U6-филлер-гРНК-Ef1 α ПЦР-амплифицировали из pBS-BE4 с использованием № 9FR с последующей инфузией NotI-AgeI-расщепленного pCMV-ABEmax и pCMV_AncBE4max- Δ BsmBI с созданием pBS-AncBE4max и pBS-ABEmax, соответственно. После этого синтезировали оgРНК-олиго, отжигали и вставляли в сайт BsmBI pBS-BE4, pBS-AncBE4max и pBS-ABEmax с созданием челночных плазмид сразу со всеми компонентами редактирования оснований, такими как pBS-ABEmax-sgHBG № 2. Этап 2) 21,0 т. о. вектор pHCAS3-MCS с сайтом клонирования PacI создавали образом, аналогичным описанному ранее (Li et al., Cancer Res 80: 549-560, 2020) за исключением того, что ДНК-вкладыш обрезали с помощью рестрикции EcoRI и повторно лигировали с 1,8 т. о. фрагментом EcoRI. 2,2 т. о. последовательность PGK-MGMT^{P140K}-2A-GFP-bGHpolyA амплифицировали из pHCA-Dual-MGMT-GFP (Li et al., Blood 131: 2915-2928, 2018) с помощью № 10FR и рекомбинировали с PacI-расщепленным pHM5-FRT-IR-Ef1 α -GFP (Richter et al., Blood 128: 2206-2217, 2016) с получением pHM5-FI-PGK-MGMT-GFP. После этого фрагмент между сайтами I-CeuI и PI-SceI переносили из этой конструкции в сайт PshAI pHCAS3-MCS с помощью № 11FR и инфузионного клонирования с образованием pHCAS3-FI-PGK-MGMT-GFP-MCS. Этап 3) Челночные плазмиды с этапа 1 и полученный вектор с этапа 2 обрабатывали PacI и рекомбинировали с созданием конечных конструкций, таких как pHCA-ABEmax-sgHBG № 2-FI-MGMT-GFP. Конечные конструкции pHCA с разными последовательностями оgРНК создавали аналогичным образом, за исключением того, что на этапе 1 использовали разные оgРНК.

[1079] *Вторая версия конструкций ABE*: Вторая версия конструкций ABE: отличается от первой версии промоторами, альтернативной частотой использования кодонов и миРНК-регулируемой генной экспрессией. Клонирование также включало 3 этапа. Этап 1) 1,5 т. о. 3' НТО β -глобина с целевой последовательностью miR183/218 амплифицировали из pBST-sgHBG1-miR (Li et al., Blood 131: 2915-2928, 2018), используя праймеры № 12FR, с последующей вставкой в сайты NotI-HpaI pBS-ABEmax-sgHBG № 2 с

созданием рBS-ABEmax-sgHBG№ 2-miR. Челночные плазмиды для второй версии конструкций ABE, например, рBS-ABEopti-sgHBG№ 2-miR, получали путем соединения следующих четырех фрагментов с AscI-EcoRV-расщепленным рBS-ABEmax-sgHBG№ 2-miR путем инфузионного клонирования: человеческий промотор PGK, амплифицированный из рHM5-FI-PGK-MGMT-GFP с использованием № 13FR, два gBlock (№ 14 и № 15), содержащие два гена TadA с альтернативной частотой использования кодонов для снижения повторяемости последовательности, и 1,9 т. о. последовательность, амплифицированная из рBS-ABEmax-sgHBG№ 2 с использованием № 16FR. Этап 2) Последовательность поли-А SV40 между сайтами PshAI-NotI рHM-FRT-IR-Ef1α-MGMT(P140K)-2A-GFP-pA замещали последовательностью поли-А bGH (gBlock № 17) с получением рHM-FI-Ef1α-MGMT(P140K)-GFP-bGHpA. Затем целый 4,9 т. о. транспозон между сайтами I-CeuI и PI-SceI переносили в сайт PshAI рHCAS3-MCS с использованием № 11FR с созданием рHCAS3-FI-Ef1α-MGMT-GFP-MCS. Этап 3) Полученные конструкции с этапов 1 и 2 объединяли путем инфузионного клонирования после обработки PacI с созданием рHCA-ABEopti-sgHBG№ 2-FI-MGMT-GFP. Конечные конструкции рHCA с разными последовательностями оgPHK создавали аналогичным образом.

[1080] Высокоточную ДНК-полимеразу Phusion Hot Start II использовали во всех процессах ПЦР-амплификации, вовлеченных в клонирование. Проводили скрининг конечных конструкций несколькими рестрикционными ферментами (HindIII, EcoRI и PmeI) и подтверждали путем секвенирования полной области, содержащей трансгены.

[1081] Для получения векторов HDAd5/35++ соответствующие плазмиды линейаризовали с помощью PmeI и сохраняли в клетках 116 (Palmer & Ng, Mol Ther 8: 846-852, 2003) с AdNG163-5/35++, хелперным вектором Ad5/35++, содержащим химерные фибры, состоящие из хвоста фибера Ad5, стержня фибера Ad35 и головки фибера Ad35++ с повышенной аффинностью (Richter et al., Blood 128: 2206-2217, 2016). Векторы HD-Ad5/35++ амплифицировали в клетках 116, как подробно описано в другом месте (Palmer & Ng, Mol Ther 8: 846-852, 2003). Уровни загрязнения хелперным вирусом составляли < 0,05%. Титры составляли $2-5 \times 10^{12}$ вирусных частиц (вч)/мл.

[1082] **Трансфекция линий клеток:** Клетки 293FT (Thermo Fisher Scientific) и K562 культивировали в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки 293FT, заранее высеянные в 6-луночный планшет, трансфицировали 4 мкг плазмид (3 мкг редактора оснований или CRISPR/Cas9+1 мкг рSP-sgBCL11AE (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev 9: 390-401, 2018)), используя липофектамин 3000 (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Клетки K562 трансфицировали 2,66 мкг плазмид (2 мкг

редактора оснований или CRISPR/Cas9+0,6 мкг pSP-sgBCL11AE), используя нуклеофекцию (Catalog № V4XC-2024) (Lonza, Basel, Switzerland) в соответствии с протоколом поставщика. Геномную ДНК выделяли через 4 дня после трансфекции для анализа.

[1083] **Клетки HUDEP-2 и эритроидная дифференцировка:** Клетки HUDEP-2 (Kurita et al., PloS One 8: e59890, 2013) культивировали в среде StemSpan SFEM (STEMCELL Technologies) дополненной 100 нг/мл SCF, 3 МЕ/мл EPO, 10^{-6} М дексаметазона и 1 мкг/мл доксицилина (DOX). Эритроидную дифференцировку индуцировали в IMDM, содержащей 5% человеческий сывороточный АВ, 100 нг/мл SCF, 3 МЕ/мл EPO, 10 мкг/мл инсулина, 330 мкг/мл трансферрина, 2 Е/мл гепарина и 1 мкг/мл DOX, в течение 6 дней.

[1084] **Анализ колониеобразующих единиц (КОЕ):** Отрицательные по линии дифференцировки (Lin^{-}) клетки выделяли путем истощения коммитированных по линии дифференцировки клеток в МНК костного мозга, используя набор для истощения клеток мышиной линии дифференцировки (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ КОЕ проводили, используя ColonyGEL (Reachbio, Seattle, WA) с мышиной полной средой в соответствии с протоколом производителя. Колонии подсчитывали через 10 дней после высевания.

[1085] **Нуклеазный анализ несовпадений T7EI:** Геномную ДНК выделяли, используя мини-набор для геномной ДНК PureLink согласно предоставленному протоколу (Life Technologies, Carlsbad, CA) (Miller et al., Nat Biotechnol 25: 778-785, 2007). Геномный сегмент, содержащий сайт-мишень эритроидного энхансера BCL11A, амплифицировали с помощью ПЦР-праймеров: прямого BCL11A (SEQ ID NO: 247) и обратного (SEQ ID NO: 263). Продукты ПЦР гибридизировали и обрабатывали 2,5 единицами T7EI (New England Biolabs) в течение 30 минут при 37 °С. Проводили разделение расщепленных продуктов ПЦР с помощью 10% TBE PAGE (Bio-Rad) и окрашивали бромидом этидия. Использовали 100 п. о. ДНК-лэддер (New England Biolabs). Интенсивность полос анализировали, используя программное обеспечение ImageJ. % расщепления= $(1 - \sqrt{\text{исходная полоса} / (\text{исходная полоса} + \text{расщепленные полосы})}) \times 100\%$.

[1086] **Проточная цитометрия:** Клетки ресуспендировали при 1×10^6 клеток/100 мкл в буфере FACS (ФСБ, 1% ФТС) и инкубировали с FcR-блокирующим реагентом (Miltenyi Biotec, Auburn CA) в течение десяти минут на льду. После этого добавляли окрашивающий раствор антител в 100 мкл на 10^6 клеток и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. После инкубации клетки один раз промывали в буфере FACS. Для вторичного окрашивания этап окрашивания повторяли со вторичным окрашивающим

раствором. После промывки клетки ресуспендировали в буфере FACS и анализировали, используя проточный цитометр LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA). Дебрис исключали, используя гейтинг на основе площади прямого рассеяния и площади бокового рассеяния. Затем проводили гейтинг одиночных клеток, используя высоту прямого рассеяния и ширину бокового рассеяния. Затем анализировали данные проточной цитометрии, используя FlowJo (версия 10.0.8, FlowJo, LLC). Для анализа клеток LSK клетки окрашивали биотин-конъюгированным коктейлем для выявления линии дифференцировки (каталог № 130-092-613) (Miltenyi Biotec, San Diego, CA), антителами против c-Kit (клон 2B8, каталог № 12-1171-83) и Sca-1 (клон D7, каталог № 25-5981-82), с последующим вторичным окрашиванием APC-конъюгированным стрептавидином (каталог № 17-4317-82) (eBioscience, San Diego, CA). Другие антитела от eBioscience включали антитело к мышинному CD3-APC (клон 17A2) (каталог № 17-0032-82), антитело к мышинному CD19-PE-Суанине7 (клон eBio1D3) (каталог № 25-0193-82) и антитело к мышинному Ly-66 (Gr-1)-PE, (клон RB6-8C5) (каталог № 12-5931-82. Антитело к мышинному Ter-119-APC (клон: Ter-119) (каталог №: 116211) было от Biolegend (San Diego, CA).

[1087] **Внутриклеточная проточная цитометрия для выявления экспрессии человеческого γ -глобина:** Использовали набор для пермеабилзации клеток FIX & PERM™ (Thermo Fisher Scientific) и придерживались протокола производителя. Вкратце, 5×10^6 клеток HUDEP-2 ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS. Добавляли 100 мкл реагента А (среда для фиксации) и инкубировали в течение 2-3 минут при комнатной температуре, затем добавляли 1 мл предварительно охлажденного абсолютного метанола, смешивали и инкубировали на льду в темноте в течение 10 минут. Затем образцы промывали буфером FACS и ресуспендировали в 100 мкл реагента В (среда для пермеабилзации) 0,6 мкг антитела к гемоглобину γ (клон 51-7, каталог № sc-21756 PE) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывки клетки ресуспендировали в буфере FACS и анализировали.

[1088] **ВЭЖХ глобина:** Уровни отдельных цепей глобина количественно оценивали на приборе Shimadzu Prominence с детектором на диодной матрице SPD-10AV и двухканальным насосом LC-10AT (Shimadzu, Kyoto, Japan). Для полипептидов использовали обращенно-фазовые колонки C4 Vydac 214TP™ (колонка 214TP54, C4, 300 Å, 5 мкм, в. о. 4,6 мм x 250 мм) (Nichrom, UK). 40%-60% градиент смеси 0,1% трифторуксусной кислоты в воде/ацетонитриле применяли при скорости 1 мл/мин.

[1089] **Измерение числа копий вектора:** Для абсолютной количественной оценки копий аденовирусного генома на клетку из клеток выделяли геномную ДНК, используя

мини-набор для геномной ДНК PureLink согласно предоставленному протоколу (Life Technologies), и использовали в качестве матрицы для кПЦР, проводимой с использованием мастер-микса power SYBR™ green (Thermo Fisher Scientific). Использовали следующие пары праймеров: прямой MGMT (SEQ ID NO: 220) и обратный (SEQ ID NO: 221).

[1090] **ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени:** Общую РНК выделяли из 5×10^6 дифференцированных клеток HUDEP-2 или 100 мкл крови, используя реагент TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific), придерживаясь метода фенольно-хлороформной экстракции. Использовали набор для обратной транскрипции QuantiTect (Qiagen) и мастер-микс для ПЦР Power SYBR™ green (Thermo Fisher Scientific). Количественную ПЦР в реальном времени проводили на системе для ПЦР в реальном времени StepOnePlus (AB Applied Biosystems). Использовали следующие пары праймеров: мышинный RPL10 (конститутивный) прямой (SEQ ID NO: 189) и обратный (SEQ ID NO: 190); человеческий γ -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 191) и обратный (SEQ ID NO: 192); человеческий β -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 216) и обратный (SEQ ID NO: 217); мышинный β -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 193) и обратный (SEQ ID NO: 194), мышинный α -глобиновый прямой (SEQ ID NO: 212) и обратный (SEQ ID NO: 213).

[1091] **Выявление редактирования оснований:** Геномную ДНК выделяли, как описано выше. Геномные сегменты, включающие сайты-мишени энхансера BCL11A и промотора HBG1/2, амплифицировали с помощью ДНК-полимеразы KOD Hot Start (MilliporeSigma), используя праймеры: прямой HBG1 (SEQ ID NO: 31), обратный (SEQ ID NO: 33); прямой HBG2 (SEQ ID NO: 69), обратный (SEQ ID NO: 72); и праймеры BCL11A, приведенные выше. Ампликоны очищали, используя набор для очистки NucleoSpin Gel & PCR (Takara), и секвенировали со следующими праймерами: HBG1-seq (SEQ ID NO: 105); HBG2-seq (SEQ ID NO: 237); и BCL11A-seq (SEQ ID NO: 247). Уровень редактирования оснований количественно оценивали по результатам секвенирования по Сэнгеру, используя EditR 1.0.9 (Kluesner et al., CRISPR J 1: 239-250, 2018).

[1092] **Исследования на животных:** Все эксперименты, включающие животных, проводили в соответствии с институциональными руководствами, установленными Университетом Вашингтона. Университет Вашингтона является аккредитованным Международной ассоциацией по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных (AALAC) исследовательским институтом, а вся работа с живыми животными, проводимая в этом университете, проводится в соответствии с политикой обеспечения общественного здравоохранения (PHS) Управления защиты лабораторных животных (OLAW), законом и нормами по благополучию животных USDA, руководством

по содержанию и использованию лабораторных животных и политикой Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC) Университета Вашингтона. Эти исследования были разрешены IACUC Университета Вашингтона (протокол № 3108-01). Трансгенные мыши на основе линии C57BL/6J, которые содержат человеческий геномный локус CD46 и демонстрируют экспрессию CD46 с уровнем и профилем, сходными с человеческими (мыши hCD46^{+/+}), были описаны ранее (Kemper et al., Clin Exp Immunol 124: 180-189, 2001). Использовали трансгенных мышей, несущих дрожжевую искусственную хромосому с 248 т. о. локусом β-глобина дикого типа (β-YAC) (Peterson et al., Ann N Y Acad Sci 850: 28-37, 1998). Мышей β-YAC скрещивали с ^{+/+} мышами в отношении человеческого CD46 для получения мышей β-YAC^{+/-}/CD46^{+/+} для исследований *in vivo* трансдукции ГСКП. Для генотипирования мышей использовали следующие праймеры: прямой CD46 (SEQ ID NO: 233) и обратный (SEQ ID NO: 234); прямой β-YAC (промотор γ-глобина) (SEQ ID NO: 242) и обратный (SEQ ID NO: 243).

[1093] *Мобилизация ГСКП и in vivo трансдукция*: ГСКП мобилизовали у мышей путем подкожных (п/к) инъекций человеческого рекомбинантного G-CSF (5 мкг/мышь/день, 4 дня) с последующей п/к инъекцией AMD3100 (5 мг/кг) на день 5. Кроме того, животные получали дексаметазон (10 мг/кг, в/б) за 16 ч и 2 ч до инъекции вируса. Через тридцать и 60 минут после AMD3100 животным внутривенно вводили вирусные векторы через ретро-орбитальное сплетение с двумя дозами вирусов (4×10^{10} вч/доза \times 2 дозы). Вирусы для редактирования оснований и SB доставляли вместе с соотношении 1:1.

[1094] *In vivo отбор*: Отбор начинали на первой неделе (модель Townes) или через четыре недели (модель β-YAC) после трансдукции. Мышам инъецировали O⁶-BG (15 мг/кг, в/б), два раза, с перерывом в 30 минут. Через один час после второй инъекции O⁶-BG мышам инъецировали (в/б) 5 мг/кг BCNU. Через две и четыре недели после первого раунда отбора проводили еще два раунда с дозами BCNU 7,5 и 10 мг/кг, соответственно.

[1095] *Вторичная трансплантация костного мозга*: Реципиентами были самки мышей C57BL/6J возрастом 6-8 недель от Jackson Laboratory. В день трансплантации мышей-реципиентов облучали дозой 1000 рад. Клетки костного мозга от *in vivo* трансдуцированных мышей CD46tg выделяли асептически, а истощенные по линии дифференцировки клетки выделяли, используя MACS, как описано выше. Через шесть часов после облучения клетки внутривенно инъецировали при 1×10^6 клеток на мышь. Вторичных реципиентов держали в течение 16 недель после трансплантации для анализа в конечный момент времени.

[1096] **Анализ тканей**: Срезы тканей селезенки и печени толщиной 2,5 мкм

фиксируют в 4% формальдегиде в течение по меньшей мере 24 часов, дегидратировали и заливали в парафин. Окрашивание гематоксилином и эозином использовали для гистологической оценки экстрамедуллярного гемопоэза. Гемосидерин был выявлен в срезах тканей посредством окрашивания берлинской лазурью по Перлсу. Вкратце, срезы тканей обрабатывали смесью одинаковых объемов (2%) ферроцианида калия и хлористоводородной кислоты в дистиллированной воде, а затем проводили контрокрашивание нейтральным красным.

[1097] **Анализ крови:** Образцы крови собирали в покрытые ЭДТА пробирки и проводили анализ на приборе HemaVet 950FS (Drew Scientific, Waterbury, CT). Мазки периферической крови окрашивали красителем Гимза/Мэя - Грюнвальда (Merck, Darmstadt, Germany) в течение 5 и 15 минут, соответственно. Ретикулоциты окрашивали бриллианткрезил синим. Исследователи, которые подсчитывали ретикулоциты в мазках крови, не имели информации о распределении групп образцов. На слайдах были только номера животных. (пять слайдов на животное, пять случайных 1 см² срезов).

[1098] **Статистический анализ:** Для сравнения множества групп использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Бонферрони для множественного сравнения. Статистический анализ проводили, используя GraphPad Prism версии 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

[1099] **Результаты. Выбор редакторов оснований и гидовых РНК.** Сравнили активность редактирования нескольких версий редакторов цитидиновых оснований (CBE), включая BE4 (Komo et al., Science Advances 3: eaao4774, 2017), AncBE4max (Koblan et al., Nature Biotechnology 36: 843-846, 2018), BE3RA и FNLS (Zafra et al., Nature Biotechnology 36: 888-893, 2018). Редакторы оснований были субклонированы и находились под управлением универсального промотора EF1 α . Вторую плазмиду, экспрессирующую гидовую РНК под управлением человеческого промотора U6, которая нацелена на мотив GATAA в +58 области энхансера BCL11A (Canver et al., Nature 527: 192-197, 2015) использовали для совместной трансфекции. Хотя BE3RA продемонстрировал более высокий уровень редактирования в клетках 293FT (Фиг. 131A), система AncBE4max демонстрировала наибольшую активность в эритроидных клетках K562 по данным измерений в анализе расщепления (Фиг. 131B). Следовательно, для последующих исследований использовали AncBE4max. В случае редактора адениновых оснований (ABE) использовали систему ABEmax, разработанную группой David Liu и оптимизированную с помощью подхода, аналогичного AncBE4max (Koblan et al., Nature Biotechnology 36: 843-846, 2018). Редакторы xCas9(3.7)-BE4 и xCas9(3.7)-ABE(7.10) также использовали в скрининге гидовой последовательности из-за их широкой совместимости с

РАМ (Hu et al., Nature 556: 57-63, 2018).

[1100] Оптимальное окно нацеливания для редактор оснований находится в позиции 4-8 от протоспейсера, если принять 5' конец первого основания за позицию 1. Разрабатывали панель последовательностей одиночных гидовых РГК (огРНК), специфических к мотиву GATAA в +58 энхансера BCL11A (sgBCL, от № 1 до № 6) или воспроизводящих различные природные мутации наследственной персистенции фетального гемоглобина (НПФГ) в промоторе HBG1/2 (sgHBG, от № 1 до № 6). Последовательности и их специфические целевые мотивы/основания приведены в таблице 14. Гидовые последовательности исследовали в линии эритроидных клеток-предшественников HUDEP-2 (Kurita et al., PloS One 8: e59890, 2013) в отношении их способности повторно активировать экспрессию γ -глобина. Клетки подвергали эритроидной дифференцировке на 4 день после трансфекции. Все 12 последовательностей огРНК приводили к значительной экспрессии γ -глобина по сравнению с отрицательным контролем СВЕ, нацеленным на экспрессию CCR5, а не связанных с гемоглобином генов (Фиг. 130). sgHBG № 2 приводил к 41% HbF⁺ клеток на 6 день после дифференцировки. Ранее описанный вектор CRISPR, нацеленный на сайт связывания BCL11A в промоторе HBG, использовался в качестве положительно контроля и генерировал 84% HbF⁺ клеток (Li et al., Blood 131: 2915-2928, 2018). Соответственно, sgBCL № 1 (СВЕ), sgHBG № 1 (СВЕ), sgHBG № 2 (АВЕ) и sgHBG № 4 (АВЕ) были выбраны для векторной доставки ввиду их активности, а также разнообразия сайтов-мишеней. Также конструировали вектор отрицательного контроля sgNeg (СВЕ) и вектор, содержащий как sgHBG№ 1, так и sgBCL№ 1 (двойной, СВЕ).

[1101] **Создание хелпер-зависимого аденовирусного вектора (HDAд), экспрессирующего ВЕ.** Далее целью было получение вирусных векторов для эффективной *in vivo* доставки ВЕ. Вследствие размера редакторов оснований более 8 т. о. и необходимости в регуляторных элементах их сложно поместить в один лентивирусный вектор (LV) или аденоассоциированный вектор (AAV). Были разработаны векторы HDAд с модифицированным фибером, называемые HDAд5/35⁺⁺, для эффективной трансдукции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) (Li et al., Mol Ther Methods Clin Dev 9: 142-152, 2018). Векторы HDAд могут иметь пакующую емкость 36 т. о., обеспечивая достаточно места для компонентов ВЕ. В первой попытке фермент ВЕ (rAPOBEC1-nCas9-2×UGI для СВЕ или 2×TadA-nCas9 для АВЕ) помещали под управление промотора EF1 α . Все компоненты ВЕ, включая огРНК под управлением человеческого промотора U6, клонировали в векторную плазмиду HDAд рHCA. Кассету MGMT/GFP, фланкируемую сайтами FRT и транспозона, также клонировали в вектор, чтобы облегчить отбор

трансдуцированных клеток путем обработки O6BG/BCNU (Фиг. 132А и 132В). Следует отметить, что компоненты ВЕ были размещены за пределами транспозона. Этот дизайн обеспечивал i) временную экспрессию ВЕ с сохранением интегрированной экспрессии MGMT/GFP; и ii) более быструю деградацию редактирующих ферментов после совместного инфицирования с другим вектором, экспрессирующим транспозазу *sleery beauty* (HDAAd-SB) (дополнительное обсуждение и/или дополнительную иллюстрацию некоторых аспектов дизайна вектора также смотрите в примере 3). Хотя выход на 3-литровый роллер был относительно низким (в среднем 1×10^{12} вирусных частиц или вч), были сохранены все четыре вектора СВЕ. Это отличается от векторов HDAAd-CRISPR, которые не подлежат сохранению без механизмов для регуляции экспрессии нуклеаз (Saydaminova et al., *Mol Ther Methods Clin Dev* 1: 14057, 2015). Эти результаты позволяют предположить, что система ВЕ без ДЦР может быть менее токсичной для клеток-продуцентов HDAAd, чем CRISPR/Cas9. В случае векторов АВЕ вирусы, по-видимому, подверглись перестройке, и после ультрацентрифугирования с градиентом CsCl не наблюдали отчетливых полос HDAAd. Поскольку основным отличием между векторами АВЕ и СВЕ является область дезаминазы, вероятно, что причиной два повтора TadA-32aa в векторах АВЕ. Поэтому в первую версию векторов АВЕ были внесены следующие модификации: i) повторяемость последовательности между двумя повторами TadA-32aa дополнительно снижали за счет альтернативной частоты использования кодонов (Фиг. 132С); ii) для управления ферментом ВЕ использовали промотор PGK. Хотя он и является конститутивным в ГСК (Li et al., *Cancer Res* 80: 549-560, 2020), промотор PGK обеспечивает более низкую генную экспрессию, чем Efl α в клетках-продуцентах 116 (Qin et al., *PloS One* 5: e10611, 2010), устраняя потенциальные связанные с TadA нежелательные явления; iii) Для дополнительного контроля экспрессии ВЕ использовали систему регуляции генов на основе miR183/218 (Saydaminova et al., *Mol Ther Methods Clin Dev* 1: 14057, 2015) (Фиг. 133А). Эта вторая версия конструкций с оптимизированным дизайном приводила к успешному сохранению двух вирусов HDAAd-ABE со средним выходом $3,3 \times 10^{12}$ вч/роллер, который соответствует нормальному диапазону выхода (Фиг. 133В).

[1102] После этого векторы HDAAd исследовали в клетках HUDEP-2. Все пять исследуемых векторов эффективно обеспечивали преобразование оснований-мишеней и приводили к значительной повторной активации γ -глобина (Фиг. 133 и Фиг. 134). В соответствии с данными скрининга при временной трансфекции вектор HDAAd-ABE-sgHBG № 2 индуцировал наибольший уровень HbF⁺ клеток (71% при МЗ 1000 вч/клетка). Что интересно, хотя sgBCL № 1 и sgHBG № 1 по отдельности опосредовали 17% и 39%

HbF⁺ клеток, соответственно, двойной нацеленный вектор, одновременно экспрессирующий sgBCL № 1 и sgHBG № 1, обеспечивал индукцию HbF на уровне, сравнимом с sgHBG № 2 (Фиг. 133С), что указывает на синергетический эффект. Для вектора отрицательного контроля не было зарегистрировано значительной индукции HbF. Уровни белка γ -глобина, измеренные методом ВЭЖХ, согласовались с данными проточной цитометрии. 23% превышение человеческого γ -глобина относительно человеческого β -глобина наблюдали после трансдукции sgHBG № 2, что демонстрирует значительную степень переключения (Фиг. 133Е и 133Н). При МЗ 1000 частота преобразования оснований для четырех оГРНК находилась в диапазоне 25-51% (Фиг. 133D и Фиг. 134А). Для sgHBG № 2 было выявлено 40% и 34% преобразования А > G в позициях 5 и 8, соответственно (Фиг. 133D). Преобразование с А₈ на G стимулировало мутацию НПФГ -113А > G (таблица 14) (Martyn et al., Blood 133(8):852-856, 2019). Не было обнаружено значительной разницы в редактировании между HBG1 и HBG2. В полученных из одиночных клеток клонах моноаллельное редактирование в сайтах А₅ и А₈ обеспечивало 100% HbF-положительных клеток (Фиг. 133F и 133G), подтверждая критическую роль этих сайтов в регуляции супрессии HbF. Аналогичные результаты были продемонстрированы в клонах, полученных из sgHBG № 1 и sgHBG № 4. В клонах, трансдуцированных sgBCL № 1, биаллельная мутация G > A в мотиве GATAA энхансера BCL11A приводила к 15% HbF-экспрессирующих клеток (Фиг. 134В и 134С). Вместе эти данные демонстрируют, что векторы HDAd-BE, специфические в отношении критически важных сайтов в энхансере BCL11A или промоторе HBG1/2, могут эффективно повторно активировать экспрессию HbF.

[1103] **Повторная активация γ -глобина у мышей β -YAC после *in vivo* трансдукции редакторами оснований.** Был создан упрощенный подход генной терапии путем *in vivo* трансдукции ГСК векторами HDAd5/35++ (Richter et al., Blood 128: 2206-2217, 2016). Поэтому исследовали эффективность редактирования оснований с этой новой *in vivo* стратегией. Использовали мышей β -YAC, которые содержат 248 т. о. человеческой ДНК, включая полный 82 т. о. локус β -глобина (Peterson et al., PNAS USA 90: 7593-7597, 1993). Этим мышам скрещивали с трансгенными в отношении человеческого CD46 мышами, чтобы сделать возможной трансдукцию векторами HDAd5/35++. HDAd-ABE-sgHBG № 2 был выбран из-за его наибольшей эффективности индукции экспрессии γ -глобина в клетках HUDEP-2. После иммунизации G-CSF/плериксафором мышам β -YAC/CD46 внутривенно вводили векторы HDAd-ABE-sgHBG № 2 и HDAd-SB. Через четыре недели после трансдукции мышам подвергали четырем раундам обработки O⁶BG/BCNU (O⁶-бензилгуанин/кармустин) для избирательного размножения

предшественников интегрированными трансгенами MGMT-GFP (Фиг. 135A). После отбора присутствие GFP в МКПК достигало 60% (Фиг. 135B и 135C). Следует отметить, что экспрессия γ -глобина в периферической крови возросла от 1% до трансдукции до в среднем 43% (n=9) на 16 неделе после трансдукции, демонстрируя значительную повторную активацию γ -глобина (Фиг. 135D и 135E). Большая вариация, существующая среди разных мышей, возможно была вызвана бицистронным дизайном MGMT-2A-GFP, что могло приводить к более низкой экспрессии MGMT и, следовательно, влиять на эффективность *in vivo* отбора. γ -глобин⁺ клетки по большей части находились во фракции красных клеток крови (RBC) (Ter-119⁺) в образцах как крови, так и костного мозга (Фиг. 135F). В лизате RBC на 16 неделе было обнаружено 21% превышение γ -глобина над белком человеческого β -глобина по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Фиг. 135G и Фиг. 136). Экспрессия мРНК γ -глобина согласовалась с данными ВЭЖХ (Фиг. 135H). В общих мононуклеарных клетках костного мозга на 16 неделе число копий интегрированного вектора составляло до 2,5 копии/клетка (в среднем 1,4) (Фиг. 135I).

[1104] Анализировали редактирование оснований в промоторе HBG1/2. Частота преобразования A > G в сайтах A₅ и A₈ в HBG1 и HBG2 в среднем составляла 15-30% (Фиг. 137A-137C). Было обнаружено, что частота редактирования оснований сильно коррелирует с уровнем экспрессии γ -глобина (критерий Пирсона, R=0,92, p < 0,001) (Фиг. 137D). У мыши с наибольшей экспрессией γ -глобина было достигнуто 82% преобразования оснований-мишеней (Фиг. 137B). Следует отметить наблюдавшуюся тенденцию, что % преобразования в сайте A₅ был немного выше, чем в A₈, в обеих областях HBG1 и HBG2, хотя статистически значимая разница отсутствовала (Фиг. 137B). Было показано, что некоторые редакторы оснований демонстрируют процессивное редактирование, когда в протоспейсере присутствует несколько мишеней. Однако в сайте A₉ не было обнаружено редактирования (Фиг. 137A и 137C). Вероятно, это было связано с тем, что позиция 9 расположена за пределами оптимального окна редактирования, демонстрируя узкость редактируемого окна.

[1105] В целом, эти данные демонстрируют, что *in vivo* трансдукция редакторами оснований, специфическими к промотору HBG1/2, с последующим отбором приводит к эффективному преобразованию оснований-мишеней и повторной активации γ -глобина у мышей β -YAC/CD46.

[1106] **Хороший профиль безопасности и стабильная эффективность после *in vivo* редактирования оснований ГСК.** На 16 неделе животных умерщвляли и проводили многочисленные гематологические и гистологические анализы с образцами тканей.

Гематологические параметры, включая белые клетки крови (К/мкл), красные клетки крови (М/мкл), Hb (г/дл), MCV (фл), MCHC (г/дл), RDW (%) и тромбоциты (К/мкл), были сходными с результатами наивных мышей β -YAC/CD46 (Фиг. 138А и 138В). Процентное содержание ретикулоцитов в периферической крови, измеренное по окрашиванию бриллианткрезил синим, было сравнимым с мышами без обработки (Фиг. 138D). В срезах селезенки и печени не наблюдали очагов экстрамедуллярного эритропоэза. Клеточная композиция в МКПК, мононуклеарных клетках селезенки и костного мозга не отличалась от контрольных мышей (Фиг. 138С). Помимо этого, по сравнению с ранее описанными векторами для генной терапии (Li et al., *Blood* 131: 2915-2928, 2018; Wang et al., *J Clin Invest.* 129(2): 598-615, 2018; Li et al., *Molecular Therapy* 27: 2195-2212, 2019) HDAd-ABE-sgHBG № 2 не вызывал очевидных изменений массы тела, поведения и внешнего вида после *in vivo* трансдукции/отбора.

[1107] Чтобы продемонстрировать, что *in vivo* трансдукция происходила в ГСКП с долгосрочной репопуляцией, отрицательные по линии дифференцировки костного мозга клетки (Lin⁻), собранные на 16 неделе, трансплантировали после трансдукции мышам C57BL/6J после летальной дозы облучения (без человеческого гена CD46). Способность трансплантированных клеток обуславливать мультилинейное восстановление у вторичных реципиентов оценивали в течение периода 16 недель. Уровни приживления на основании экспрессии huCD46 в МКПК составляли более 95% и оставались стабильными (Фиг. 139А). Присутствие GFP в МКПК было сравнимым с первичными мышами (Фиг. 139В). Процент γ -глобин⁺ RBC в среднем составлял 40% и был стабильным (Фиг. 139С).

[1108] Вместе эти наблюдения демонстрируют, что *in vivo* редактирование оснований ГСК было в целом безопасным. Модифицированные ГСКП персистировали в течение длительного времени и были способны восстанавливать вторичных реципиентных мышей со стабильной экспрессией трансгена.

[1109] **Минимальное межгенное удаление и отсутствие выявляемого редактирования в наиболее вероятных нецелевых сайтах.** Обратной стороной ДЦР-зависимых стратегий редактирования генов является потенциальное геномное удаление крупного фрагмента (Kosicki et al., *Nature Biotechnology* 36: 765, 2018). В случае нацеливания на промоторы HBG1/2 ДЦР-генерирующими нуклеазами этот эффект может стать более значимым вследствие высокой степени сходства между областями HBG1 и HBG2. Гидовые последовательности, специфические в отношении одной из двух областей, также могут нацеливаться на другую. Сообщалось, что нацеливание на сайты связывания BCL11A в промоторах HBG1/2 с помощью CRISPR/Cas9 приводит к 4,9 т. о. межгенному удалению (Traxler et al., *Nature Medicine* 22: 987-990, 2016; Li et al., *Blood*

131: 2915-2928, 2018). В результате происходит удаление полного генома HBG2. Поэтому исследовали геномное удаление методом полуколичественной ПЦР (Li et al., Blood 131: 2915-2928, 2018). Пару праймеров, фланкирующих два сайта нацеливания, использовали для амплификации 9,9 т. о. геномного сегмента. Наличие 4,9 т. о. удаления создавало бы сильно укороченный 5,0 т. о. ПЦР-ампликон. Процентное содержание удаления положительно коррелировало с отношением 5,0 т. о. к 9,9 т. о. ампликонов по созданной стандартной кривой (смотрите Фиг. 7С в Li et al., Blood 131: 2915-2928, 2018). Было обнаружено, что среднее 4,9 т. о. удаление у мышей, обработанных редактором оснований, составляло менее 1% (Фиг. 140). У некоторых мышей оно было практически невыявляемым. Это значительно меньше, чем в результате трансдукции вектором HDAd-HBG-CRISPR (Li et al., Blood 131: 2915-2928, 2018).

[1110] После этого проводили анализ, чтобы изучить точность системы. In silico анализ не показал потенциальных целевых сайтов с несовпадениями ≤ 2 пар оснований (п. о.) с гидовой последовательностью как в человеческом, так и в мышинном геноме. У человека и мышей было 10 и 2 потенциальных не-мишеней с несовпадениями 3 п. о., соответственно. Было предположено, что вероятность нецелевого редактирования в этих предсказанных мишенях была низкой, потому что все сайты имеют по меньшей мере 1 несовпадение в РАМ-проксимальной половине протоспейсера. Было обнаружено 79 и 74 потенциальных мишеней с 4 п. о. несовпадениями у человека и мышей, соответственно. Поскольку исследование проводили на мышах, амплифицировали 10 первых геномных сайтов (два с 3 п. о. несовпадениями; семь с 4 п. о. несовпадениями) от мышей с наибольшей целевой вставкой оснований, используя секвенирование по Сэнгеру. Ни один из этих сайтов не демонстрировал выявляемое редактирование.

[1111] Вместе эти данные обеспечивают доказательство минимального межгенного удаления и высокой точности in vivo системы редактирования оснований.

[1112] **Пример 11. Дополнительное описание касательно вариантов осуществления редакторов оснований**

[1113] На Фиг. 141 представлен профиль безопасности редактора оснований, включая гематологический анализ (Фиг. 141А) и клеточное сравнение в МНК костного мозга (Фиг. 141В). Иллюстрация ожидаемого редактирования в результате активности редактора оснований BE4-sgBCL11AE1 приведена на Фиг. 142. На Фиг. 143 показано оптимальное расположение последовательности протоспейсера для максимизации эффективности редактирования оснований при осуществлении трансформаций оснований с С на Т (верхнее изображение) или с G на А (нижнее изображение). На Фиг. 144 проиллюстрирован вектор для редактирования С на Т, когда мишень С находится в

позициях от 4 до 8 в пределах протоспейсера. На Фиг. 145 приведена диаграмма вирусной гДНК (HBG2-miR, редактор аденина), которая представляет одну непрерывную конструкцию, но была разделена на секции исключительно для удобства представления. На Фиг. 146 приведены последовательности TadA и TadA*. Секвенирование по Сэнгеру проводили для подтверждения редактирования оснований последовательностей (Фиг. 147). На Фиг. 148 показано редактирование оснований вирусом HDAd5/35++_BE4-sgBCL11Ae1-FI-mgmtGFP (041318-1), а на Фиг. 149 приведено процентное содержание γ -глобин+ клеток при указанной МЗ. На Фиг. 150 приведены редакторы цитидиновых оснований и редакторы адениновых оснований для повторной активации HbF посредством редактирования оснований. На Фиг. 151 приведены типовые редакторы оснований и процент HbF+ клеток при разных МЗ редакторов оснований. На Фиг. 152 приведен % HbF+ из второго исследования в клетках HUDEP-2. На Фиг. 153 приведены результаты для клонов, полученных из одиночных клеток. На Фиг. 154A-154S приведены данные, представляющие полученные из одиночных клеток клоны. Редакторы оснований также исследовали в клетках 293FT (Фиг. 155). На Фиг. 156A-156D приведены результаты секвенирования по Сэнгеру. Редакторы оснований также исследовали в клетках HUDEP-2 (Фиг. 157). Экспрессия γ -глобина проиллюстрирована на Фиг. 158. На Фиг. 159A-159D приведены результаты секвенирования по Сэнгеру в случае их доступности. Конструкции отбирали для Махи-получения, как показано на Фиг. 160.

[1114] Приживление huCD45+ клеток, отредактированных, например, редактором оснований HDAd-AAVS1-CRISPR или HDAd-глобин-BE4, проиллюстрировано на Фиг. 161.

[1115] Временная трансфекция клеток HUDEP-2 (с расщеплением T7E1) проиллюстрирована на Фиг. 162.

[1116] Неограничивающие примеры конструкций для редактирования оснований для HbF могли включать (1) pHCA-ABEmax-sgHBG2-miR-FI-mgmtGFP; (2) pHCA-ABEmax-sgHBG4-miR-FI-mgmtGFP; или (3) pHCA-ABEmax-Dual-Skip-miR-FI-mgmtGFP.

[1117] По меньшей мере одно применение редакторов оснований включает двойные векторы для редактирования оснований и проиллюстрировано на Фиг. 163.

[1118] В полученных из одиночных клеток кломах моноаллельное или биаллельное преобразование оснований-мишеней обеспечивало 100% HbF-положительных клеток. Наблюдали 60% мутации НПФН с -113 А на G в промоторе HBG1/2 смешанных клеток HUDEP-2 с использованием вектора ABE HDAd-ABE-HBG № 2 (смотрите Фиг. 135). Этот вектор был выбран для некоторых будущих исследований на животных. Исследования на животных проводили на мышах, которые несут 248 т. о. локуса человеческого β -глобина

(мышь β -YAC) и, следовательно, точно отражают переключение глобина (смотрите, например, Фиг. 137). В вектор была включена экспрессионная кассета EF1 α -mgmt^{P140K}, фланкируемая FRT и сайтами транспозона, чтобы сделать возможным *in vivo* отбор трансдуцированных клеток (смотрите, например, Фиг. 136). После *in vivo* трансдукции HDAd-ABE-HBG №2+HDAd-SB и отбора с низкими дозами O^bBG/BCNU было обнаружено в среднем 35% HbF-положительных клеток в периферических красных клетках крови (Фиг. 138). У одной из восьми мышей были достигнуты практически полное преобразование с -113 А на G и 90% HbF-положительных клеток. Не было обнаружено изменений в числе клеток крови (Фиг. 141). Клеточная композиция образцов костного мозга была сравнимой с таковой у нетрансдуцированных мышей, демонстрируя хороший профиль безопасности (Фиг. 141). Отрицательные по линии дифференцировки костного мозга клетки выделяли от первичных мышей на 14 неделе после трансдукции и инфузирвали мышам C57BL/6J после летальной дозы облучения. Процентное содержание HbF-положительных клеток сохранялось у вторичных реципиентов в течение 16 недель, что указывает на то, что редактирование генома происходило в мышечных ГСК с долгосрочной репопуляцией. Эти наблюдения демонстрирует, что редакторы оснований, доставляемые векторами HDAd5/35++ *in vivo*, являются стратегией для точного конструирования генома, например, для лечения гемоглобинопатий.

VII. Заключительные параграфы

[1119] Также включены варианты последовательностей, описанных и упоминаемых в данном документе. Руководство по определению того, какие аминокислотные остатки можно заменять, вставлять или удалять, не нарушая биологическую активность, можно найти, используя компьютерные программы, хорошо известные в данной области техники, такие как программное обеспечение DNASTAR™ (Madison, Wisconsin). Предпочтительно аминокислотные замены в описанных в данном документе белковых вариантах являются консервативными аминокислотными заменами, т. е. заменами одинаково заряженных или незаряженных аминокислот. Консервативное аминокислотное изменение включает замену одной из семейства аминокислот, которые являются родственными по своим боковым цепям.

[1120] В пептиде или белке подходящие консервативные замены аминокислот известны специалистам в данной области техники и в общем случае могут быть проведены без изменения биологической активности получаемой в результате молекулы. Специалистам в данной области техники известно, что в общем случае одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида по существу не изменяют биологическую активность (смотрите, например, Watson et al., Molecular

Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224). Встречающиеся в природе аминокислоты в общем случае разделены на семейства консервативных замен следующим образом: группа 1: аланин (Ala), глицин (Gly), серин (Ser) и треонин (Thr); группа 2: (кислотные): аспарагиновая кислота (Asp) и глутаминовая кислота (Glu); группа 3: (кислотные; также классифицируемые как полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды): аспарагин (Asn), глутамин (Gln), Asp и Glu; группа 4: Gln и Asn; группа 5: (основные; также классифицируемые как полярные, положительно заряженные остатки): аргинин (Arg), лизин (Lys) и гистидин (His); группа 6 (крупные алифатические неполярные остатки): изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), валин (Val) и цистеин (Cys); группа 7 (незаряженные полярные): тирозин (Tyr), Gly, Asn, Gln, Cys, Ser и Thr; группа 8 (крупные ароматические остатки): фенилаланин (Phe), триптофан (Trp) и Tyr; группа 9 (неполярные): пролин (Pro), Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Met и Trp; группа 11 (алифатические): Gly, Ala, Val, Leu и Ile; группа 10 (небольшие алифатические, неполярные или слабополярные остатки): Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; и группа 12 (серосодержащие): Met и Cys. Дополнительную информацию можно найти в Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company.

[1121] При проведении таких изменений можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Важность индекса гидропатичности аминокислот в придании интерактивной биологической функции белку в целом известна в данной области техники (Kyte & Doolittle, J. Mol. Biol. 157(1), 105-32, 1982). Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основании ее гидрофобности и зарядовых характеристик (Kyte and Doolittle, 1982). Эти значения составляют: Ile (+4,5); Val (+4,2); Leu (+3,8); Phe (+2,8); Cys (+2,5); Met (+1,9); Ala (+1,8); Gly (-0,4); Thr (-0,7); Ser (-0,8); Trp (-0,9); Tyr (-1,3); Pro (-1,6); His (-3,2); глутамат (-3,5); Gln (-3,5); аспаргат (-3,5); Asn (-3,5); Lys (-3,9); и Arg (-4,5).

[1122] В данной области техники известно, что некоторые аминокислоты можно замещать другими аминокислотами, имеющими сходный индекс или показатель гидропатичности, и при этом получать белок со сходной биологической активностью, т. е. получать биологически функционально эквивалентный белок. При проведении таких изменений предпочтительной является замена аминокислот, чьи индексы гидропатичности находятся в пределах ± 2 , особенно предпочтительно в пределах ± 1 и даже более предпочтительно в пределах $\pm 0,5$. Также в данной области техники известно, что замену подобных аминокислот можно эффективно проводить на основании гидрофильности.

[1123] Как подробно описано в патенте США № 4554101, аминокислотным

остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: Arg (+3,0); Lys (+3,0); аспаргат (+3,0±1); глутамат (+3,0±1); Ser (+0,3); Asn (+0,2); Gln (+0,2); Gly (0); Thr (-0,4); Pro (-0,5±1); Ala (-0,5); His (-0,5); Cys (-1,0); Met (-1,3); Val (-1,5); Leu (-1,8); Ile (-1,8); Tyr (-2,3); Phe (-2,5); Trp (-3,4). Понятно, что аминокислоту можно заменить другой, имеющей сходное значение гидрофильности, и при этом получить биологически эквивалентный и, в частности, иммунологически эквивалентный белок. При таких изменениях предпочтительной является замена аминокислот, чьи значения гидрофильности находятся в пределах ± 2 , особенно предпочтительно в пределах ± 1 и даже более предпочтительно в пределах $\pm 0,5$.

[1124] Как указано выше, аминокислотные замены могут быть основаны на относительном сходстве заместителей боковых цепей аминокислот, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т. п.

[1125] Как указано в другом месте, варианты генных последовательностей могут включать кодон-оптимизированные варианты, полиморфизмы последовательностей, сплайс-варианты и/или мутации, которые не влияют на функцию кодируемого продукта в статистически значимой степени.

[1126] Варианты последовательностей белков, нуклеиновых кислот и генов, описанных в данном документе, также включают последовательности с по меньшей мере 70% идентичности последовательности, 80% идентичности последовательности, 85% идентичности последовательности, 90% идентичности последовательности, 95% идентичности последовательности, 96% идентичности последовательности, 97% идентичности последовательности, 98% идентичности последовательности или 99% идентичности последовательности с последовательностями белков, нуклеиновых кислот или генов, описанными в данном документе.

[1127] «% идентичности последовательности» относится к взаимосвязи между двумя или более последовательностями, определяемой по сравнению последовательностей. В данной области техники «идентичность» также означает степень родства последовательности между последовательностями белков, нуклеиновых кислот или генов, определяемую по совпадению между участками таких последовательностей. «Идентичность» (часто называемую «сходством») можно легко определить известными методами, включая описанные в: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1994); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (Von Heijne, G., ed.) Academic Press (1987); и Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and

Devereux, J., eds.) Oxford University Press, NY (1992). Предпочтительные методы определения идентичности разработаны для обеспечения наилучшего соответствия между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности и сходства запрограммированы в общественно доступных компьютерных программах. Выравнивание последовательностей и расчеты процента идентичности можно проводить, используя программу Megalign из пакета для биоинформационных вычислений LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin). Множественное выравнивание последовательностей также можно проводить, используя метод выравнивания Clustal (Higgins and Sharp CABIOS, 5, 151-153 (1989) с параметрами по умолчанию (ШТРАФ ЗА ГЭП=10, ШТРАФ ЗА ДЛИНУ ГЭПА=10). Релевантные программы также включают пакет программ GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin); BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin); и программу FASTA, в основе которой лежит алгоритм Смита - Уотермана (Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Publisher: Plenum, New York, N.Y.). В контексте этого изобретения следует понимать, что в случае применения программного обеспечения для анализа последовательностей результаты анализа основаны на «значениях по умолчанию» указанных программ. В контексте данного документа «значения по умолчанию» означают любой набор значений или параметров, который изначально загружается с программным обеспечением при первой инициации.

[1128] Варианты также включают молекулы нуклеиновых кислот, которые гибридизируются в жестких условиях гибридизации с описанной в данном документе последовательностью и обеспечивают такую же функцию, что и эталонная последовательность. Типовые жесткие условия гибридизации включают инкубацию в течение ночи при 42 °C в растворе, содержащем 50% формамид, 5XSSC (750 mM NaCl, 75 mM тринатриевый цитрат), 50 mM фосфат натрия (pH 7,6), 5X раствор Денхардта, 10% сульфат декстрана и 20 мкг/мл денатурированной, фрагментированной ДНК из молок лососевых, с последующей промывкой фильтров в 0,1XSSC при 50 °C. Изменения жесткости гибридизации и регистрацию сигнала выполняют главным образом путем изменения концентрации формамида (более низкое процентное содержание формамида приводит к более низкой жесткости); содержания солей или температуры. Например, условия умеренно высокой жесткости включают инкубацию в течение ночи при 37 °C в растворе, содержащем 6XSSPE (20XSSPE=3 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,02 M ЭДТА, pH 7,4), 0,5% ДСН, 30% формамид, 100 мкг/мл блокирующей ДНК из молок лососевых; с последующей промывкой при 50 °C с помощью 1XSSPE, 0,1% ДСН. Кроме того, для

достижения еще более низкой жесткости промывку, проводимую после жесткой гибридизации, можно осуществлять при более высоких концентрациях соли (например, 5XSSC). Вариации в вышеуказанных условиях можно осуществлять путем включения и/или замены чередующихся блокирующих реагентов, используемых для подавления фона в экспериментах по гибридизации. Типичные блокирующие реагенты включают реагент Денхардта, BLOTTO, гепарин, денатурированную ДНК из молок лососевых и коммерчески доступные соответствующие составы. Для включения конкретных блокирующих реагентов могут потребоваться модификации условий гибридизации, описанных выше, вследствие проблем с совместимостью.

[1129] Термин «специфически связывается» относится к ассоциации связывающего домена (например, связывающего домена CAR или наночастицы нацеленного на выбранную клетку лиганда) со своей когнатной связывающей молекулой с аффинностью или K_a (т. е. равновесной константой ассоциации конкретного взаимодействия связывания в единицах $1/M$), равной или большей $10^5 M^{-1}$, при этом без существенной ассоциации с любыми другими молекулами или компонентами в релевантном образце среды. В данном документе термин «специфически связывается» также употребляется как «связывается». Связывающие домены можно классифицировать как «высокоаффинные» или «низкоаффинные». В конкретных вариантах осуществления термин «высокоаффинные» связывающие домены относится к связывающим доменам с K_a по меньшей мере $10^7 M^{-1}$, по меньшей мере $10^8 M^{-1}$, по меньшей мере $10^9 M^{-1}$, по меньшей мере $10^{10} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{11} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{12} M^{-1}$ или по меньшей мере $10^{13} M^{-1}$. В конкретных вариантах осуществления термин «низкоаффинные» связывающие домены относится к связывающим доменам с K_a до $10^7 M^{-1}$, до $10^6 M^{-1}$, до $10^5 M^{-1}$. В альтернативном варианте аффинность можно определить как равновесную константу диссоциации (K_d) конкретного взаимодействия связывания в единицах M (например, от $10^{-5} M$ до $10^{-13} M$). В определенных вариантах осуществления связывающий домен может иметь «повышенную аффинность», что относится к выбранным или сконструированным связывающим доменам с более сильным связыванием с когнатной связывающей молекулой по сравнению со связывающим доменом дикого типа (или родительским). Например, повышенная аффинность может быть обусловлена тем, что K_a (равновесная константа ассоциации) в отношении когнатной связывающей молекулы выше, чем у эталонного связывающего домена, или тем, что K_d (константа диссоциации) в отношении когнатной связывающей молекулы ниже, чем у эталонного связывающего домена, или тем, что скорость диссоциации (K_{off}) в отношении когнатной связывающей молекулы ниже, чем у эталонного связывающего домена. Известен ряд анализов для выявления связывающих

доменов, которые специфически связываются с конкретной когнатной связывающей молекулой, а также для определения аффинности связывания, таких как анализы вестерн-блоттинг, ELISA и BIACORE® (также смотрите, например, Scatchard, et al., 1949, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; и US 5283173, US 5468614 или эквивалентные работы).

[1130] Если не указано иное, при практической реализации настоящего изобретения можно применять традиционные методики иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и рекомбинантных ДНК. Эти методики описаны в следующих публикациях. Смотрите, например, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition (1989); F. M. Ausubel, et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, (1987); серию *Methods IN Enzymology* (Academic Press, Inc.); M. MacPherson, et al., *PCR: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press (1991); MacPherson et al., eds. *PCR 2: Practical Approach*, (1995); Harlow and Lane, eds. *Antibodies, A Laboratory Manual*, (1988); и R. I. Freshney, ed. *Animal Cell Culture* (1987).

[1131] Как понятно специалисту в данной области техники, каждый описанный в данном документе вариант осуществления может включать, состоять преимущественно из или состоять из конкретного указанного элемента, этапа, ингредиента или компонента. Таким образом, термины «включать» или «включающий» следует интерпретировать как означающие «содержать, состоять из или состоять преимущественно из». Переходный термин «содержать» или «содержит» означает «включает», но не ограничивается этим, и допускает включение неуказанных элементов, этапов, ингредиентов или компонентов даже в значительных количествах. Переходное выражение «состоящий из» исключает любой не указанный элемент, этап, ингредиент или компонент. Переходное выражение «состоящий преимущественно из» ограничивает объем варианта осуществления указанными элементами, этапами, ингредиентами или компонентами и теми, которые не оказывают существенное влияние на вариант осуществления. Существенное влияние приводило бы к статистической значимому снижению способности получать заявленный эффект в соответствии с релевантным экспериментальным способом, описанным в настоящем изобретении.

[1132] Если не указано иное, все числа, выражающие количества компонентов, свойства, такие как молекулярная масса, реакционные условия, и т. п., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицируемые во всех случаях с термином «около». Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными и могут варьироваться в зависимости от необходимых свойств, которые стремятся получить с помощью настоящего изобретения. Как минимум, что не

стоит трактовать как попытку ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр необходимо, по меньшей мере, толковать с учетом числа приведенных значимых цифр и путем применения обычных методов округления. Когда необходимо дополнительно внести ясность, термины «около» и «приблизительно» используются в данном документе взаимозаменяемо и имеют значение, в целом приписываемое им специалистом в данной области техники при использовании в сочетании с указанным числовым значением или диапазоном, т. е. означающее несколько больше или несколько меньше, чем указанные значение или диапазон, в пределах диапазона $\pm 20\%$ от указанного значения; $\pm 19\%$ от указанного значения; $\pm 18\%$ от указанного значения; $\pm 17\%$ от указанного значения; $\pm 16\%$ от указанного значения; $\pm 15\%$ от указанного значения; $\pm 14\%$ от указанного значения; $\pm 13\%$ от указанного значения; $\pm 12\%$ от указанного значения; $\pm 11\%$ от указанного значения; $\pm 10\%$ от указанного значения; $\pm 9\%$ от указанного значения; $\pm 8\%$ от указанного значения; $\pm 7\%$ от указанного значения; $\pm 6\%$ от указанного значения; $\pm 5\%$ от указанного значения; $\pm 4\%$ от указанного значения; $\pm 3\%$ от указанного значения; $\pm 2\%$ от указанного значения; или $\pm 1\%$ от указанного значения.

[1133] Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, приведенные в полном объеме данного изобретение, являются приблизительными, приведенные в конкретных примерах числовые значения указаны настолько точно, насколько это возможно. При этом любое числовое значение по своей сути содержит определенные погрешности, неизбежно возникающие в результате стандартного отклонения, присущего соответствующим экспериментальным измерениям.

[1134] Подразумевается, что в данном документе перечисление диапазонов значений служит исключительно сокращенным способом индивидуального указания каждого конкретного значения, попадающего в диапазон. Если в данном документе не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в описание так, как если бы оно было индивидуально указано в данном документе. Все способы, описанные в данном документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Использование любого и всех примеров или вводных фраз (например, «такой как»), приведенных в данном документе, предназначено исключительно для лучшей иллюстрации изобретения и не ограничивает объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одну фразу в описании не следует толковать как указывающую на какой-либо не заявленный элемент, существенный для практической реализации изобретения.

[1135] Группы альтернативных элементов или вариантов осуществления

изобретения, описанные в данном документе, не следует толковать как ограничения. Каждый член группы может быть указан или заявлен индивидуально или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами данного документа. Предусмотрено, что один или более членов группы могут быть включены в группу или удалены из нее по причинам удобства и/или патентоспособности. В случае такого включения или удаления подразумевается, что описание содержит модифицированную группу, таким образом, удовлетворяя письменному описанию всех групп Маркуша, используемых в прилагаемой формуле изобретения.

[1136] В данном документе описаны варианты осуществления изобретения, включающие наилучший способ осуществления изобретения, известный авторам изобретения. Естественно, после прочтения предыдущего описания для специалистов в данной области техники станут очевидны вариации этих описанных вариантов осуществления. Автор изобретения ожидает, что специалисты в данной области техники будут при необходимости использовать такие вариации, а также авторы изобретения предполагают, что данное изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, это изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета изобретения, изложенного в прилагаемой формуле изобретения, насколько это допустимо применимыми правовыми нормами. Более того, изобретение охватывает любую комбинацию описанных выше элементов во всех возможных вариациях, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

[1137] Кроме того, в данном описании приведены многочисленные ссылки на патенты, печатные публикации, журнальные статьи и другие письменные материалы (ссылочные материалы в данном документе). Каждый из ссылочных материалов индивидуально в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки в отношении своих ссылочных сведений. Если ссылочные материалы подлежат корректировке со временем (например, значения в базах данных последовательностей и т. п.), содержание такой ссылки включено в том виде, в котором она существовала на момент включения ссылки при подаче и притязании на приоритет этой заявки.

[1138] В заключение, следует понимать, что описанные в данном документе варианты осуществления изобретения являются иллюстративными для принципов настоящего изобретения. Другие применимые модификации входят в объем изобретения. Таким образом, в качестве примера, но не ограничения, в соответствии с представленными в данном документе сведениями можно использовать альтернативные конфигурации настоящего изобретения. Соответственно, настоящее изобретение не

ограничено исключительно проиллюстрированным и описанным.

[1139] Конкретные детали, показанные в данном документе, приведены исключительно в качестве примера и в целях иллюстративного обсуждения предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения и представлены, чтобы предоставить то, что считается наиболее применимым и хорошо понятным описанием принципов и концептуальных аспектов различных вариантов осуществления изобретения. В связи с этим не предпринято попыток показать структурные детали изобретения более подробно, чем это необходимо для фундаментального понимания изобретения, при этом описание в сочетании с графическими материалами и/или примерами делает очевидным для специалистов в данной области техники, как именно можно реализовать на практике некоторые формы изобретения.

[1140] Определения и пояснения, используемые в настоящем изобретении, рассматриваются и предполагаются как преимущественные в любой будущей конструкции, если это четко и однозначно не модифицировано в примерах, или когда применение значения делает любую конструкцию бессмысленной или по существу бессмысленной. В случаях, когда конструкция термина делает его бессмысленным или по существу бессмысленным, определение следует брать из словаря Уэбстера, 3-е издание, или словаря, известного специалистам в данной области техники, такого как Оксфордский словарь биохимии и молекулярной биологии (Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Eds. Attwood T et al., Oxford University Press, Oxford, 2006).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система получения рекомбинантного аденовирусного вектора серотипа 35 (Ad35), содержащая:

рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий:

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и

прямые повторы (ПП) рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, и

рекомбинантный хелпер-зависимый донорный геном Ad35, содержащий:

5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35;

3' ИКП Ad35;

последовательность упаковки Ad35; и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

2. Рекомбинантный аденовирусный хелперный вектор серотипа 35 (Ad35), содержащий:

стержень фибера Ad35;

головку фибера Ad35; и

геном Ad35, содержащий прямые повторы (ПП) рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35.

3. Рекомбинантный аденовирусный хелперный геном серотипа 35 (Ad35), содержащий:

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и

прямые повторы (ПП) рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35.

4. Рекомбинантный хелпер-зависимый аденовирусный донорный вектор серотипа 35 (Ad35), содержащий:

последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую

5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35;

3' ИКП Ad35;

последовательность упаковки Ad35; и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт,

причем геном не содержит последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую вирусный структурный белок Ad35; и

стержень фибера Ad35 и/или головку фибера Ad35.

5. Рекомбинантный хелпер-зависимый аденовирусный донорный геном серотипа 35 (Ad35), содержащий:

5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35;

3' ИКП Ad35;

последовательность упаковки Ad35; и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт,

причем донорный геном Ad35 не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экспрессионный продукт, кодируемый геномом Ad35 дикого типа.

6. Способ получения рекомбинантного хелпер-зависимого аденовирусного донорного вектора серотипа 35 (Ad35), включающий выделение рекомбинантного хелпер-зависимого донорного вектора Ad35 из культуры клеток, причем культура клеток содержит:

рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий:

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и

прямые повторы (ПП) рекомбиназы, фланкирующие по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, и

рекомбинантный хелпер-зависимый донорный геном Ad35, содержащий:

5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35;

3' ИКП Ad35;

последовательность упаковки Ad35; и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

7. Система получения рекомбинантного аденовируса серотипа 35 (Ad35), содержащая:

рекомбинантный хелперный геном Ad35, содержащий:

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и

прямые повторы (ПП) рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35, и

рекомбинантный донорный геном Ad35, содержащий:

5' ИКП Ad35;

3' ИКП Ad35;

последовательность упаковки Ad35; и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

8. Рекомбинантный аденовирусный хелперный вектор серотипа 35 (Ad35), содержащий:

стержень фибера Ad35;

головку фибера Ad35; и

геном Ad35, содержащий прямые повторы (ПП) рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35.

9. Рекомбинантный аденовирусный хелперный генотип 35 (Ad35), содержащий:

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и

прямые повторы (ПП) рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35.

10. Способ получения рекомбинантного хелпер-зависимого аденовирусного донорного вектора серотипа 35 (Ad35), включающий выделение рекомбинантного хелпер-зависимого донорного вектора Ad35 из культуры клеток, причем культура клеток содержит:

рекомбинантный хелперный генотип Ad35, содержащий:

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую стержень фибера Ad35;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую головку фибера Ad35; и

прямые повторы (ПП) рекомбиназы в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35, которые функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' инвертированный концевой повтор (ИКП) Ad35, и

рекомбинантный донорный генотип Ad35, содержащий:

5' ИКП Ad35;

3' ИКП Ad35;

последовательность упаковки Ad35; и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный экспрессионный продукт.

11. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном, донорный вектор или способ по любому из пп. 1-4 или 6-10, где:

головка фибера Ad35 представляет собой головку фибера Ad35 дикого типа или головка фибера Ad35 представляет собой сконструированную головку фибера Ad35, причем сконструированная головка фибера содержит мутацию, которая повышает аффинность головки фибера к CD46.

12. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном, донорный вектор или способ по п. 11, где мутация:

включает мутацию, выбранную из Ile192Val, Asp207Gly (или Glu207Gly), Asn217Asp, Thr226Ala, Thr245Ala, Thr254Pro, Ile256Leu, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His; или

включает каждую из мутаций Ile192Val, Asp207Gly (или Glu207Gly), Asn217Asp, Thr226Ala, Thr245Ala, Thr254Pro, Ile256Leu, Ile256Val, Arg259Cys и Arg279His.

13. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по любому из пп. 1, 4-7 или 10, где гетерологичный экспрессионный продукт содержит терапевтический экспрессионный продукт, функционально связанный с регуляторной последовательностью, причем необязательно терапевтический экспрессионный продукт включает:

(a) белок β -глобина или белок γ -глобина;

(b) антитело или его иммуноглобулиновую цепь, причем необязательно антитело представляет собой антитело к CD33;

(c) первое антитело или его иммуноглобулиновую цепь и второе антитело или его иммуноглобулиновую цепь, причем необязательно антитело представляет собой антитело к CD33;

(d) CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу и/или гидовую РНК (гРНК), причем необязательно CRISPR-ассоциированная РНК-направляемая эндонуклеаза включает Cas9 или *cpf1*;

(e) редактор оснований и/или гРНК, необязательно при этом редактор оснований представляет собой редактор цитозиновых оснований (CBE) или редактор адениновых оснований (ABE), причем необязательно редактор оснований включает каталитически нефункциональную нуклеазу, выбранную из нефункциональной Cas9 и нефункциональной *cpf1*;

(f) фактор коагуляции или белок, который блокирует или уменьшает вирусную инфекцию, причем необязательно терапевтический экспрессионный продукт включает белок-заместитель фактора VII или белок-заместитель фактора VIII;

(g) ингибитор контрольных точек;

(h) химерный антигенный рецептор или сконструированный Т-клеточный рецептор; или

(i) белок, выбранный из группы, состоящей из γ C, JAK3, IL7RA, RAG1, RAG2, DCLRE1C, PRKDC, LIG4, NHEJ1, CD3D, CD3E, CD3Z, CD3G, PTPRC, ZAP70, LCK, AK2, ADA, PNP, WHN, CHD7, ORAI1, STIM1, CORO1A, CIITA, RFXANK, RFX5, RFXAP, RMRP, DKC1, TERT, TNF2, DCLRE1B, SLC46A1, FancA, FancB, FancC, FancD1, FancD2, FancE, FancF, FancG, FancI, FancJ, FancL, FancM, FancN, FancO, FancP, FancQ, FancR, FancS, FancT, FancU, FancV, FancW, растворимого CD40, CTLA, Fas L, антитела к PD-L1, антитела к CD4, антитела к CD5, антитела к CD7, антитела к CD52, антитела к IL-1, антитела к IL-2, антитела к IL-4, антитела к IL-6, антитела к IL-10, антитела к TNF, антитела к TCR, специфически присутствующему на аутореактивных Т-клетках, гена семейства глобинов, WAS, rhox, дистрофина, пируваткиназы, CLN3, ABCD1, арилсульфатазы А, SFTPВ, SFTPС, NLX2.1, ABCA3, GATA1, гена рибосомального белка, TERT, TERC, DKC1, TNF2, CFTR, LRRK2, PARK2, PARK7, PINK1, SNCA, PSEN1, PSEN2, APP, SOD1, TDP43, FUS, убиквитина 2 и/или C9ORF72, необязательно при этом белок включает белок FancA.

14. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.13(d) или 13(e), где:

гРНК связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты HBG1, HBG2, и/или эритроидного энхансера bcl11a, причем необязательно гРНК сконструирована для повышения экспрессии γ -глобина; или

гРНК связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует часть CD33, причем необязательно CD33 представляет собой CD33 человека.

15. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.13, где терапевтический экспрессионный продукт включает:

белок β -глобина или белок γ -глобина; и

систему CRISPR, содержащую CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу; и одно, два или три из:

гРНК, которая связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты HBG1;

гРНК, которая связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты HBG2; и/или

гРНК, которая связывает целевую последовательность нуклеиновой кислоты Bcl11a,

причем необязательно гРНК сконструирована для повышения экспрессии γ -глобина.

16. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.13, где регуляторные последовательности содержат промотор, причем необязательно промотор представляет собой промотор β -глобина, причем необязательно промотор β -глобина имеет длину приблизительно 1,6 т. о. и/или содержит нуклеиновую кислоту в соответствии с положениями 5228631-5227023 хромосомы 11.

17. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.13, где регуляторная(ые) последовательность(и) содержит(ат) область контроля локуса (LCR), причем необязательно LCR представляет собой LCR β -глобина.

18. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.13, где LCR β -глобина:

содержит сайты гиперчувствительности (HS) к ДНКазе I LCR β -глобина, содержащие или состоящие из HS1, HS2, HS3 и HS4, причем необязательно LCR β -глобина имеет длину приблизительно 4,3 т. о.;

содержит HS к ДНКазе I LCR β -глобина, содержащие HS1, HS2, HS3, HS4 и HS5, причем необязательно LCR β -глобина имеет длину приблизительно 21,5 т. о.; или

причем LCR β -глобина содержит последовательность в соответствии с положениями 5292319-5270789 хромосомы 11.

19. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.13 или 14, где регуляторная(ые) последовательность(и) содержит(ат) 3'HS1, причем необязательно 3'HS1 содержит последовательность в соответствии с положениями 5206867-5203839 хромосомы 11.

20. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.13, где регуляторная(ые) последовательность(и) содержит(ат) сайт связывания миРНК, причем необязательно:

сайт связывания миРНК представляет собой сайт связывания для миРНК, экспрессируемой естественным образом представляющим интерес видом;

миРНК демонстрирует разные профили занятости в крови и опухолевом микроокружении или целевой ткани, причем необязательно профиль занятости в крови выше, чем в опухолевом микроокружении или целевой ткани;

сайт связывания миРНК включает сайты связывания miR423-5, miR423-5p, miR42-2, miR181c, miR125a или miR15a; и/или

сайты связывания миРНК включают сайты связывания miR187 или miR218.

21. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по любому из пп. 1, 4-7 или 10, где нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный экспрессионный продукт, является частью нагрузки, дополнительно содержащей элемент интеграции, причем необязательно элемент интеграции содержит экспрессионный продукт.

22. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.21, где элемент интеграции сконструирован для интеграции в целевой геном посредством гомологичной рекомбинации, причем элемент интеграции фланкируется плечами гомологии, которые соответствуют непрерывно связанным последовательностям целевого генома, причем необязательно:

плечи гомологии составляют от 0,8 до 1,8 т. о.; и/или

плечи гомологии гомологичным последовательностям нуклеиновых кислот целевого генома, которые фланкируют хромосомный безопасный локус, причем необязательно безопасный локус выбран из AAVS1, CCR5, HPRT или Rosa.

23. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.21, где элемент интеграции сконструирован для интеграции в целевой геном посредством транспозиции, причем элемент интеграции фланкируется инвертированными повторами (ИП) транспозона, причем необязательно ИП фланкируются ПП рекомбиназы.

24. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.23, где:

ИП транспозона представляют собой ИП Sleeping Beauty (SB), причем необязательно ИП SB представляют собой ИП рТ4; или

ИП транспозона представляют собой ИП piggyback, Mariner, frog prince, Tol2, TcBuster или spinON.

25. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по любому из пп. 21, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую транспозазу, которая опосредует транспозицию элемента интеграции, фланкируемого ИП транспозона, причем необязательно нуклеиновая кислота, кодирующая транспозазу, содержится в поддерживающем векторе или поддерживающем векторном геноме.

26. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный вектор или способ по п.25, где транспозаза представляет собой транспозазу Sleeping beauty, piggyback, Mariner, frog prince, Tol2, TcBuster или spinON, причем необязательно транспозаза представляет собой транспозазу Sleeping Beauty 100x (SB100x).

27. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, донорный геном, донорный

вектор или способ по п.25 или 26, где нуклеиновая кислота, кодирующая транспозазу, функционально связана с промотором PGK.

28. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по любому из пп. 1-3 или 6-10, где ПП рекомбиназы, которые фланкируют по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35 и/или находятся в пределах 550 нуклеотидов 5' конца генома Ad35 и функционально разрушают сигнал упаковки Ad35, но не 5' ИКП Ad35, представляют собой сайты FRT, loxP, gox, vox, AttB или AttP.

29. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по п.28, где нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбиназу для вырезания по меньшей мере части последовательности упаковки Ad35, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты клетки, содержащей хелперный геном.

30. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по п.23, где ПП рекомбиназы, которые фланкируют ИП транспозона, представляют собой сайты FRT, loxP, gox, vox, AttB или AttP.

31. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по п.21, где нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбиназу для вырезания нуклеиновой кислоты, содержащей элемент интеграции, содержится в поддерживающем векторе или поддерживающем векторном геноме.

32. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по п.29 или 31, где рекомбиназа представляет собой рекомбиназу Flp, Cre, Dre, Vika или PhiC31.

33. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по п.32, где нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбиназу, функционально связана с промотором EF1 α .

34. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по п.21,

где нагрузка содержит элемент интеграции, содержащий гетерологичный экспрессионный продукт,

причем гетерологичный экспрессионный продукт содержит белок β -глобина, функционально связанный с промотором β -глобина и длинной LCR β -глобина,

причем элемент интеграции фланкируется ИП SB,

и причем ИП SB фланкируются ПП рекомбиназы, причем необязательно ПП рекомбиназы представляют собой сайты FRT.

35. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор,

хелперный геном или способ по п.21, где нагрузка содержит:

элемент интеграции, и

кондиционально экспрессируемая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует экспрессионный продукт, не содержится в элементе интеграции и расположена так, чтобы интеграция элемента интеграции в целевой геном делала ее нефункциональной.

36. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по п.35, где экспрессионный продукт, кодируемый кондиционально экспрессируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, содержит компонент системы CRISPR или компонент системы редактора оснований, причем необязательно компонент представляет собой CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу, фермент редактора оснований или гРНК.

37. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по п.21, где нагрузка содержит кассету отбора, причем необязательно кассета отбора содержится в элементе интеграции.

38. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по п.37, где кассета отбора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую $mgmt^{P140K}$, или кассета отбора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую анти-CD33 мшРНК.

39. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по любому из пп. 1-3 или 6-10, где по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, фланкируемой ПП рекомбиназы, соответствует нуклеотидам 138-481 последовательности Ad35 в соответствии с номером доступа GenBank № AX049983.

40. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по любому из пп. 1-3 или 6-10, где по меньшей мере часть последовательности упаковки Ad35, фланкируемой ПП рекомбиназы, соответствует: нуклеотидам 179-344; нуклеотидам 366-481; нуклеотидам 155-481; нуклеотидам 159-480; нуклеотидам 159-446; нуклеотидам 180-480; нуклеотидам 207-480; нуклеотидам 140-446; нуклеотидам 159-446; нуклеотидам 180-446; нуклеотидам 202-446; нуклеотидам 159-481; нуклеотидам 180-384; нуклеотидам 180-481; или нуклеотидам 207-481

последовательности Ad35 в соответствии с номером доступа GenBank № AX049983.

41. Система получения рекомбинантного вектора Ad35, хелперный вектор, хелперный геном или способ по любому из пп. 1-3 или 6-10, где ПП рекомбиназы

представляют собой сайты LoxP.

42. Хелперный вектор или хелперный геном по любому из пп. 2, 3, 8 или 9, где хелперный геном Ad35 содержит E4orf6 Ad5 для амплификации в клетках 293T.

43. Хелперный вектор или хелперный геном по любому из пп. 2, 3, 8 или 9, где хелперный геном содержит или генерирует последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 51-65.

44. Клетка, содержащая хелперный вектор, хелперный геном, донорный вектор или донорный геном по любому из пп. 2-5, 8 или 9, причем необязательно клетка представляет собой клетку HEK293.

45. Клетка, содержащая донорный геном по любому из пп. 1, 4, 6, 7, 10, 13-27 или 44, причем необязательно клетка представляет собой эритроцит, причем необязательно клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку, Т-клетку, В-клетку или миелоидную клетку, причем необязательно клетка секретирует экспрессионный продукт.

46. Способ по п.6 или 10, где клетки представляют собой клетки HEK293.

47. Способ модификации клетки, включающий приведение клетки в контакт с донорным вектором Ad35 по любому из пп. 5 или 11-27.

48. Способ модификации клетки субъекта, включающий введение субъекту донорного вектора Ad35 по любому из пп. 5 или 11-27, причем необязательно способ не включает выделение клетки из организма субъекта.

49. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту донорного вектора Ad35 по любому из пп. 5 или 11-27, причем необязательно введение является внутривенным.

50. Способ по п.49, где способ включает введение субъекту мобилизационного агента, причем необязательно мобилизационный агент содержит одно или более из гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, GM-CSF, S-CSF, антагониста CXCR4 и агониста CXCR2, причем необязательно антагонист CXCR4 представляет собой AMD3100 и/или агонист CXCR2 представляет собой GRO-β.

51. Способ по п.49 или 50, где донорный вектор Ad35 содержит кассету отбора, причем необязательно способ дополнительно включает введение субъекту агента для отбора, причем необязательно кассета отбора кодирует $mgmt^{P140K}$, и агент для отбора представляет собой O⁶BG/BCNU.

52. Способ по п.49, где способ дополнительно включает введение субъекту агента для иммунной супрессии, причем необязательно схема иммунной супрессии включает стероид, антагонист рецептора IL-6 и/или антагонист рецептора IL-1R, причем необязательно стероид включает глюкокортикоид или дексаметазон.

53. Способ по п.49, где донорный вектор Ad35 содержит элемент интеграции, и способ приводит к интеграции и/или экспрессии копии элемента интеграции в по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% клеток, экспрессирующих CD46, в по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% гемопоэтических стволовых клеток и/или в по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% эритроидных Ter119⁺ клеток.

54. Способ по п.49, где способ приводит к интеграции в среднем по меньшей мере 2 копий или по меньшей мере 2,5 копий элемента интеграции в геномах клеток-мишеней, содержащих по меньшей мере 1 копию элемента интеграции.

55. Способ по п.49, где способ приводит к экспрессии экспрессионного продукта, кодируемого нагрузкой или элементом интеграции, на уровне, который составляет по меньшей мере приблизительно 20% от уровня эталона или по меньшей мере приблизительно 25% от уровня эталона, причем необязательно эталон представляет собой экспрессию эндогенного эталонного белка у субъекта или в эталонной популяции.

56. Способ по п.49, где заболевание или состояние представляет собой гемоглобинопатию, тромбоцитарное расстройство, анемию, иммунодефицит, дефицит фактора коагуляции, анемию Фанкони, дефицит альфа-1 антитрипсина, серповидноклеточную анемию, талассемию, промежуточную талассемию, гемофилию А, гемофилию В, болезнь фон Виллебранда, дефицит фактора V, дефицит фактора VII, дефицит фактора X, дефицит фактора XI, дефицит фактора XII, дефицит фактора XIII, синдром Бернара - Сулье, синдром серых тромбоцитов или мукополисахаридоз.

57. Способ по п.49, где субъект представляет собой субъекта, имеющего рак, и способ обеспечивает лечение, предотвращение или задержку повторного появления рака, причем необязательно субъект является носителем одной или более мутаций зародышевой линии, связанных с развитием рака,

причем необязательно рак представляет собой анапластическую астроцитому, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, диффузную глиому ствола головного мозга, саркому Юинга, мультиформную глиобластому, злокачественную глиому, меланому, метастатическую злокачественную меланому, рак носоглотки или детский рак,

причем необязательно субъект получал или принимает O⁶BG, TMZ (темозоломид) и/или BCNU (кармустин).

58. Способ по п.49, где заболевание или состояние представляет собой промежуточную талассемию, причем необязательно вектор или геном содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более экспрессионных продуктов, выбранных из:

экспрессионных продуктов, которые повышают или повторно активируют экспрессию эндогенного γ -глобина, причем необязательно экспрессионные продукты, которые повышают или повторно активируют экспрессию эндогенного γ -глобина, содержат CRISPR-ассоциированную РНК-направляемую эндонуклеазу или редактор оснований и одно или более из:

гРНК, которая связывает последовательность нуклеиновой кислоты HBG1 и сконструирована для повышения экспрессии из кодирующей последовательности, функционально связанной с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты;

гРНК, которая связывает последовательность нуклеиновой кислоты HBG2 и сконструирована для повышения экспрессии из кодирующей последовательности, функционально связанной с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты; и

гРНК, которая связывает последовательность нуклеиновой кислоты эритроидного энхансера *bcl11a* и сконструирована для снижения экспрессии *BCL11A*;

γ -глобина; и

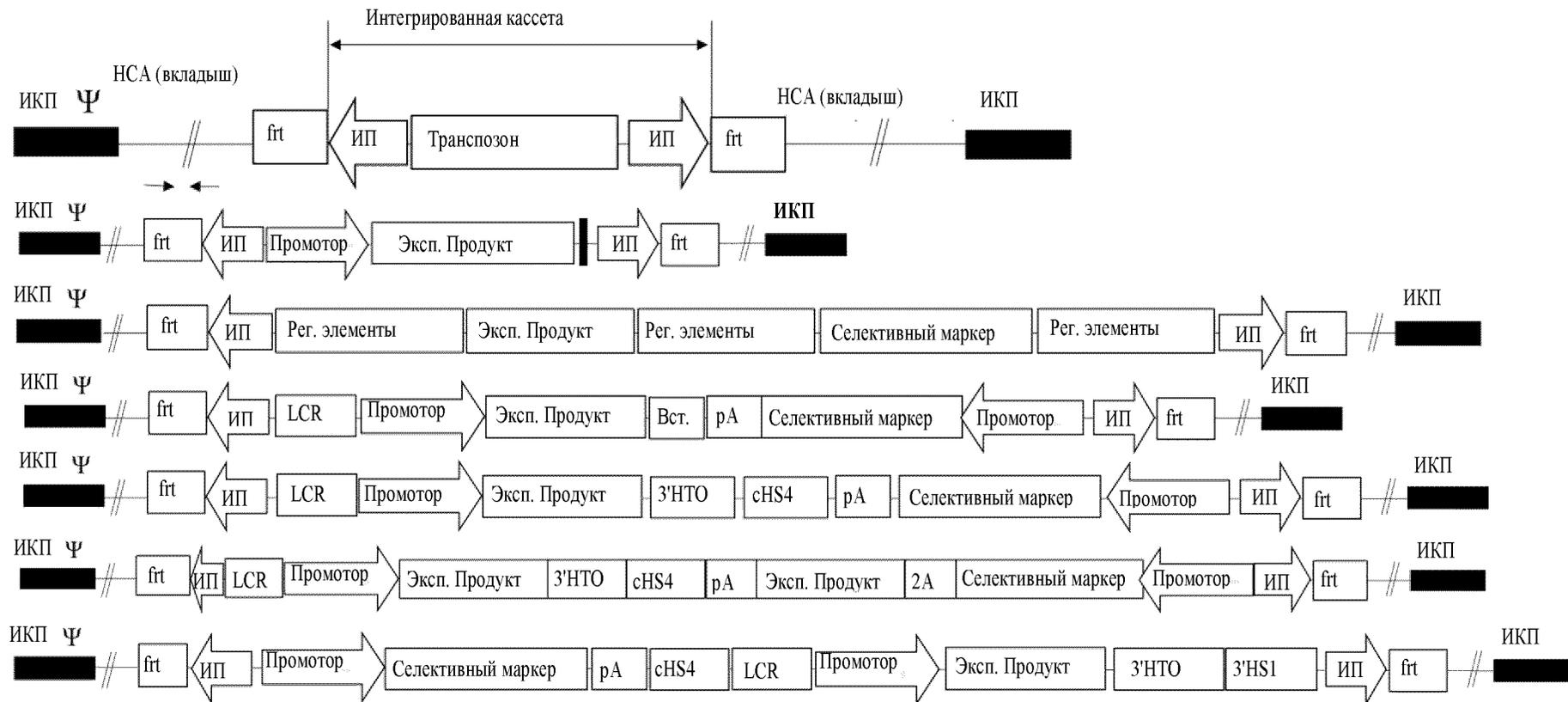
β -глобина,

причем необязательно способ обеспечивает уменьшение симптома промежуточной талассемии, и/или лечение промежуточной талассемии, и/или повышение HbF.

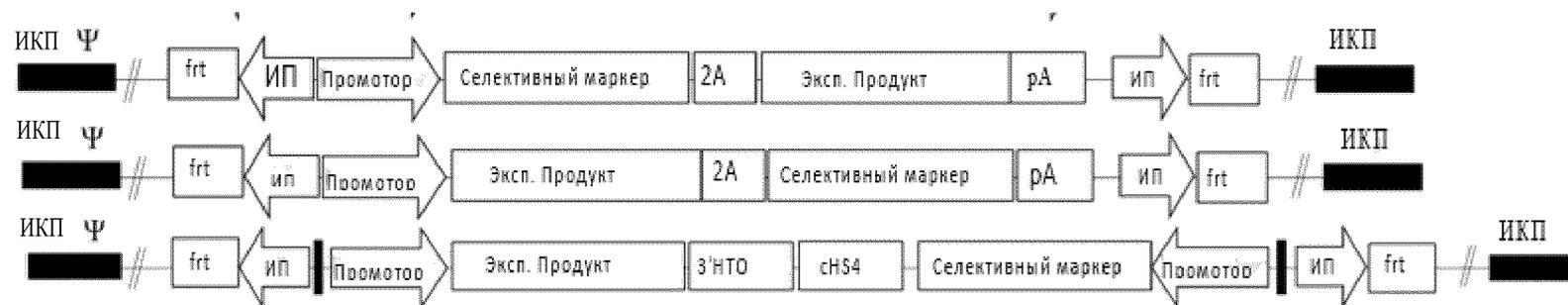
По доверенности

Фиг. 1

Интегрированные кассеты (интегрированные части находятся между сайтами *frt*)

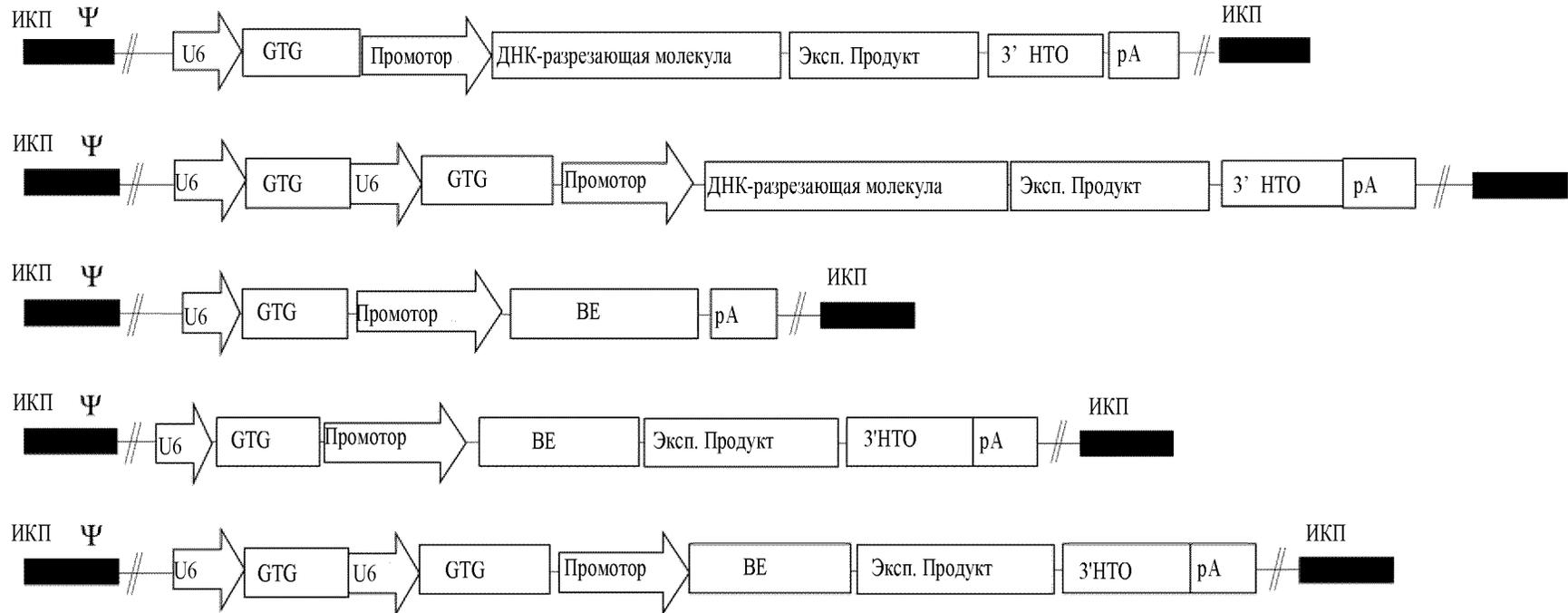


Фиг. 1, продолж.

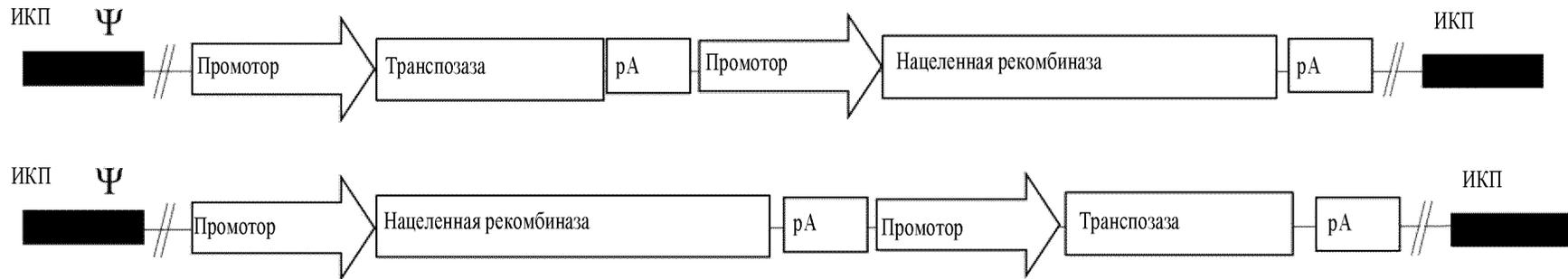


Фиг. 1, продолж.

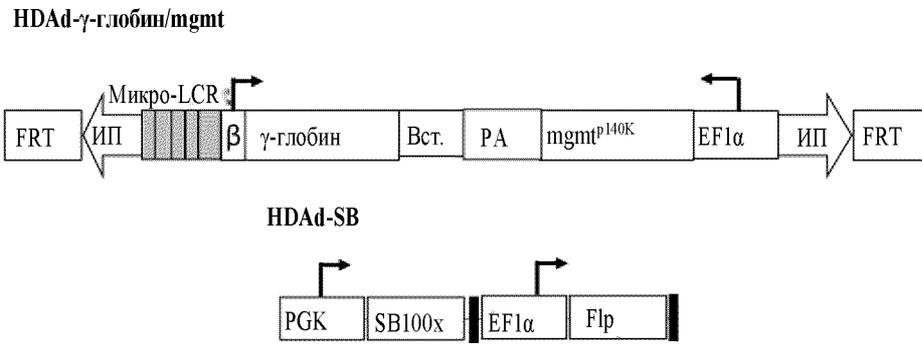
Временная



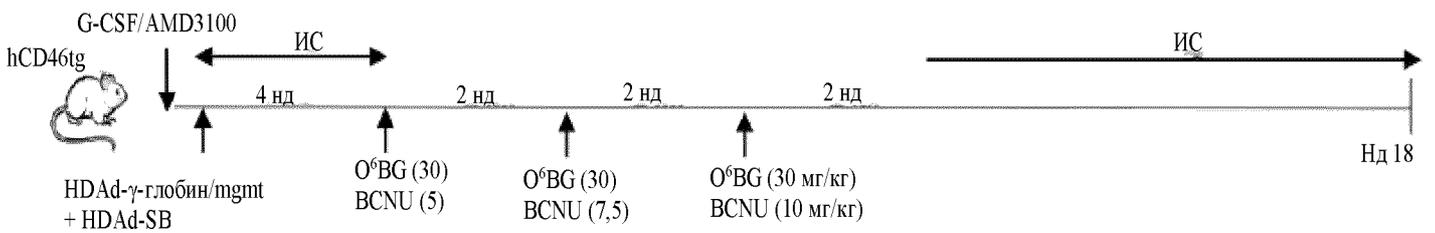
Транспозаза



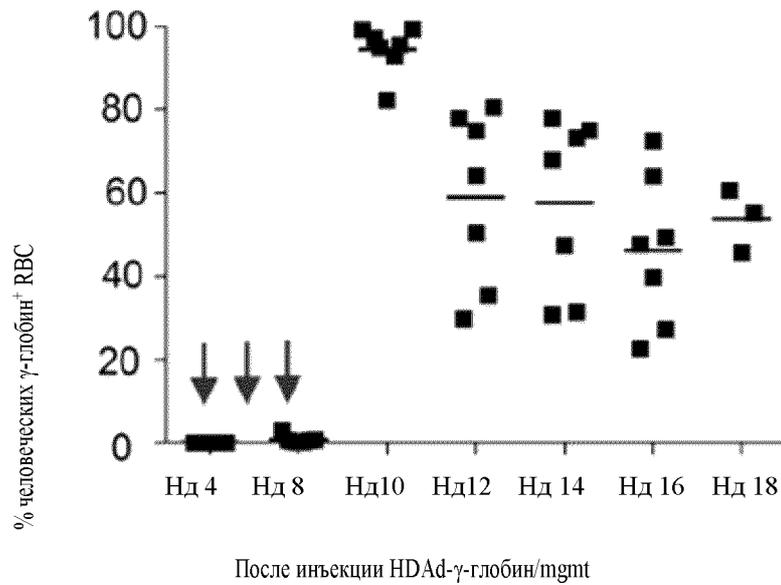
Фиг. 2А



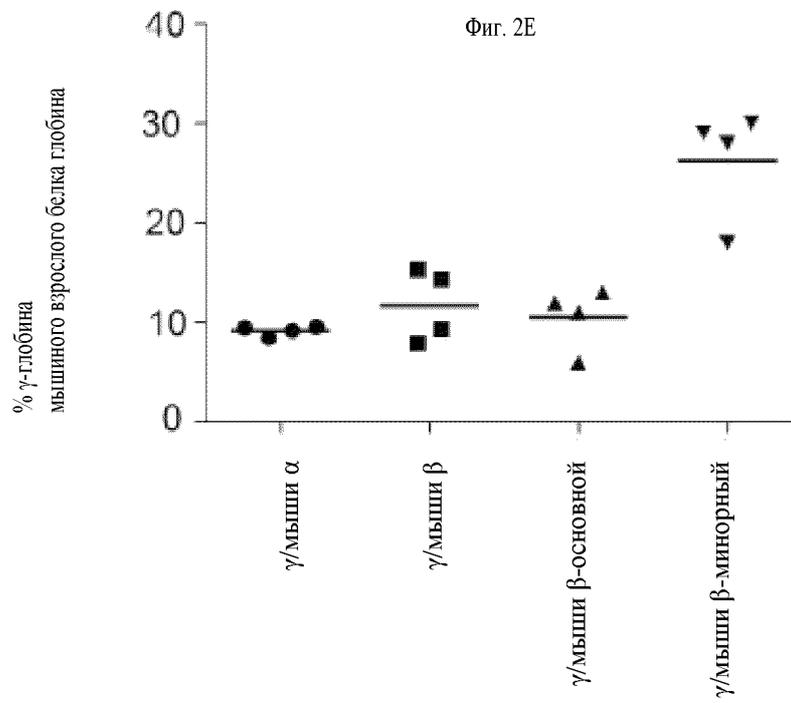
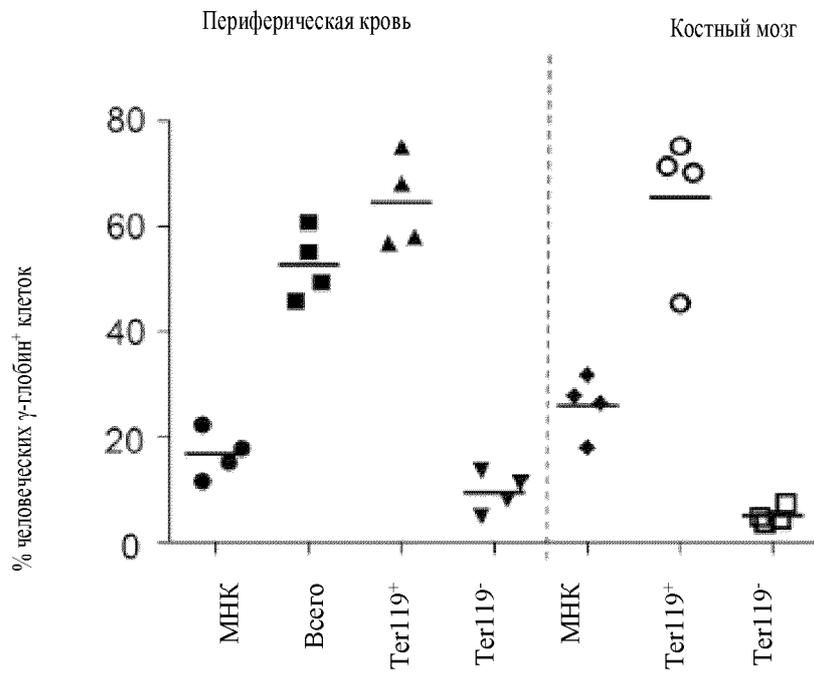
Фиг. 2В



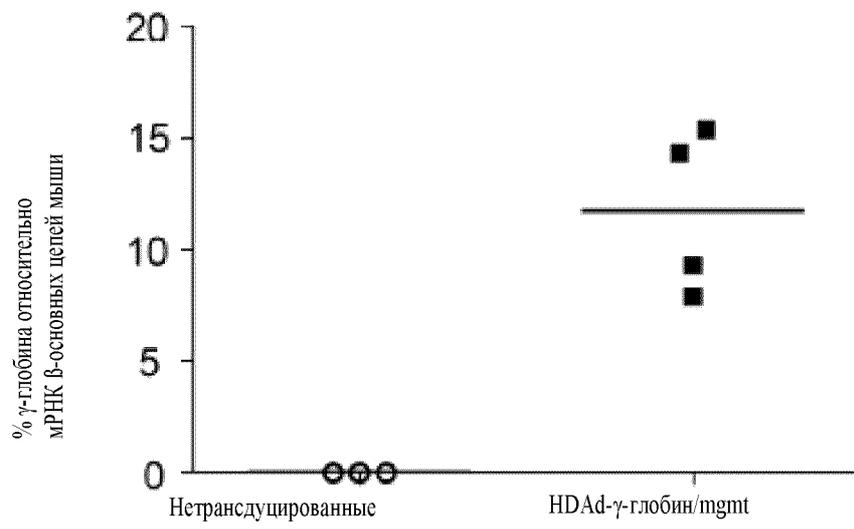
Фиг. 2С



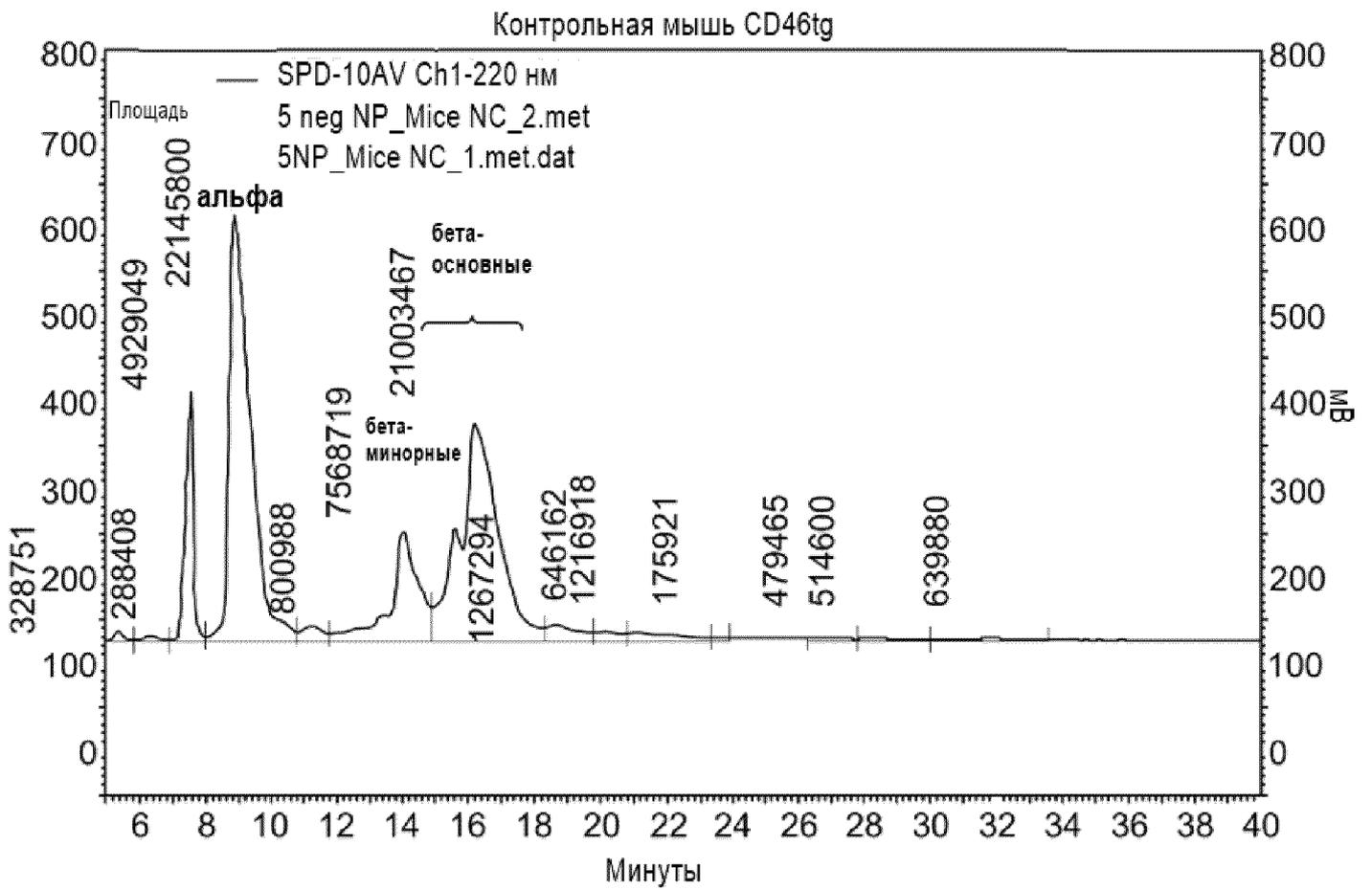
Фиг. 2D



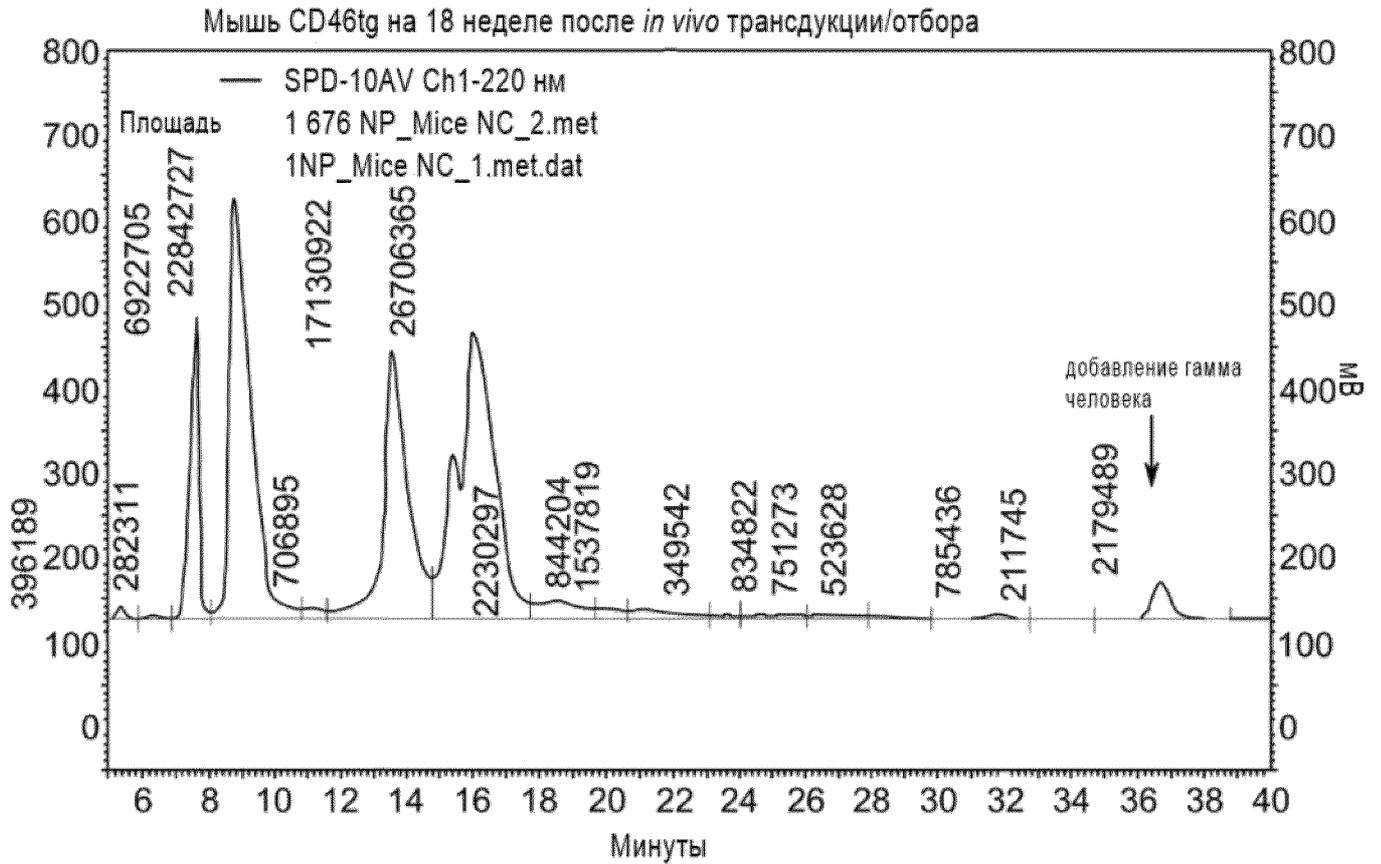
Фиг. 2F

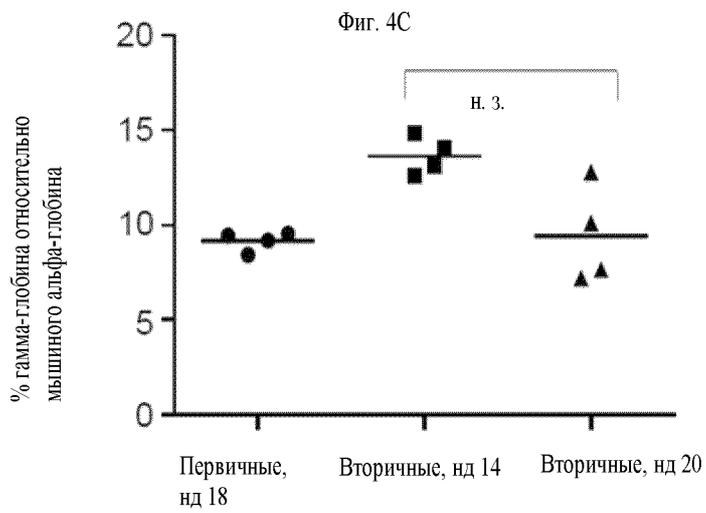
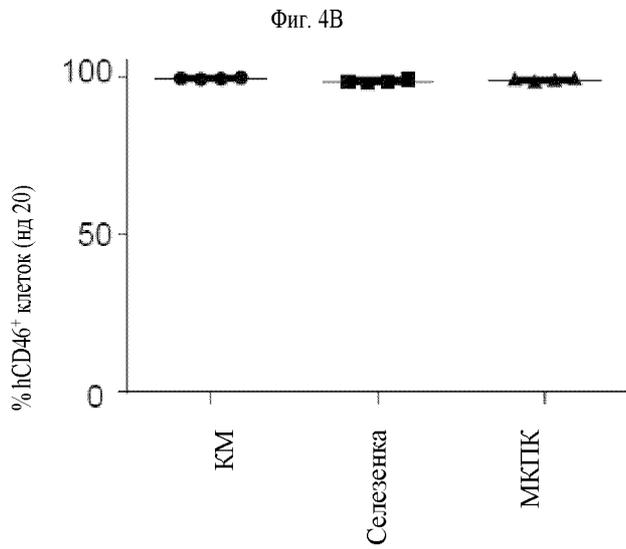


Фиг. 3



Фиг. 3 продолж.

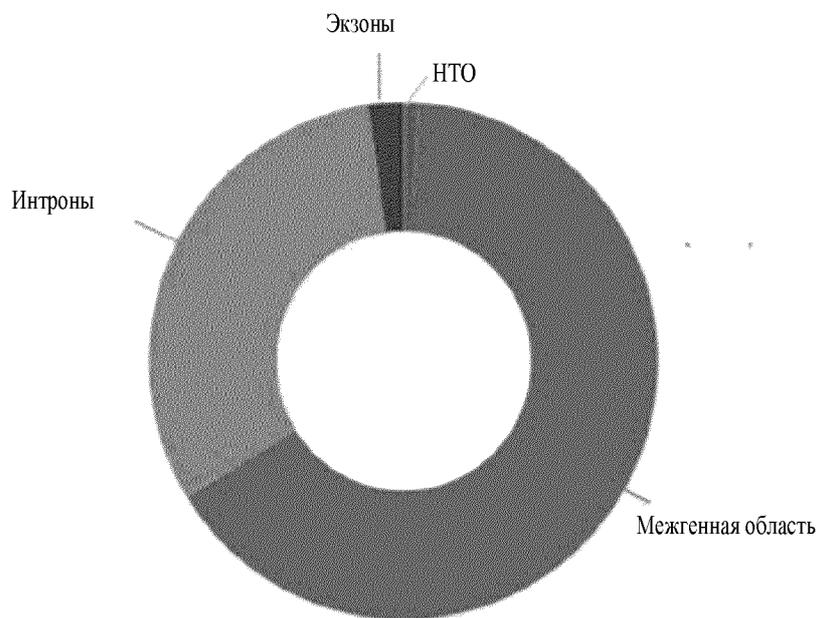




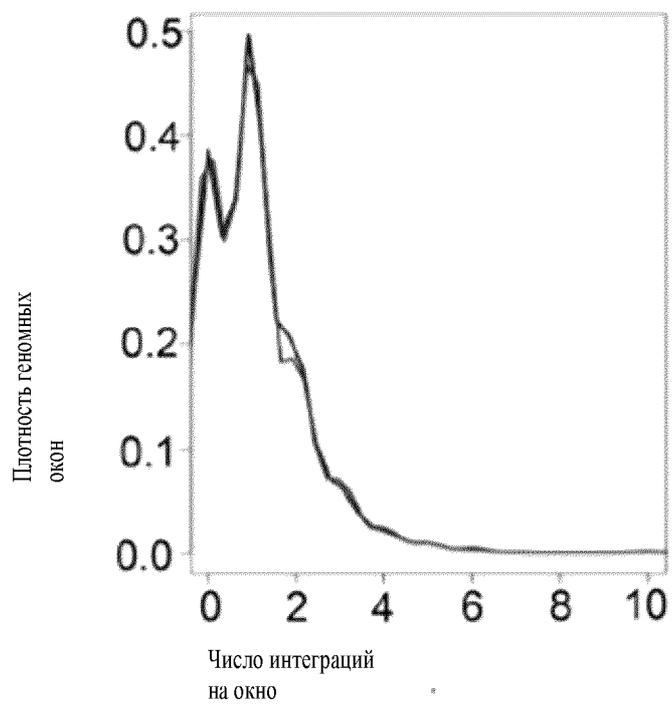
Фиг. 5А



Фиг. 5В

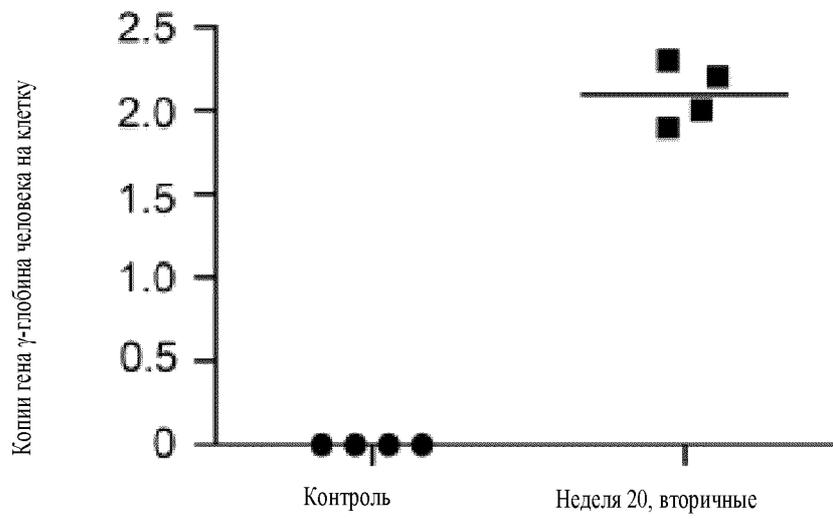


Фиг. 5С

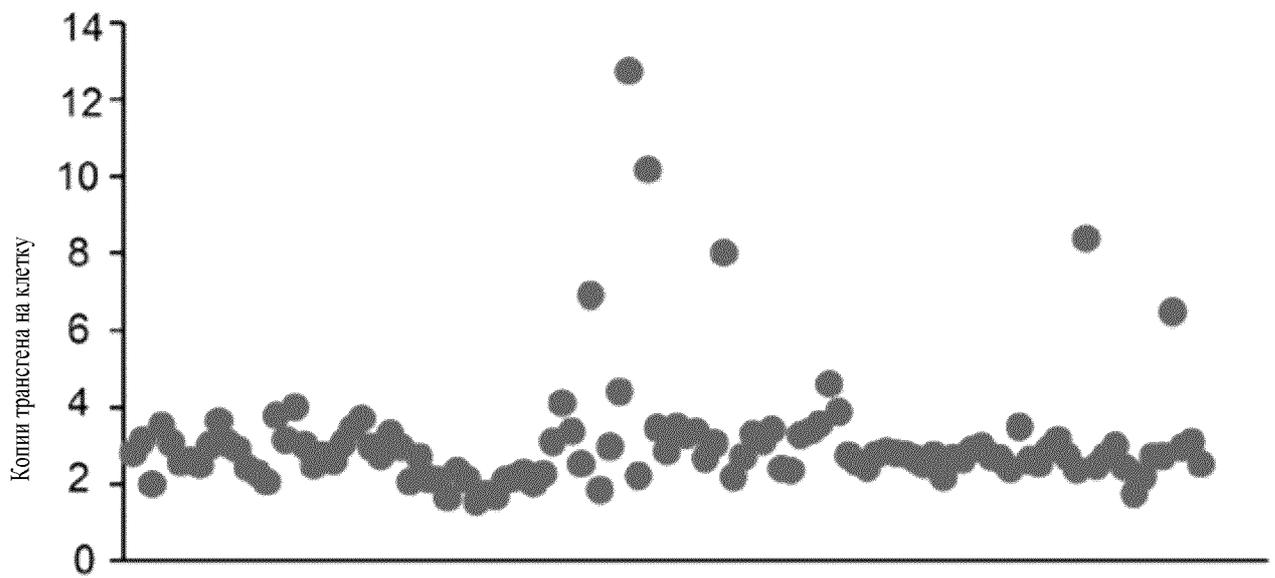


12/350

Фиг. 5D

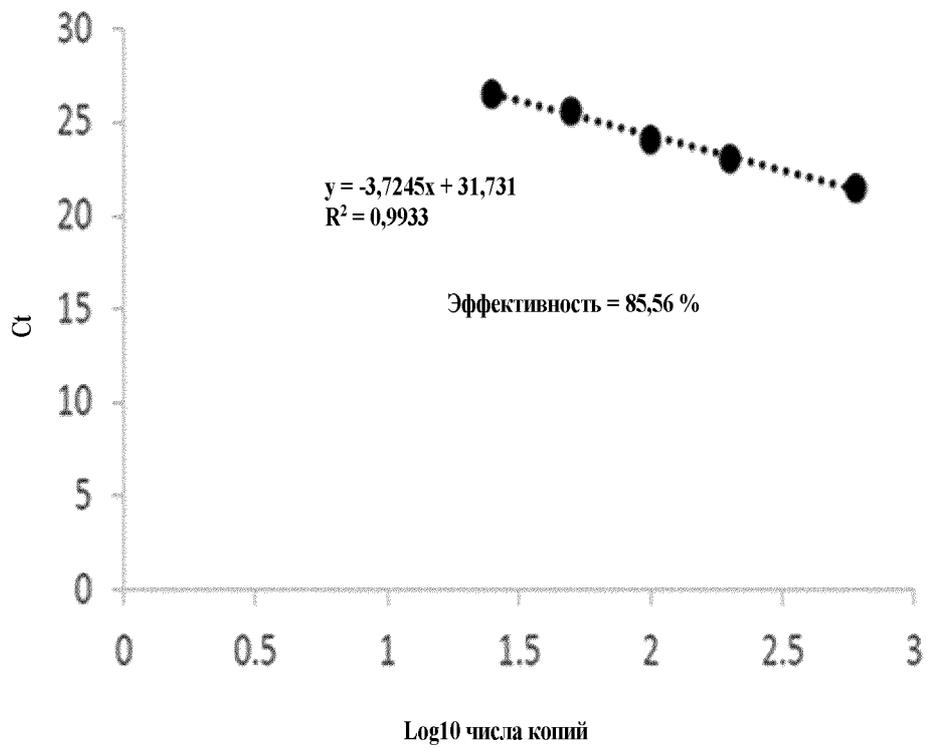
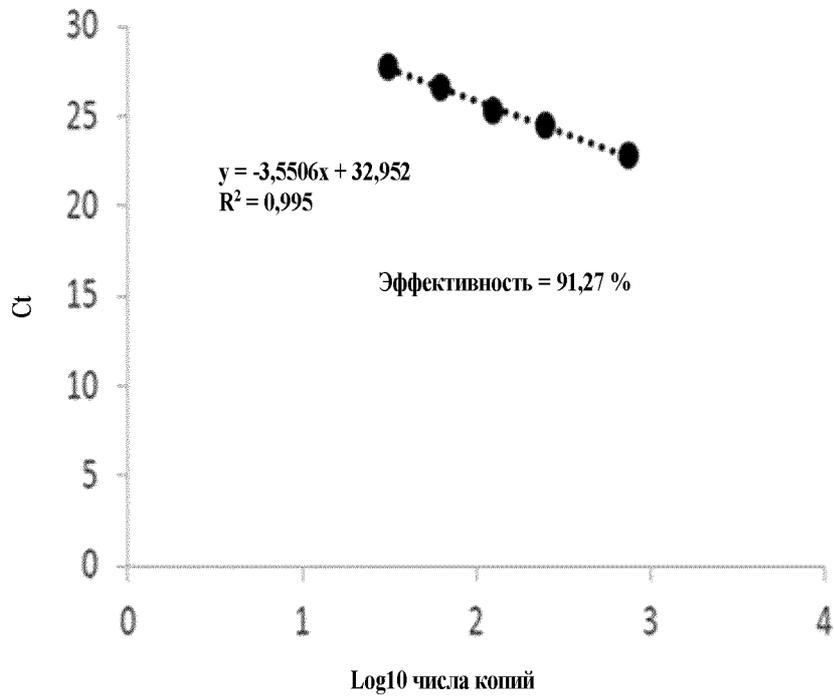


Фиг. 5E



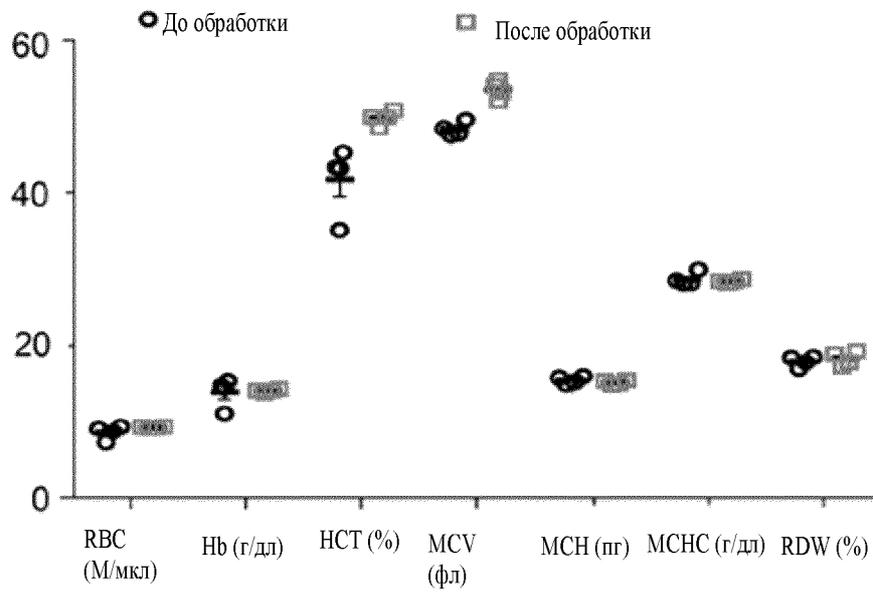
13/350

Фиг. 6

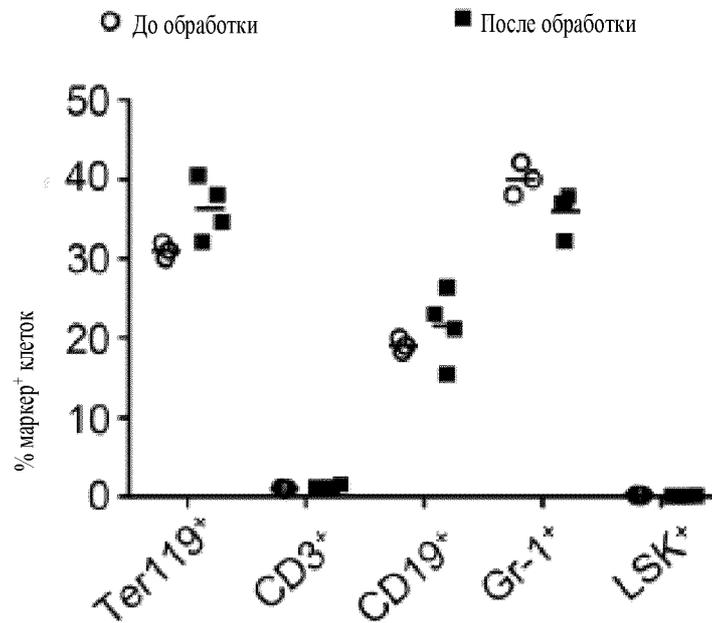


15/350

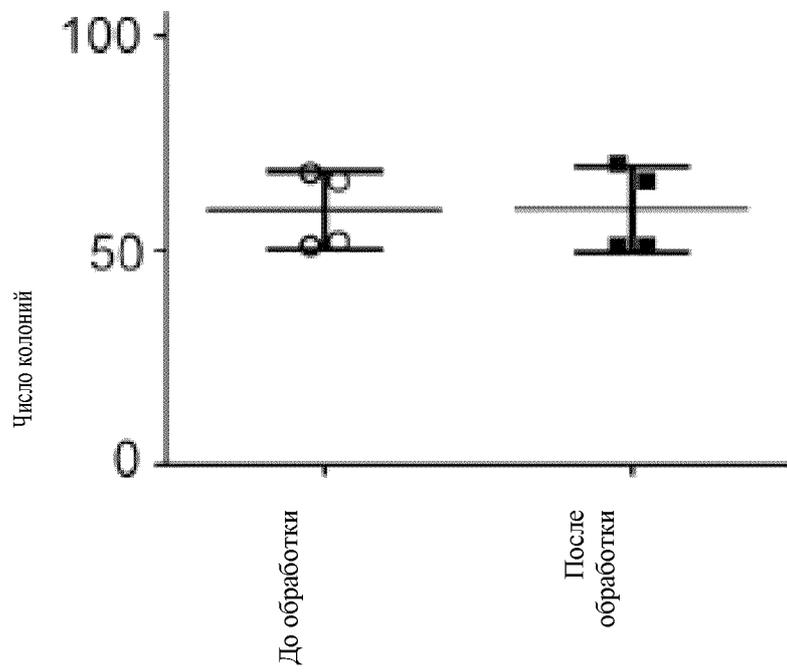
Фиг. 7С



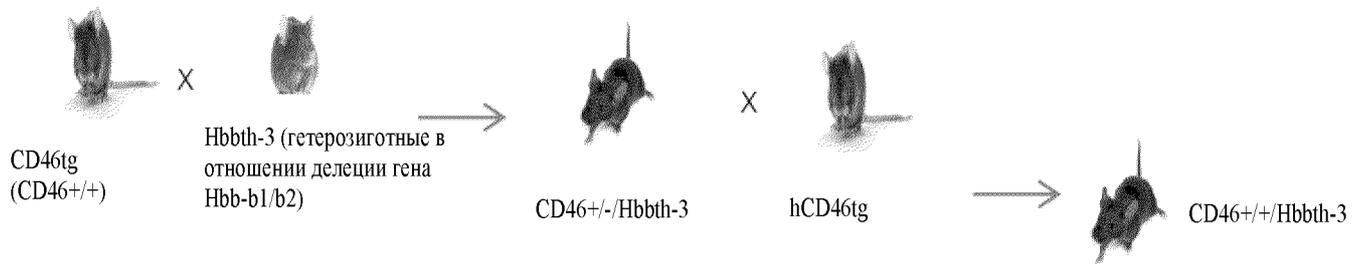
Фиг. 7D



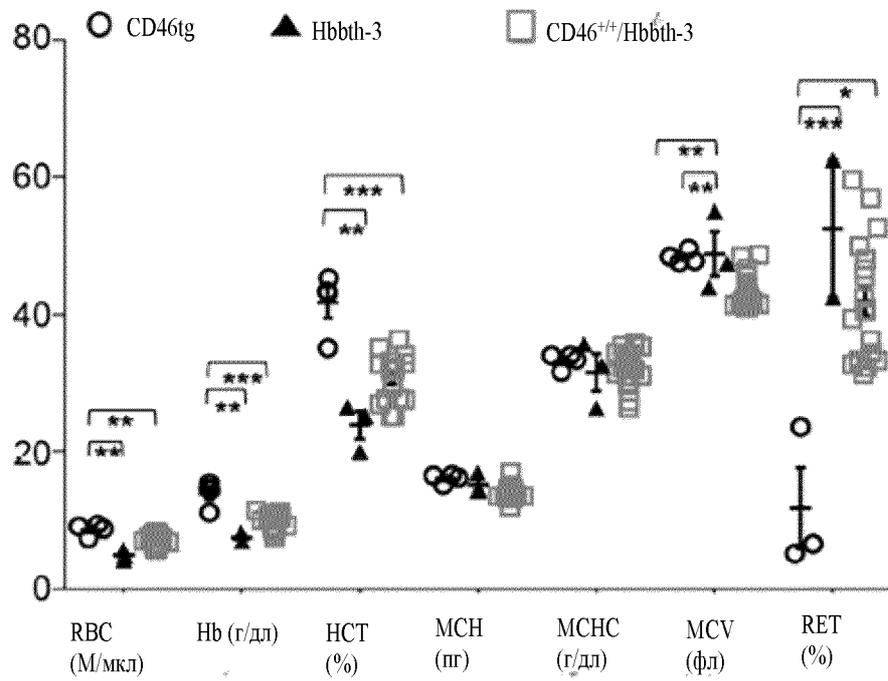
Фиг. 7Е



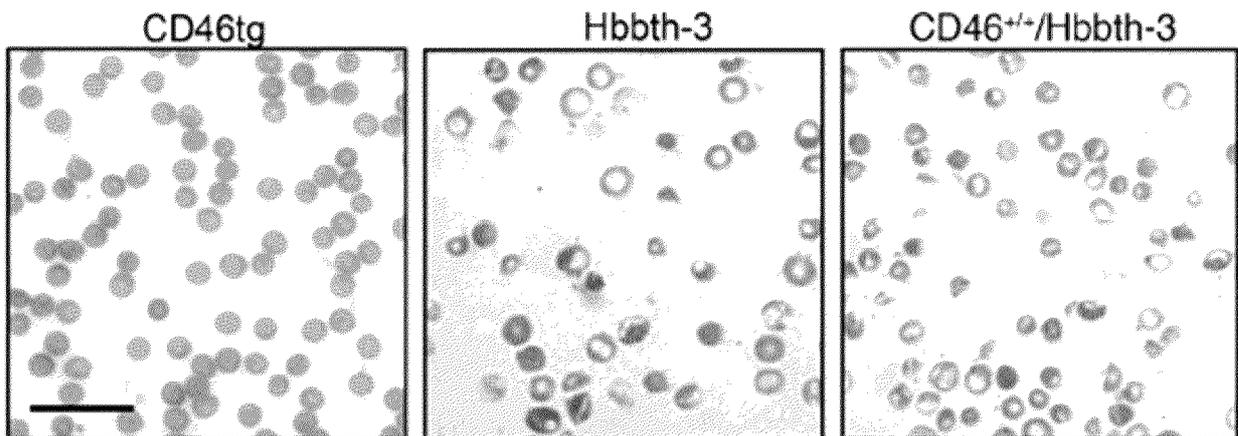
Фиг. 8



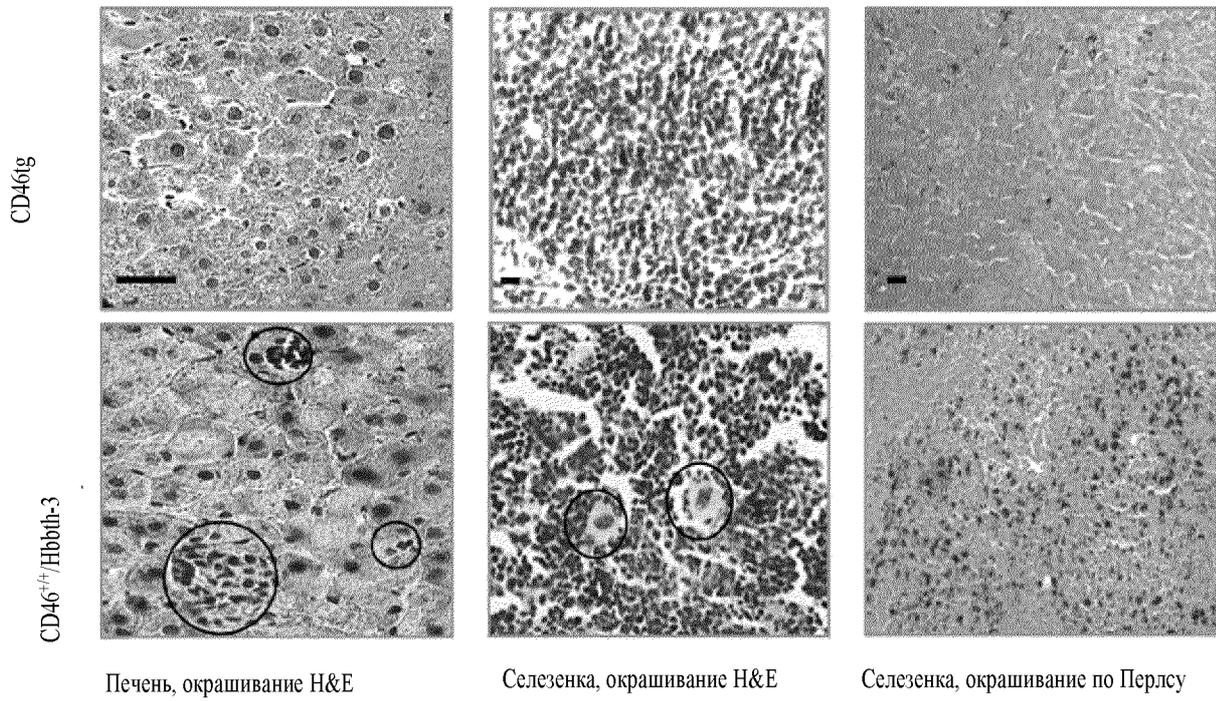
Фиг. 9А



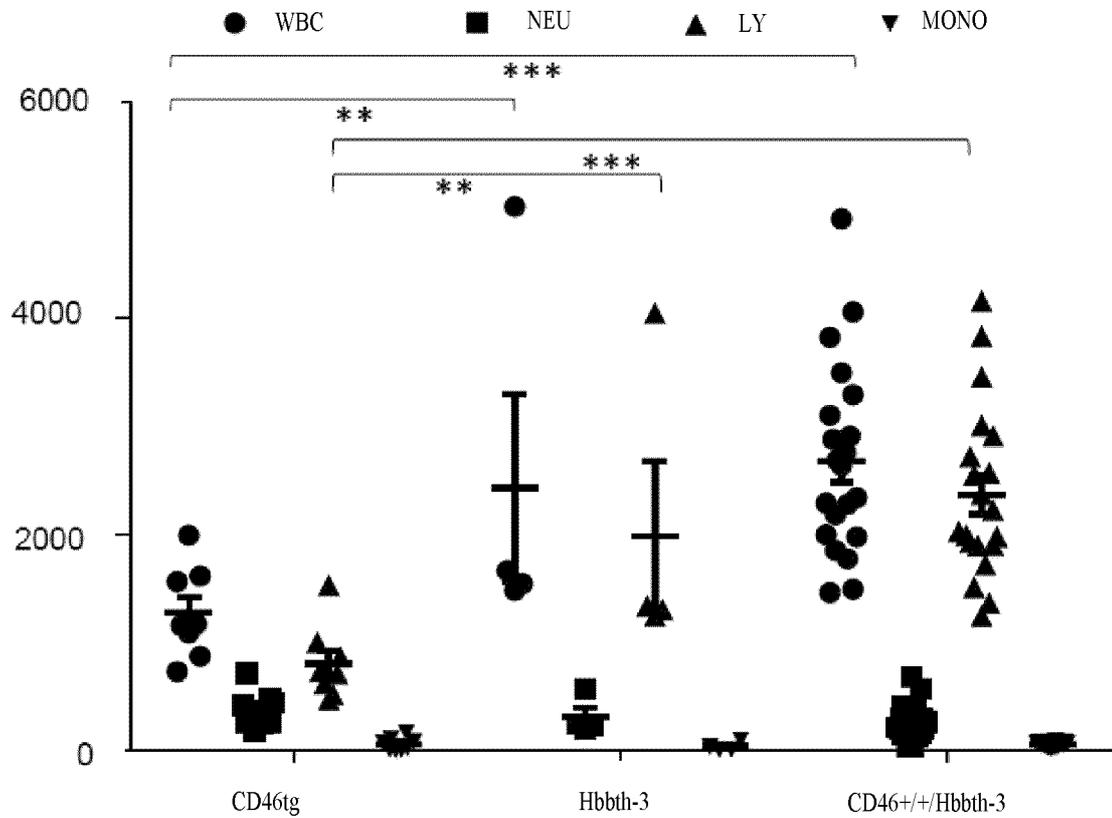
Фиг. 9В



Фиг. 9С

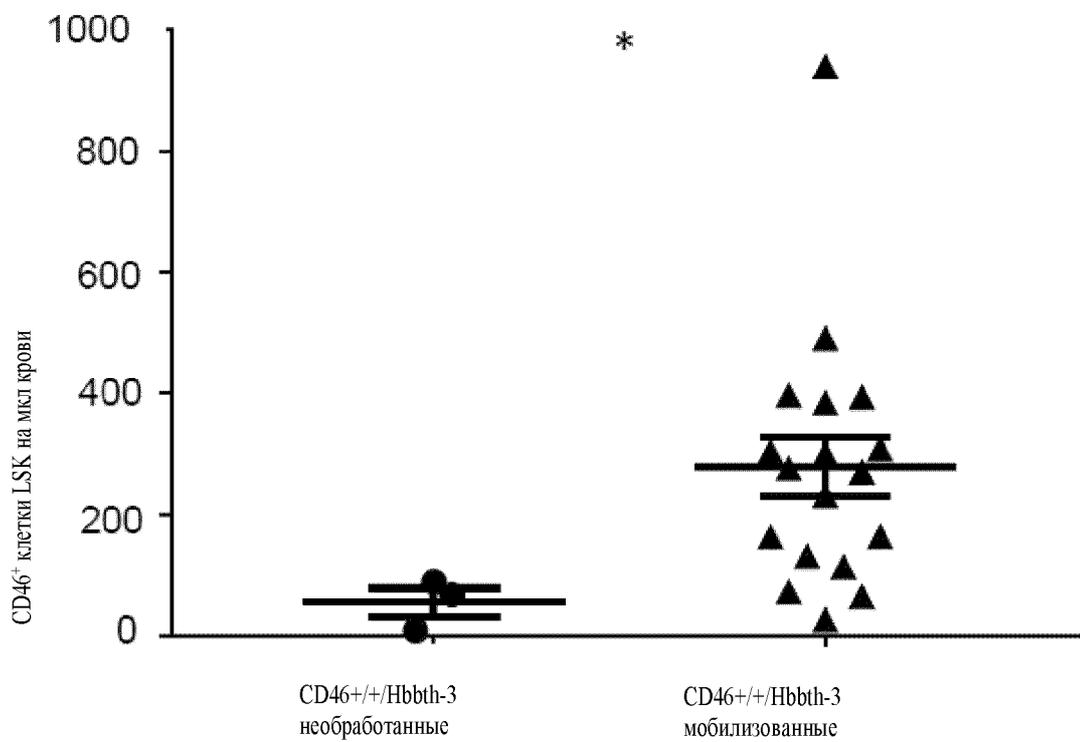


Фиг. 10

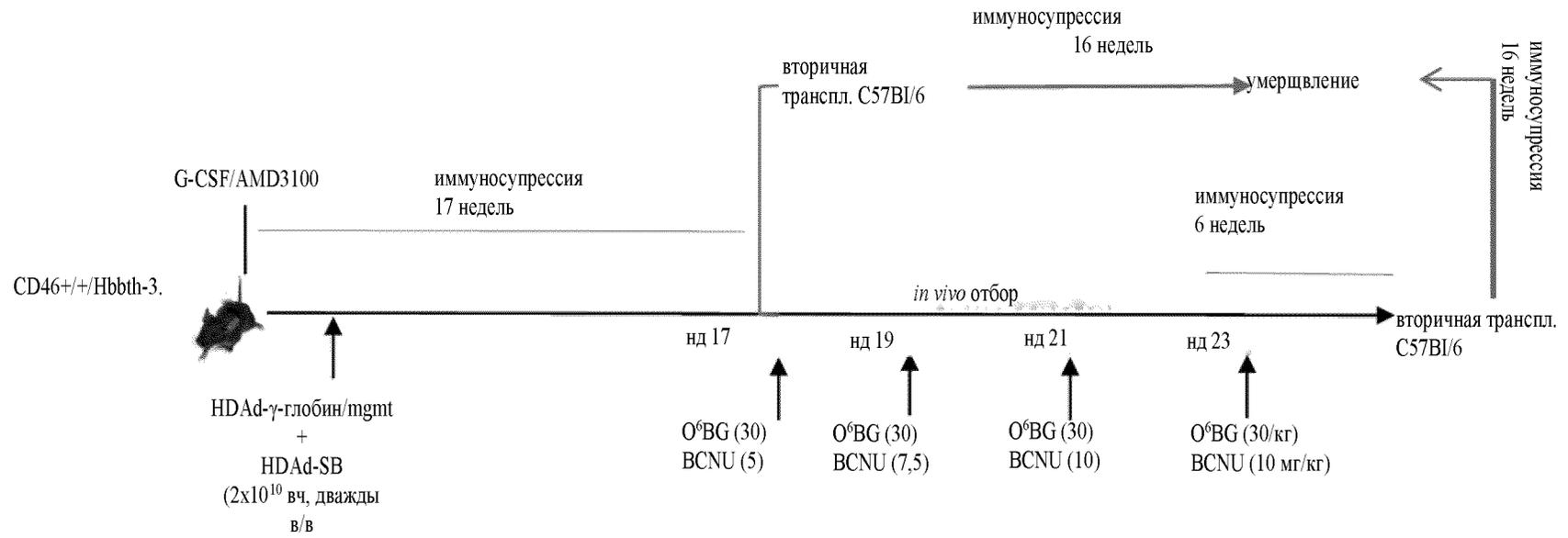


19/350

Фиг. 11

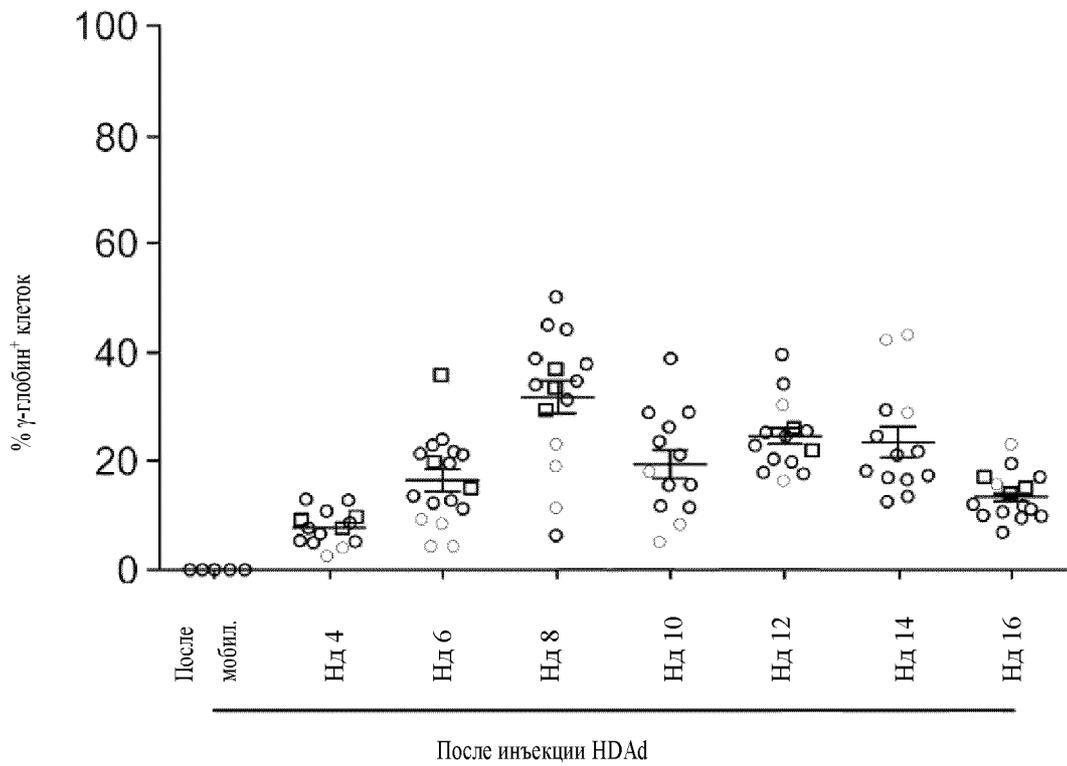


Фиг. 12

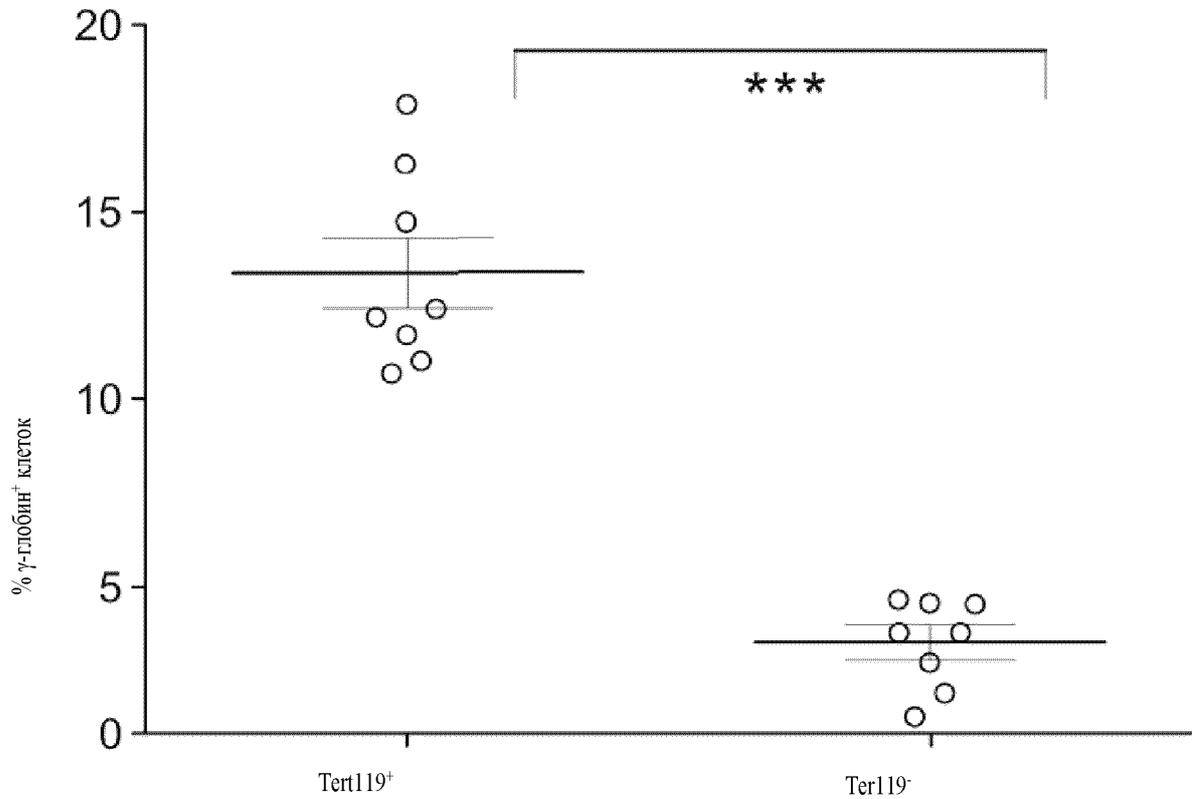


20/350

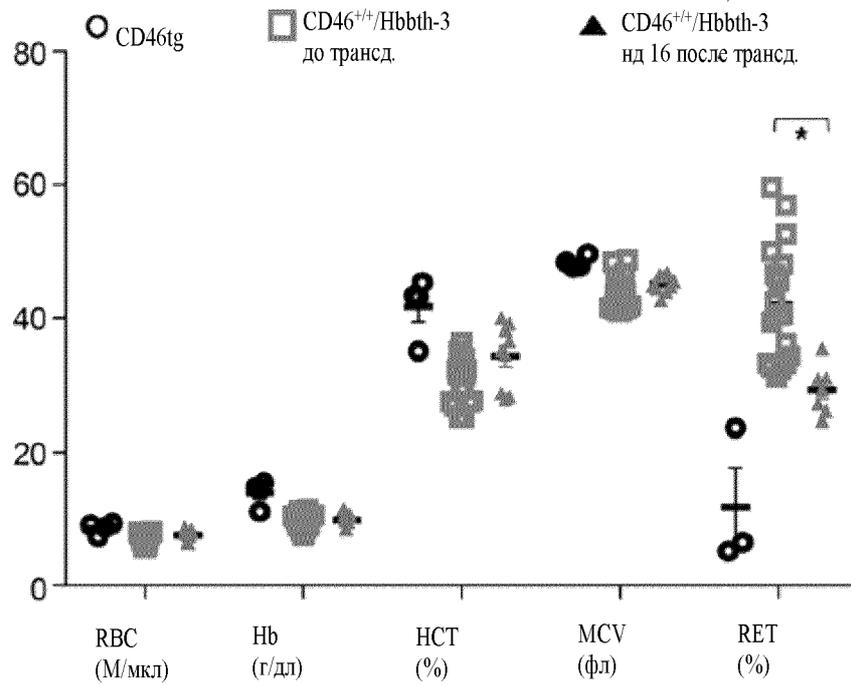
Фиг. 13А



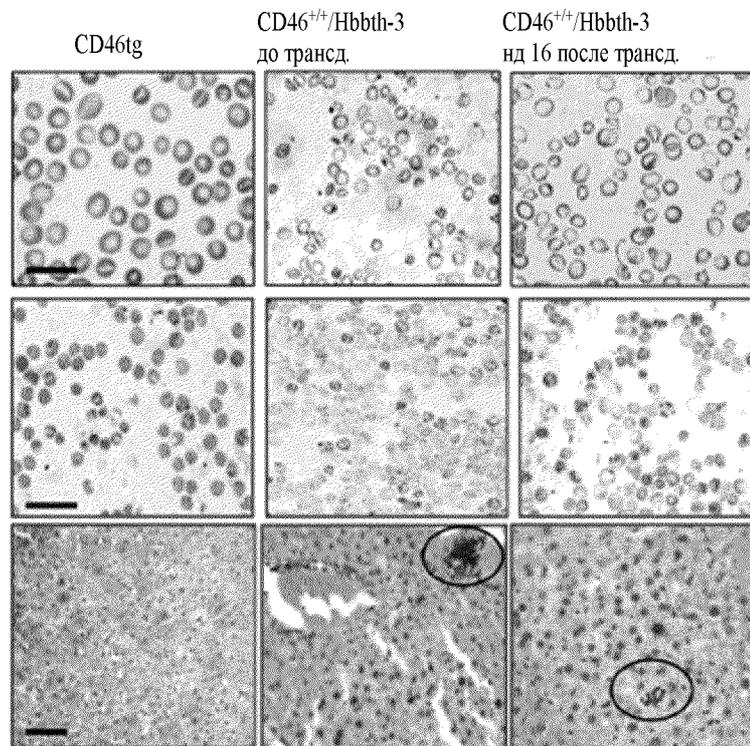
Фиг. 13В



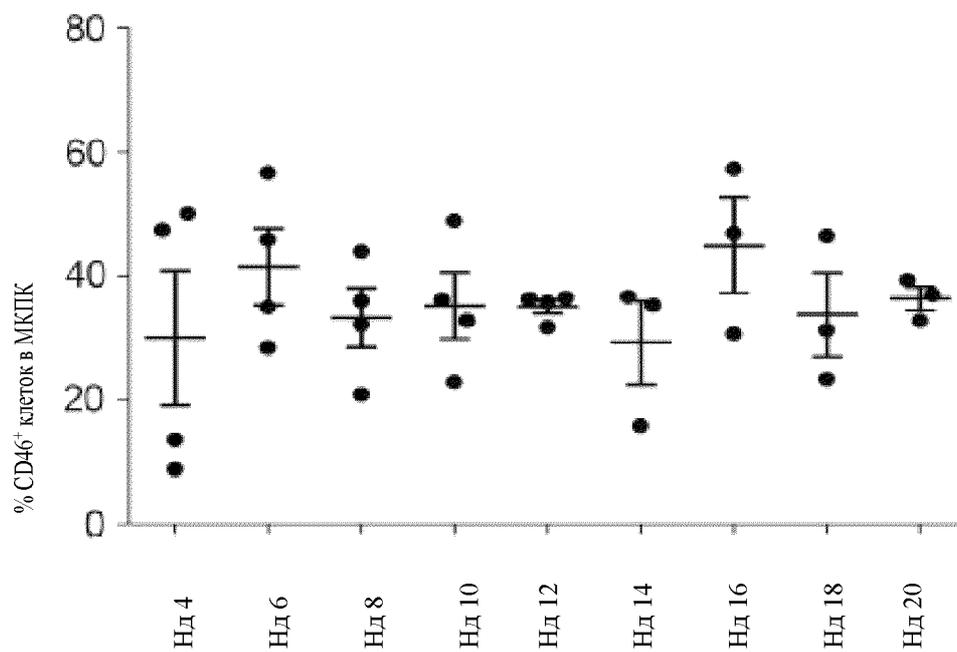
Фиг. 13С



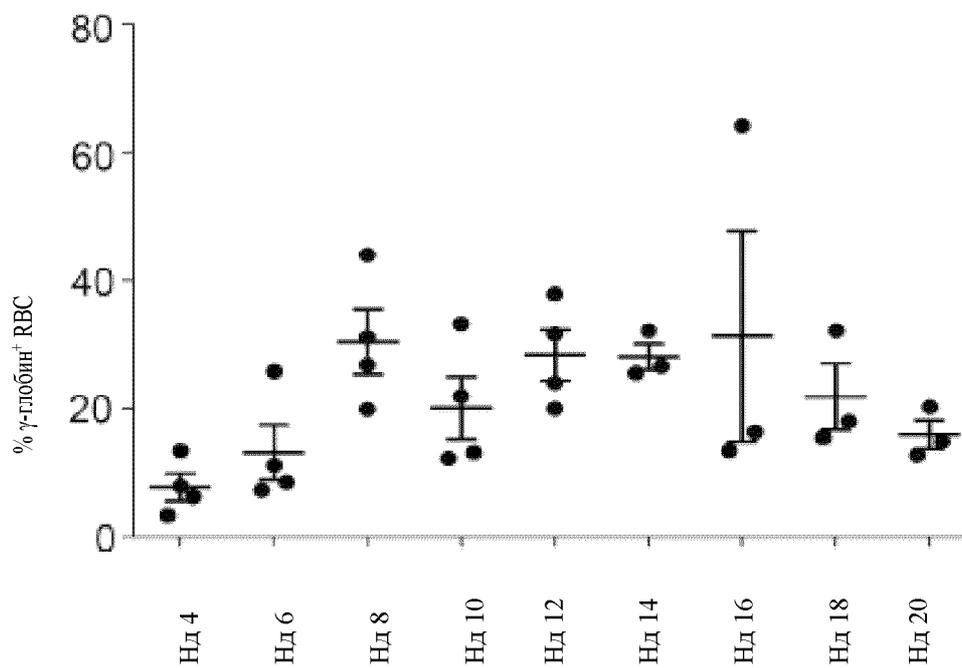
Фиг. 13D



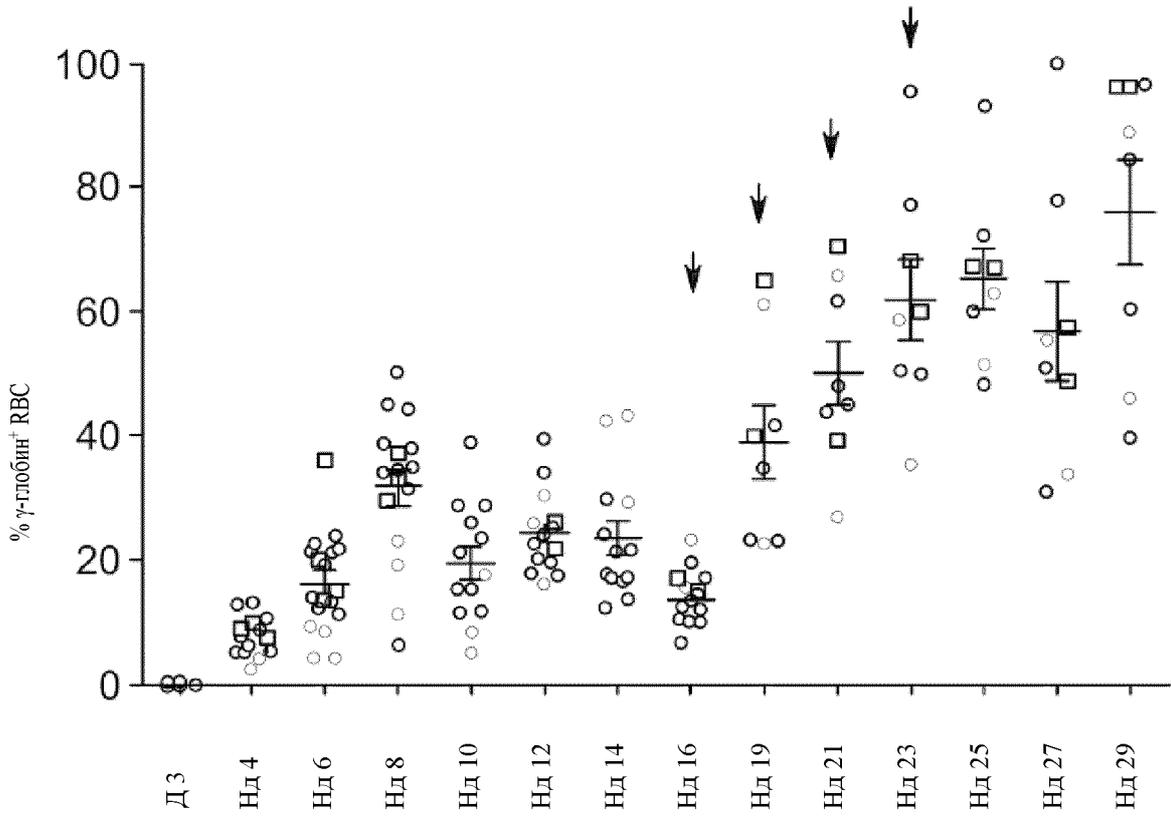
Фиг. 13Е



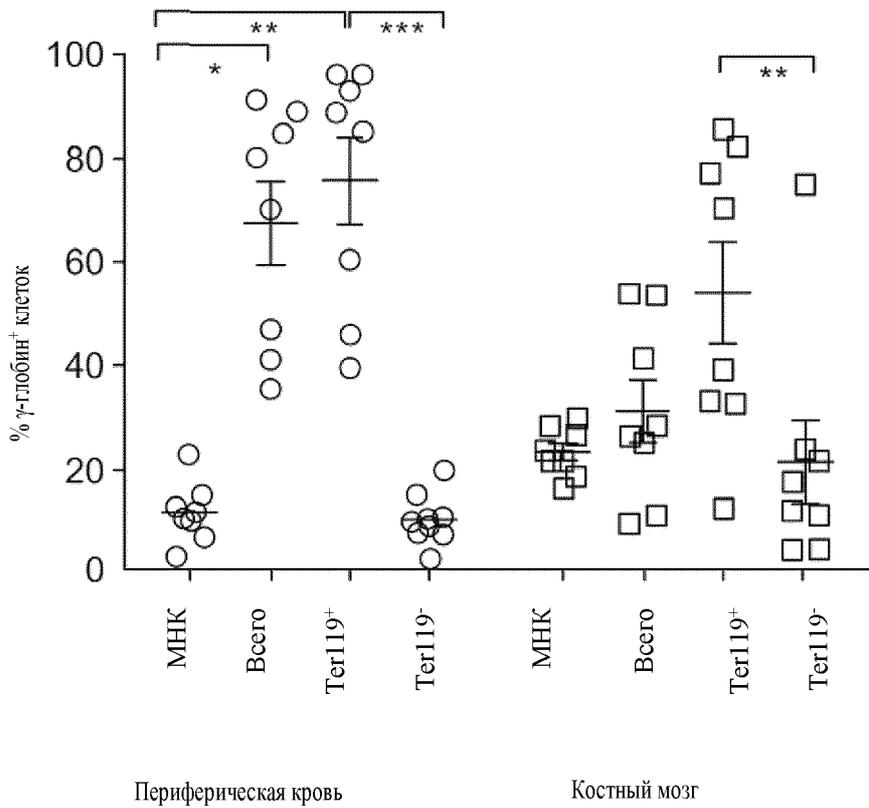
Фиг. 13F



Фиг. 14А

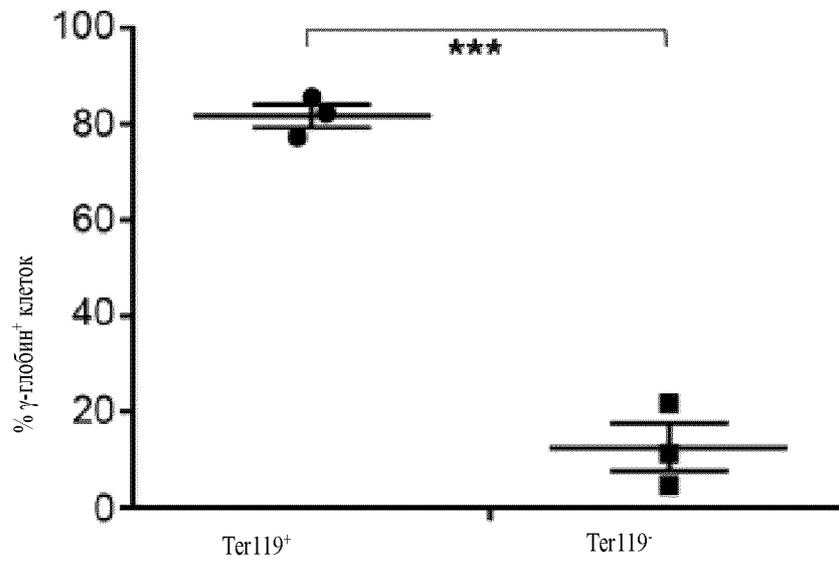


Фиг. 14В

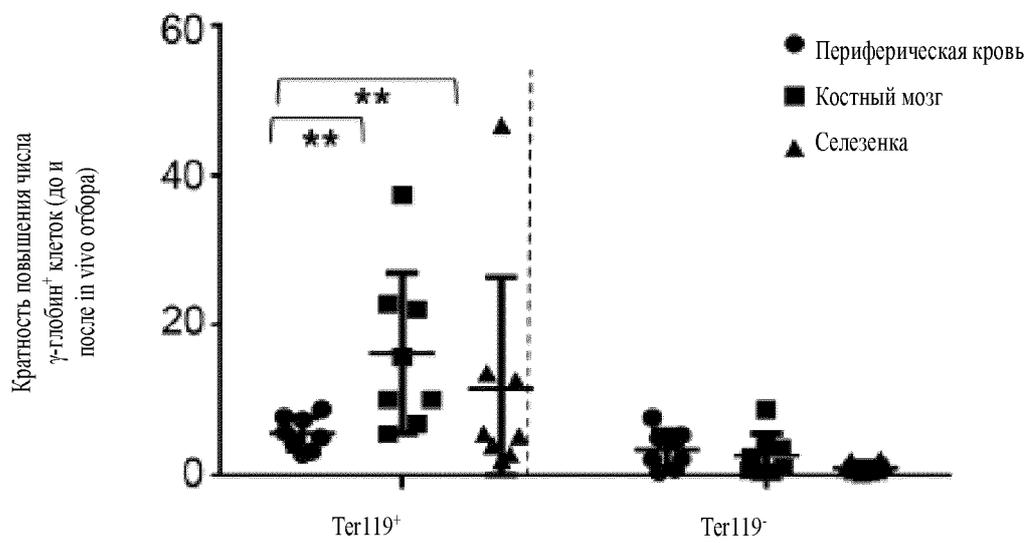


25/350

Фиг. 14С

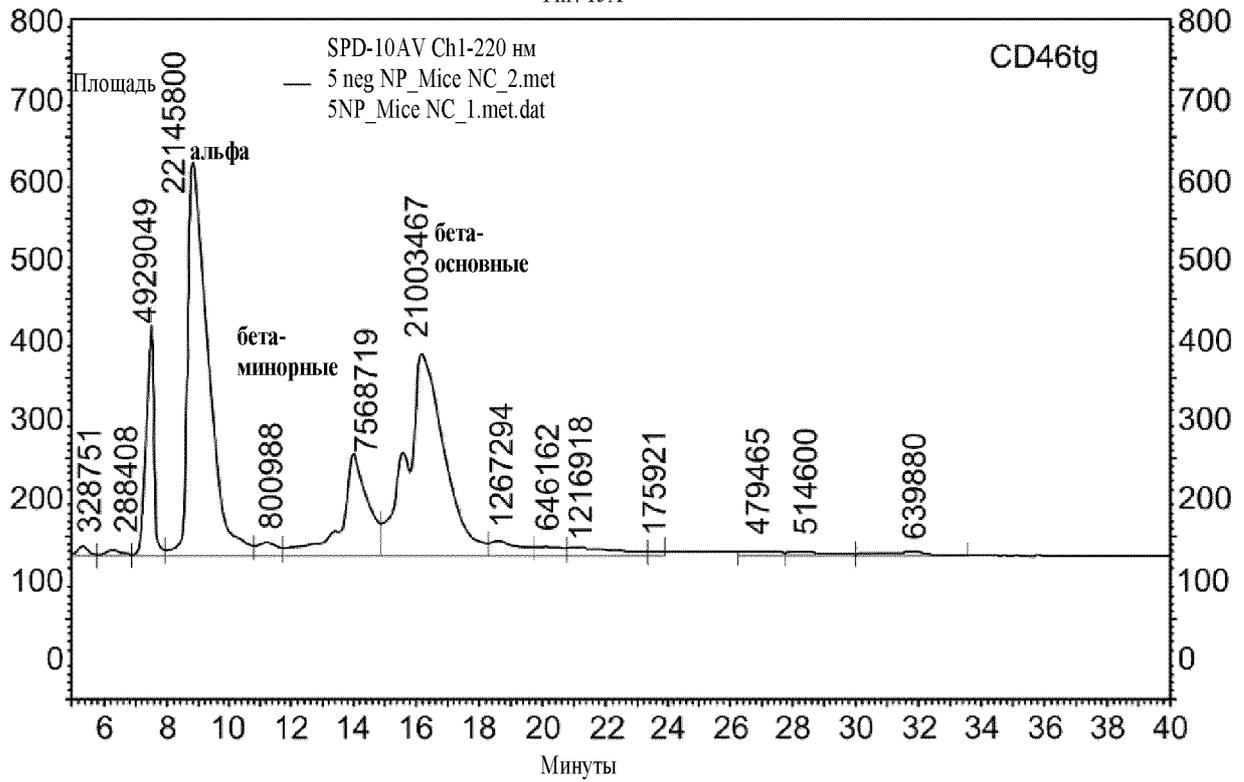


Фиг. 14D

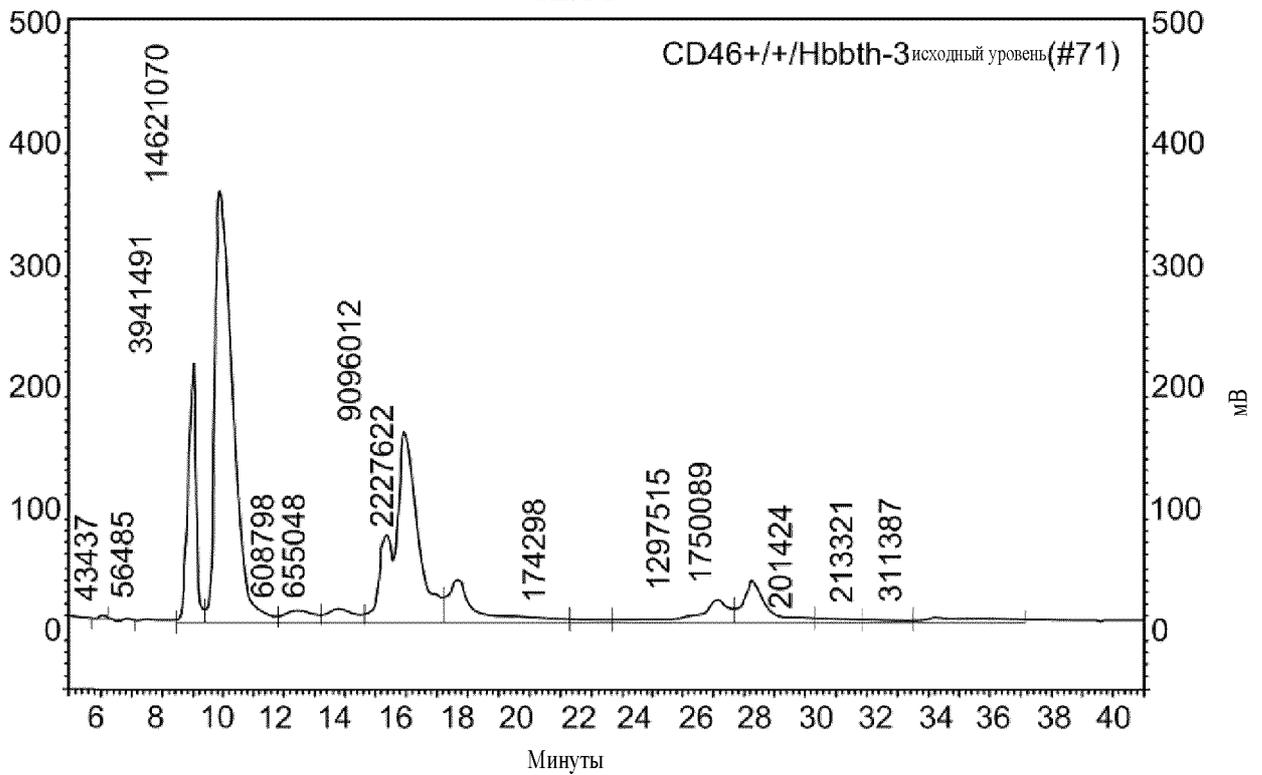


27/350

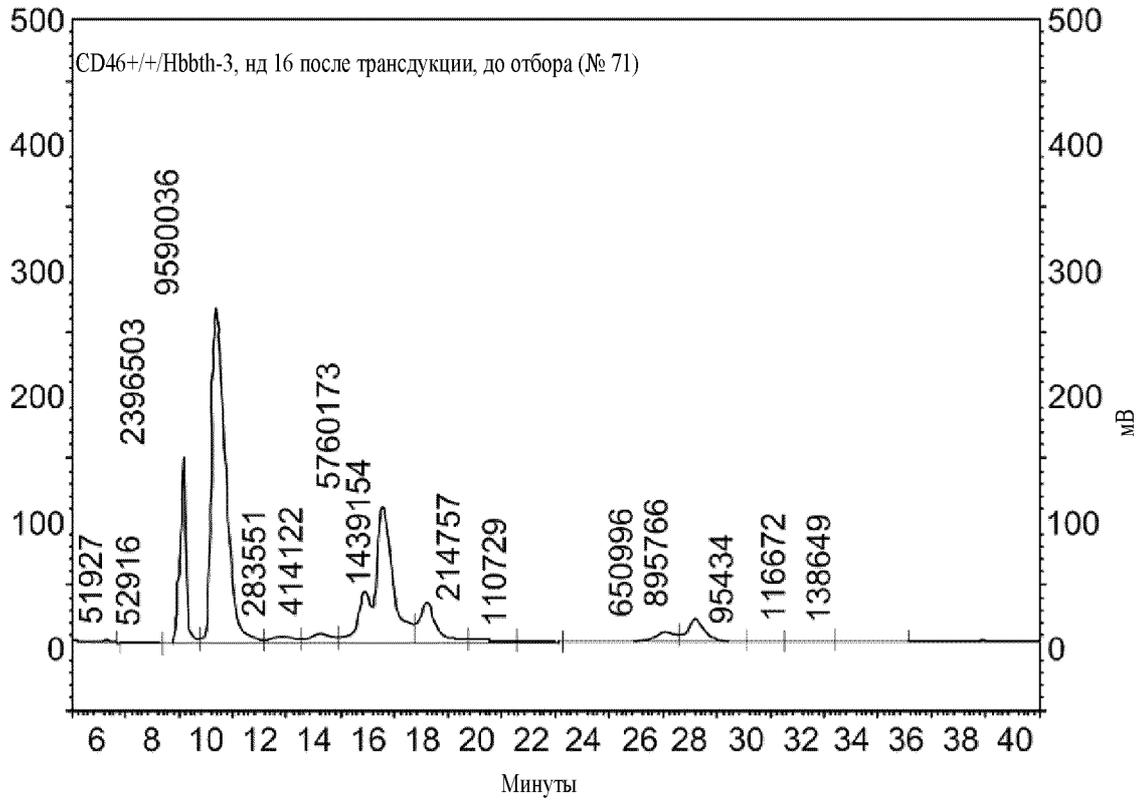
Фиг. 15А



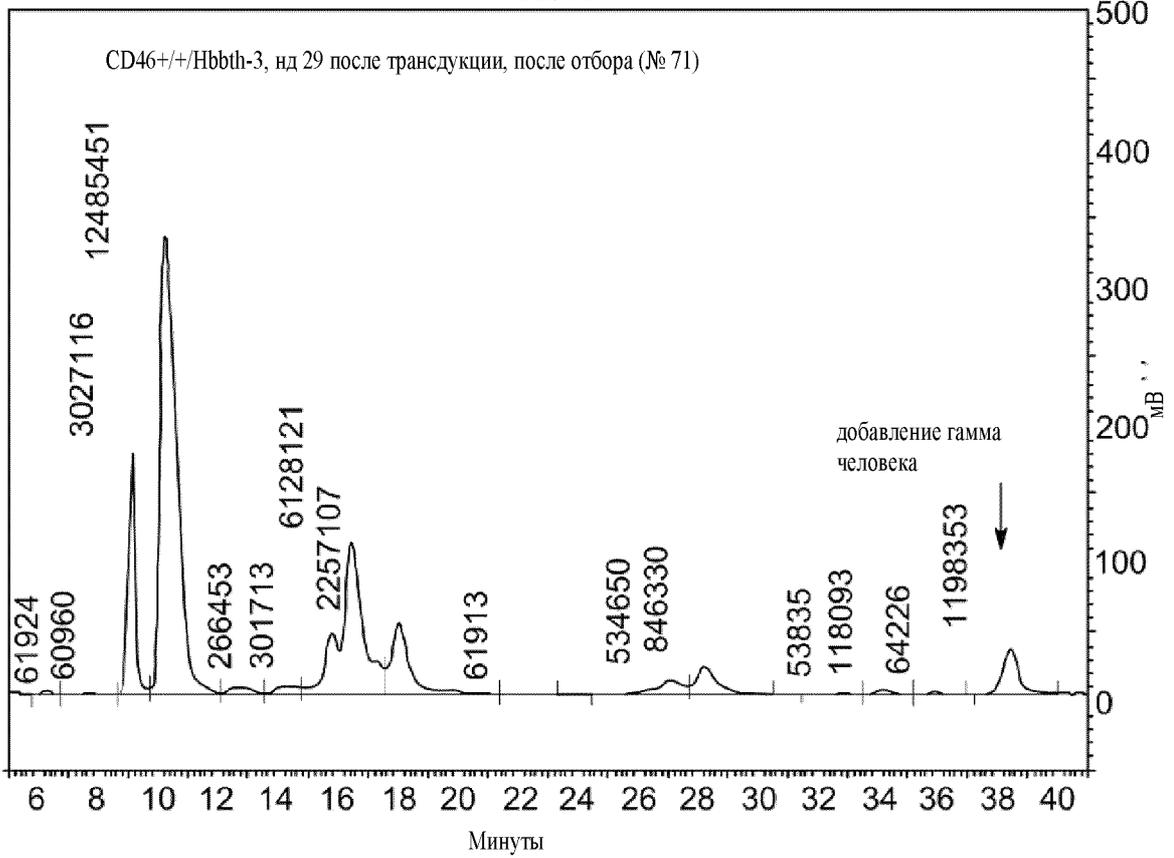
Фиг. 15В



Фиг. 15С

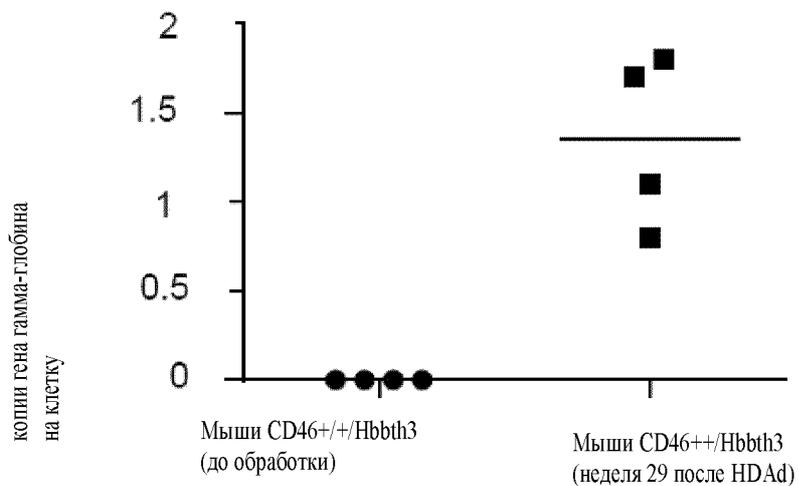


Фиг. 15D

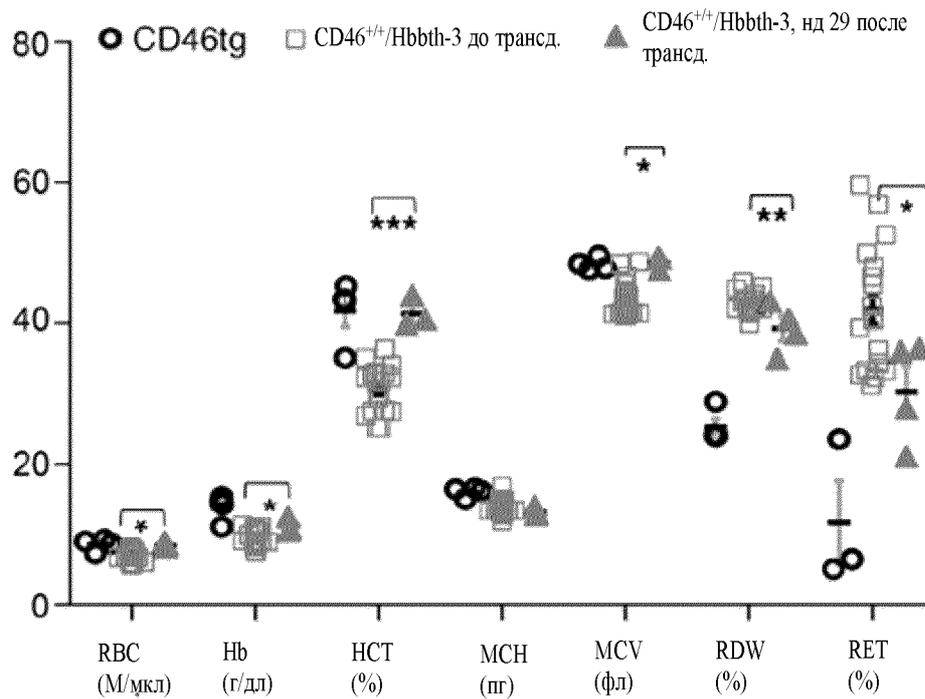


29/350

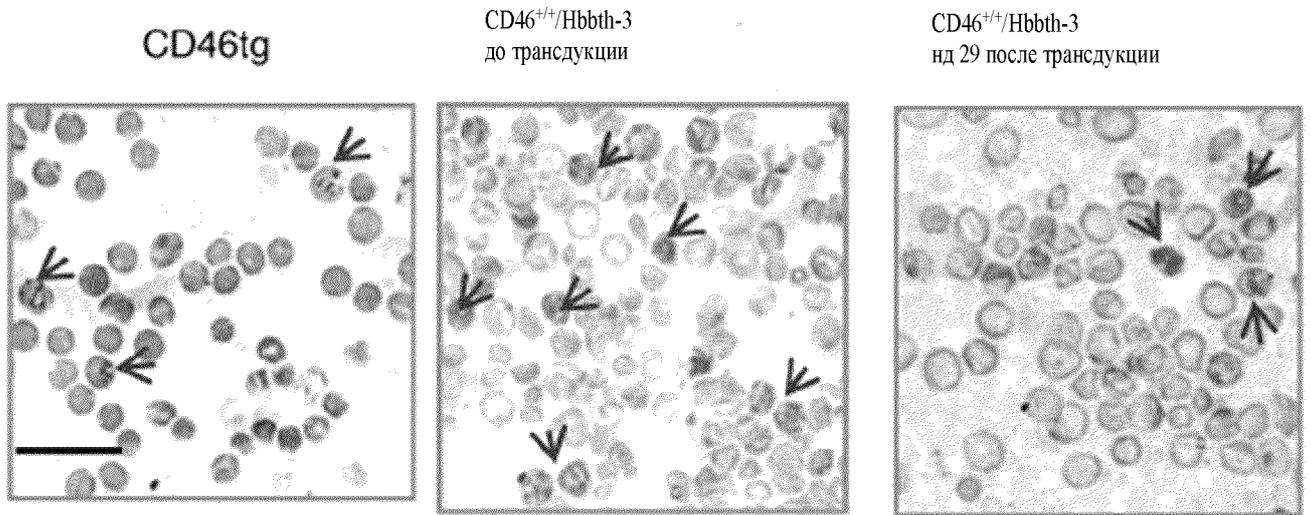
Фиг. 16



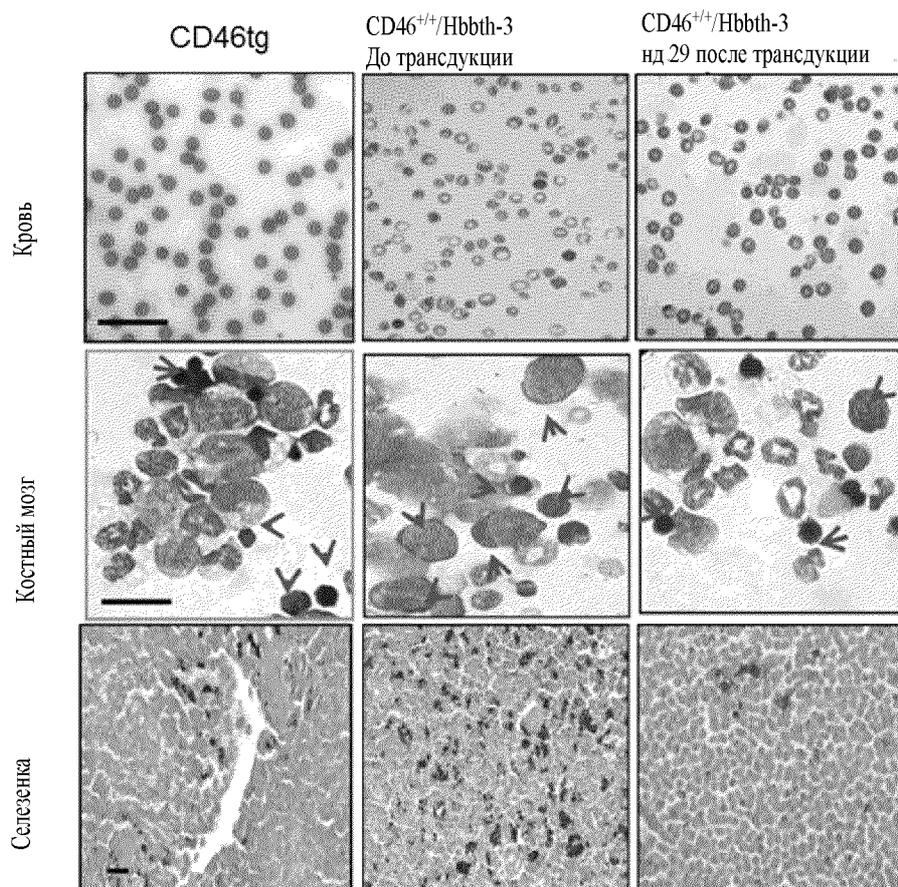
Фиг. 17А



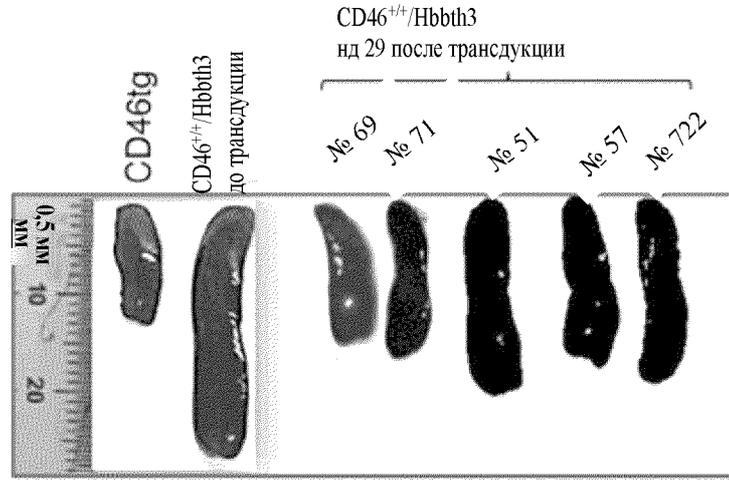
Фиг. 17В



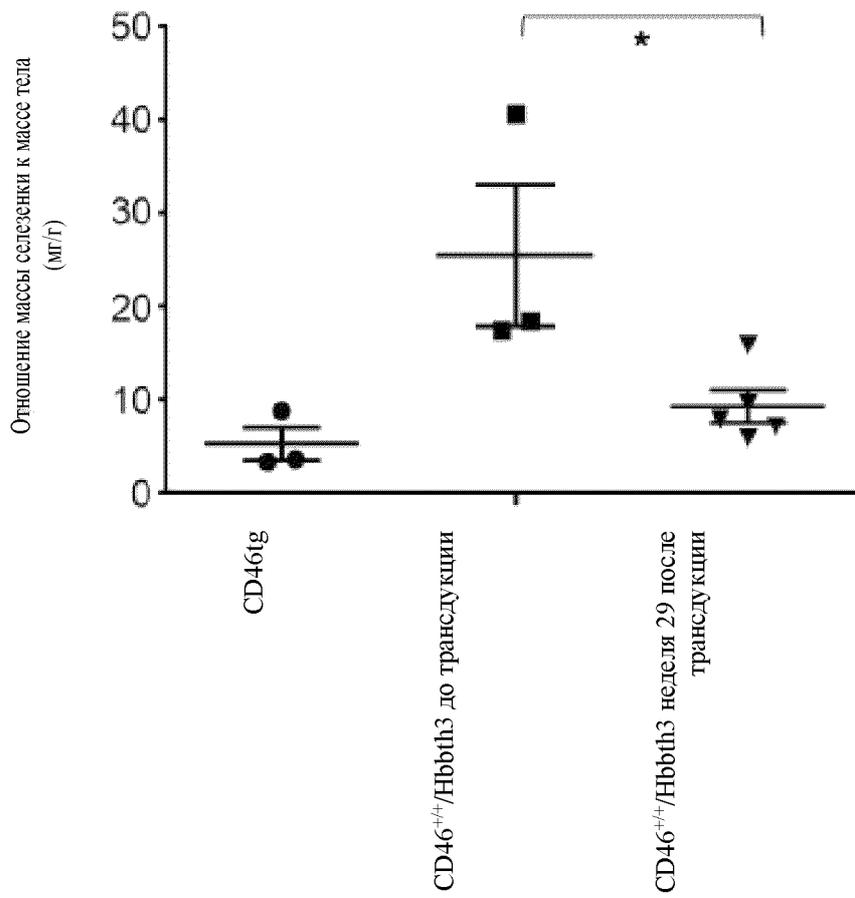
Фиг. 17С



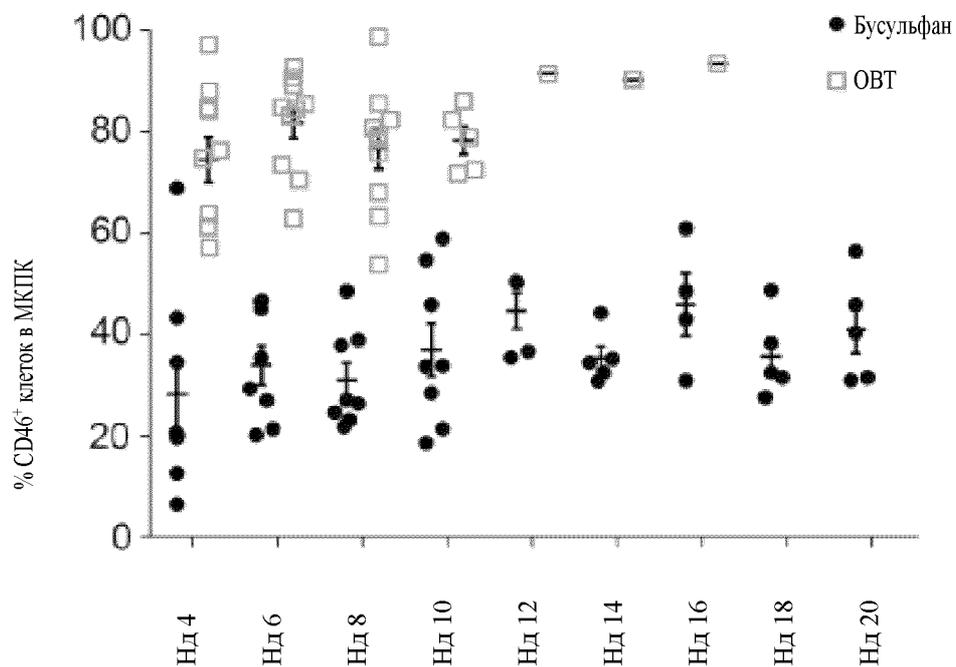
Фиг. 17D



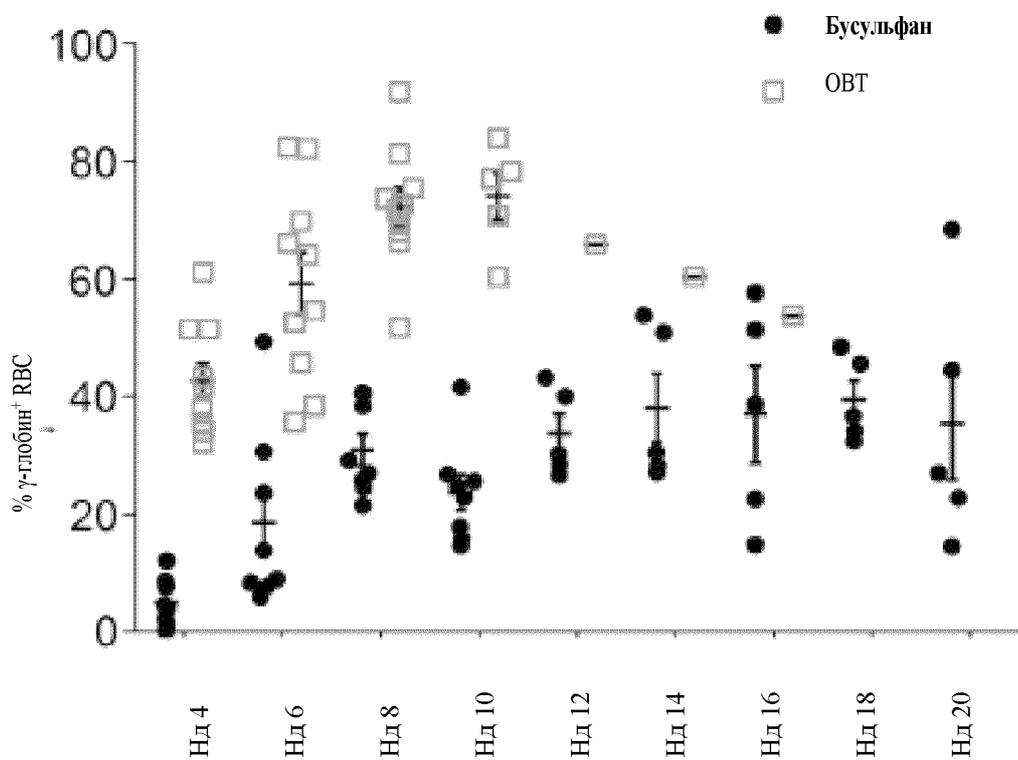
Фиг. 17E



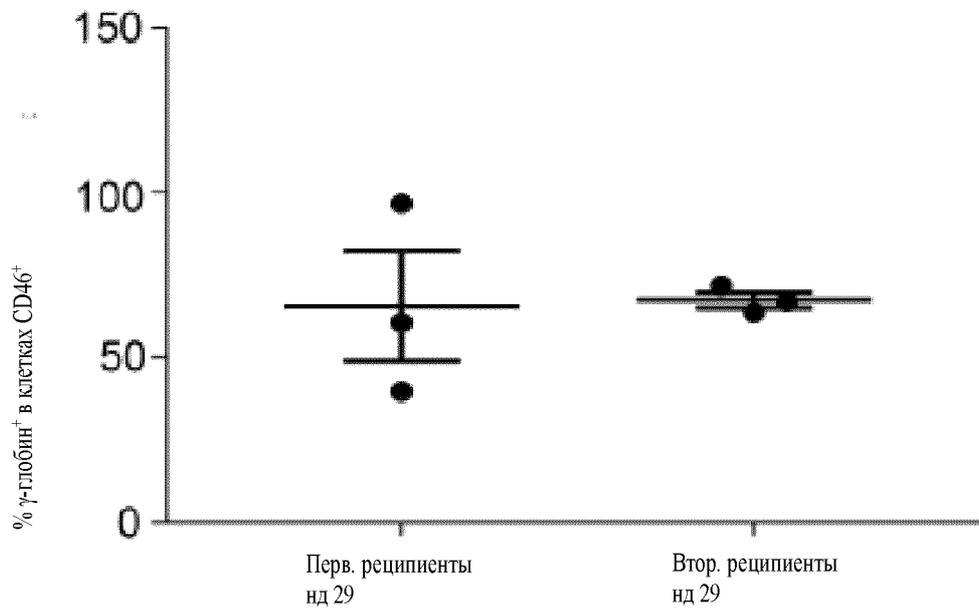
Фиг. 18А



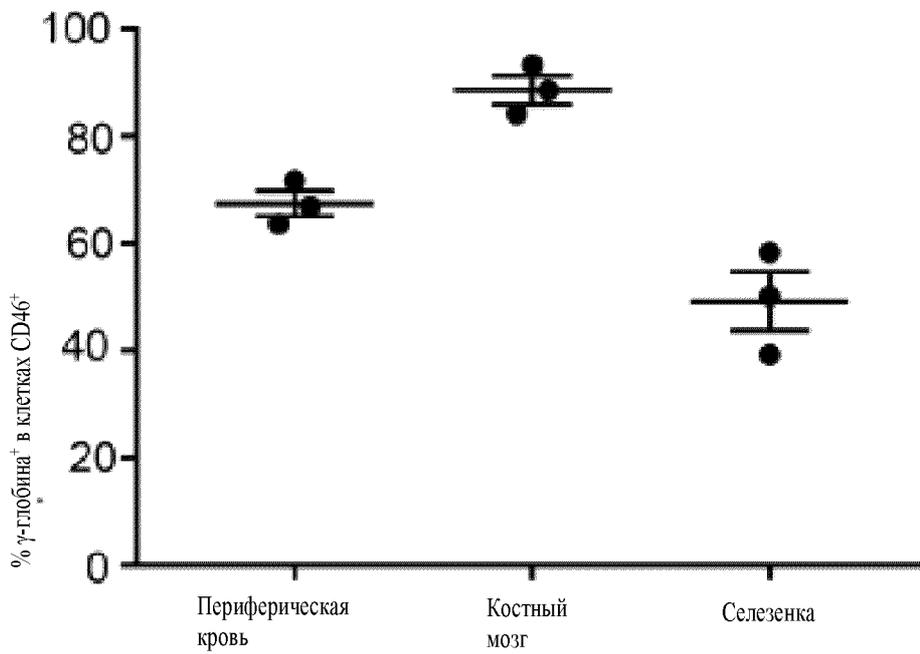
Фиг. 18В



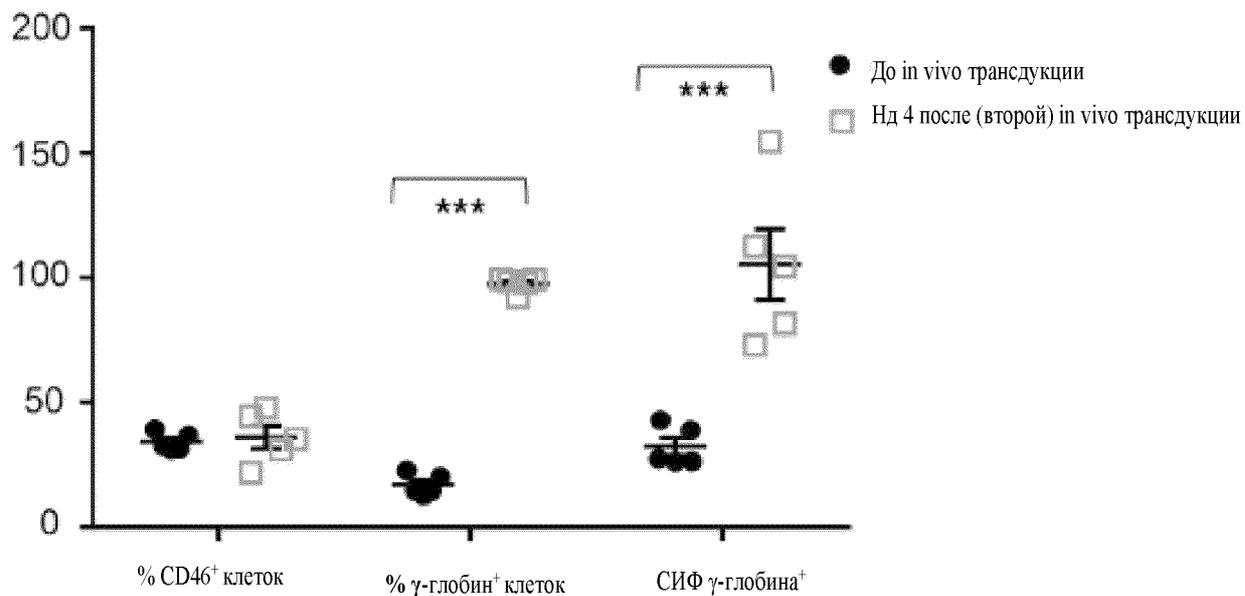
Фиг. 18С



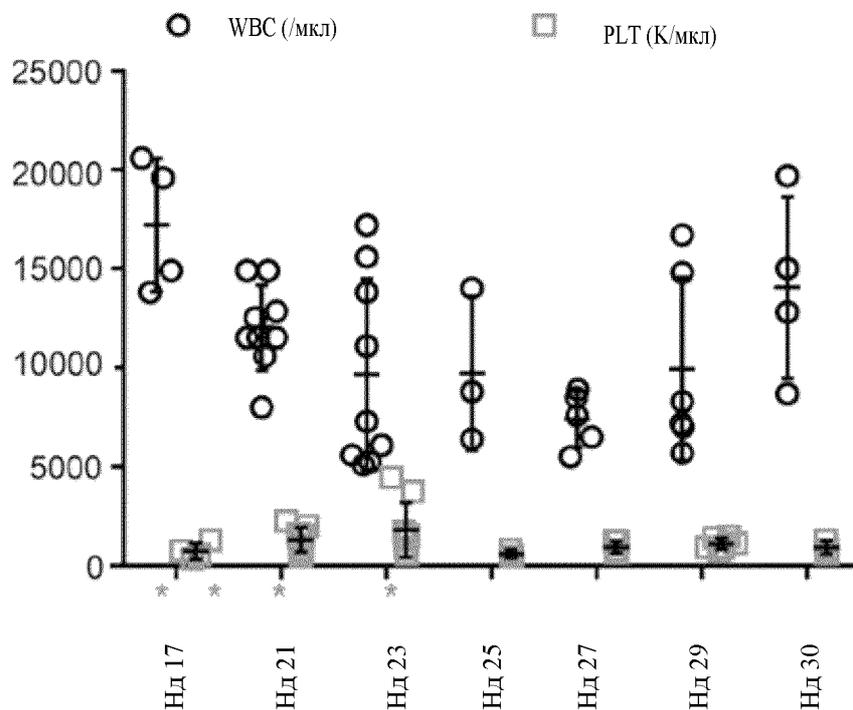
Фиг. 18D



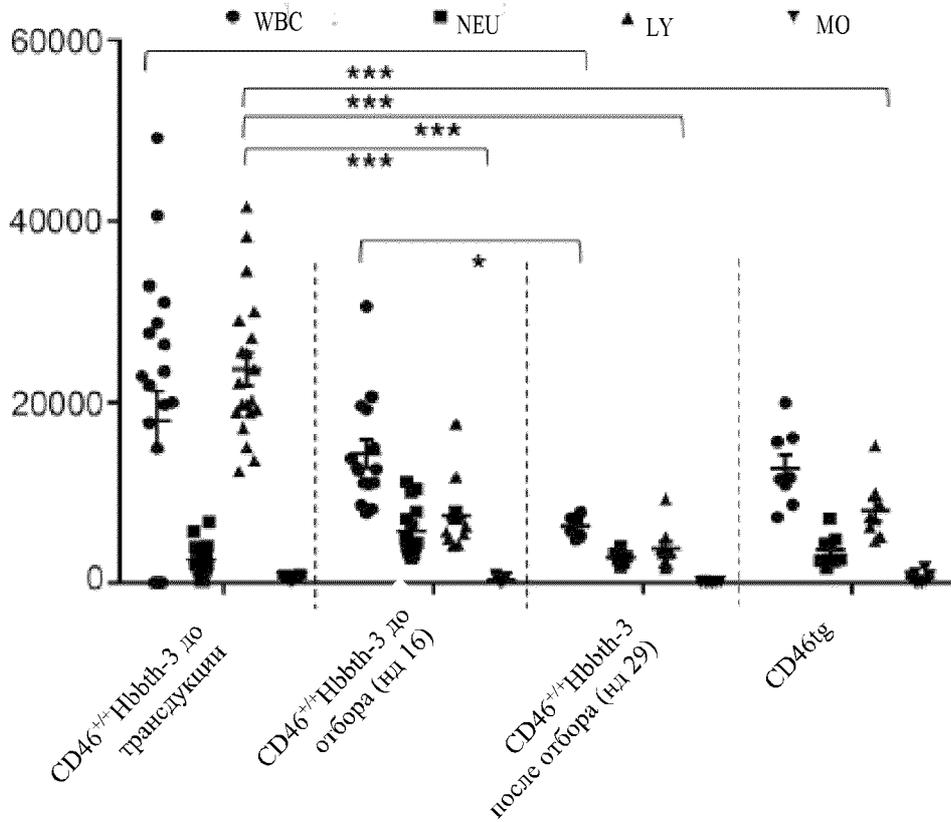
Фиг. 18Е



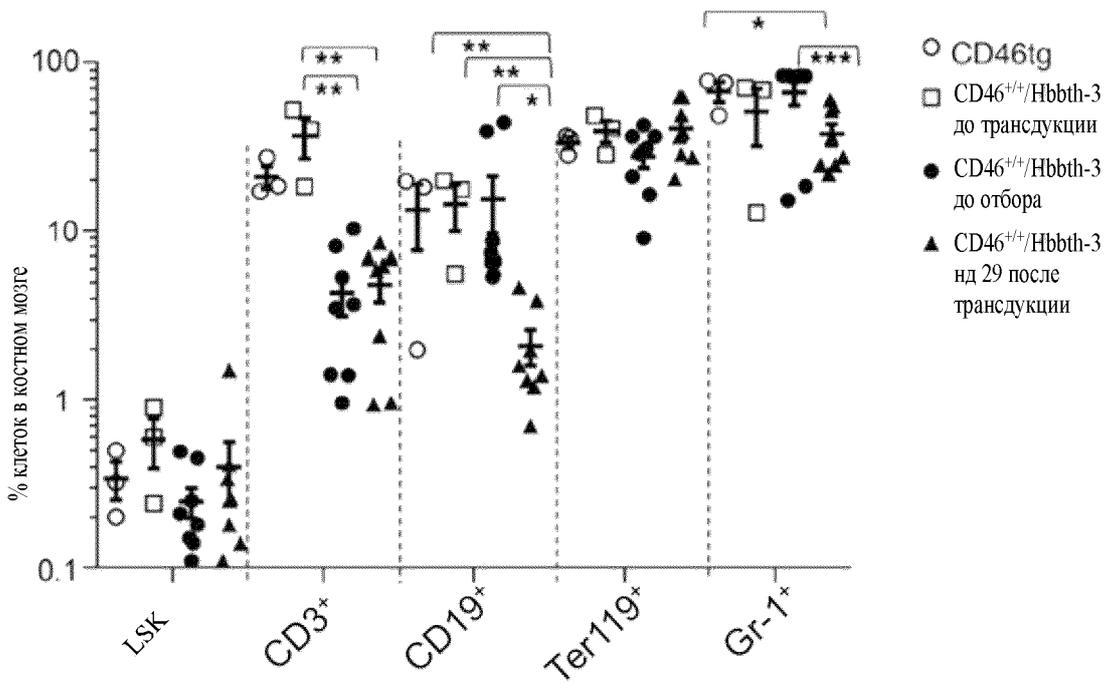
Фиг. 19А



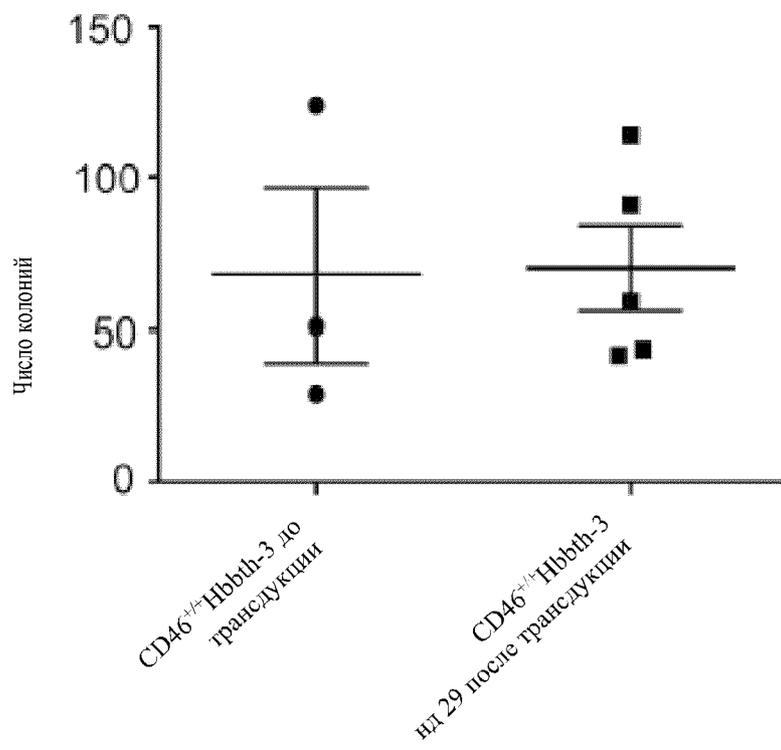
Фиг. 19В

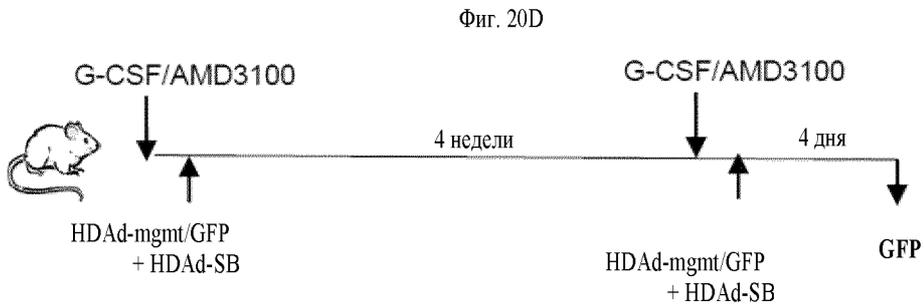
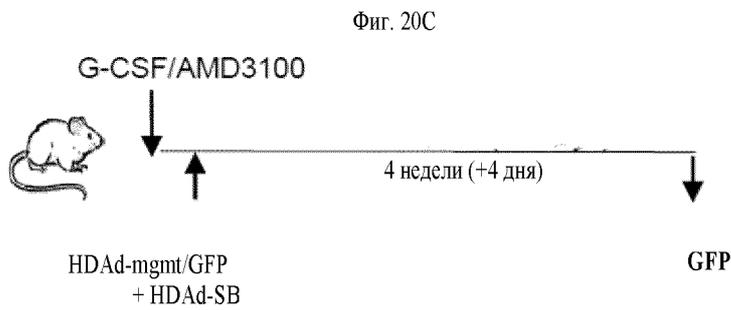
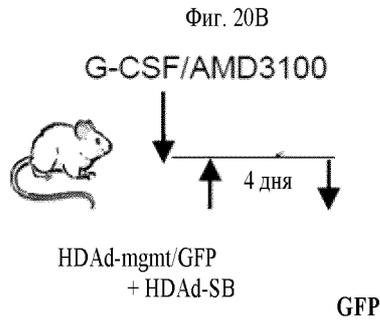
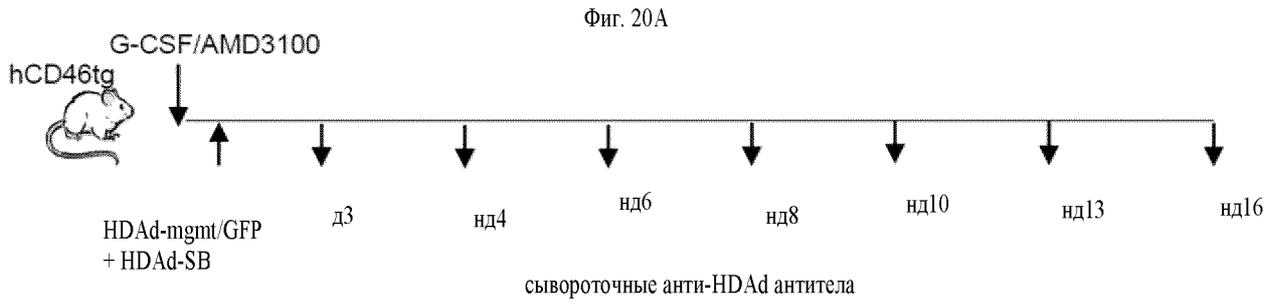


Фиг. 19С

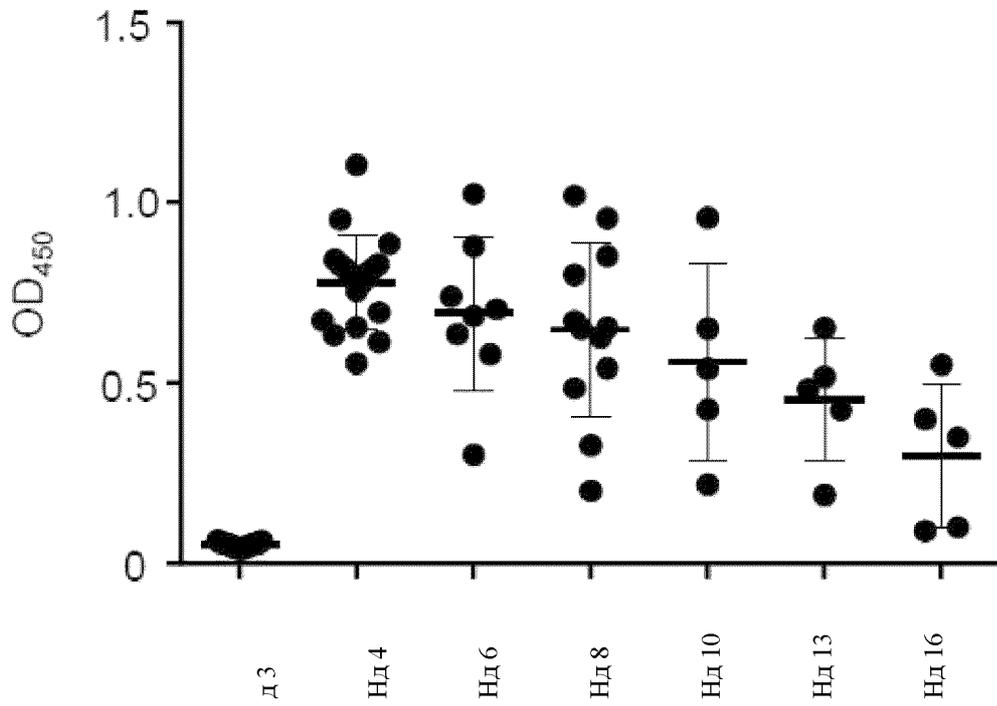


Фиг. 19D

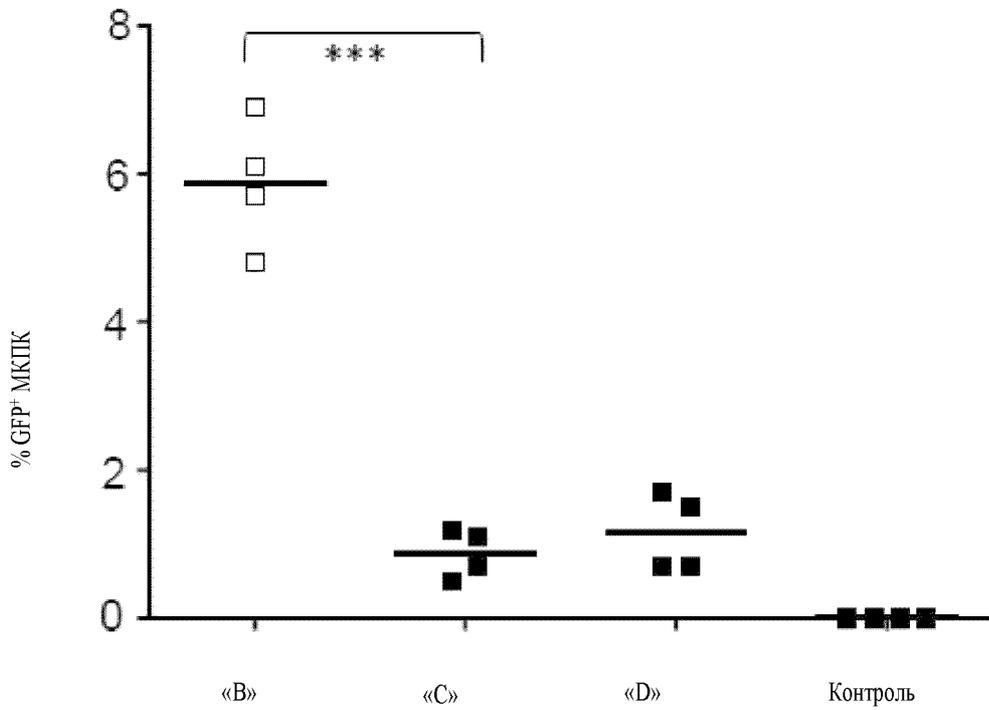




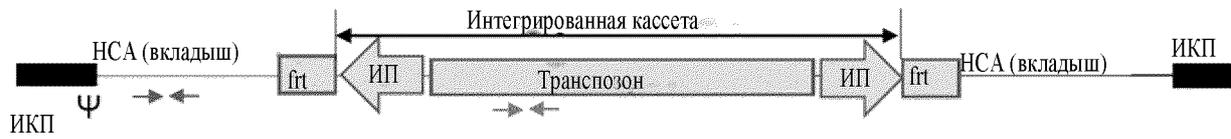
Фиг. 20E



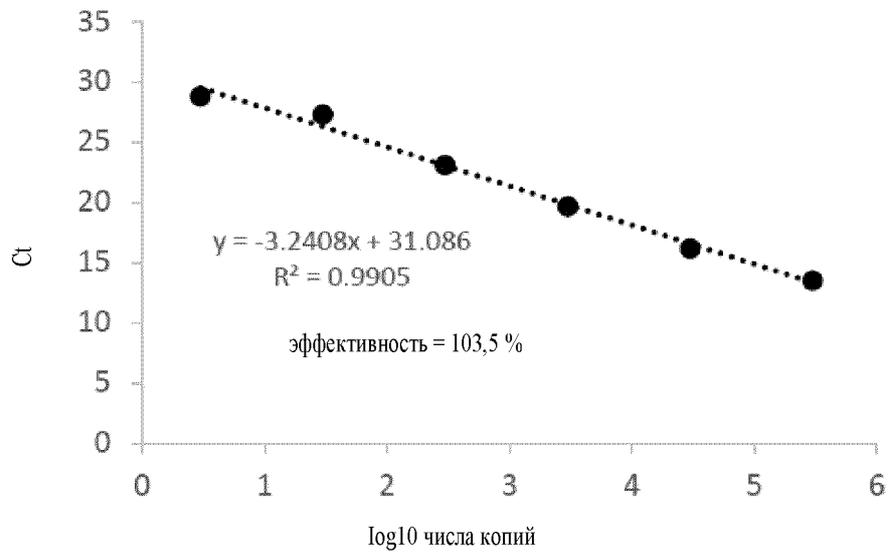
Фиг. 20F



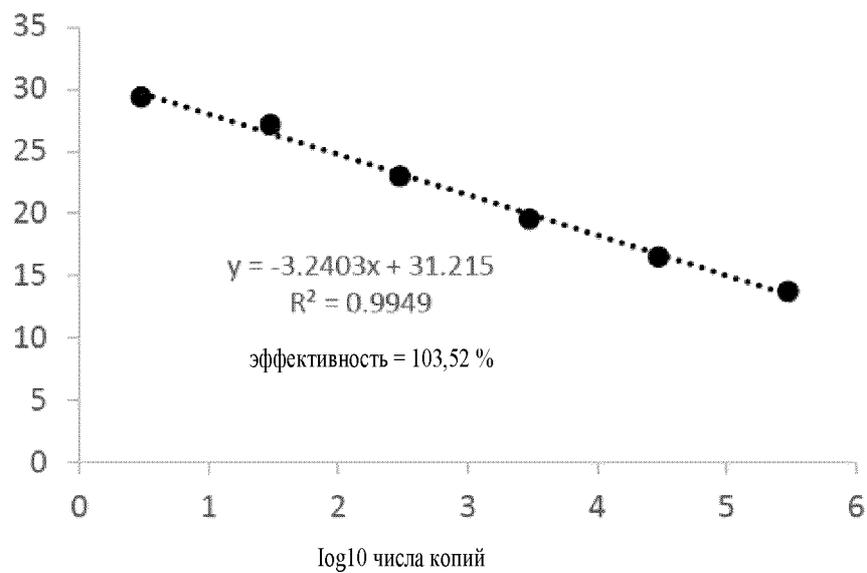
Фиг. 21А



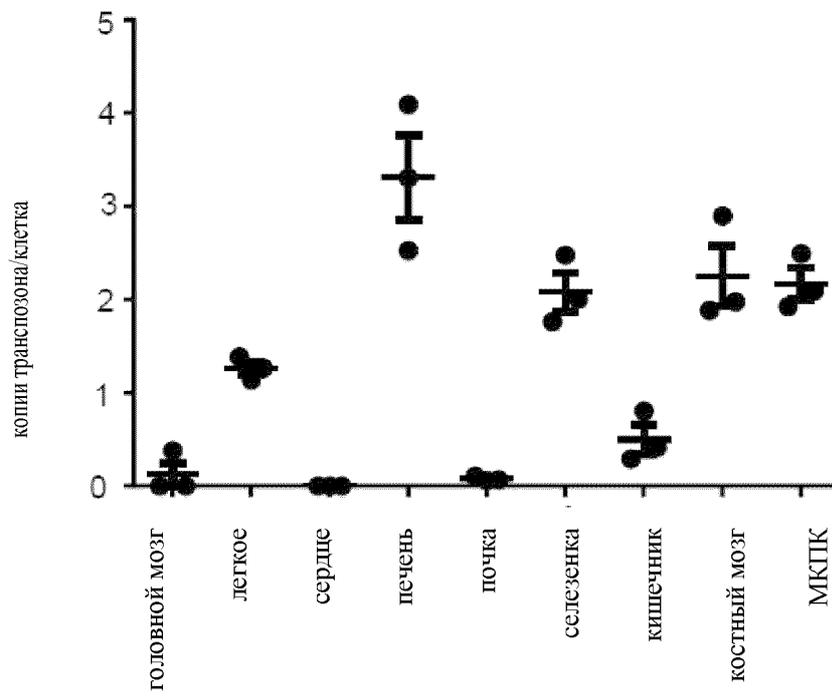
Фиг. 21В



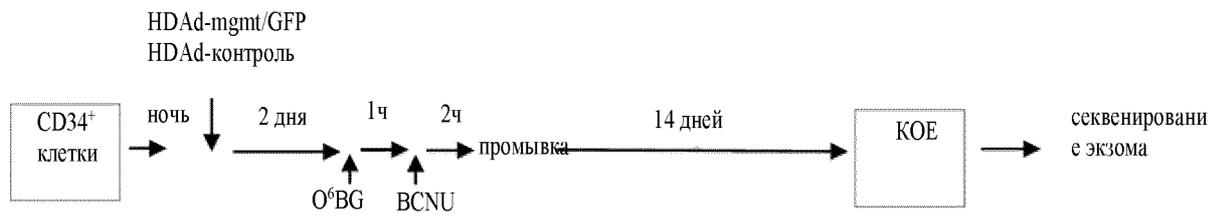
Фиг. 21С



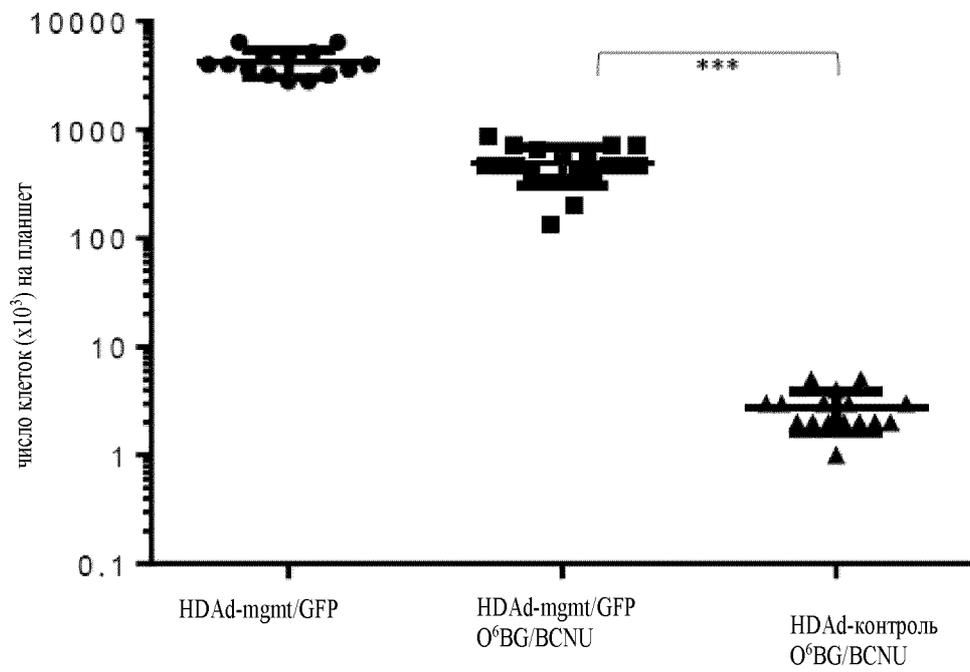
Фиг. 21D



Фиг. 22А

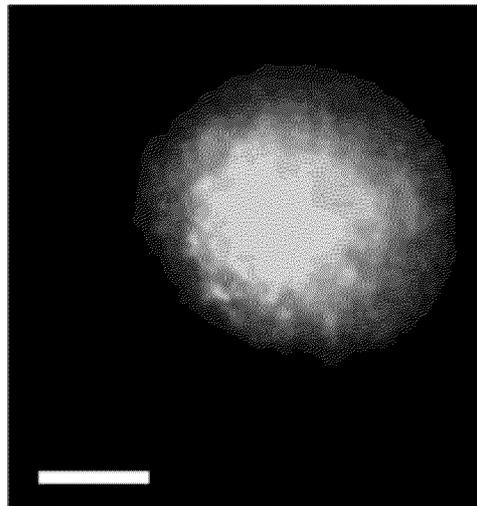
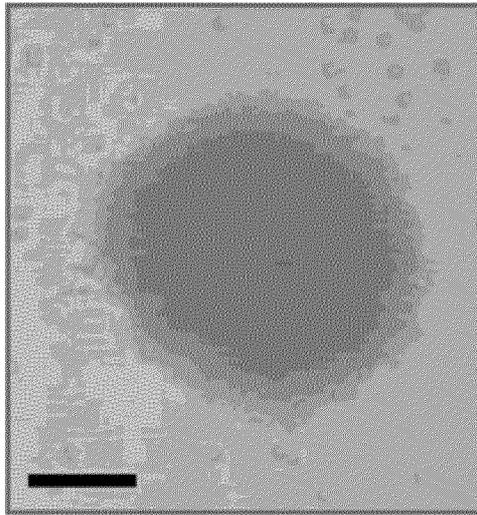


Фиг. 22В



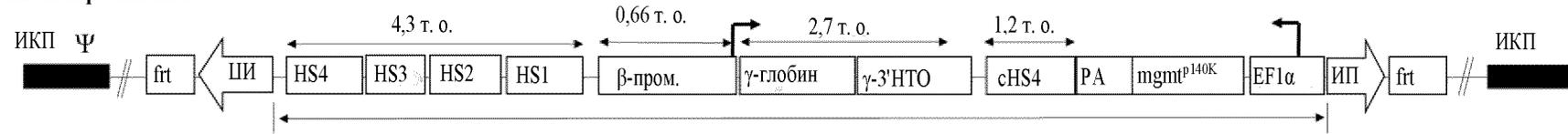
42/350

Фиг. 22С

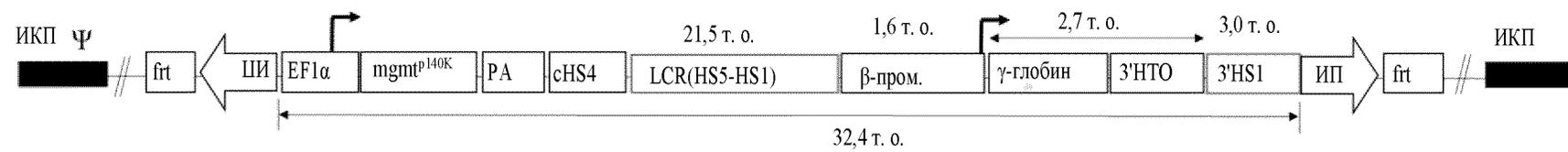


Фиг. 23

HDAd-короткая-LCR



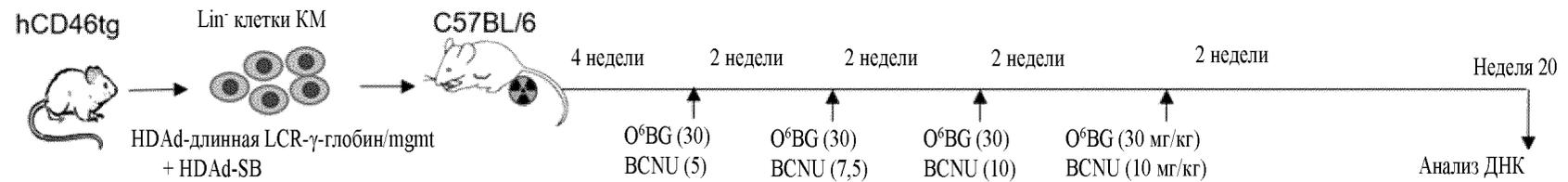
HDAd-длинная-LCR

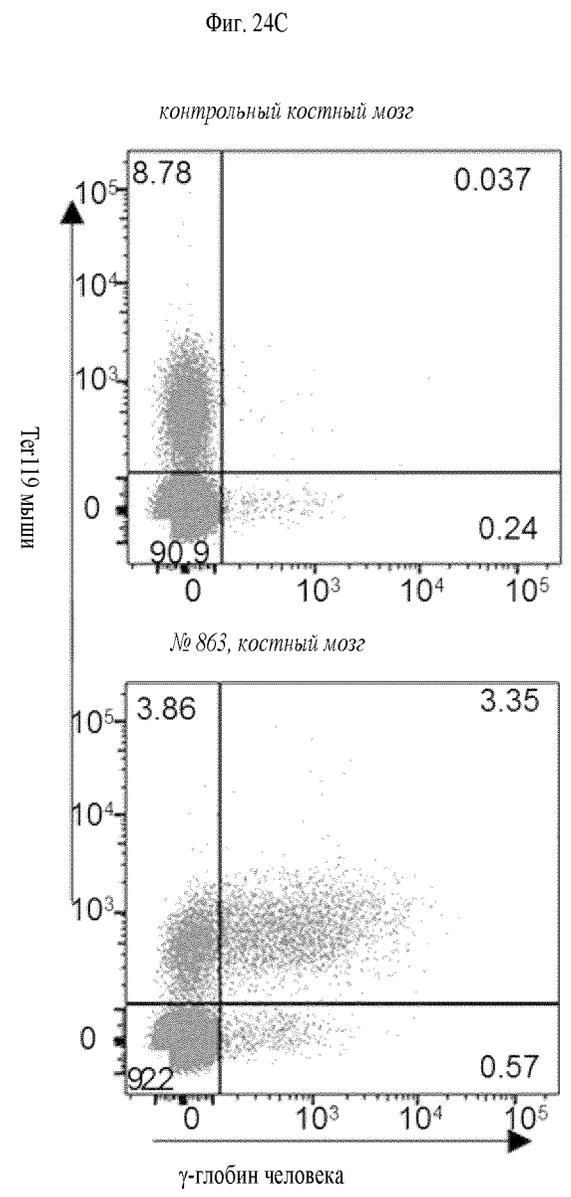
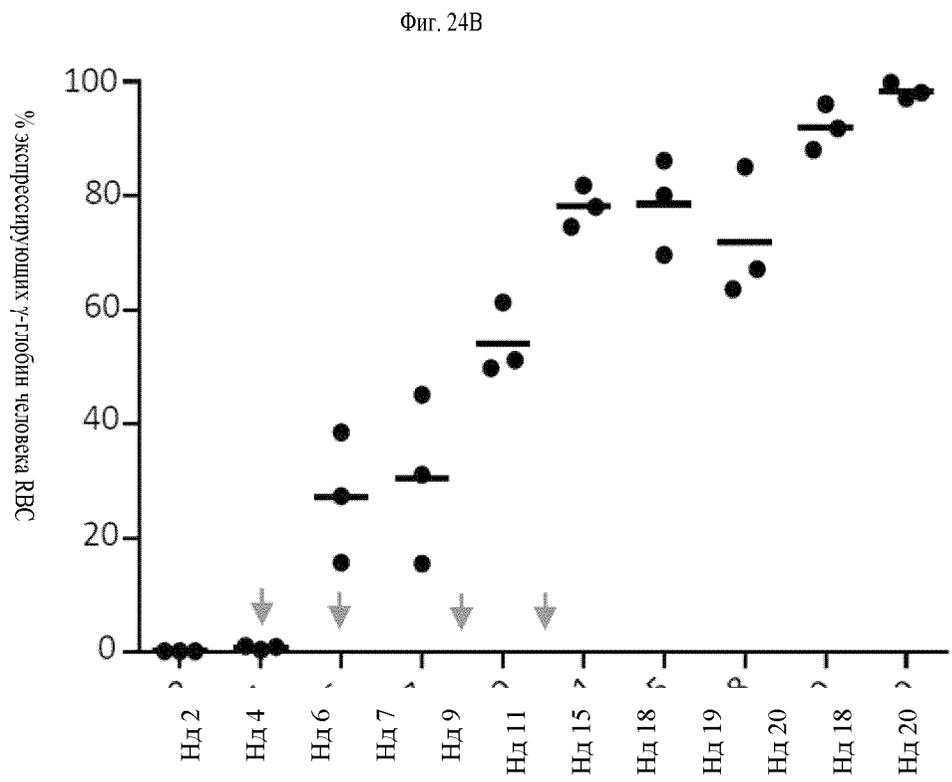


HDAd-SB

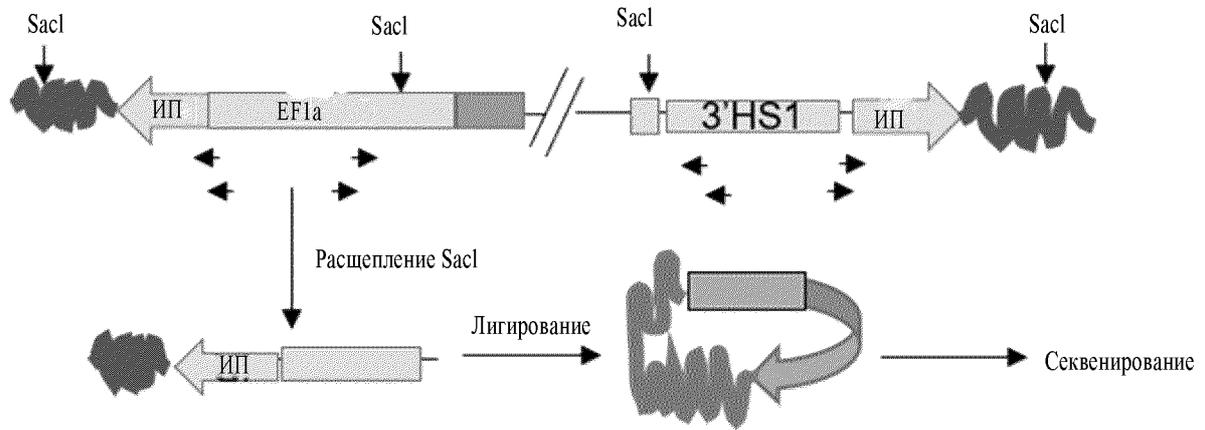


Фиг. 24А

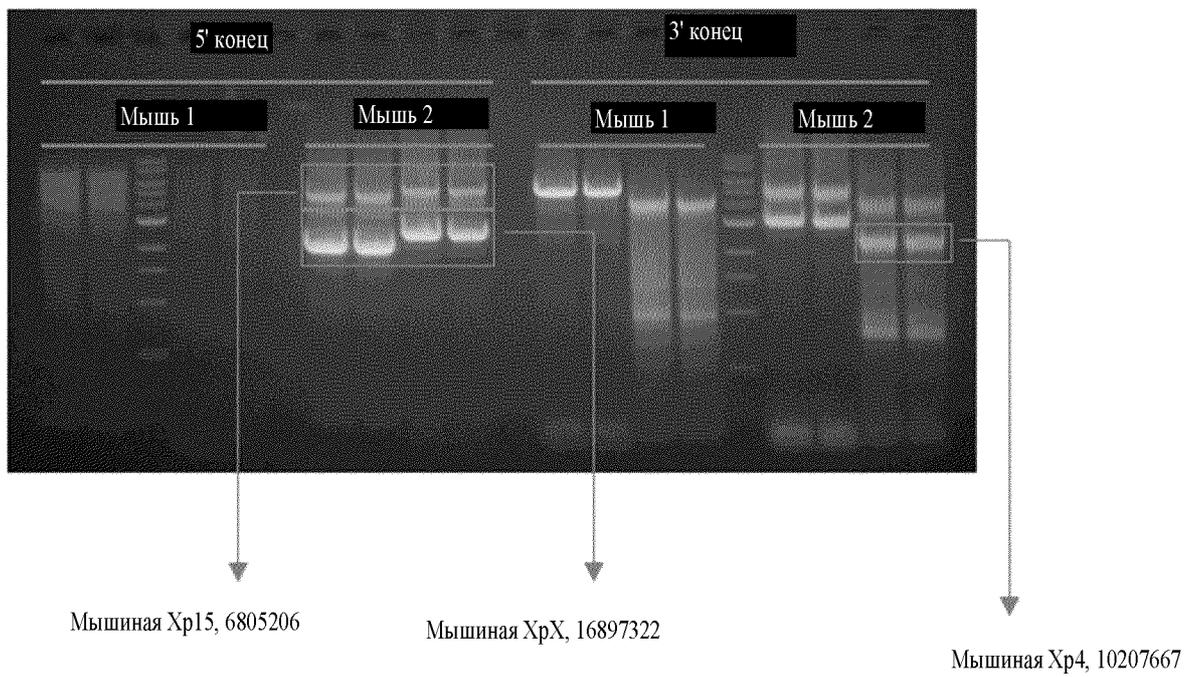




Фиг. 24D



Фиг. 24E



Фиг. 24F

CCCTGGGATTCCCCAAGGCAGGGGCGAGTCCTTTTGTATGAATTACTCAAATCGATAACTAGAACTTAATTAACAACGA
GATCTTATAATTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGACTTTCCACACCCTAGCTGACACAAGAATTTGAAATACATCCACAG
GTACACCTCCAATTGACTCAAATGATGTCAATTAGTCTATCATAATCTTCTAAAGCCATGACATCATTTTAACTGGAATT
TTCCAAGCTGTTTAAAGGCACAGTCAACTTAGTGTATGTAACTTCTGACCCACTGGAATTGTGATACAGTGAATTATAA
GTGAAATAATCTGTCTGTAAACAATTGTTGGAAAAATGACTTGTGTGCATGCACAAAGTAGATGTCCTAACTGACTTGCCA
AACTATFGTTTGTTAACAAGAAATTTGTGGAGTAGTTGAAAAACGAGTTTAAATGACTCCAACTTAAGTGTATGTAAAC
TTCCGACTTCAACTG [TA] AGAATGGCCCATTCATCTATAGTAGCACACAATATTTGCATTTGTGGACAGTATAAGGGACA
ATTATGCTATCAGGCATTTTCCAAAGTGAGTAATCGAAGTTTATACCTTTGTGTGCCATGTTTGCCTACCATGGTGGG
ATAATCTTACACGCGTTCTCGCGACCGGCCAGGAAAGACGCAACAAACCGGAATCTTCTGCGGCAAAAGCTTTATTCCTT

SEQ ID NO: 1

TAGAACTTAATTAACAACGAGATCTTATAATTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGACTTTCCACACCCTAGCTGACACAA
GAATTTGAAATACATCCACAGGTACACCTCCAATTGACTCAAATGATGTCAATTAGTCTATCATAATCTTCTAAAGCCAT
GACATCATTTTAACTGGAATTTTCCAAGCTGTTTAAAGGCACAGTCAACTTAGTGTATGTAACTTCTGACCCACTGGAA
TTGTGATACAGTGAATTATAAGTGAATAATCTGTCTGTAAACAATTGTTGGAAAAATGACTTGTGTGCATGCACAAAGTA
GATGTCCTAACTGACTTGCCAAAACCTATTGTTTGTAAACAAGAAATTTGTGGAGTAGTTGAAAAACGAGTTTAAATGACT
CCAACTTAAGTGTATGTAACTTCCGACTTCAACTG [TA] CAAGTAGACCAAATATCCATATACATAAAAGAAAAAATAGA
AAAAATTTCTAGTGACAGAAAAATGACAAAGAACATACTGCTTTATTACTACTATTAAGATGTTTGCCTTCCATTACACTC
ATATGAGTCATGATATTTTTTCTTCATTTTTTCTANTNNCACTNGAAAT

SEQ ID NO: 2

GTTGCTAGGAATGAGCCAAATTCATCTGTATTAAACAGTGGGAGCTTGTGGAAGGCTACTCGAAATGTTTGAACCAAGTT
AAACAATTTAAAGGCAATGCTACCAAATACTAATTGAGTGTATGTTAACTTCTGACCCACTGGGAATGTGATGAAAGAAA
TAAAAGCTGAAATGAATCATTCTCTCTACTATTATTCTGATATTTACATCTTAAAATAAAGTGGTGATCCTAACTGAC
CTTAAGACAGGGAATCTTACTCGGATTAATGTCAGGAATGTGAAAAAGTGAGTTTAAATGTATTTGGCTAAGGTGTA
TGTAACCTCCGACTTCAACTG [TA] TATCCTCCCCGTTGCACCCTCTTGATGATGCTGAGATGAACACAGATGCTCACTCC
TTGAGGGCTCTAAGCTTATGCTGACACAGACACAGGTGCTCACCTTCTATGAAATGGCCTAAGATTTGAGGACATCATGAGG
ACAAGTGTGATAAAATCTTGGAAACAACCTCCCAGAGGTCT

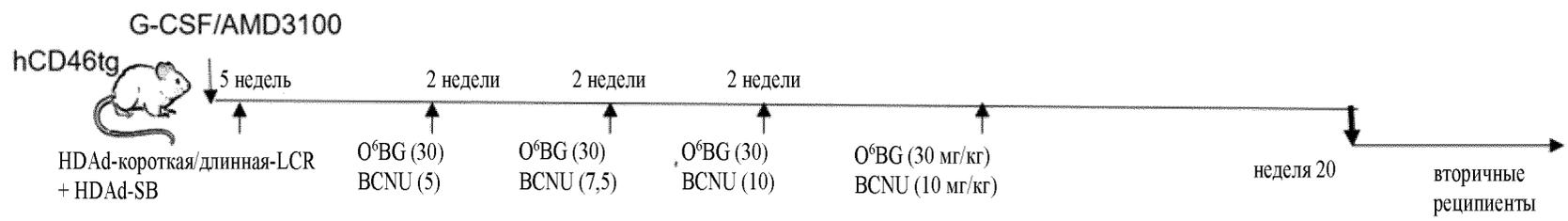
SEQ ID NO: 3

5' концевая векторная
последовательность ИП/ПП
последовательности
Sleeping beauty Интеграционное
соединение (xp15,
6805206)

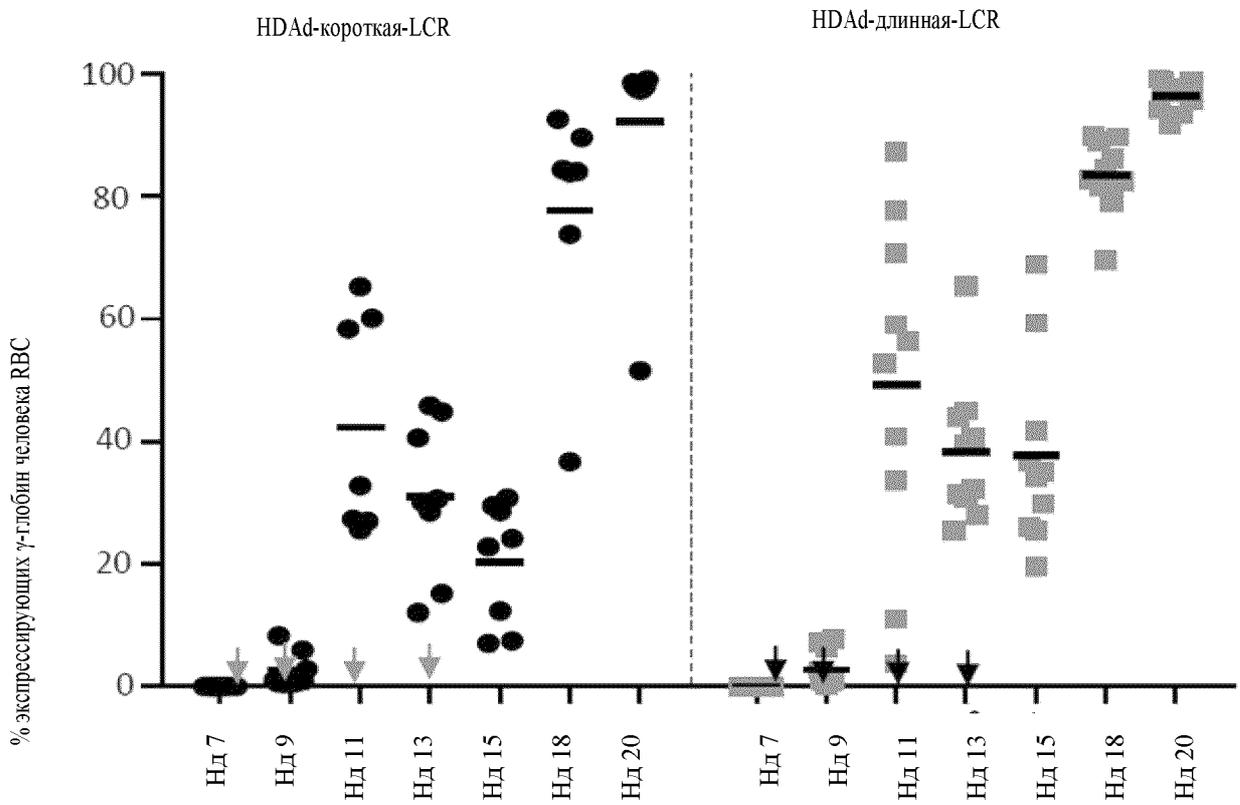
5' концевая векторная
последовательность ИП/ПП
последовательности
Sleeping beauty Интеграционное
соединение (xpX,
16897322)

3' концевая векторная
последовательность ИП/ПП
последовательности
Sleeping beauty Интеграционное
соединение (xp4,
10207667)

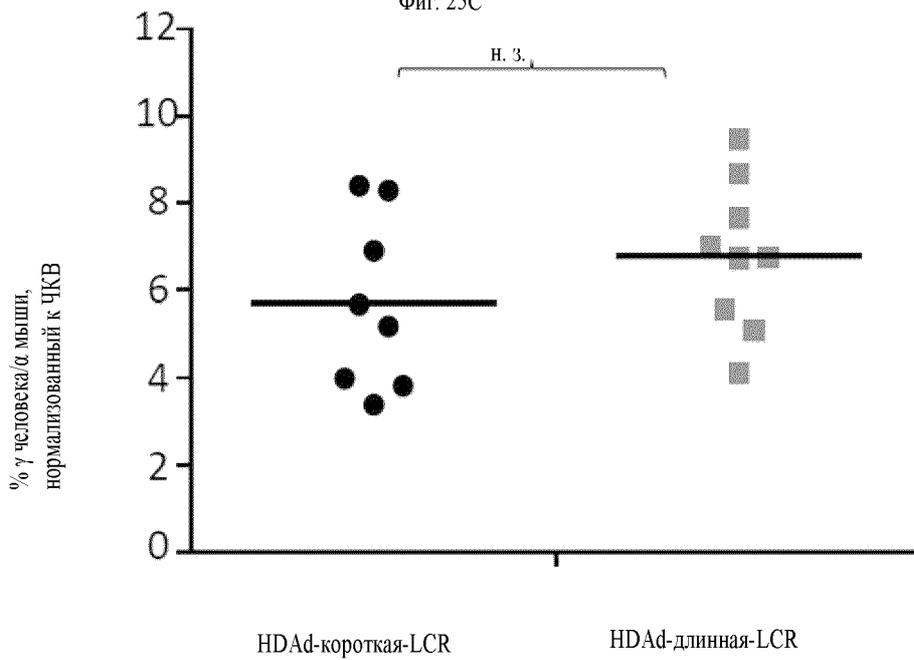
Фиг. 25А



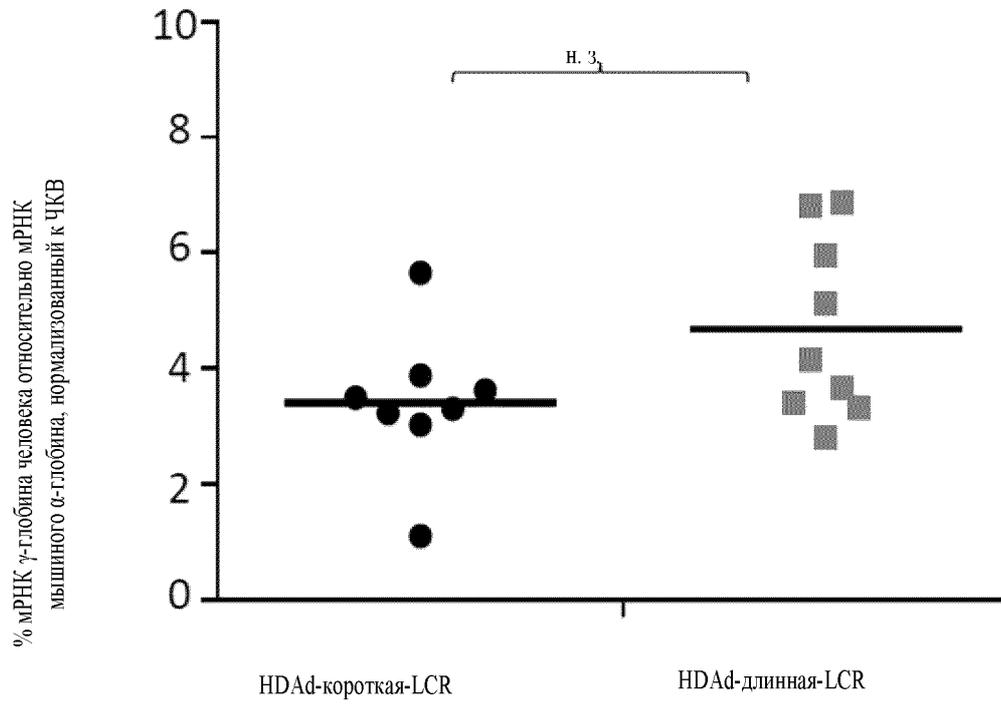
Фиг. 25В



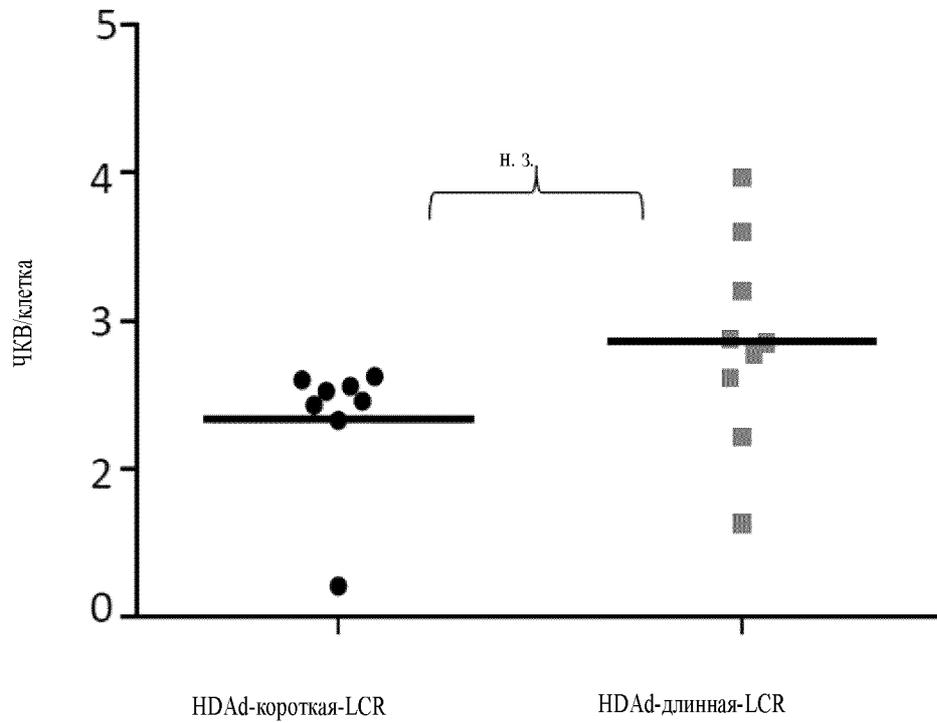
Фиг. 25С



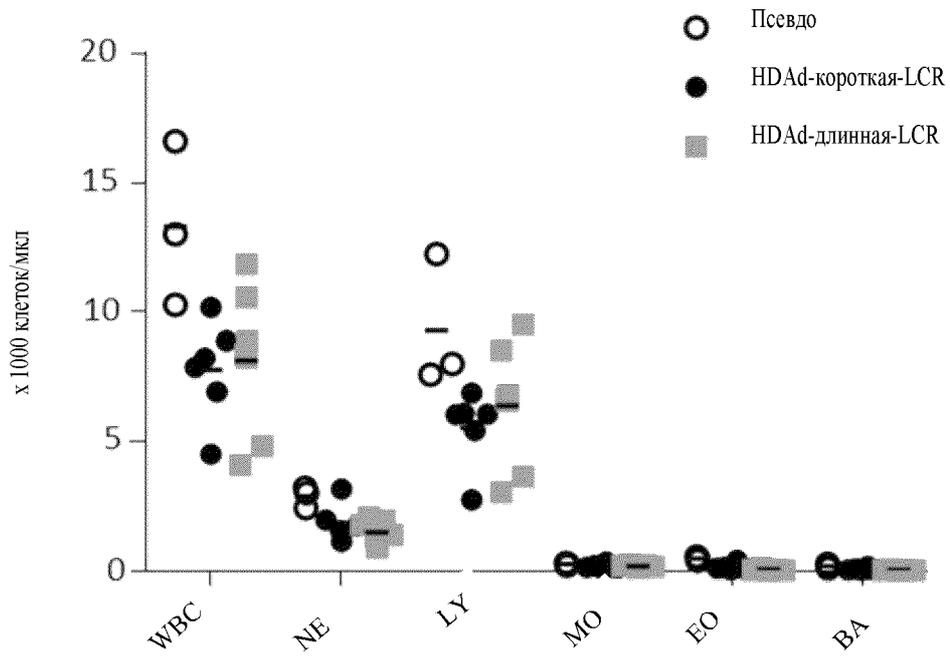
Фиг. 25D



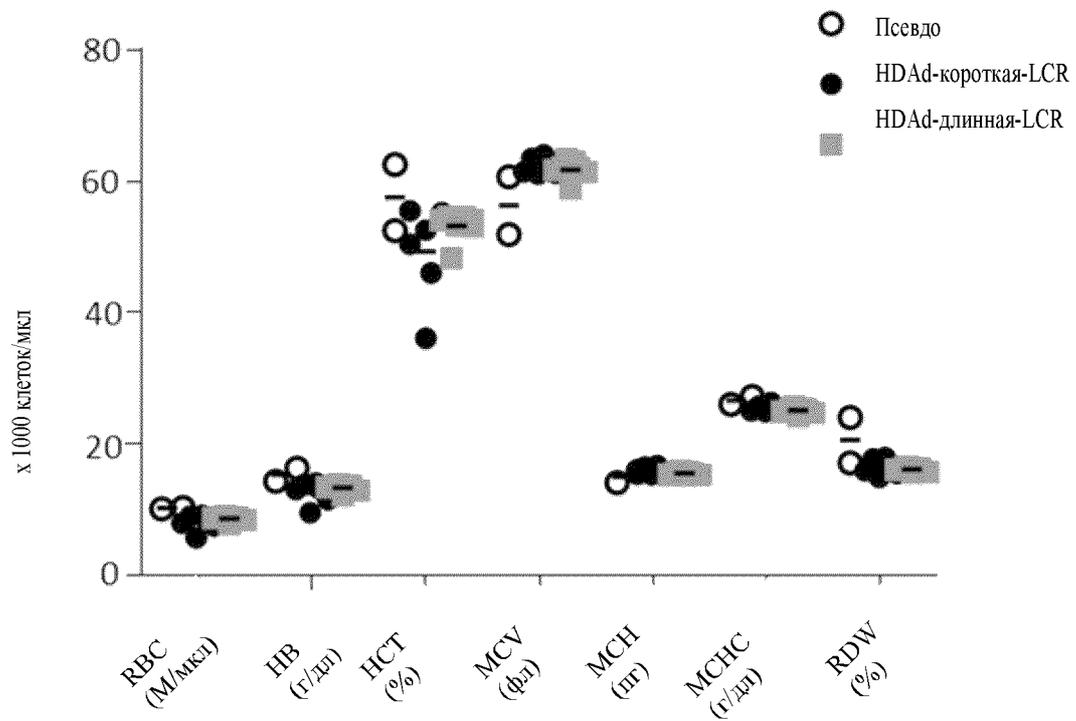
Фиг. 25E



Фиг. 26А

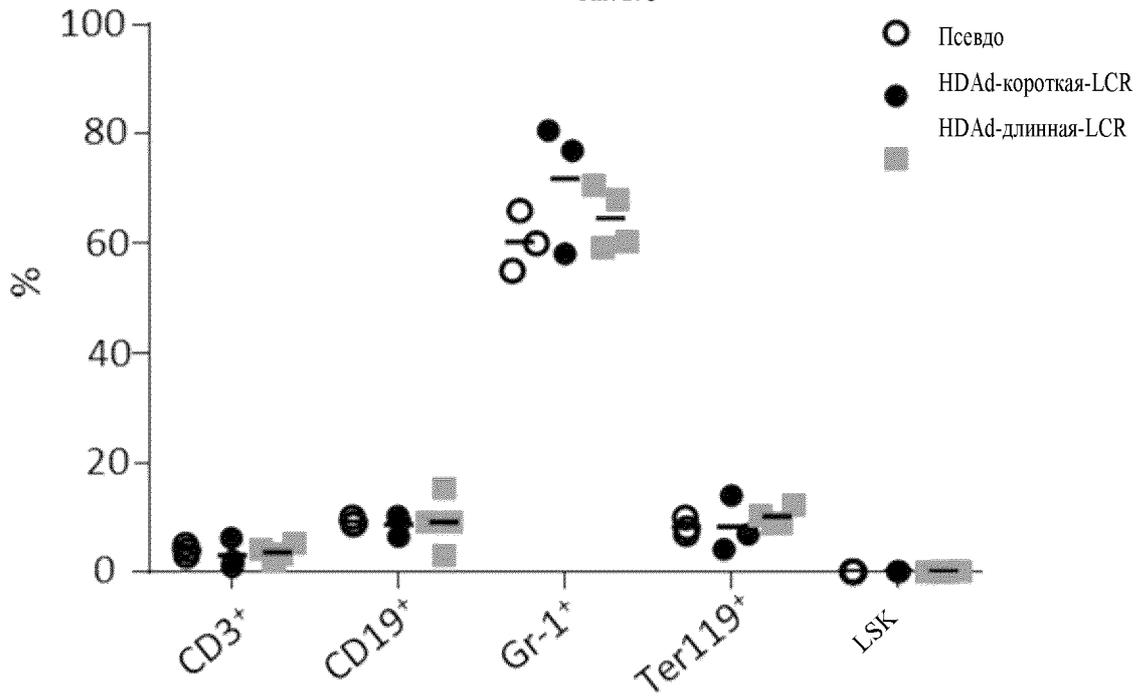


Фиг. 26В

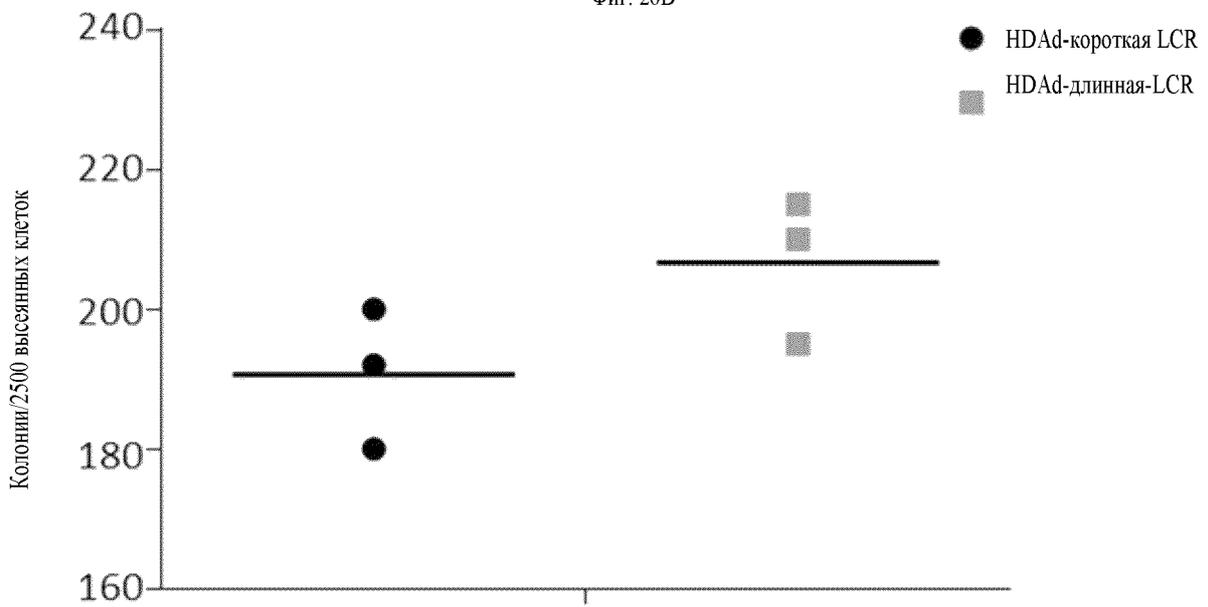


51/350

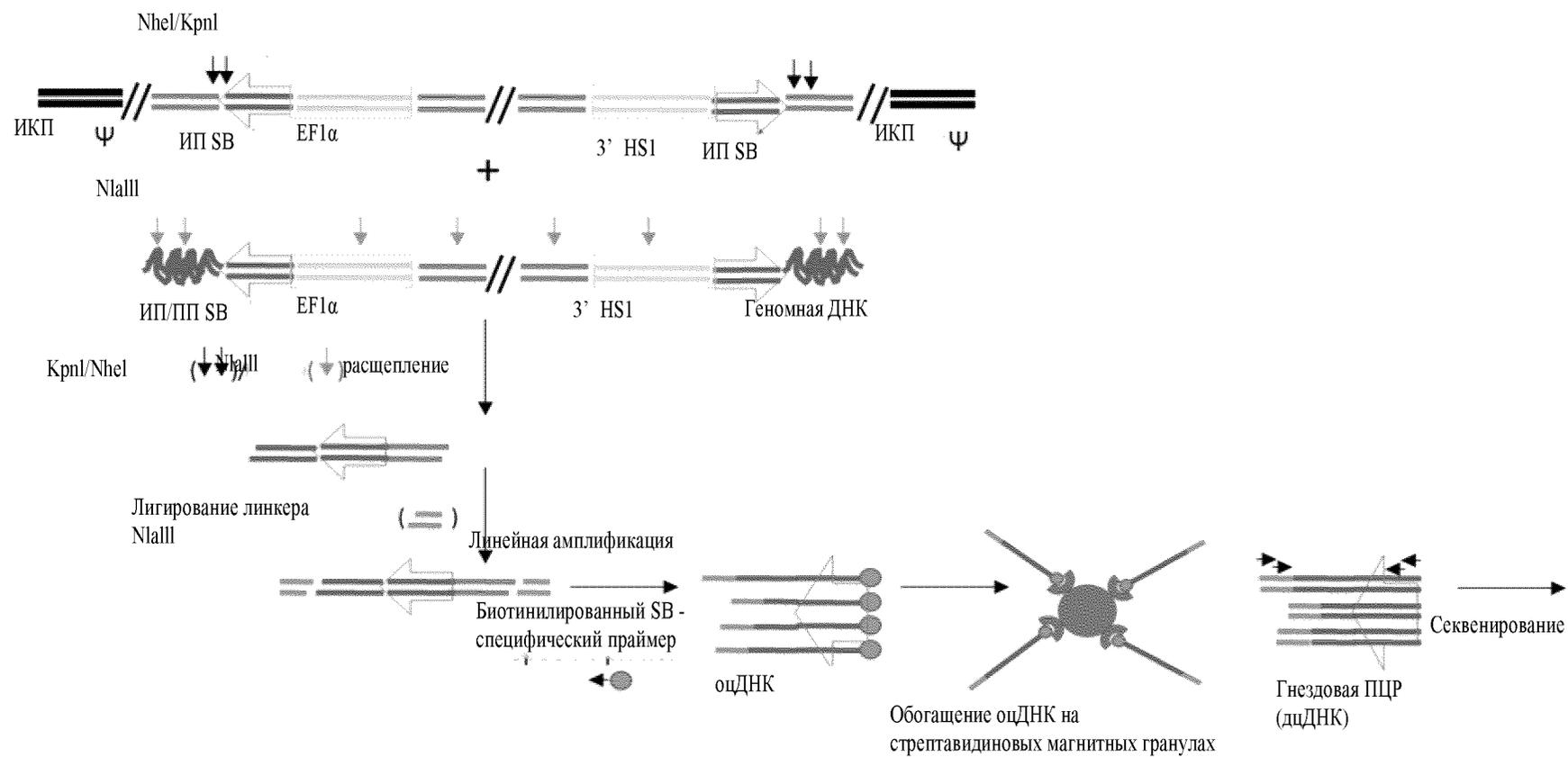
Фиг. 26С



Фиг. 26D



Фиг. 27



Фиг. 28А



Фиг. 28В

Последовательность ИП/ПП *Sleeping beauty*

Последовательность ИП/ПП *Sleeping beauty*

Интеграционное соединение (область

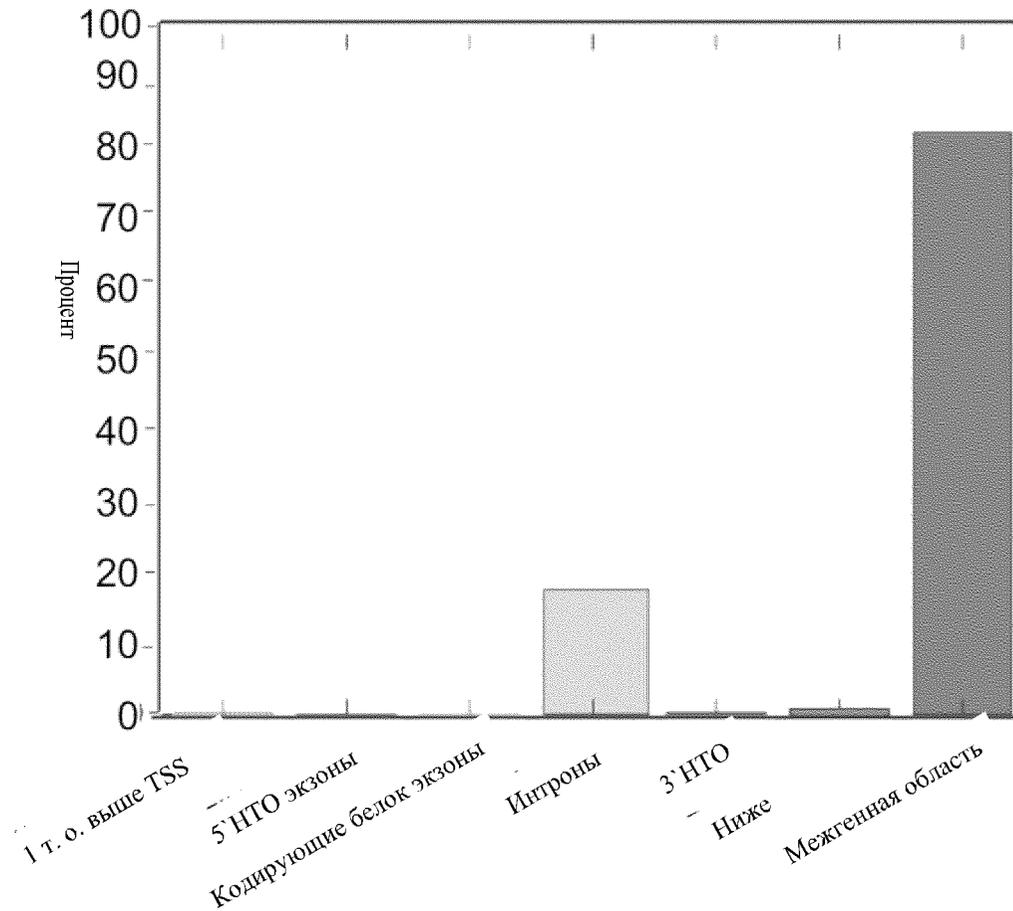
ACTTAAGTGT ATGTAAACTT CCGACTTCAA CTGTAGGGTA CCTGATTCTC TGGGCATCTC TGCCCACTAC CATG

SEQ ID NO: 4

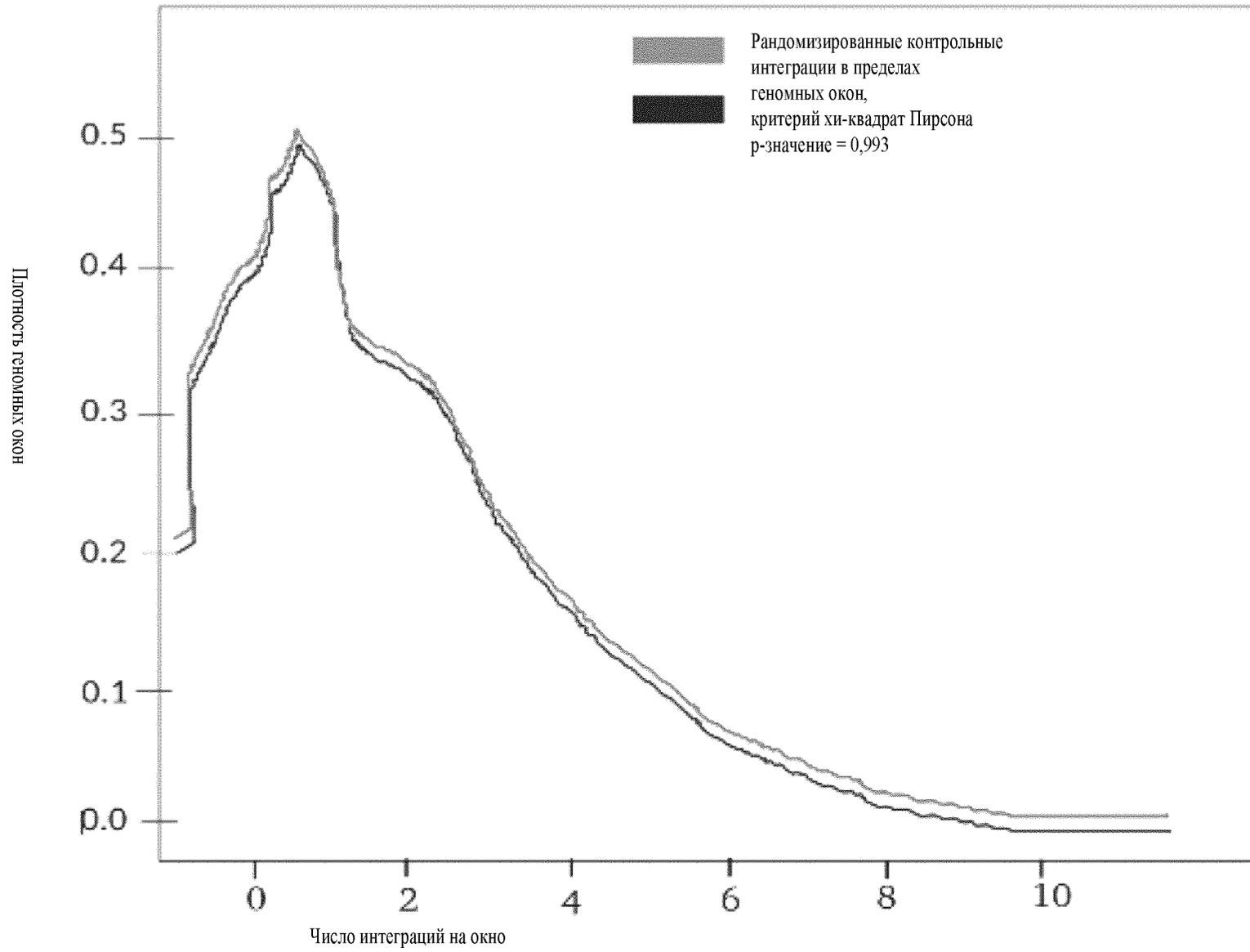
ACTTAAGTGT ATGTAAACTT CCGACTTCAA CTGTAAATTT TCCACSTTTT TCAGTTTTC TCGCCATATT TCATG

SEQ ID NO: 5

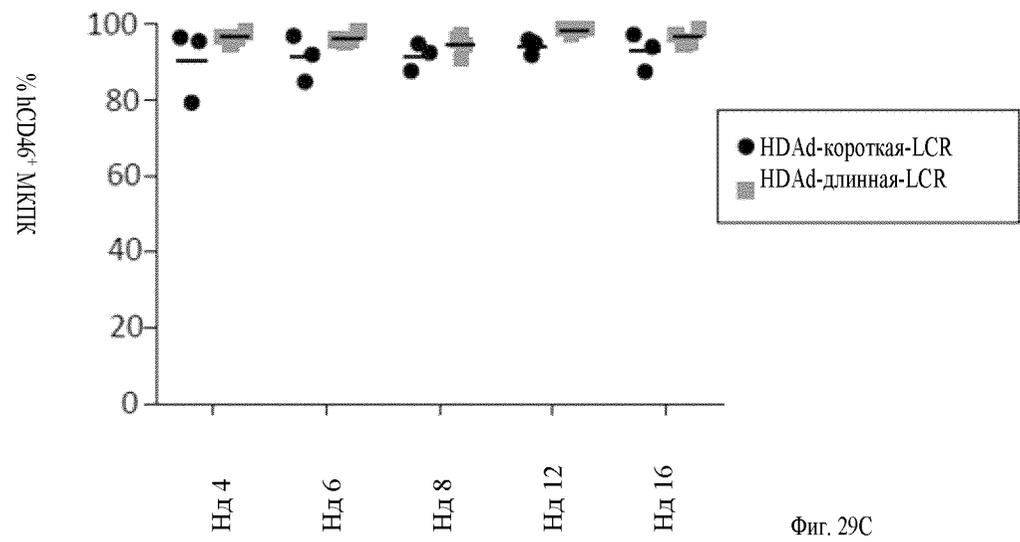
Фиг. 28С



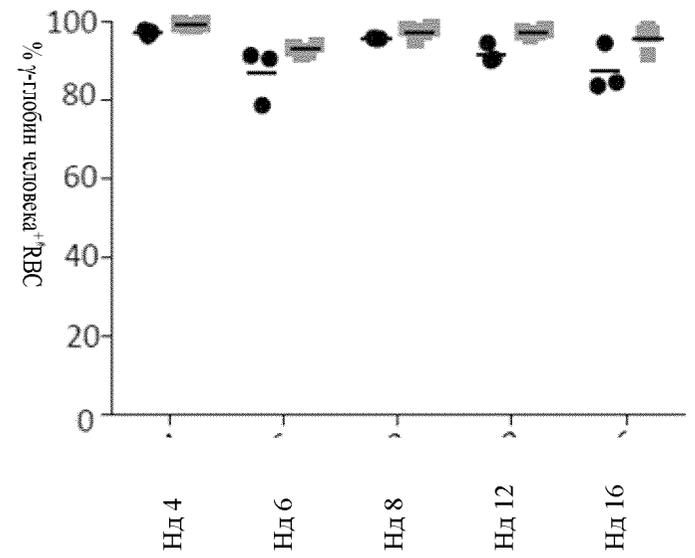
Фиг. 28D



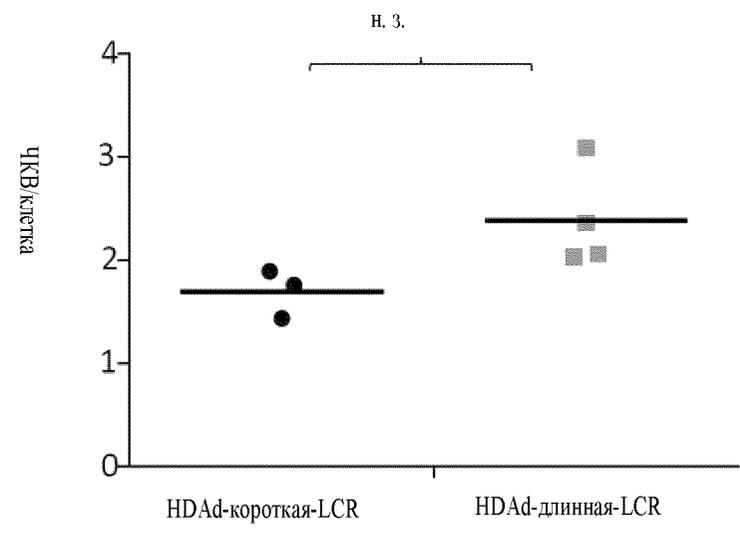
Фиг. 29А

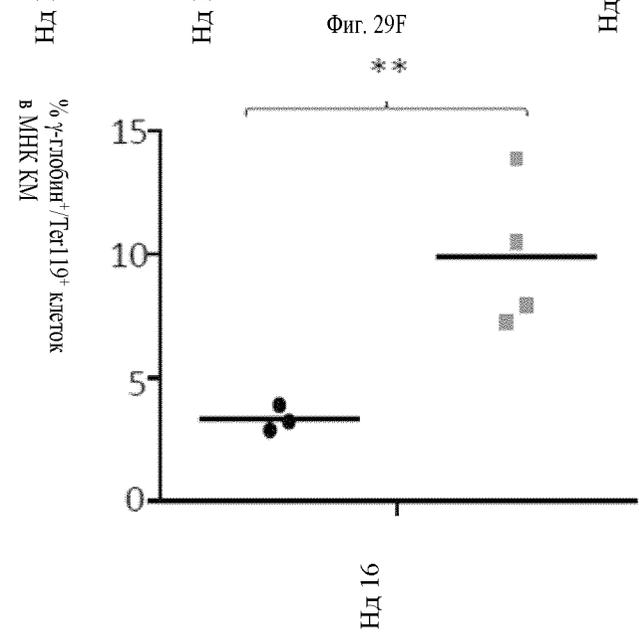
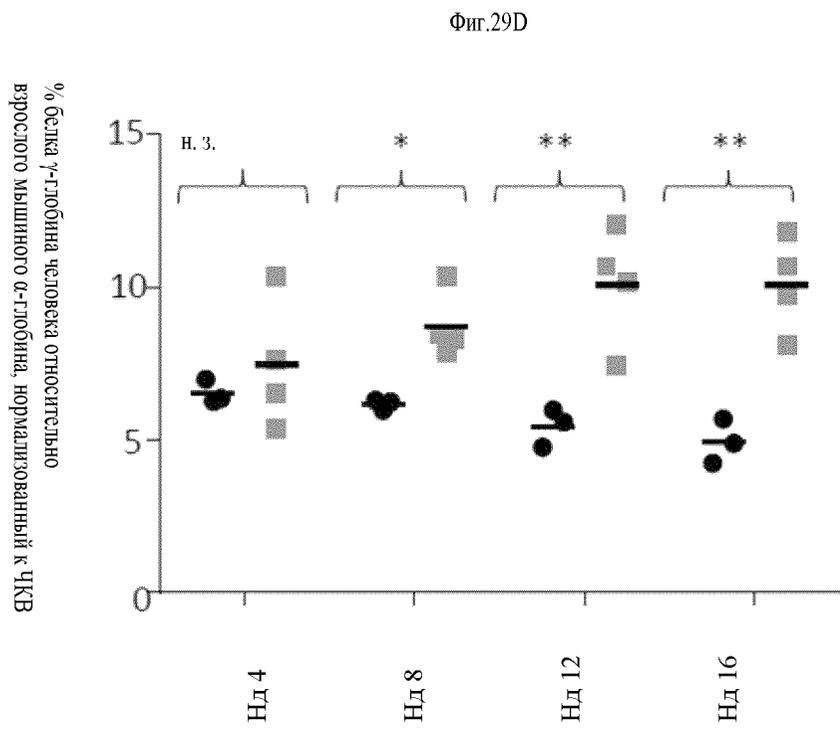
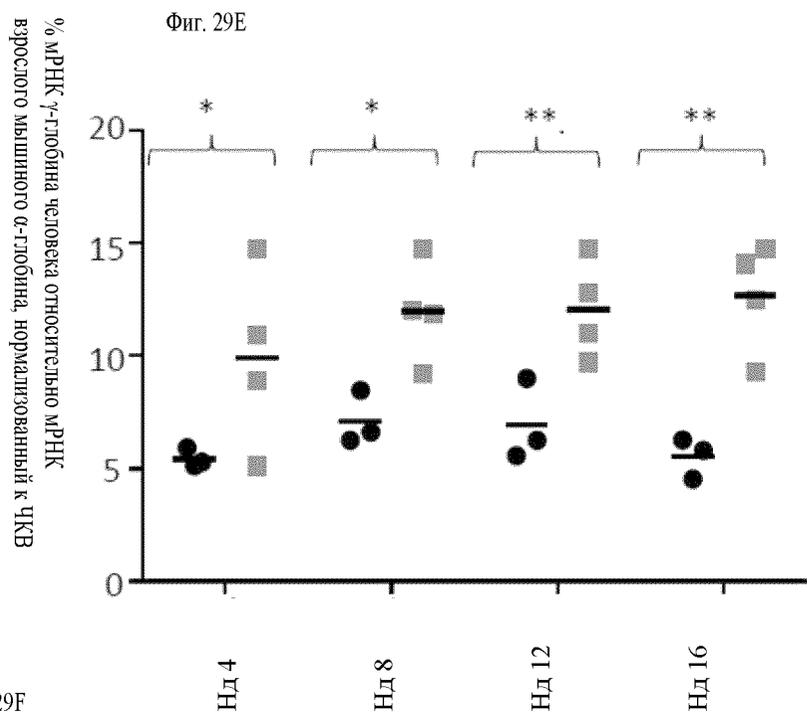


Фиг. 29В

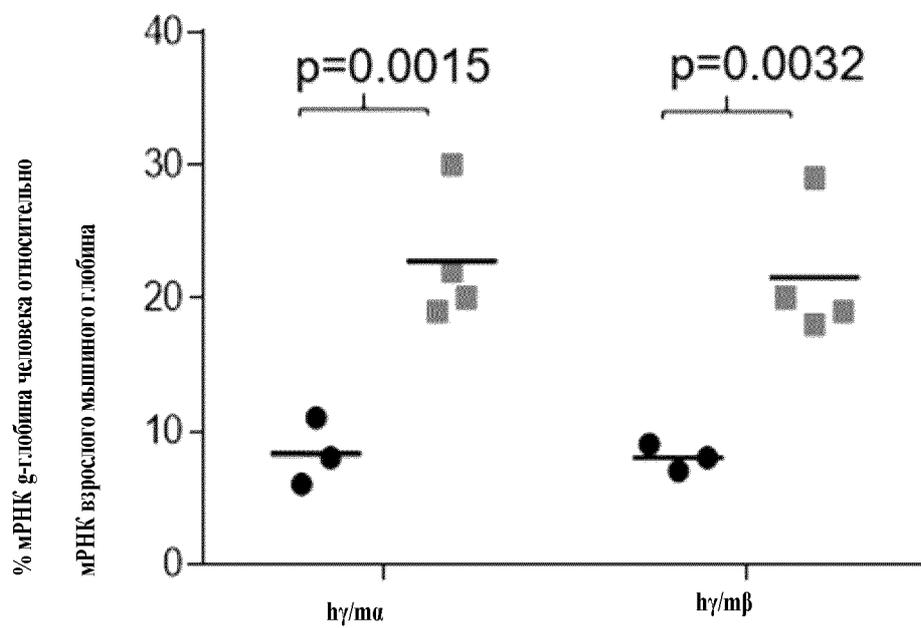


Фиг. 29С

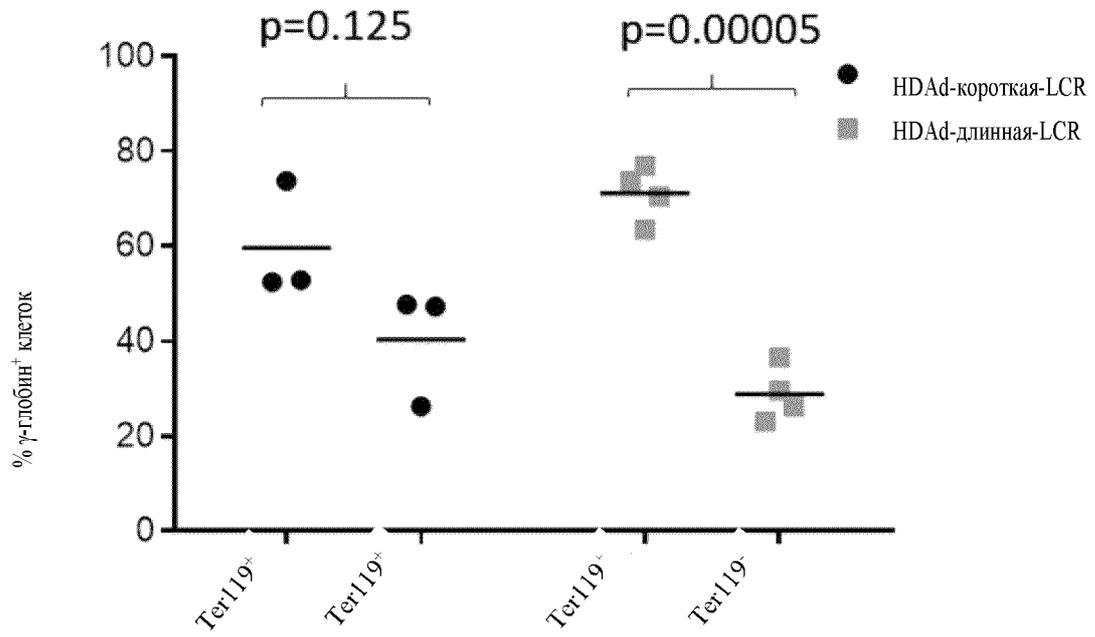




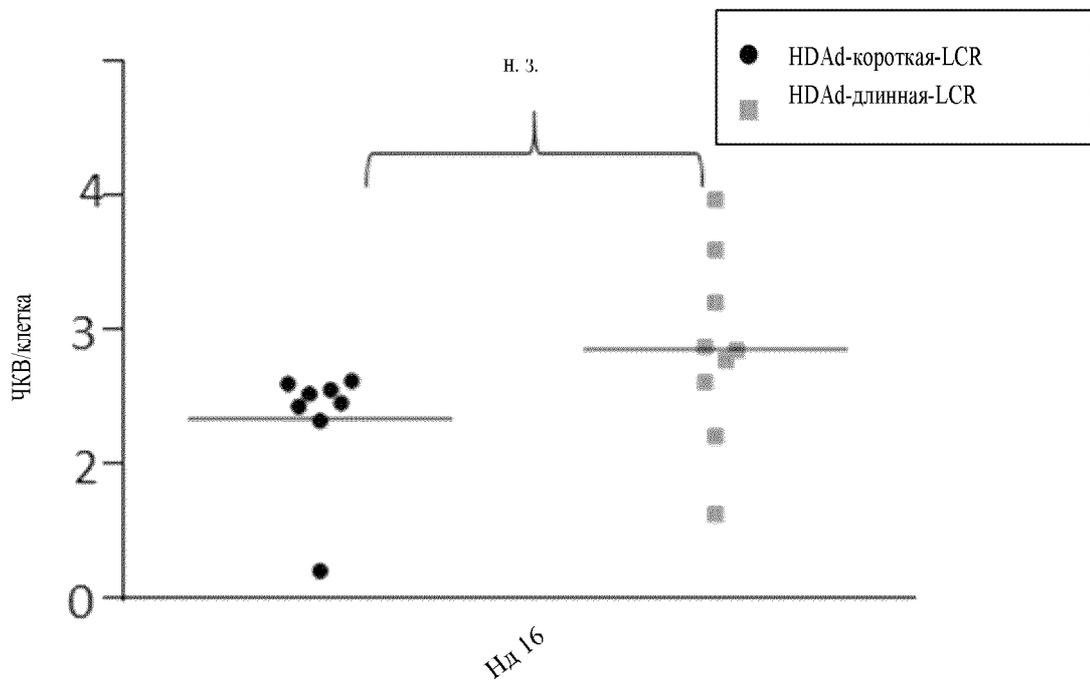
Фиг. 29G

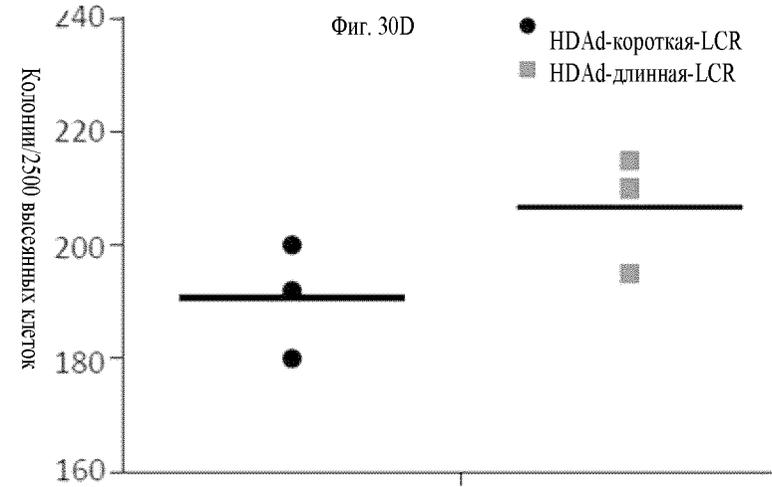
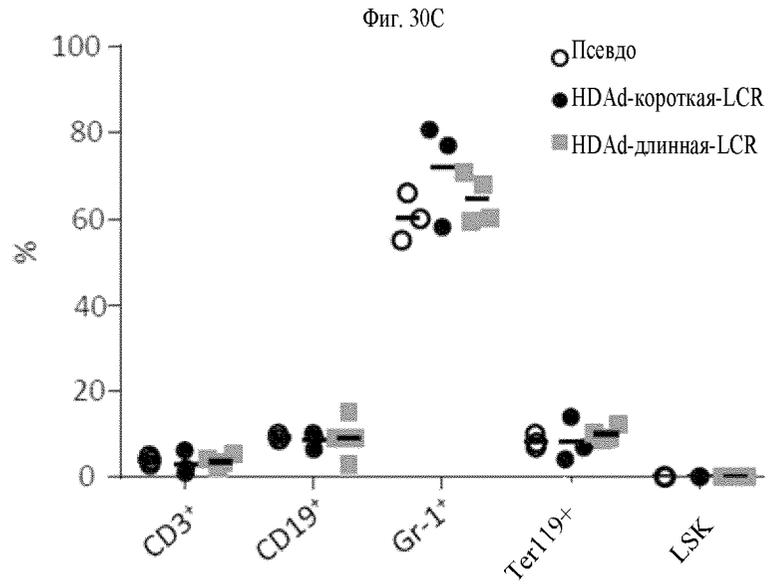
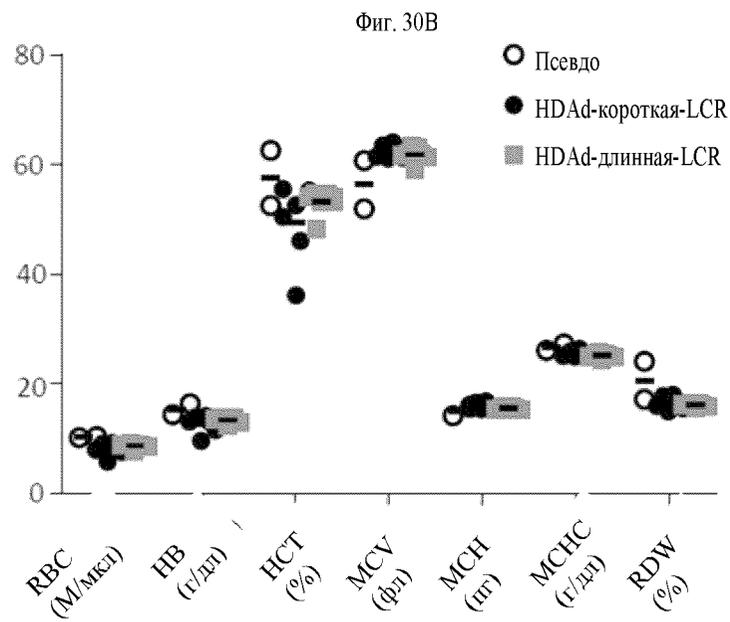
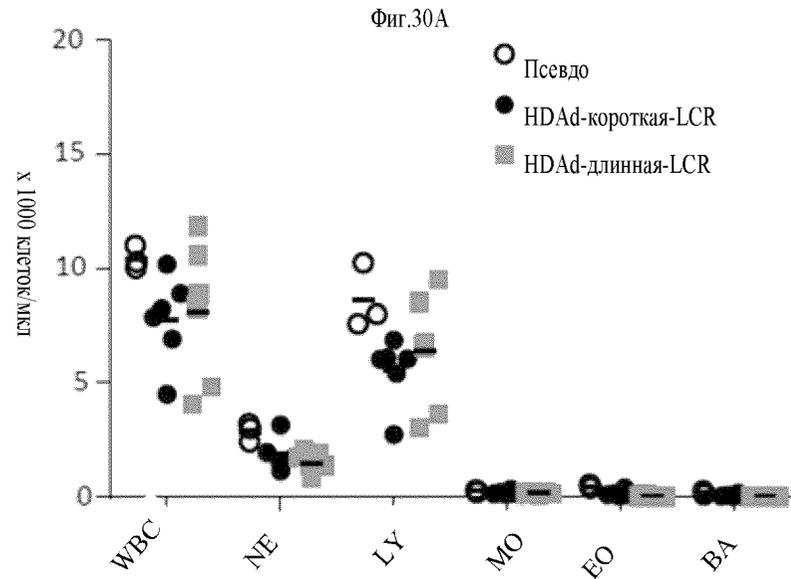


Фиг. 29Н

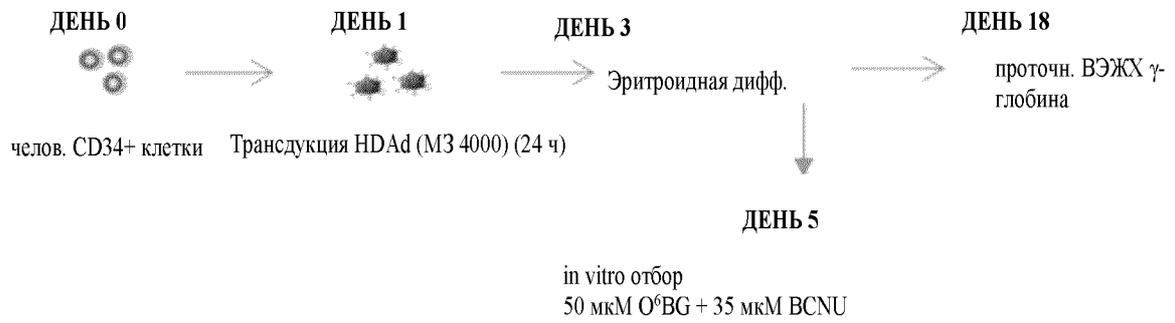


Фиг. 29I

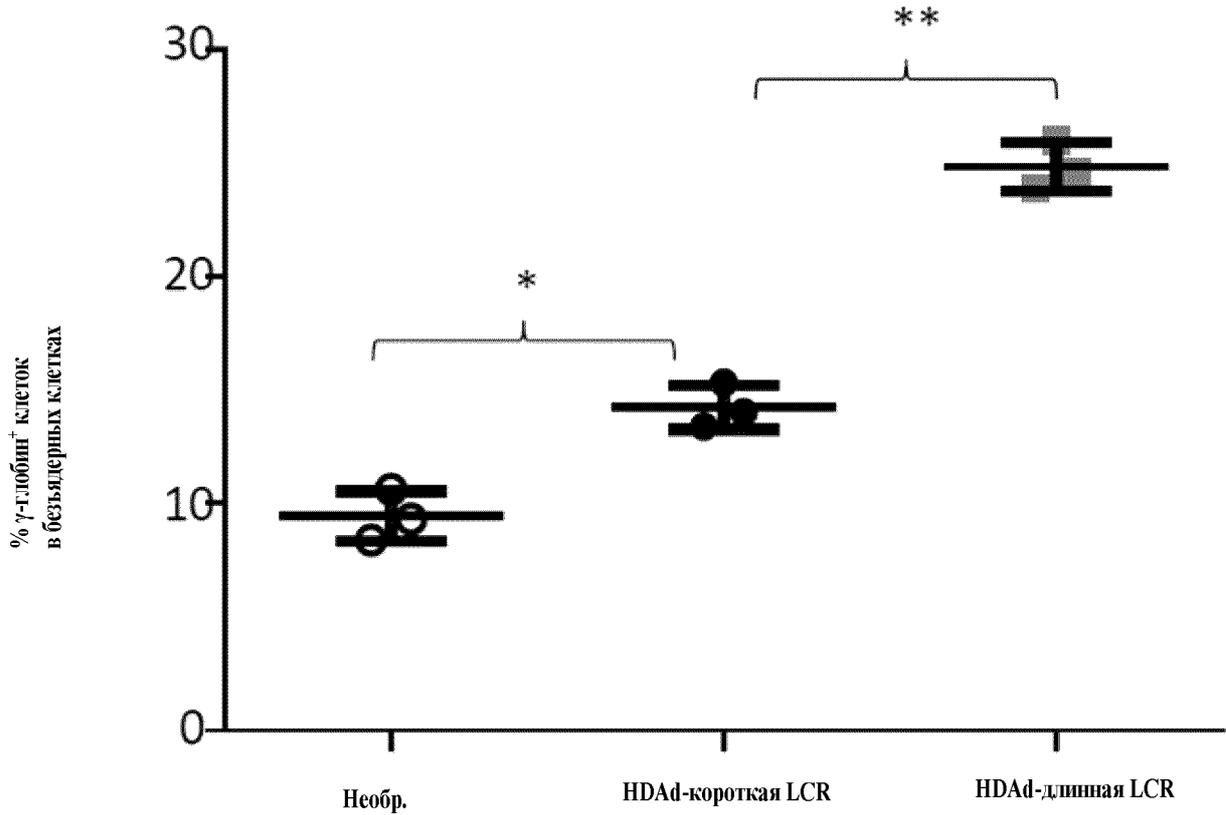




Фиг. 31А

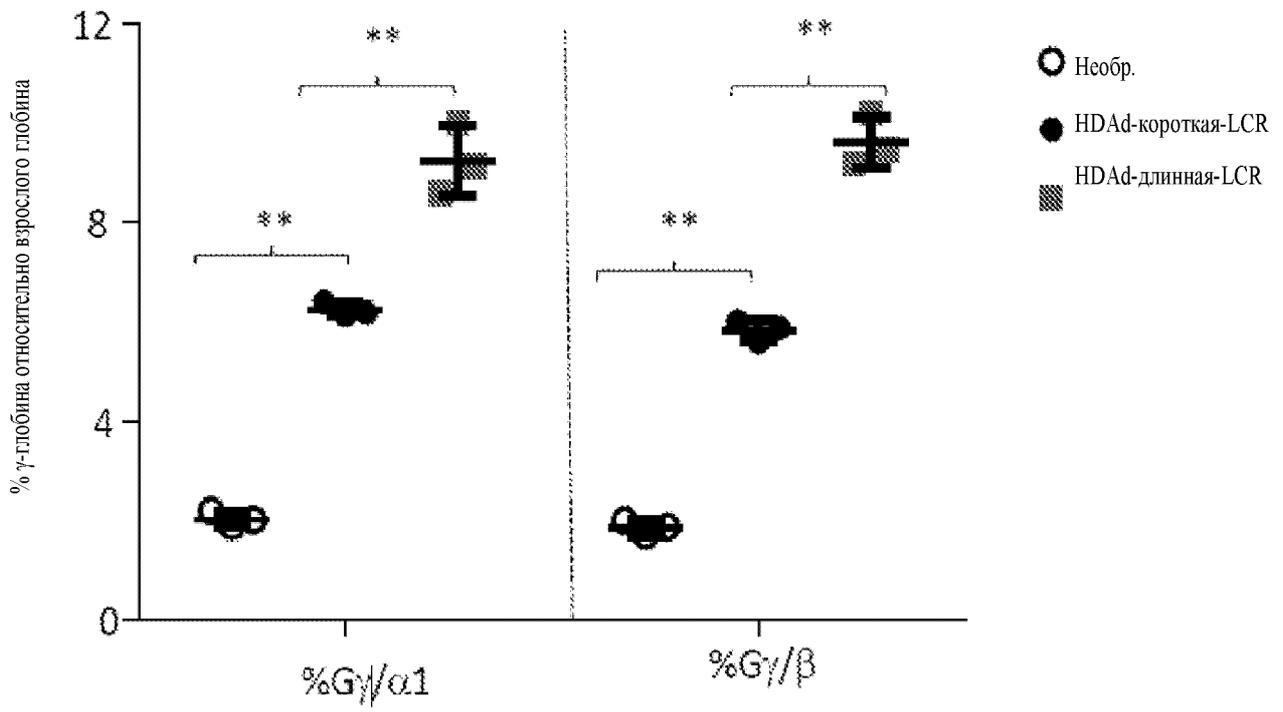


Фиг. 31В

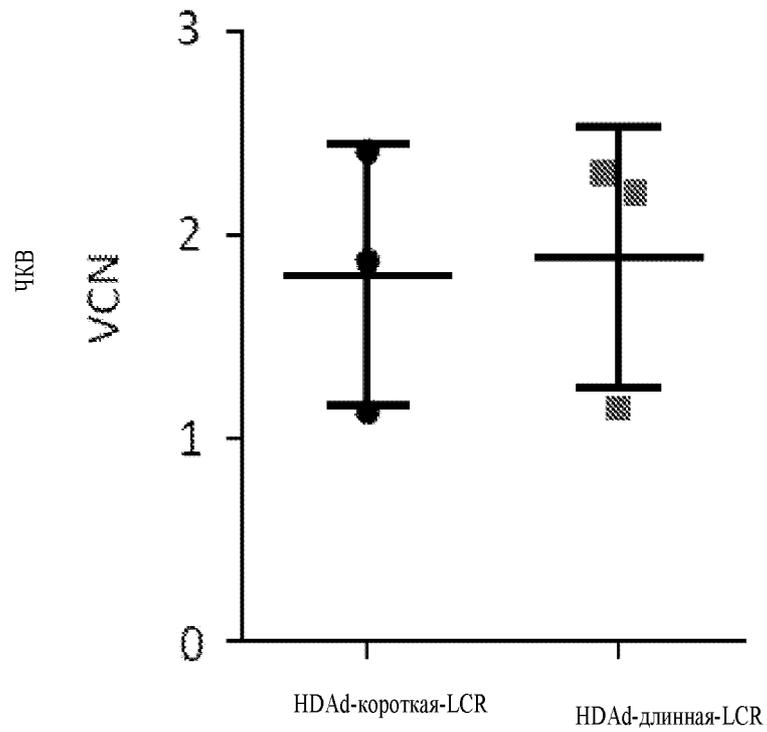


62/350

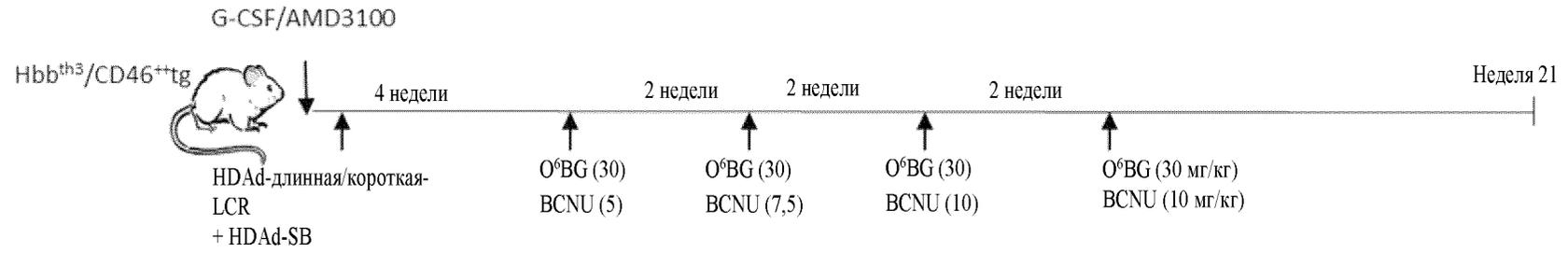
фиг. 31С



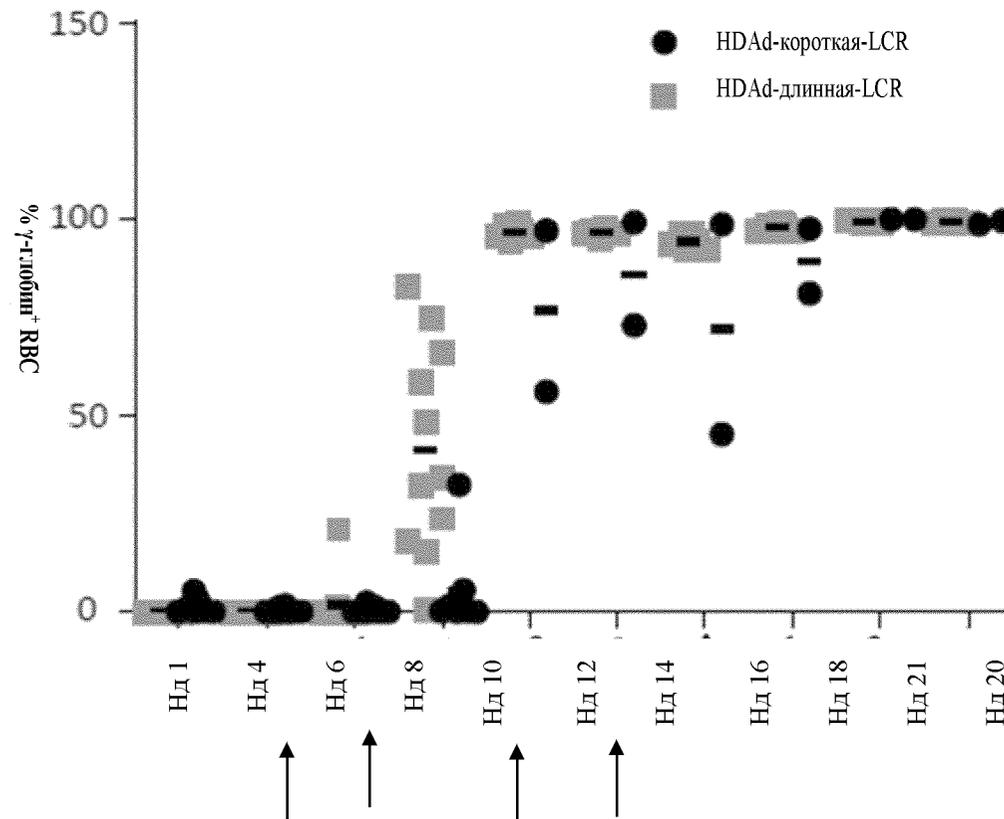
Фиг. 31D



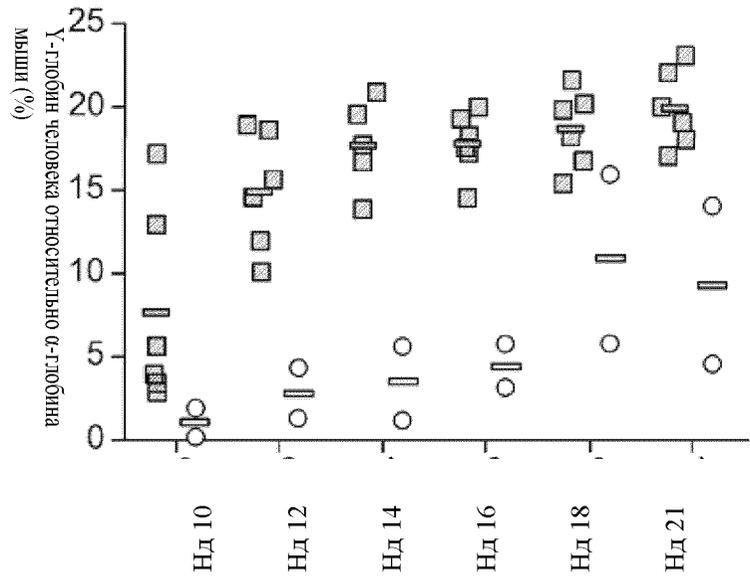
Фиг. 32А



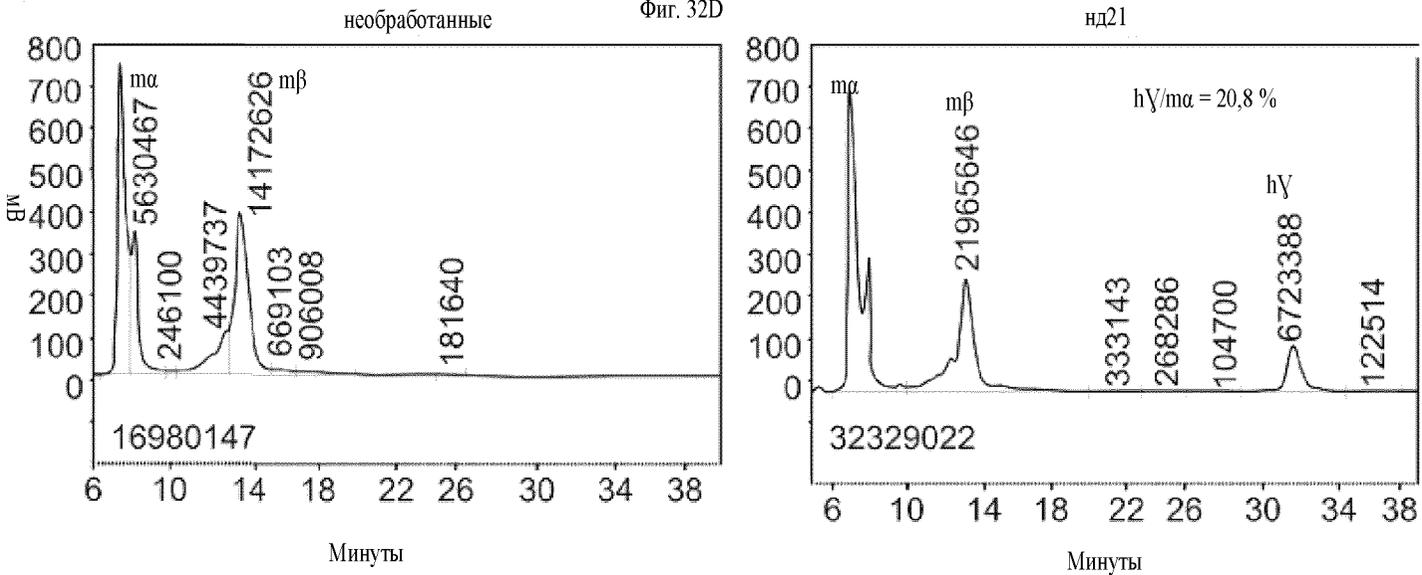
Фиг. 32В



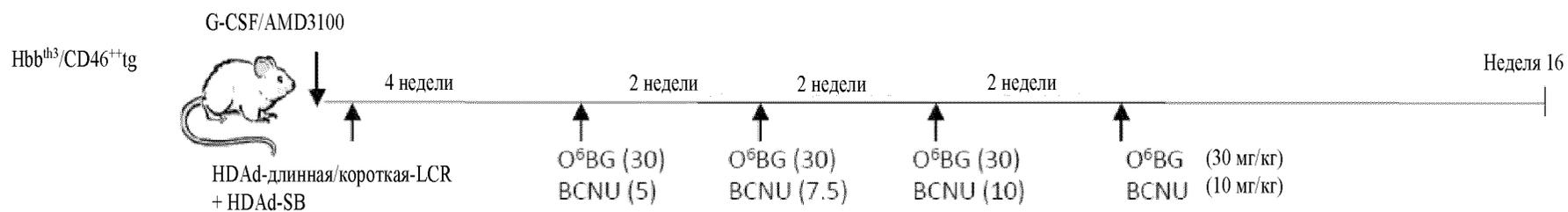
Фиг. 32С



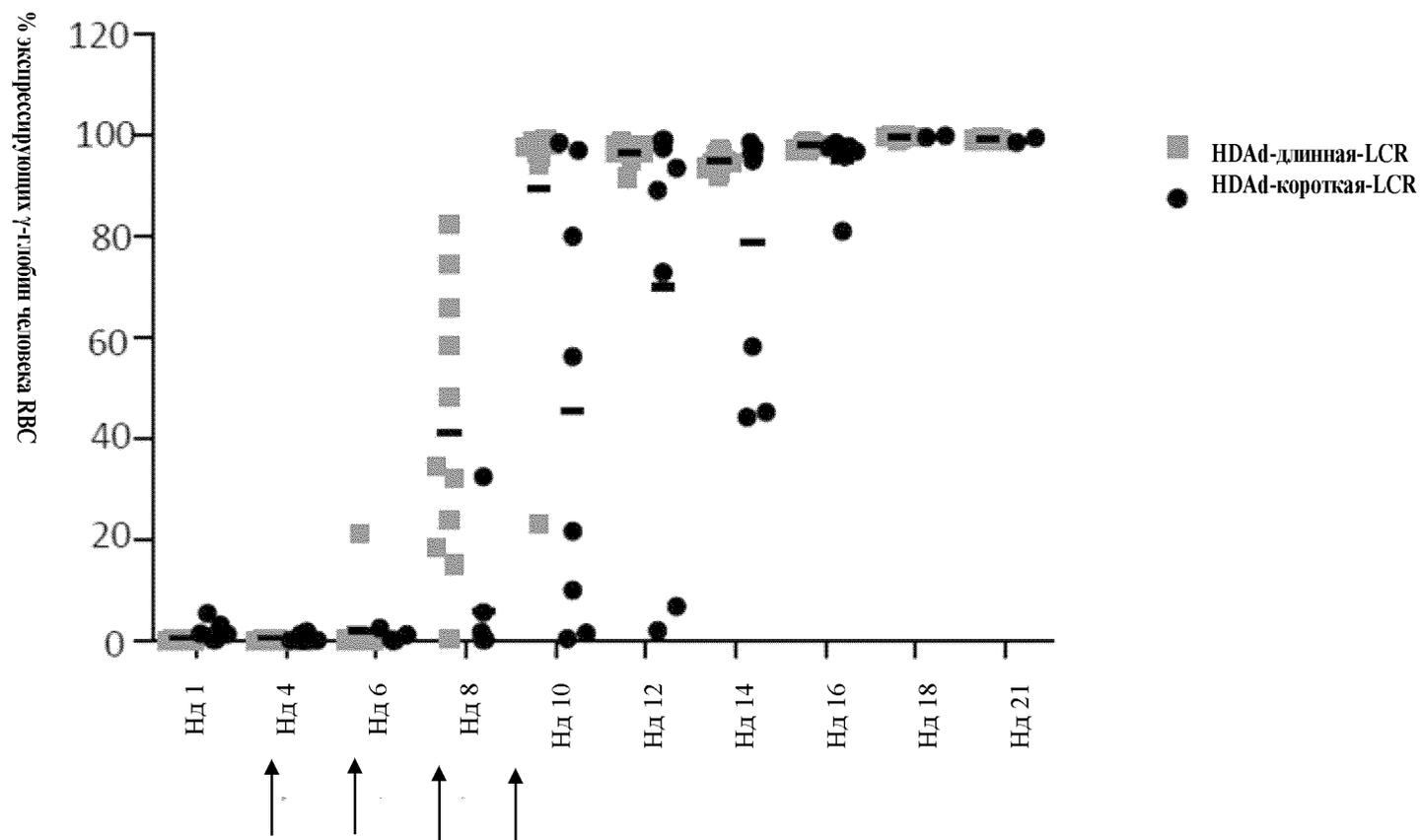
Фиг. 32D

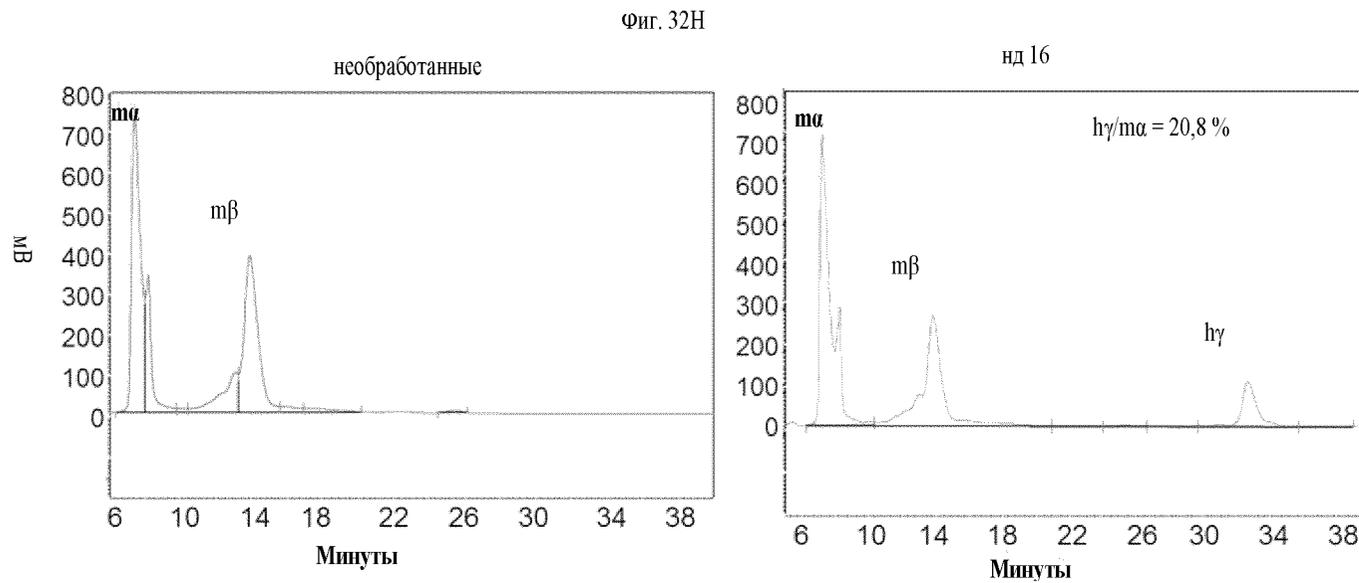
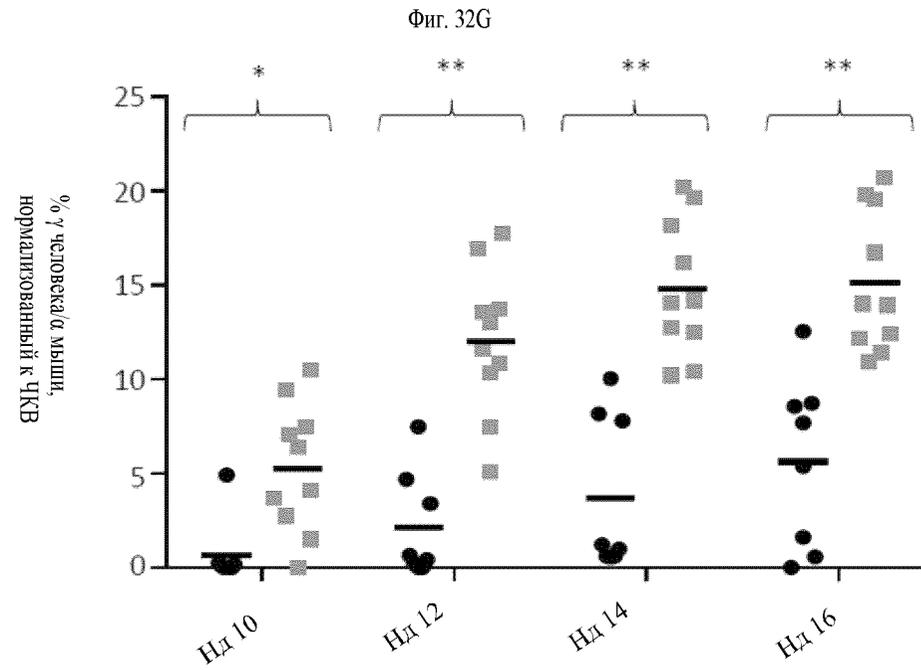


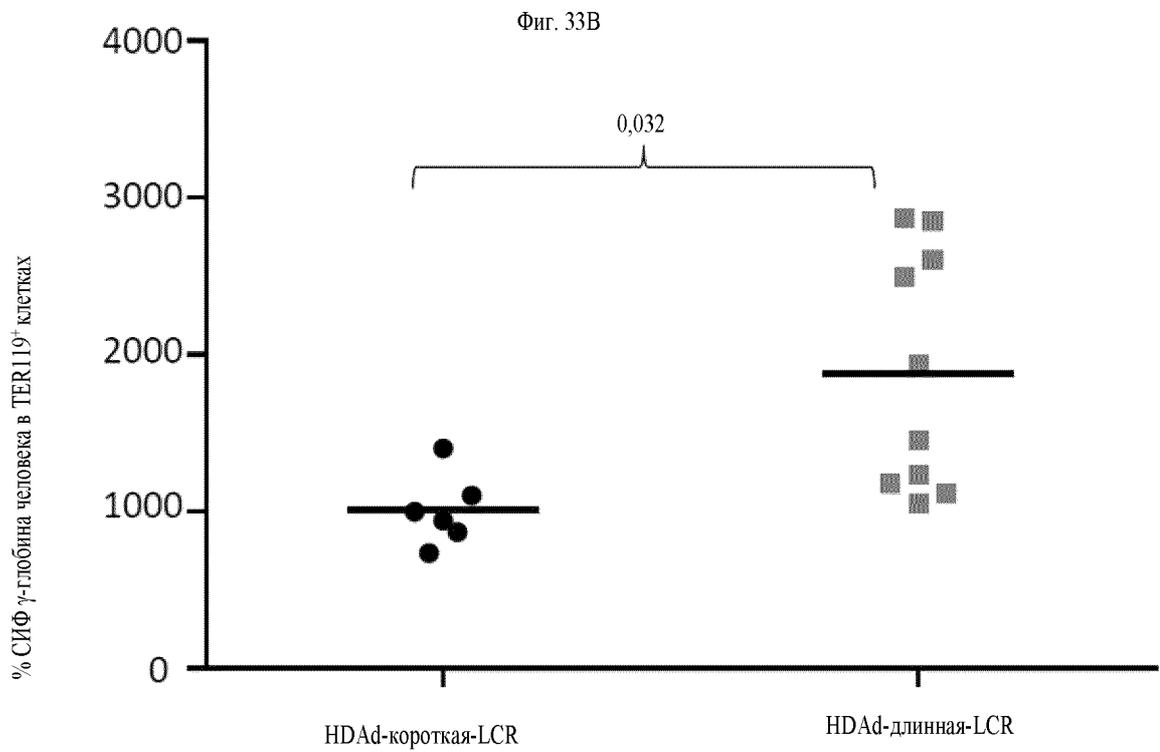
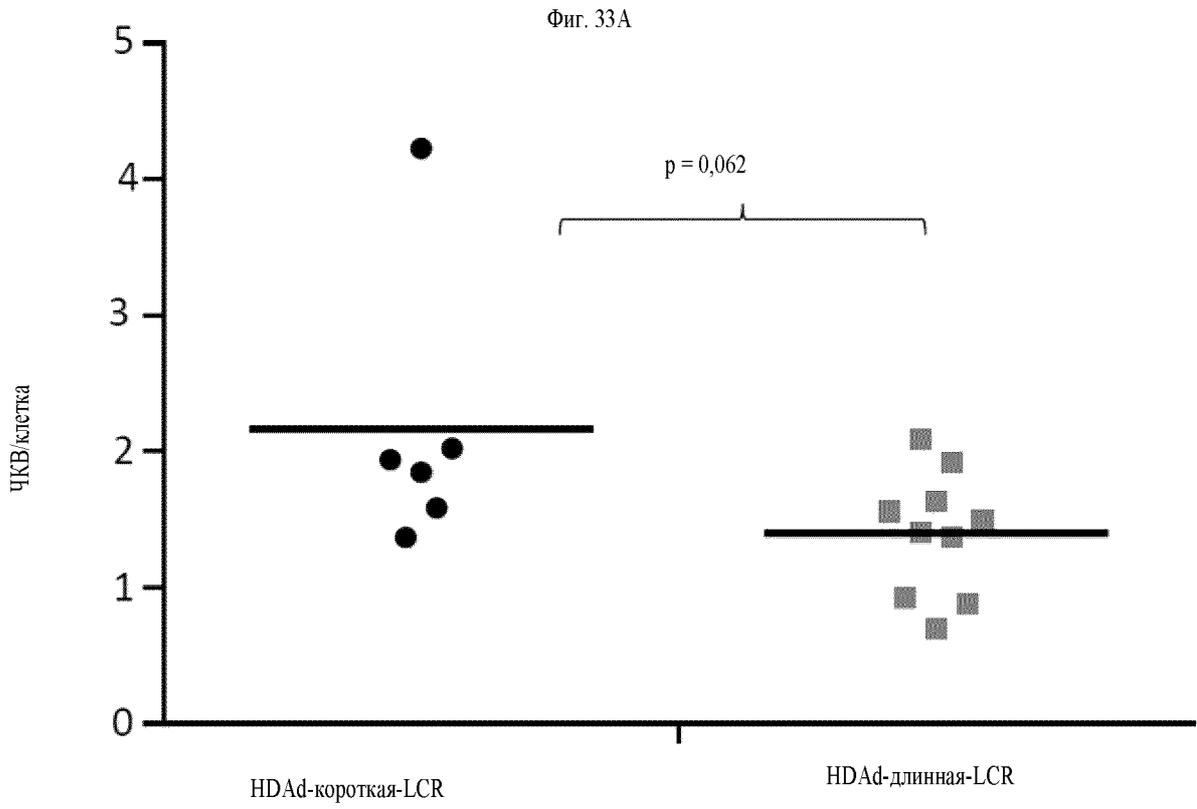
Фиг. 32Е



Фиг. 32F

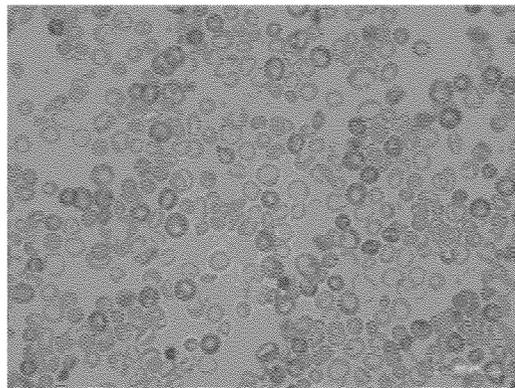




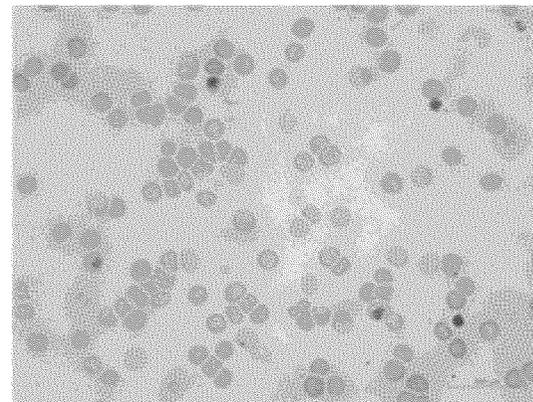


Фиг. 34

До обработки

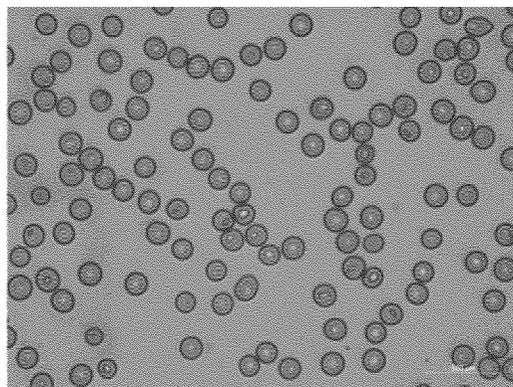


Неделя 10 после обработки

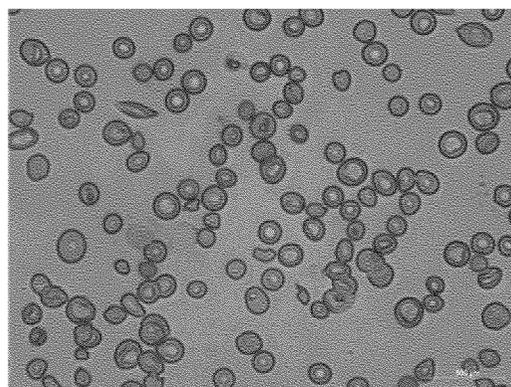


Фиг. 35

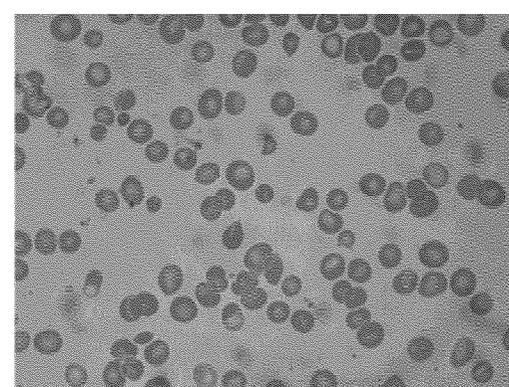
C57BL6 (нормальные мыши)



До обработки



Неделя 10 после обработки – длинная LCR



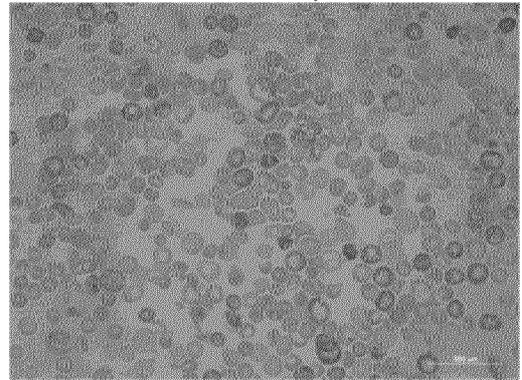
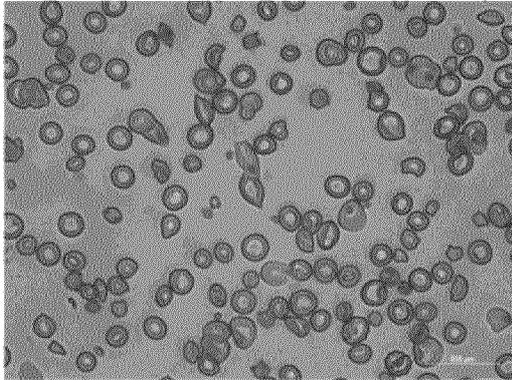
69/350

Фиг. 36А

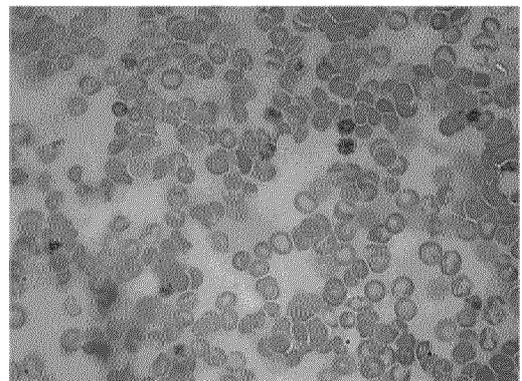
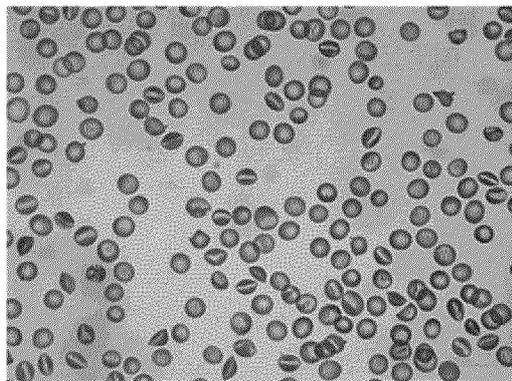
Гимза

Ретикулоциты

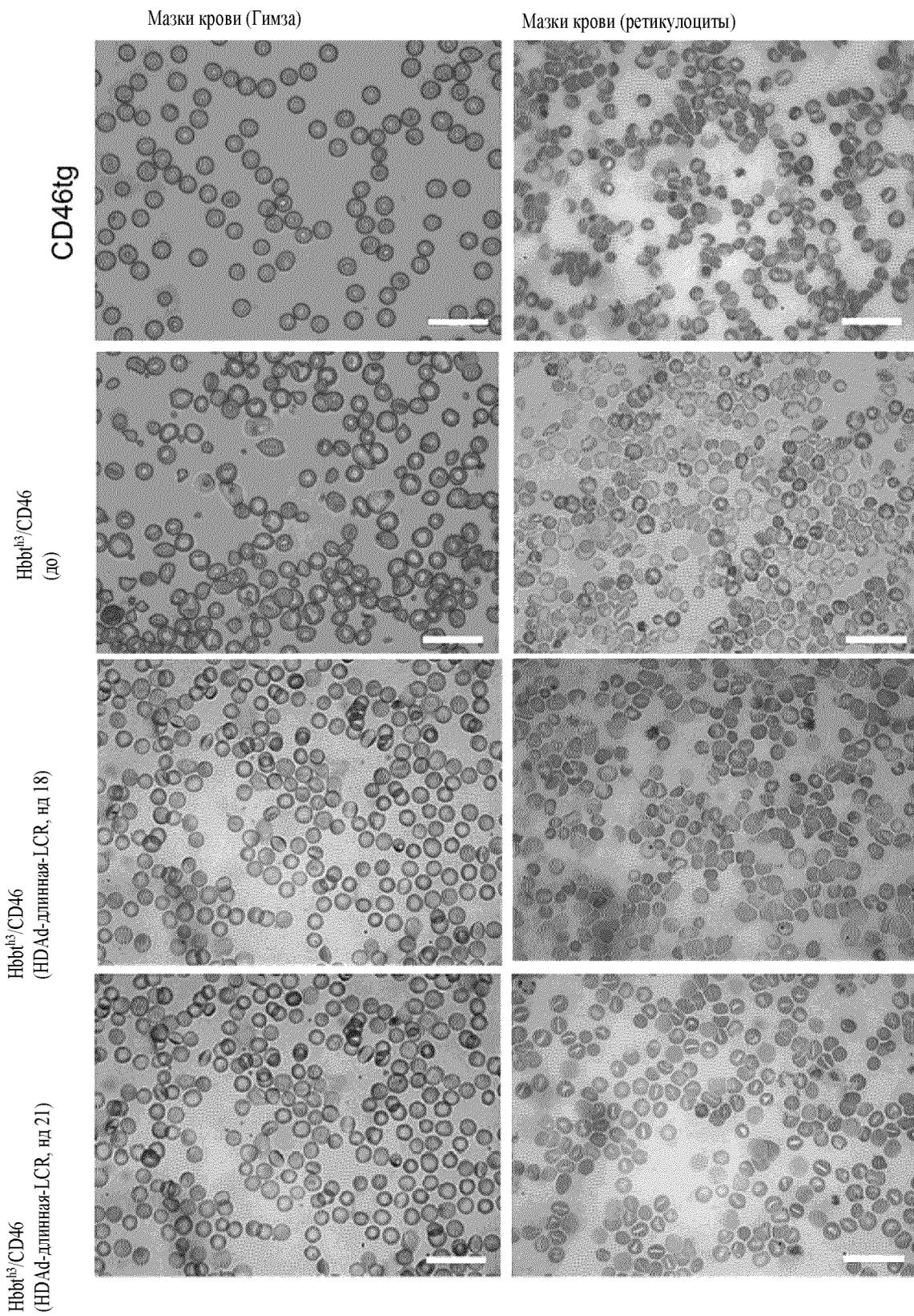
До



Нд 14

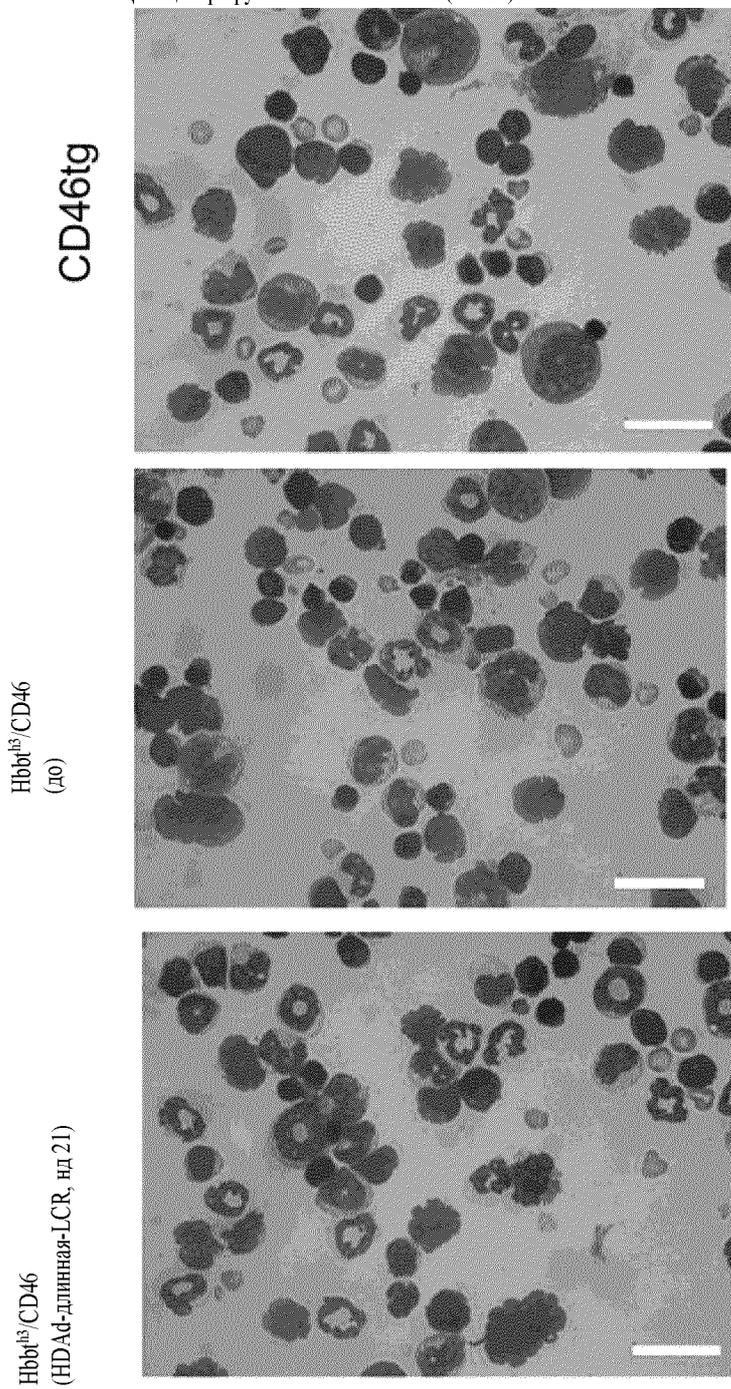


Фиг. 36В

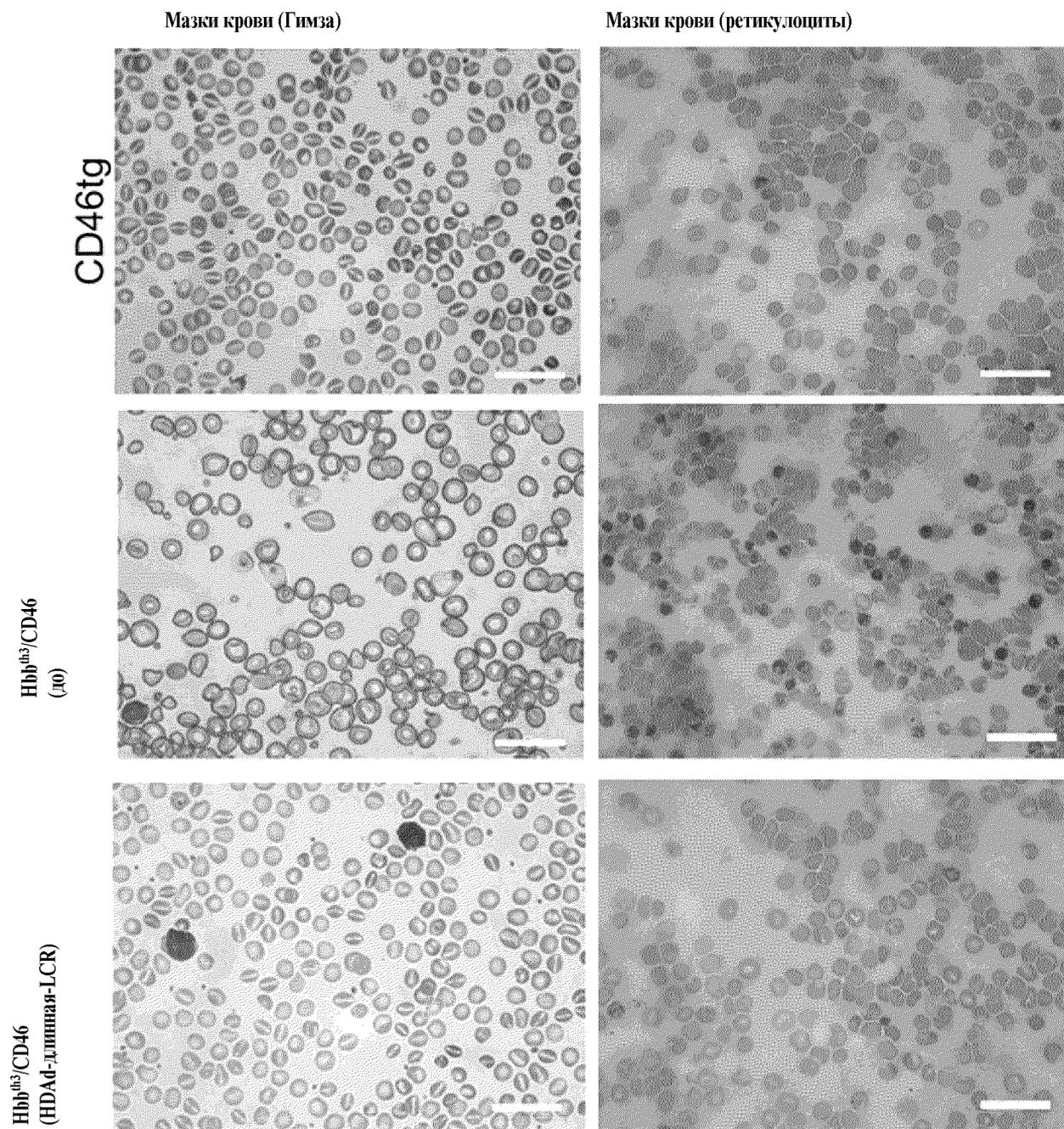


Фиг. 36С

Цитоцентрифугаты костного мозга (Гимза)



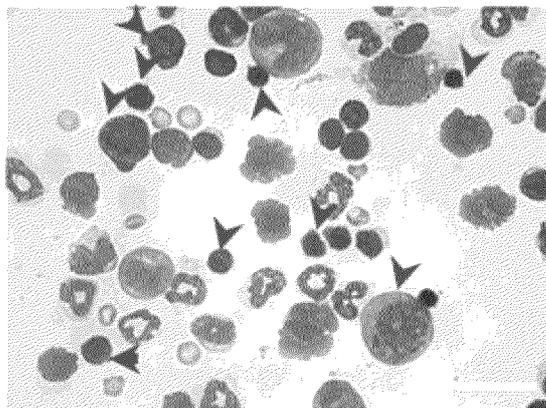
Фиг. 37А



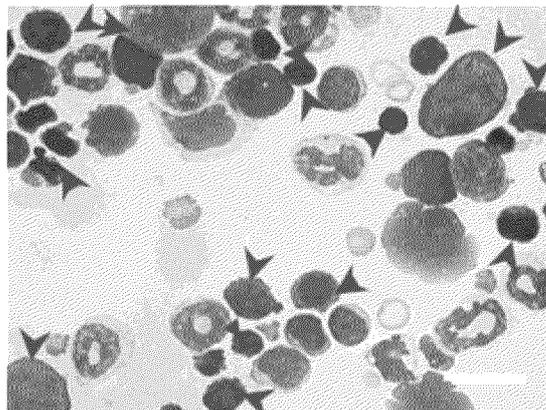
Фиг. 37В

Цитоцентрифугаты костного мозга (Гимза)

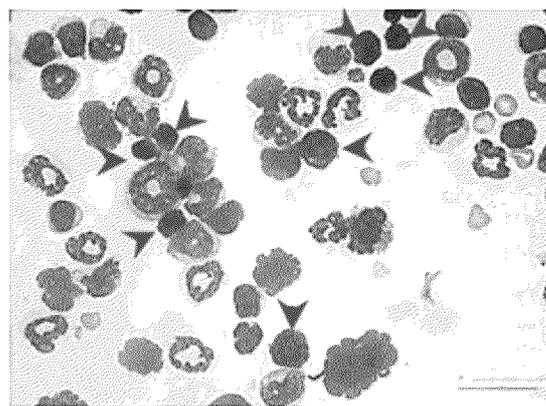
CD46tg



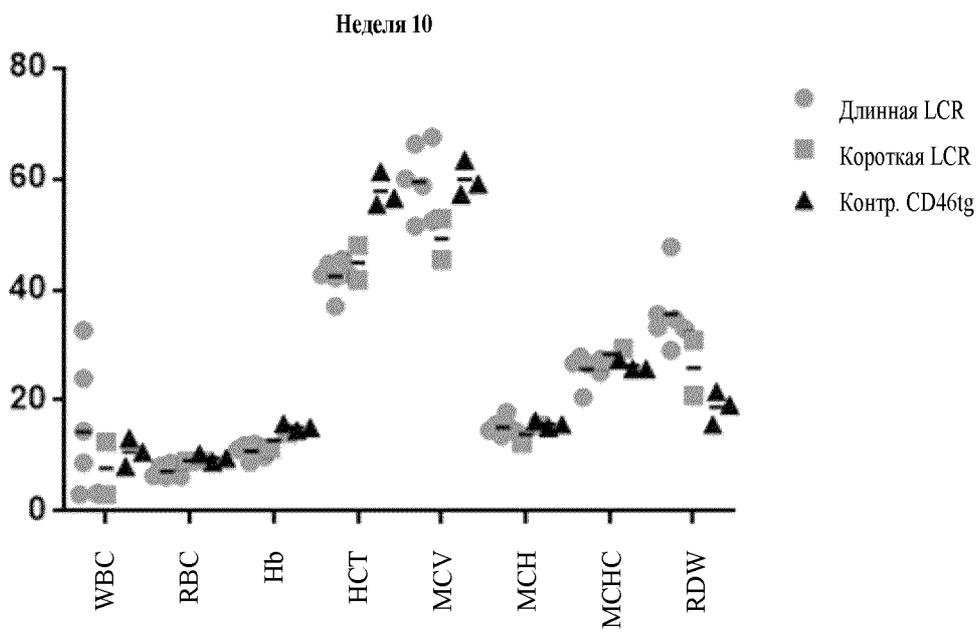
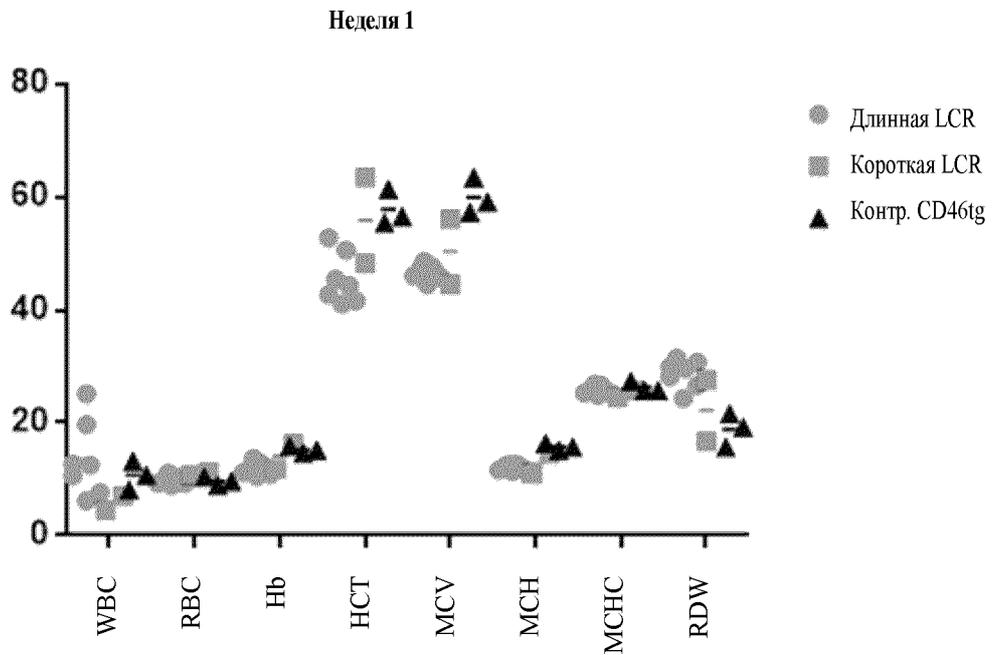
Hbb^{tdy}/CD46
(до)



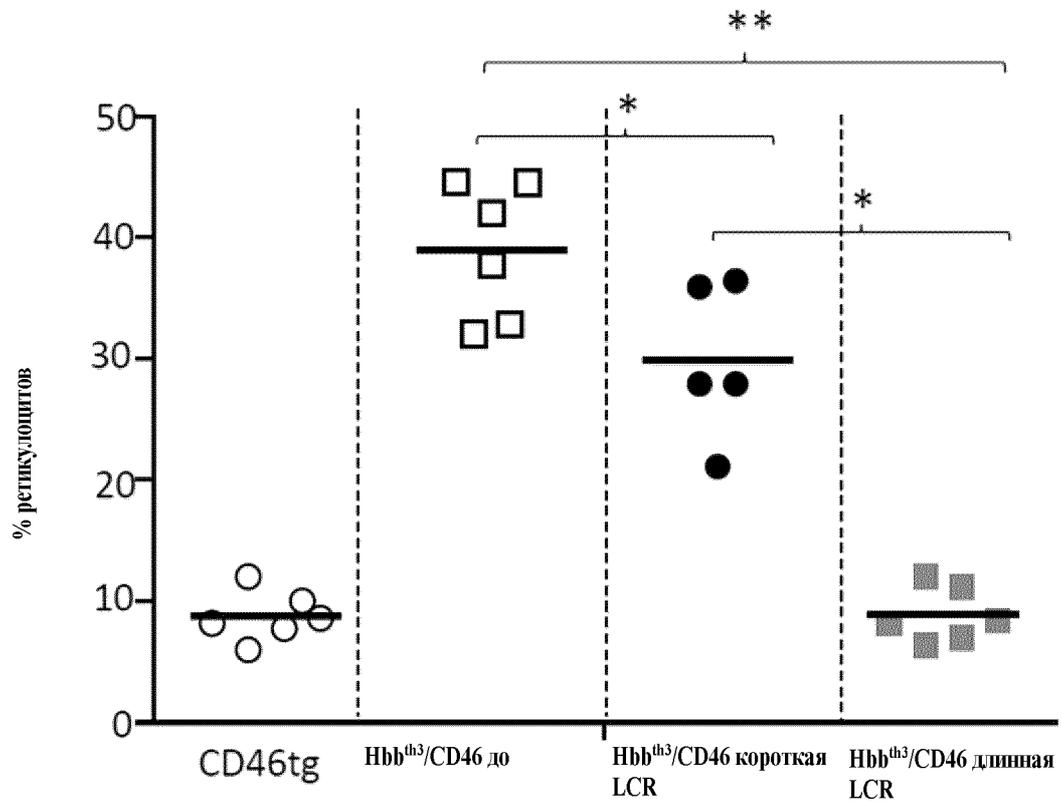
Hbb^{tdy}/CD46
(HDAd-длинная-LCR)

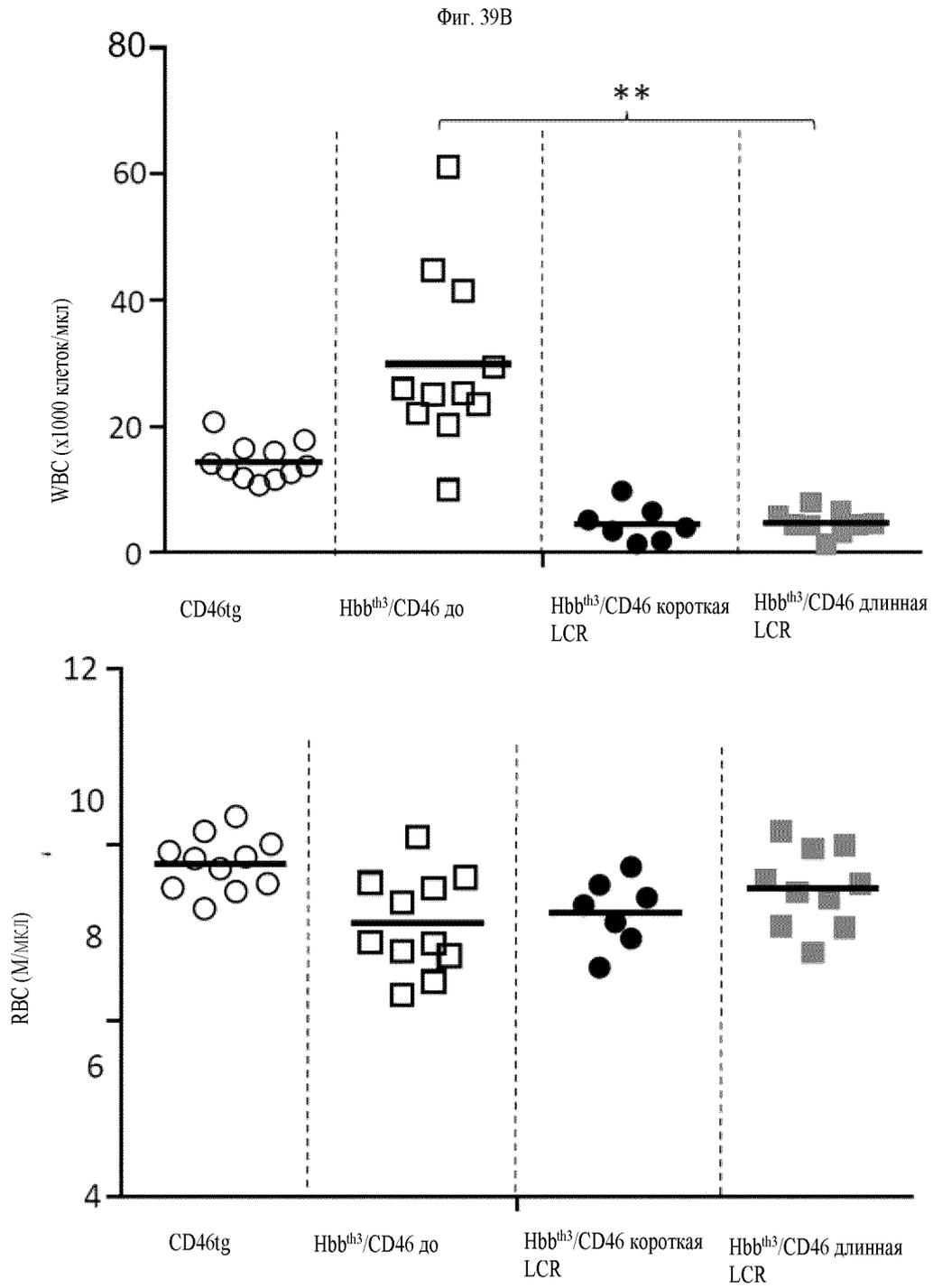


Фиг. 38

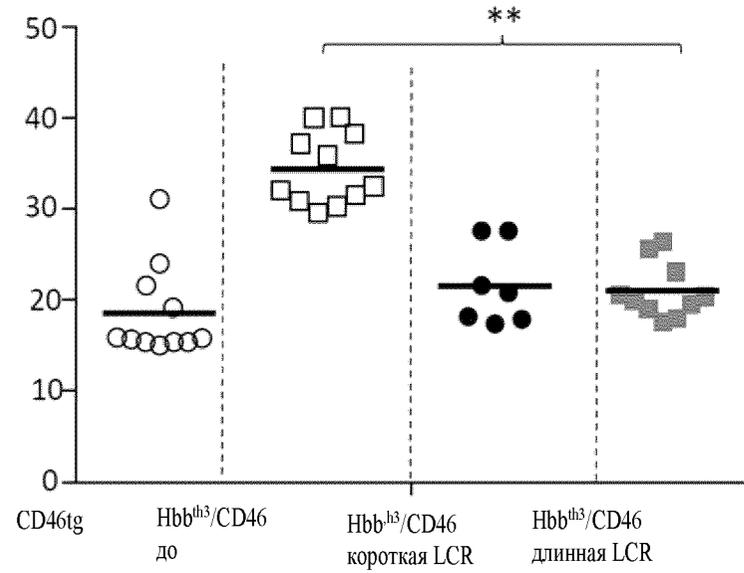
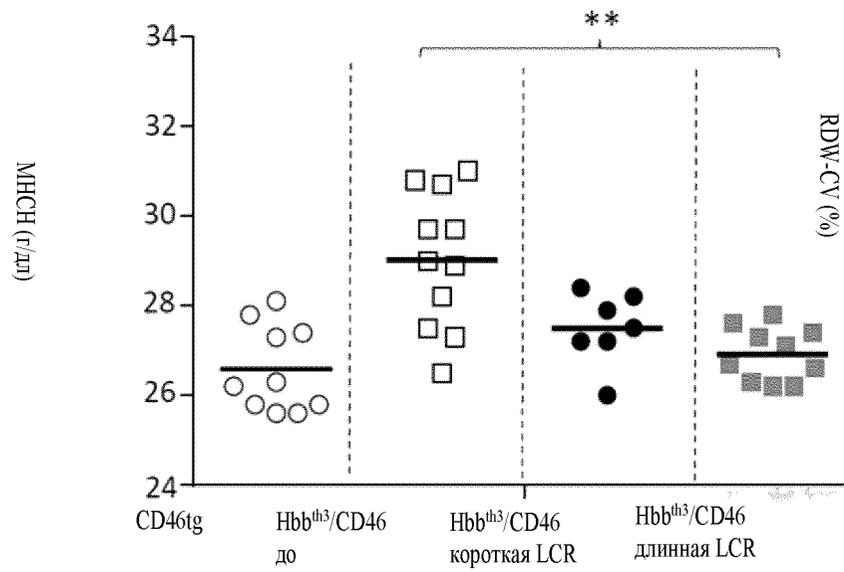
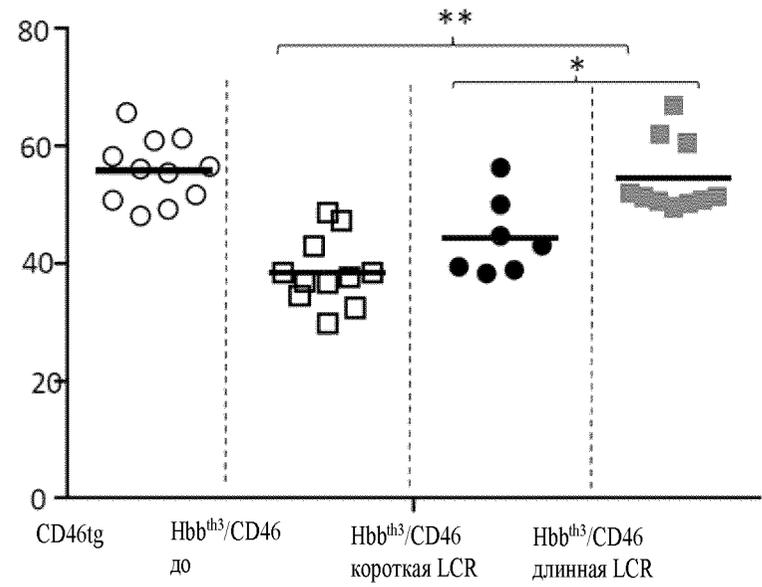
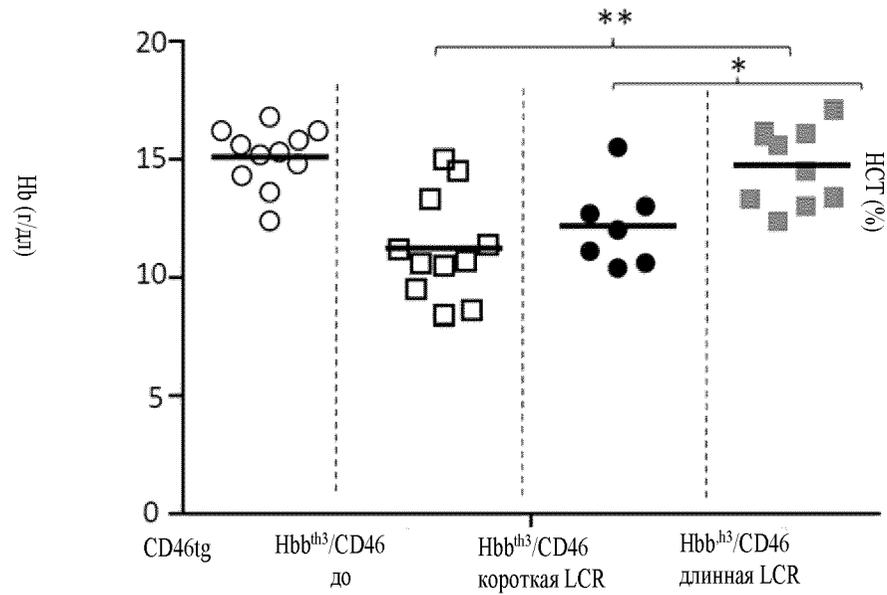


Фиг. 39А

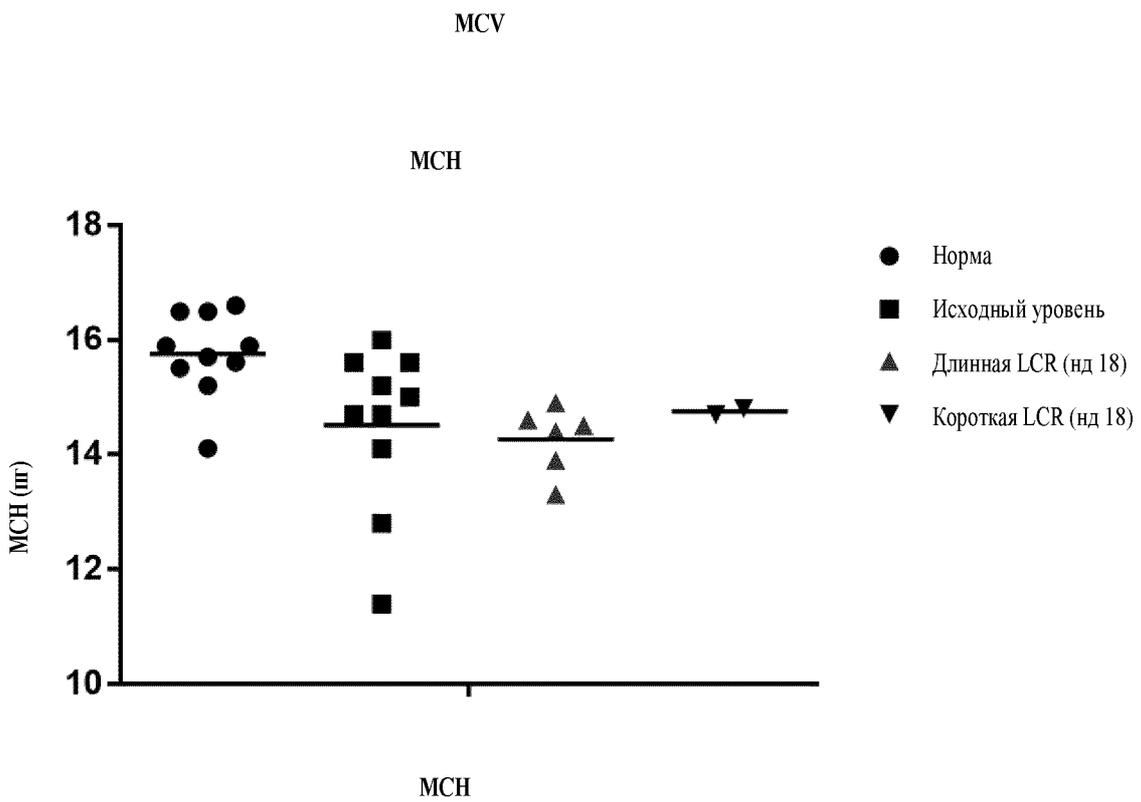
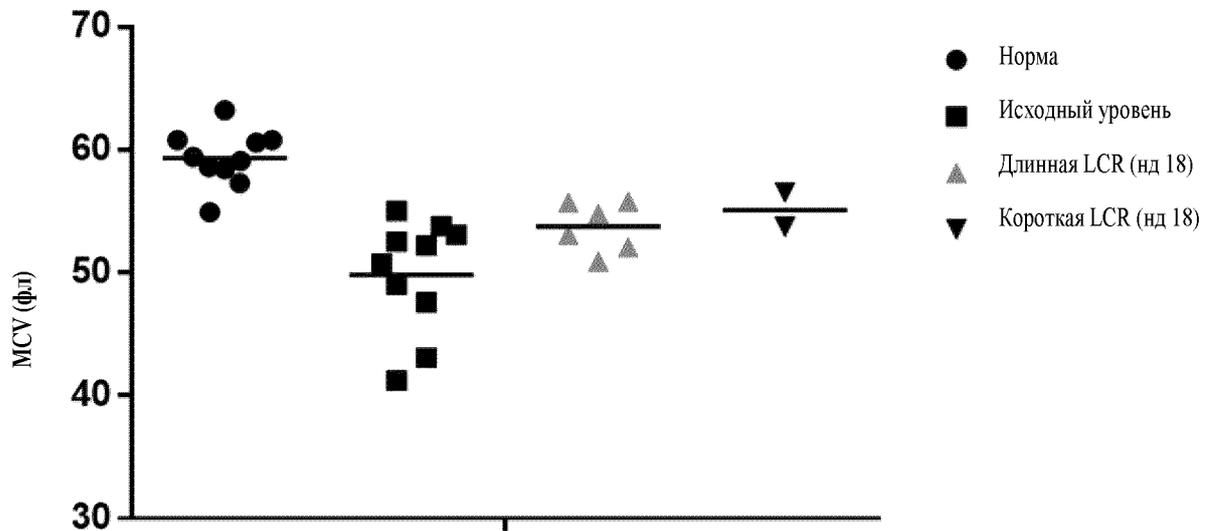




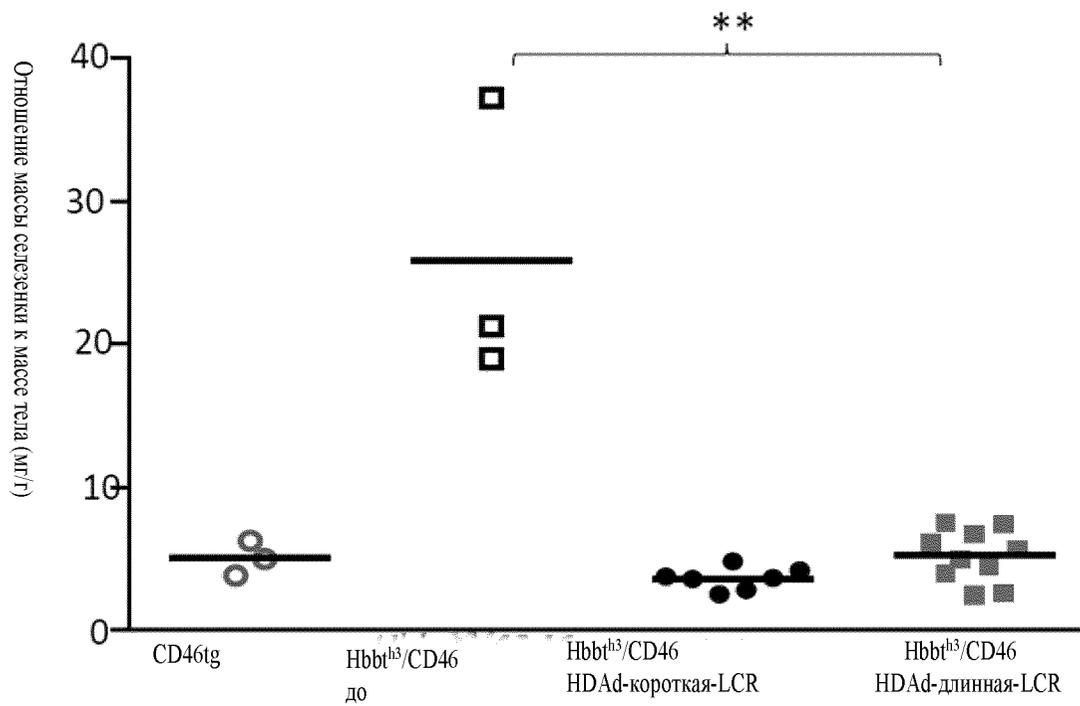
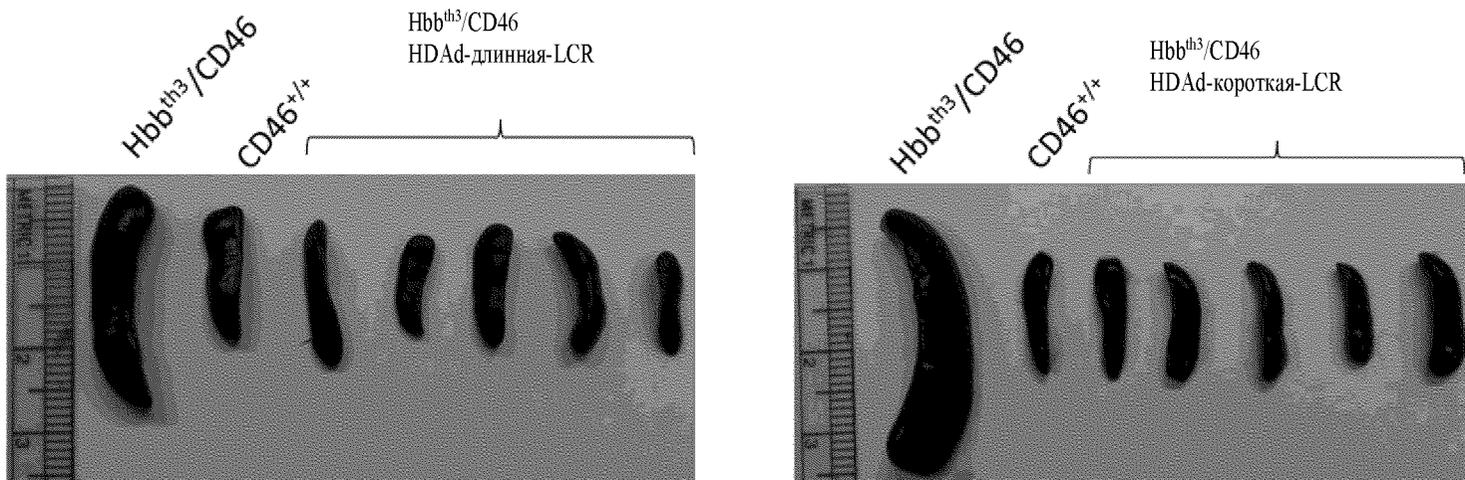
Фиг. 39В продолж.



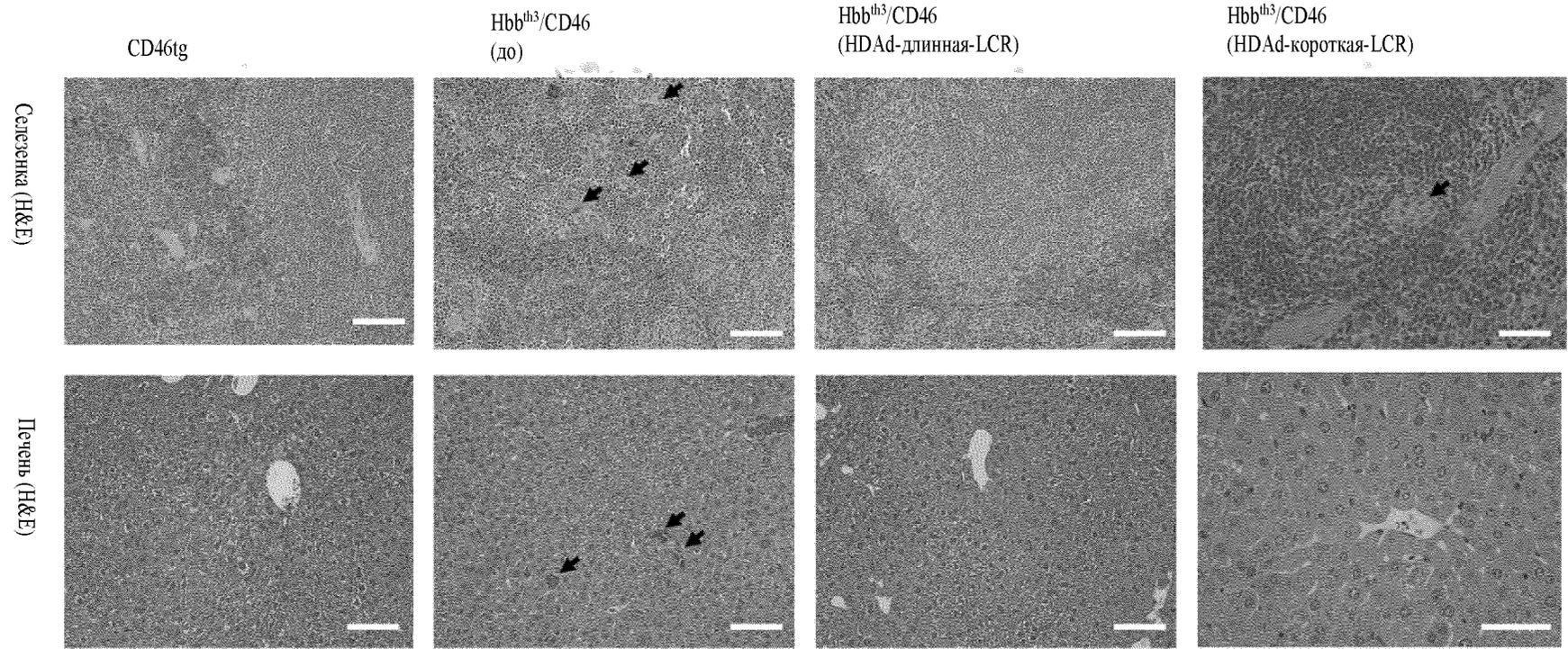
Фиг. 39В продолж.



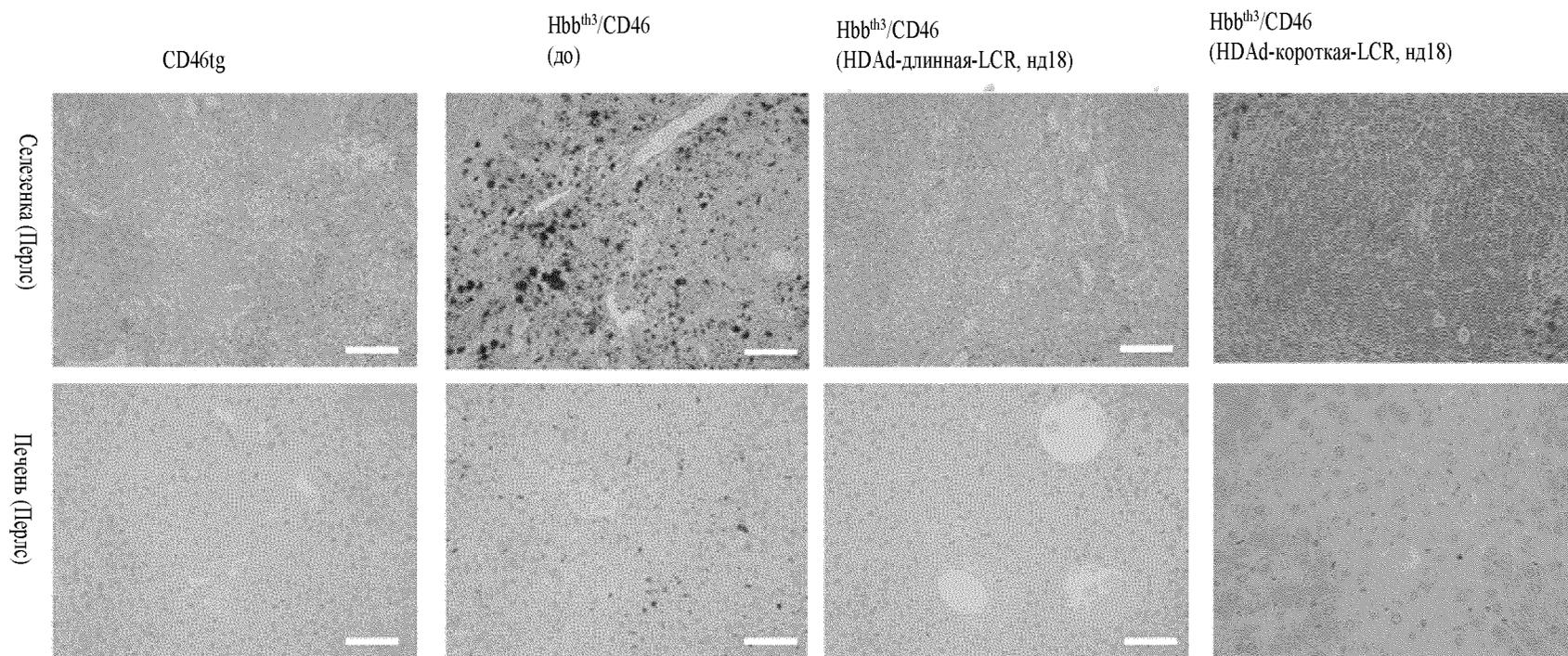
Фиг. 40А



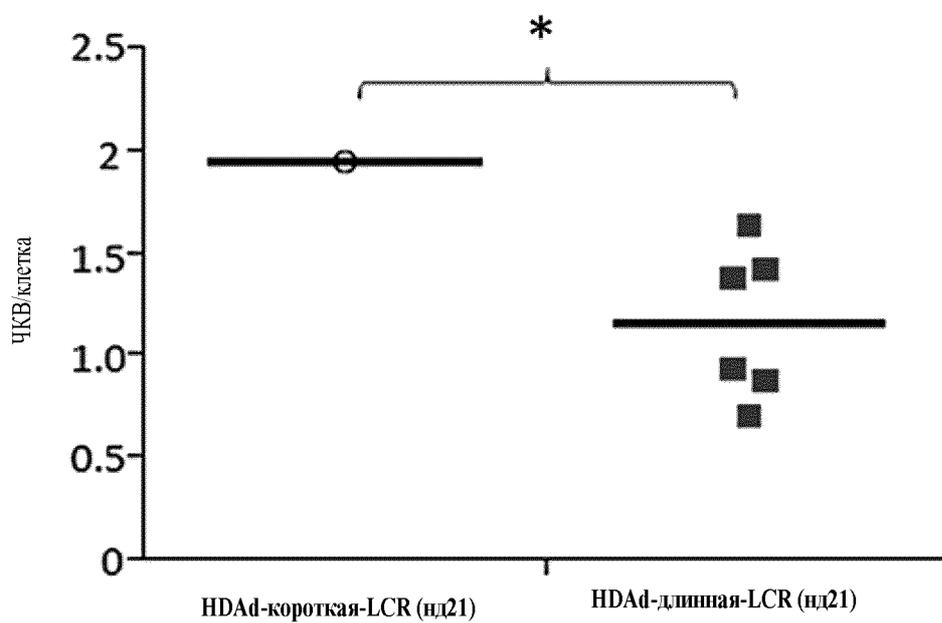
Фиг. 40В



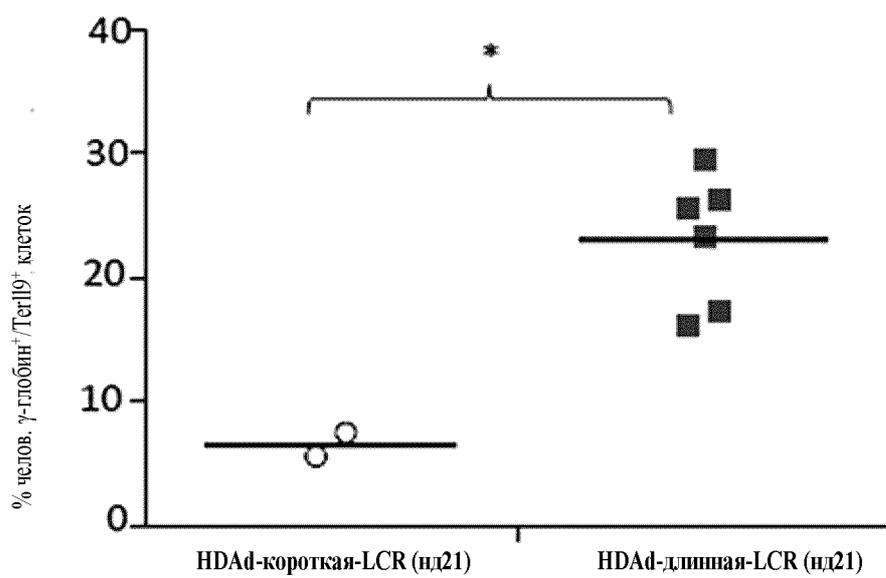
Фиг. 41



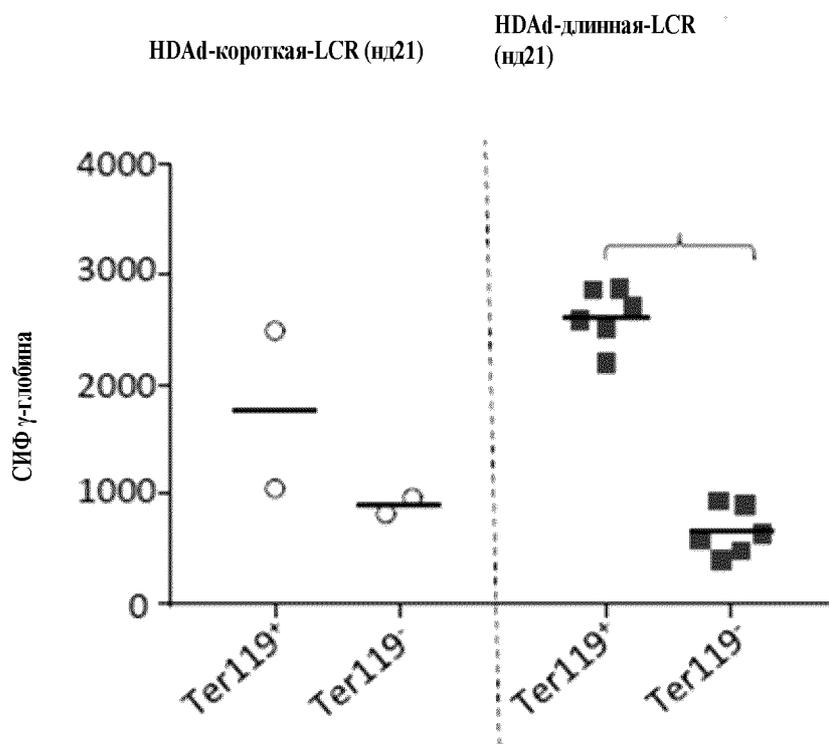
Фиг. 42А



Фиг. 42В

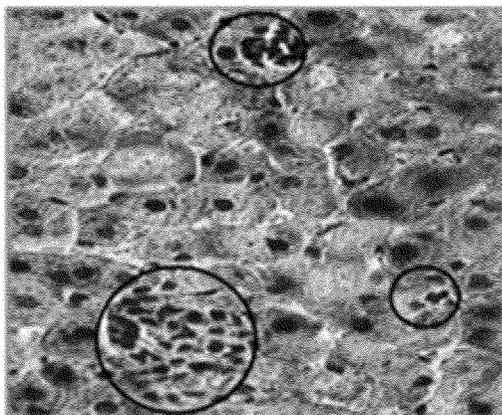
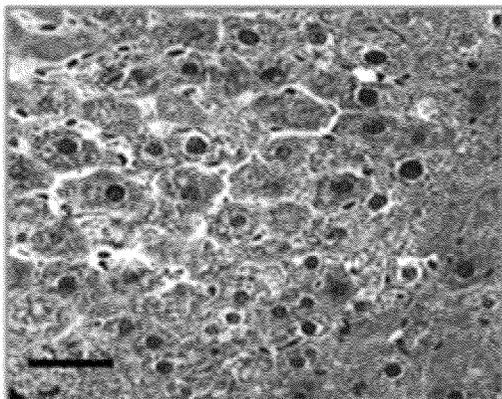


Фиг. 42С



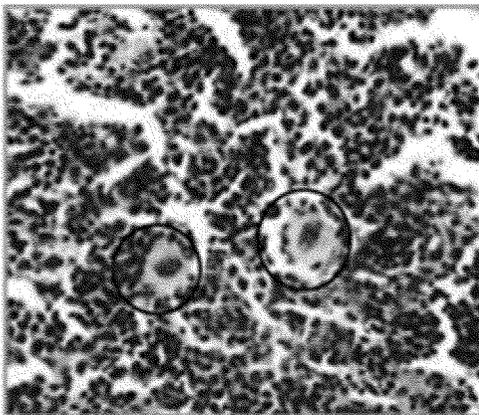
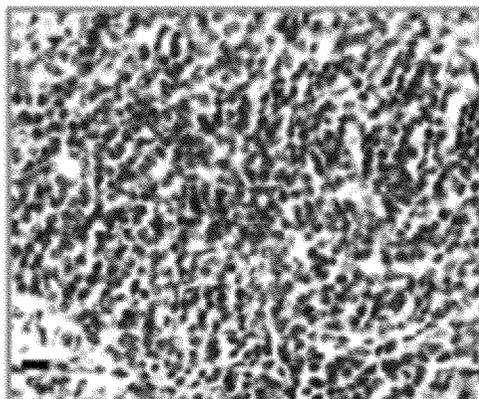
Фиг. 43

CD46^{fl/e}
до

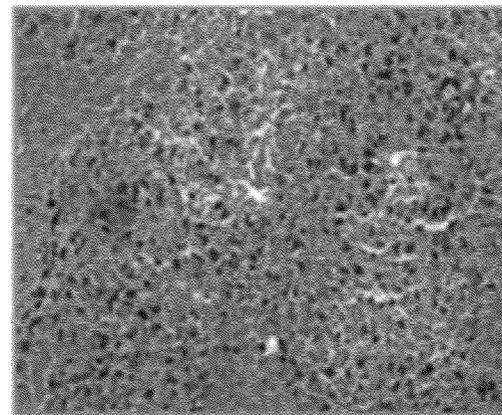
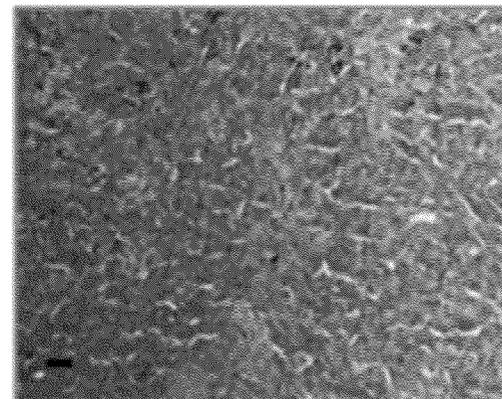


Печень, окрашивание Н&Е

CD46^{+/+}/Nrbhr-3

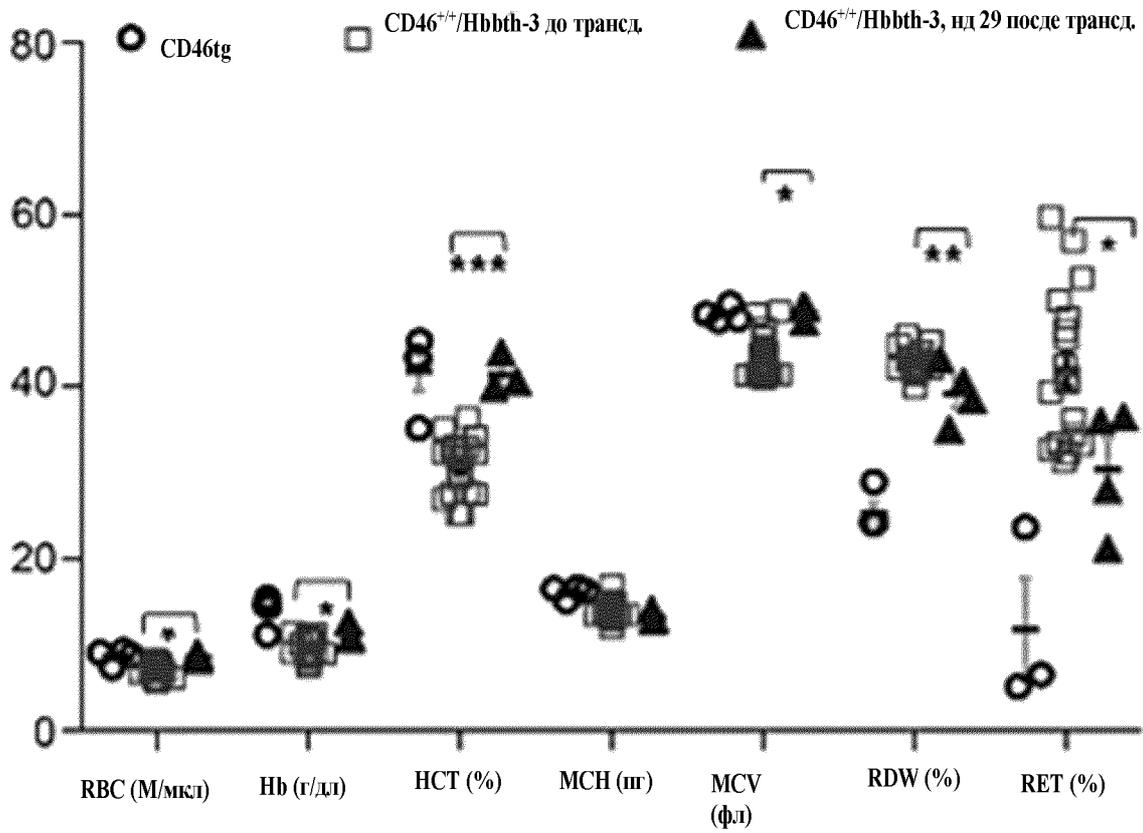


Селезенка. Окрашивание Н&Е

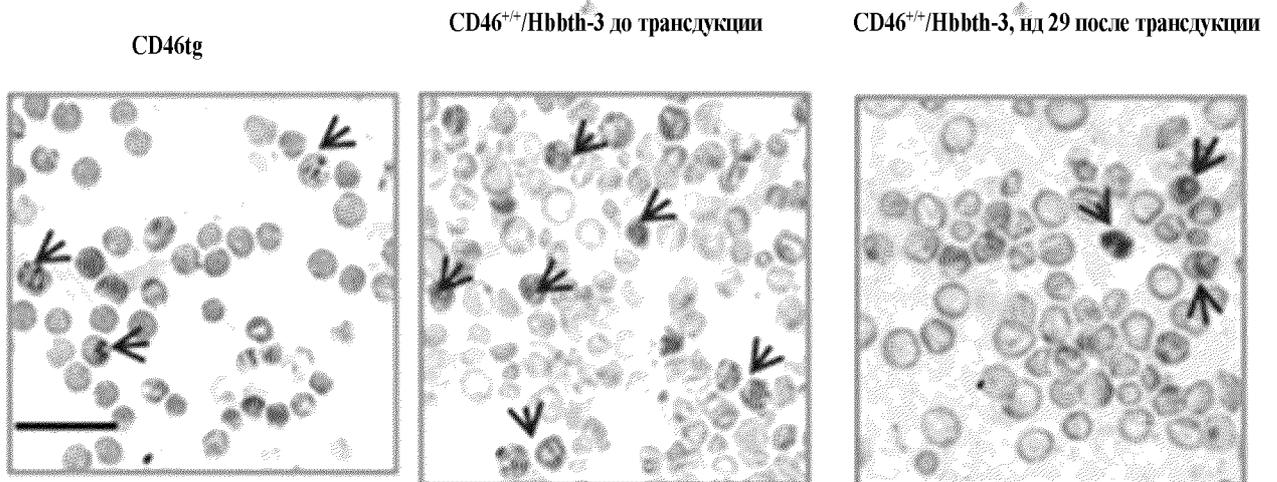


Селезенка. Окрашивание по Перлеу

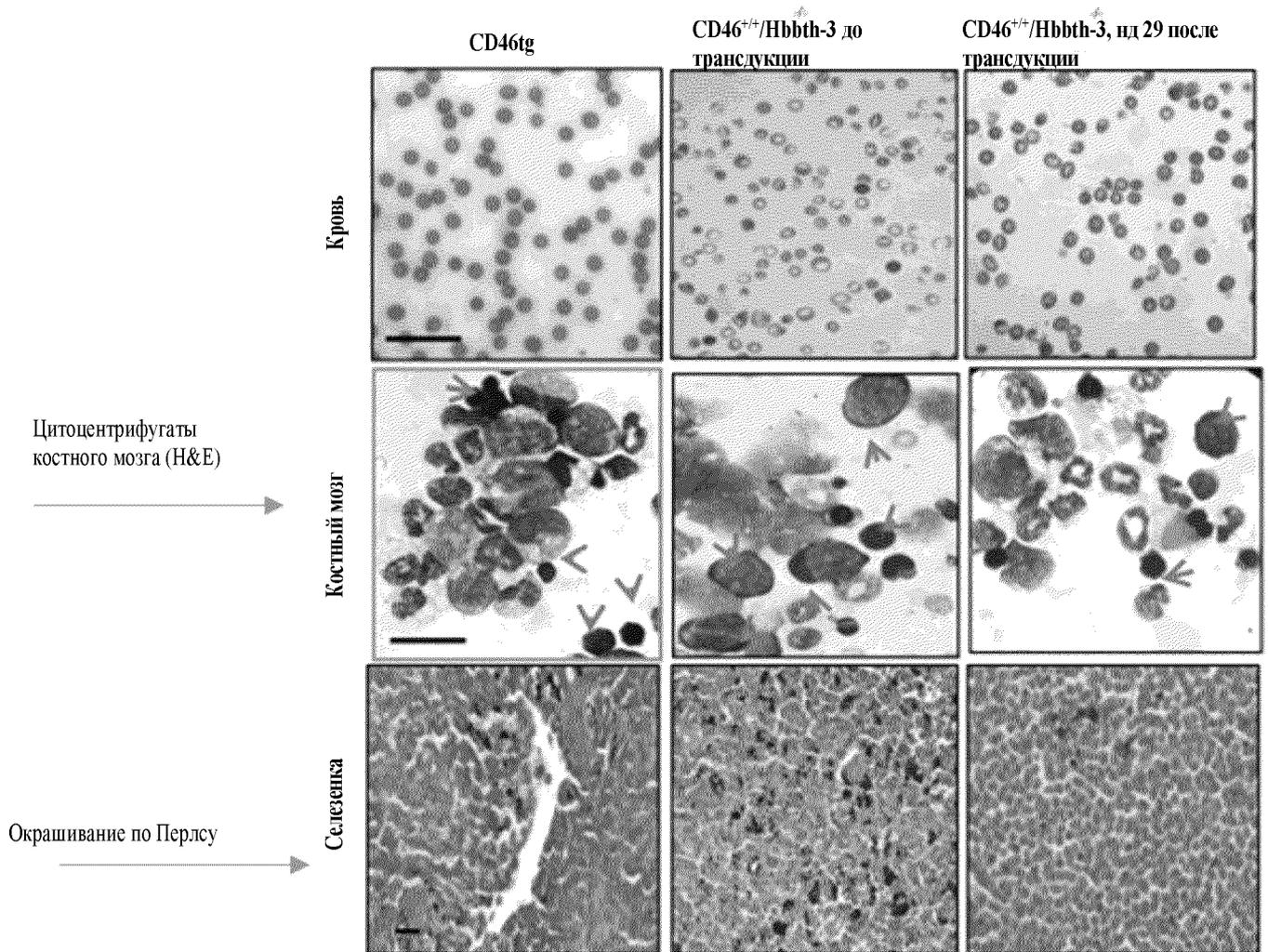
Фиг. 44А



Фиг. 44В

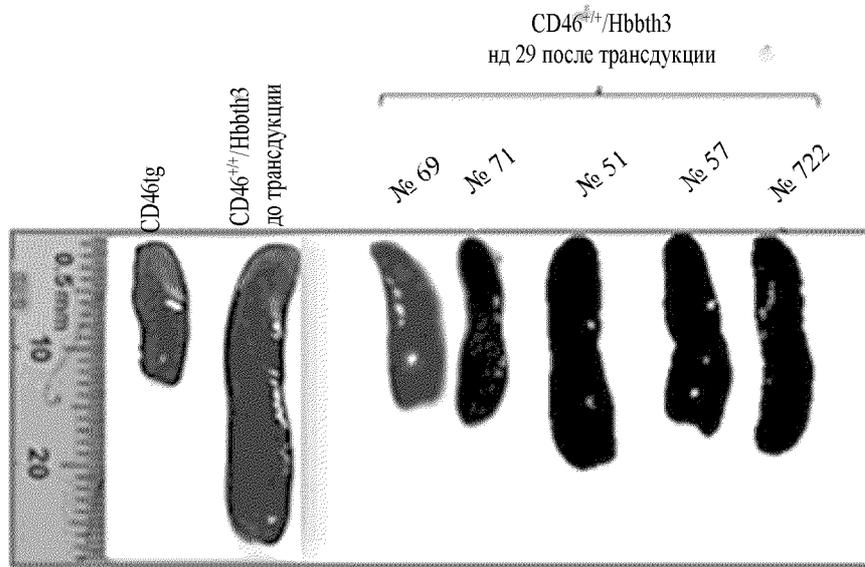


Фиг. 44С

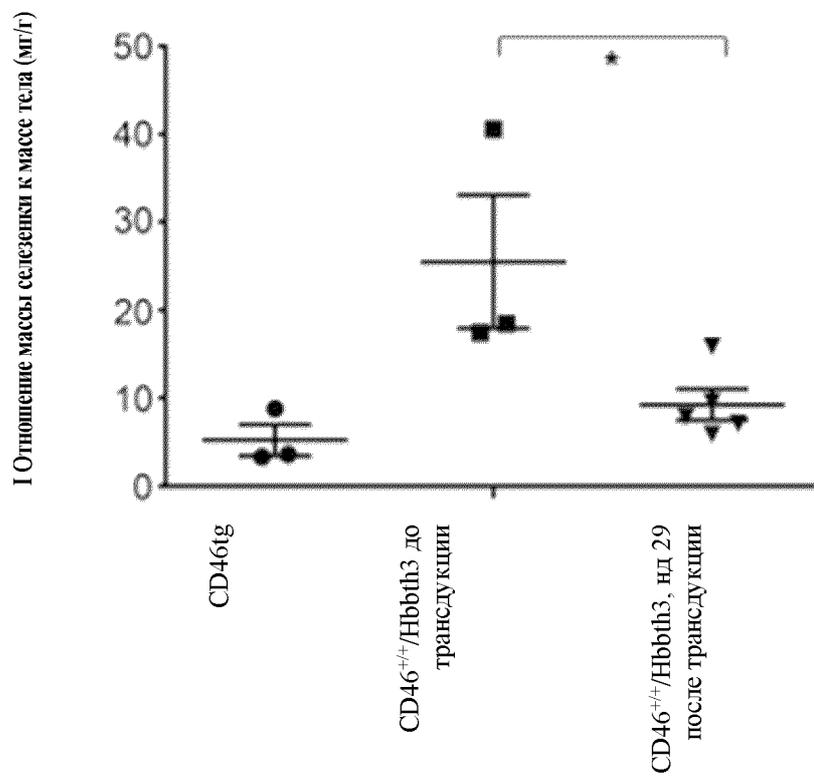


87/350

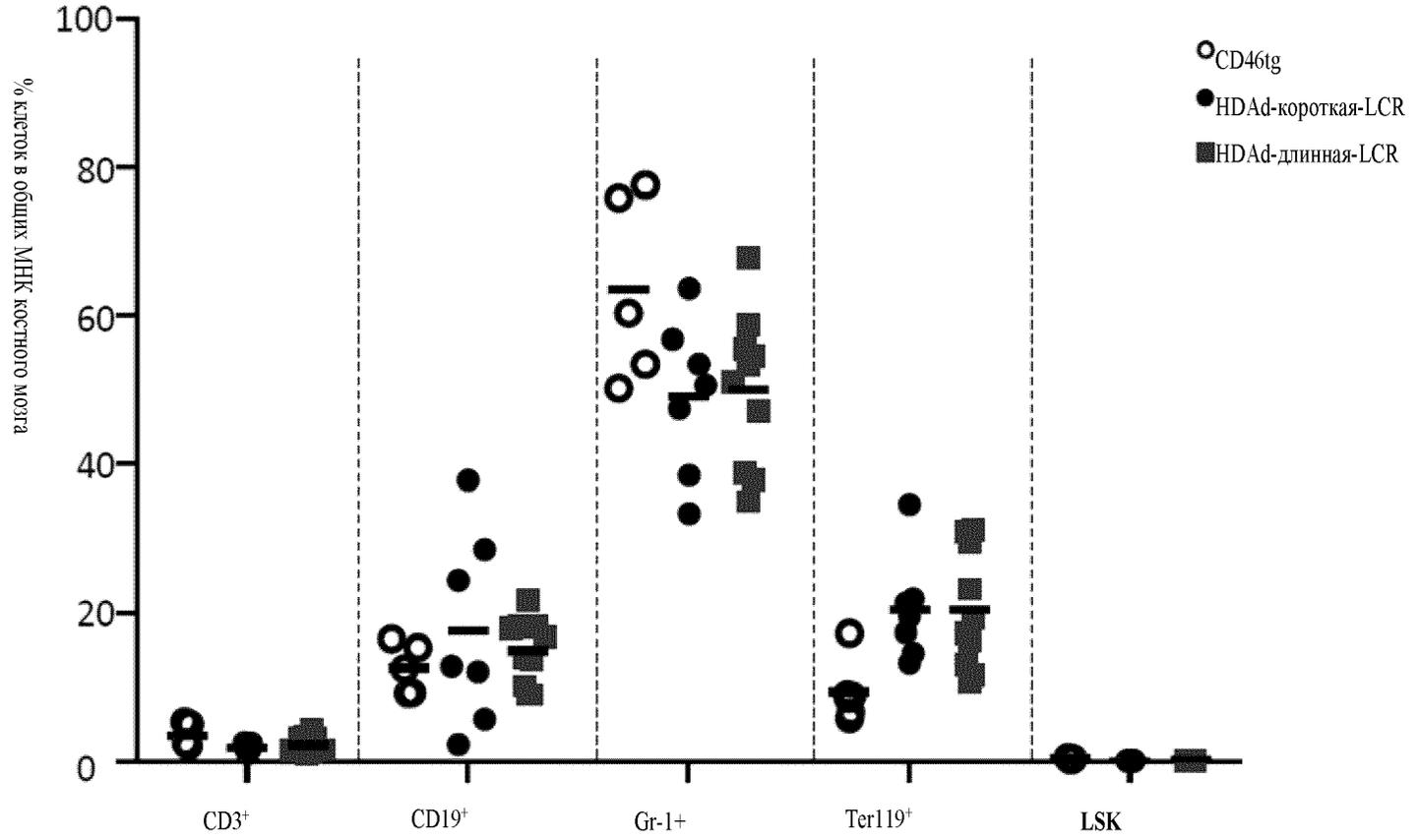
Фиг. 44D



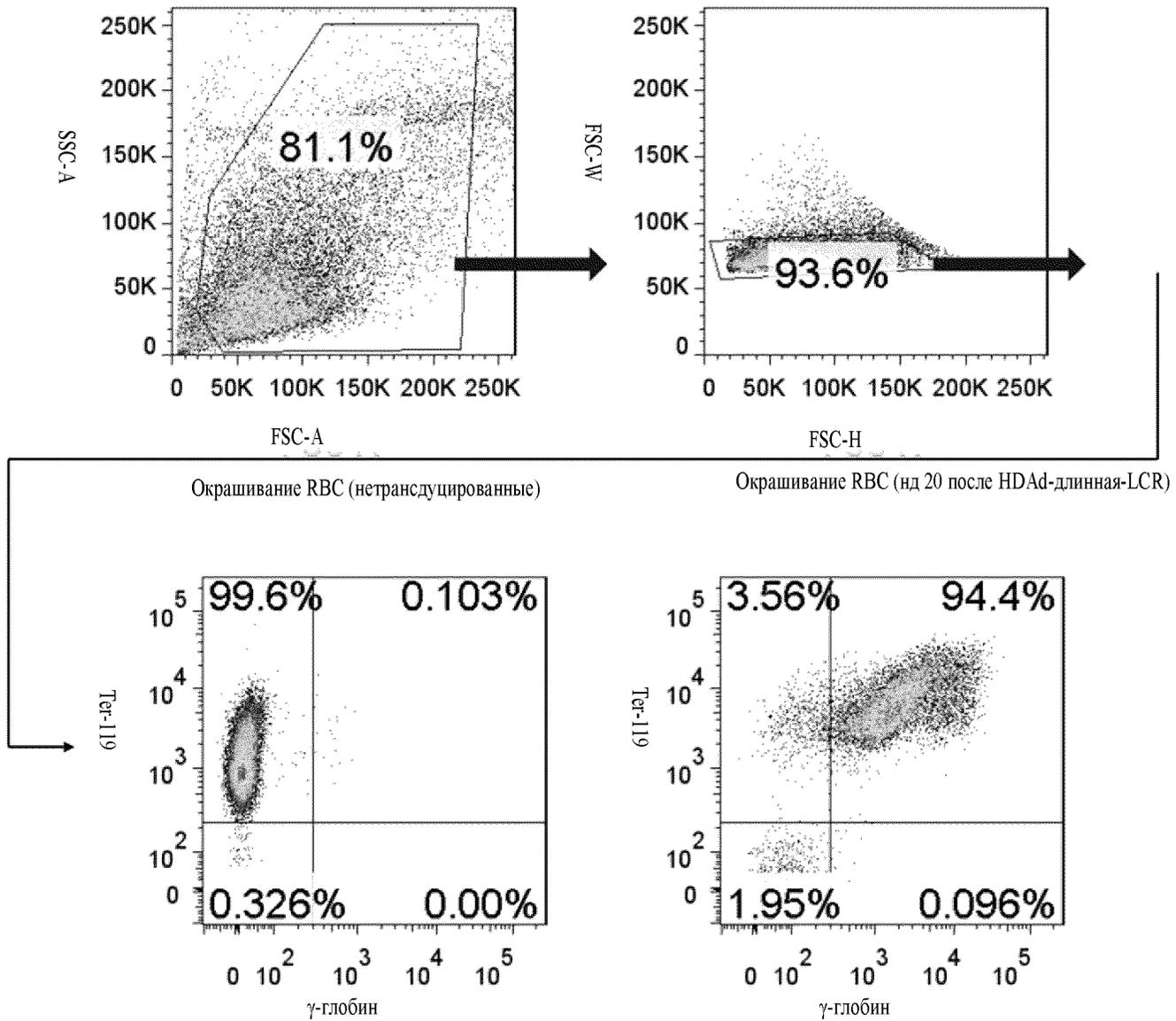
Фиг. 44E



Фиг. 45



Фиг. 46

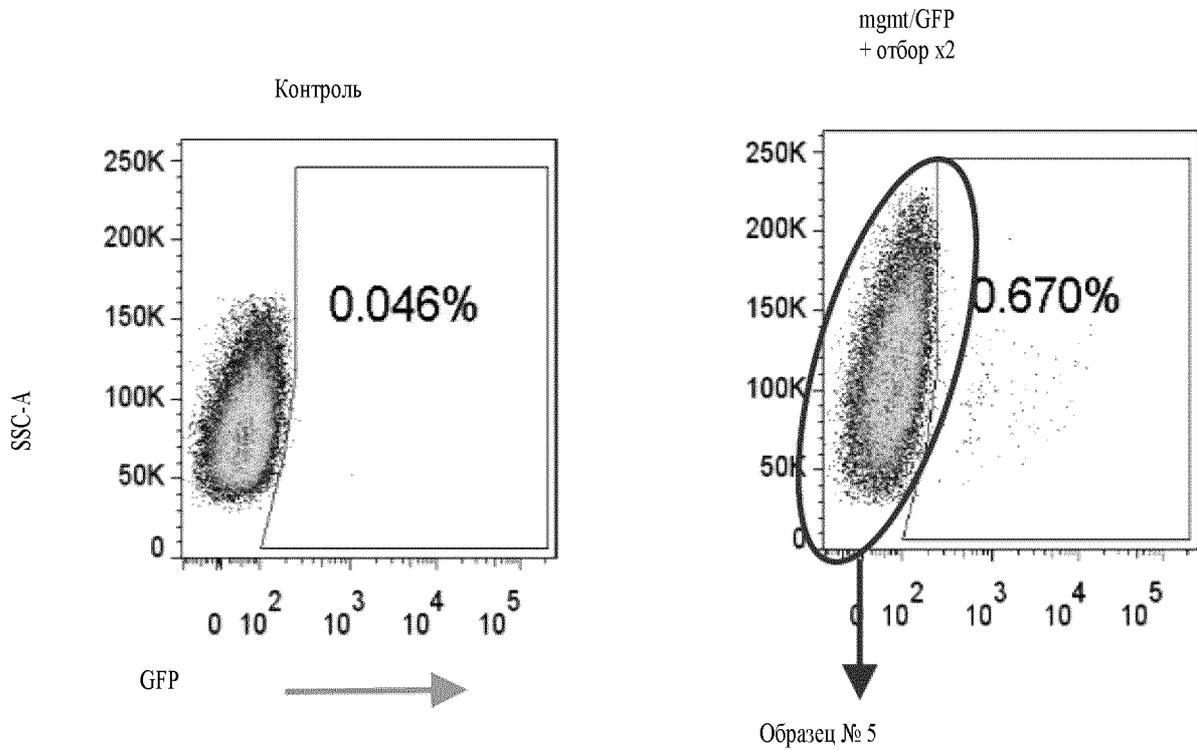
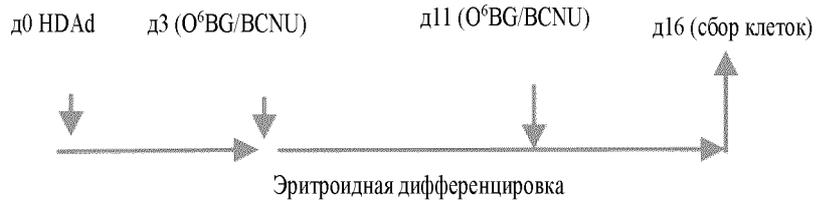


90/350

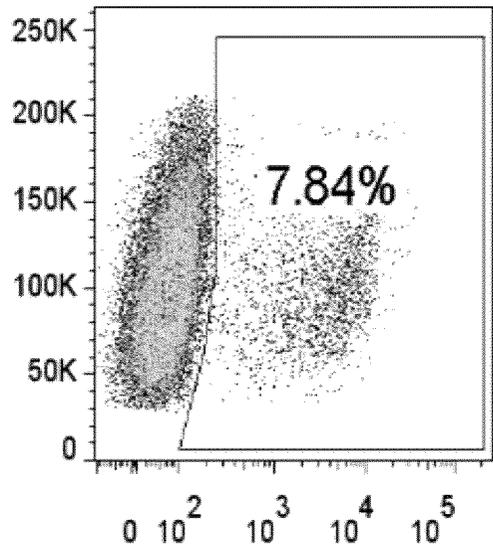
Фиг. 47А

huCD34+ клетки

- HDAd5/35++ mgmt/GFP (2000 вч/клетка)
- HDAd5/35++ mgmt/GFP (2000)+ HDAd5/35+-SB (2000)

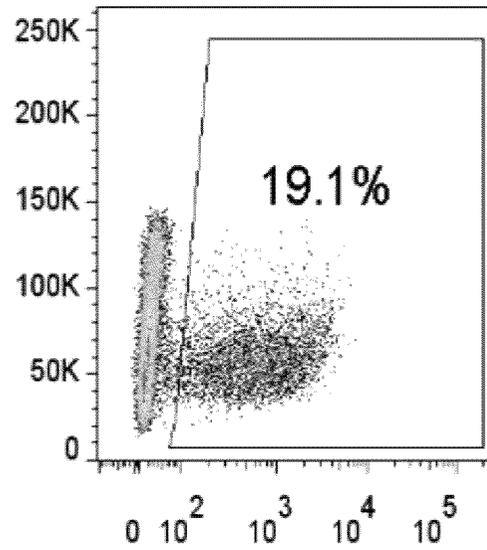


mgmtGFP + SB
+ отбор x1

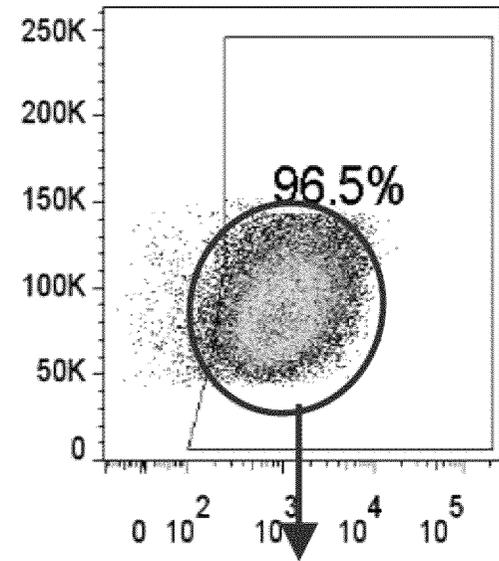


Фиг. 47А продолж.

mgmtGFP + SB
+ отбор x2



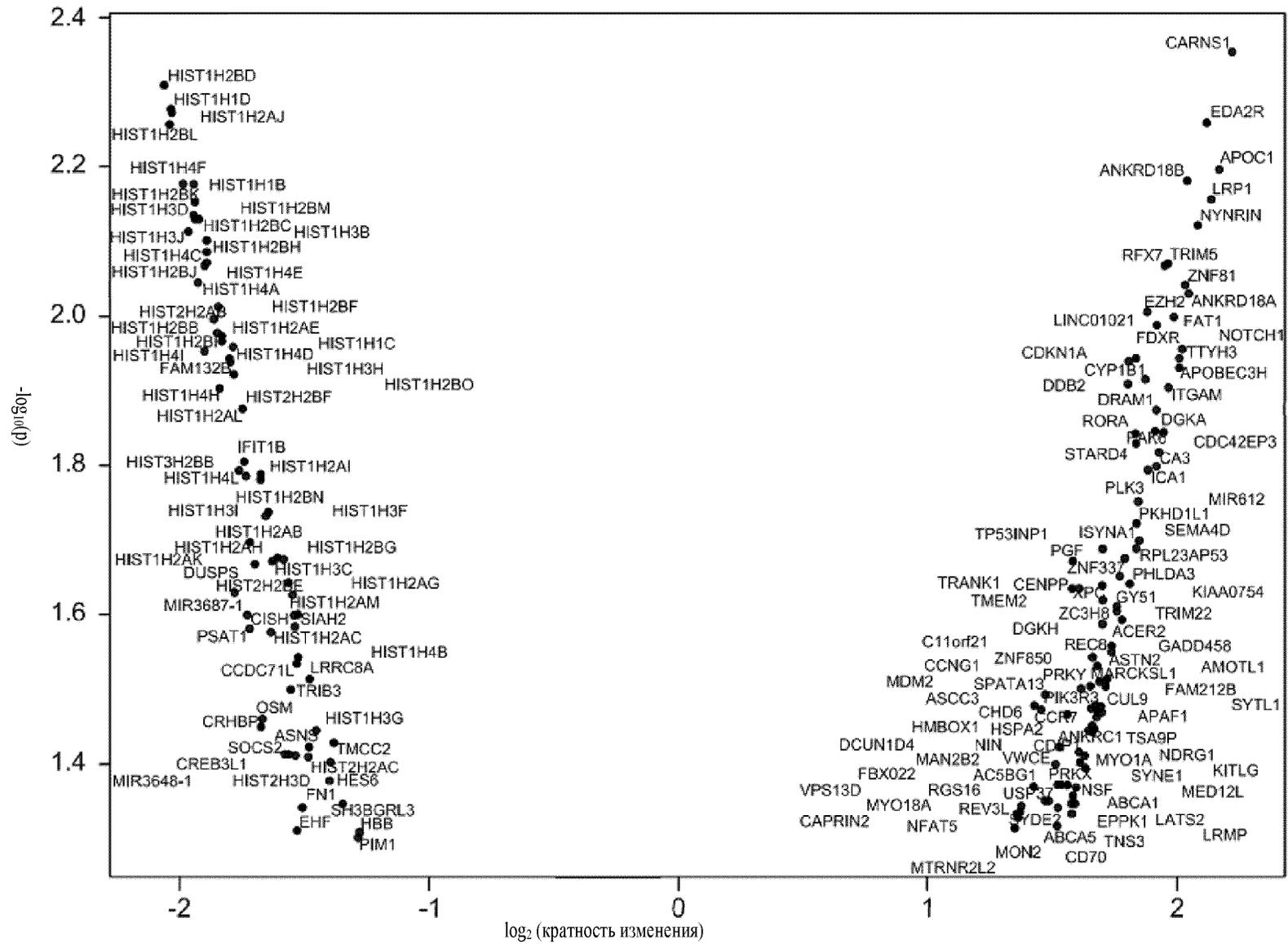
mgmtGFP + SB
+ отбор x2 + сортировка



Образец № 6

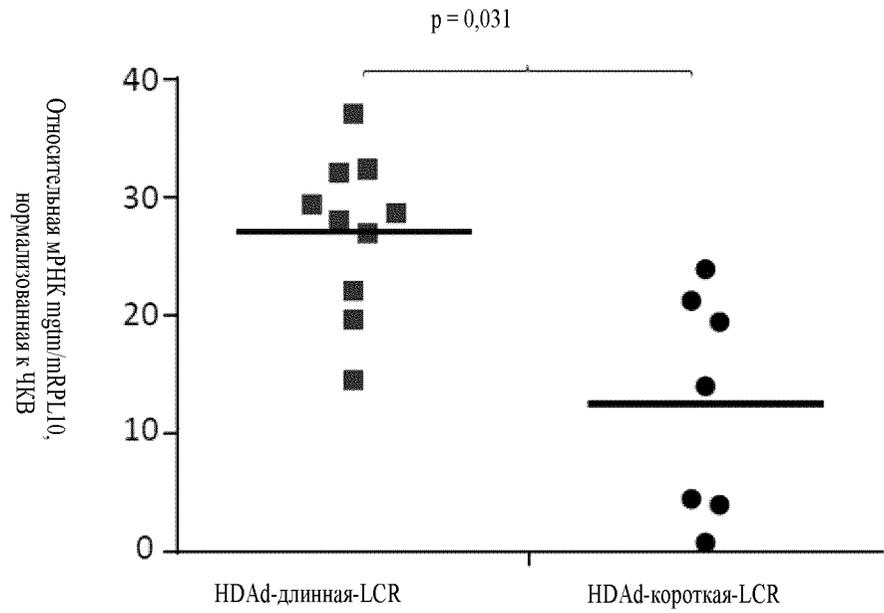
91/350

Фиг. 47В

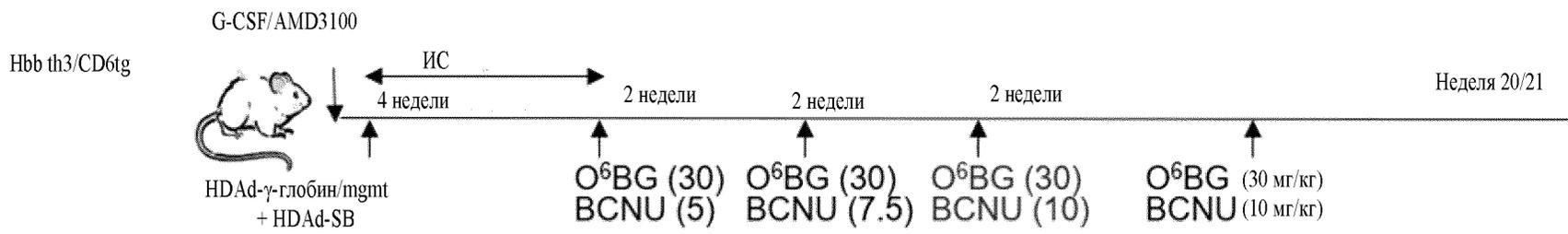


92/350

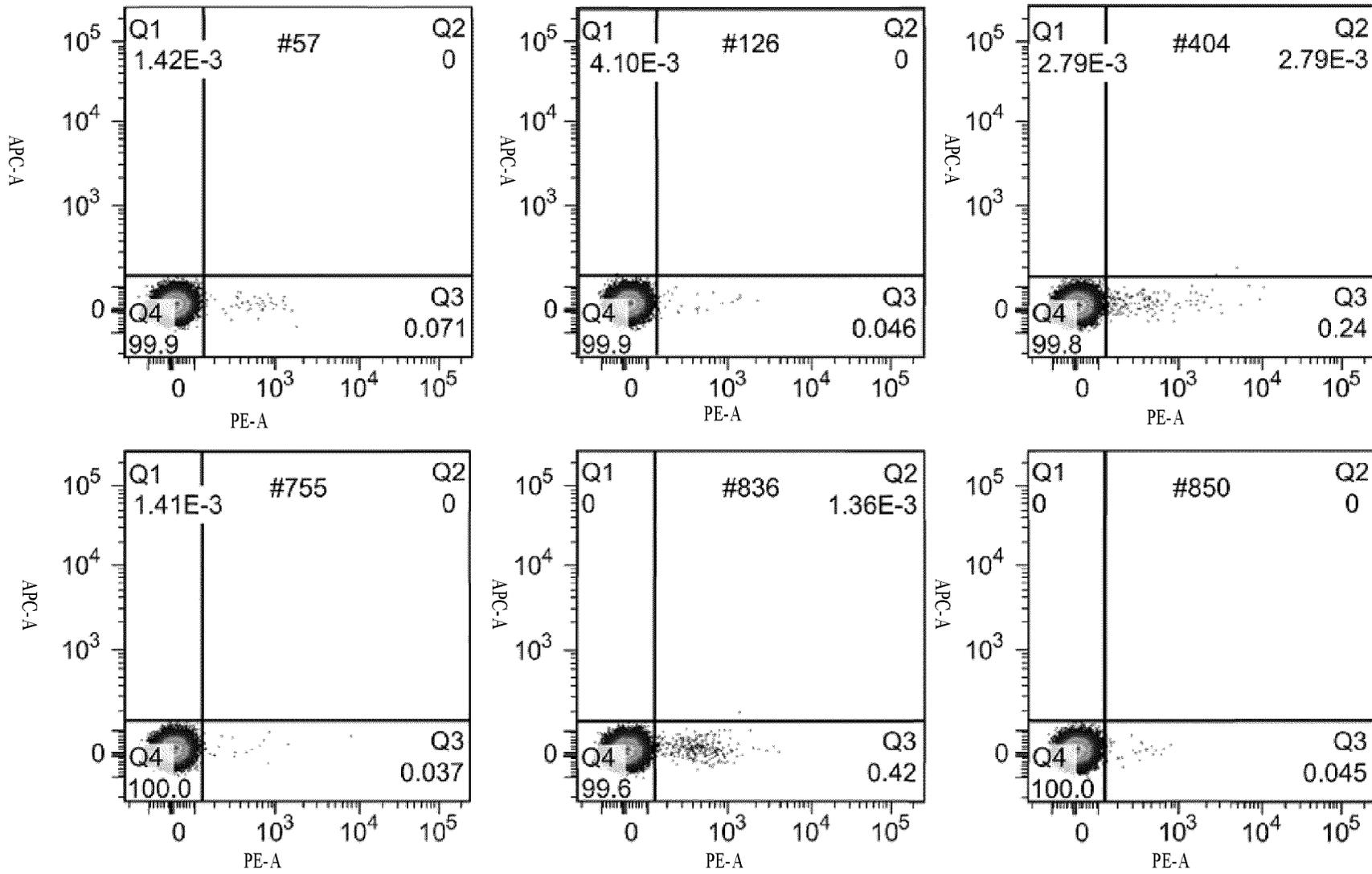
Фиг. 48



Фиг. 49



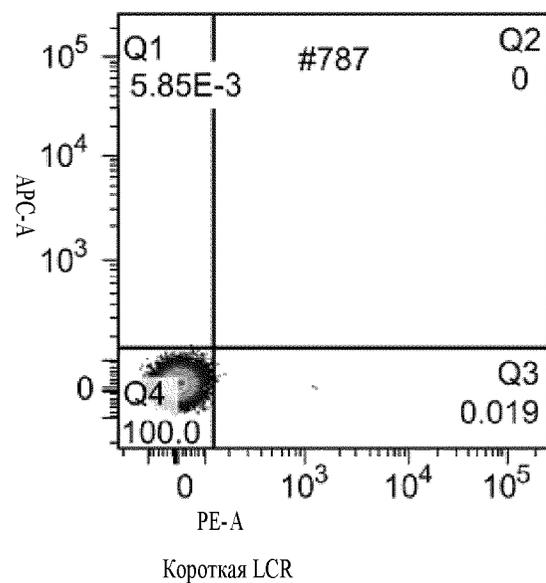
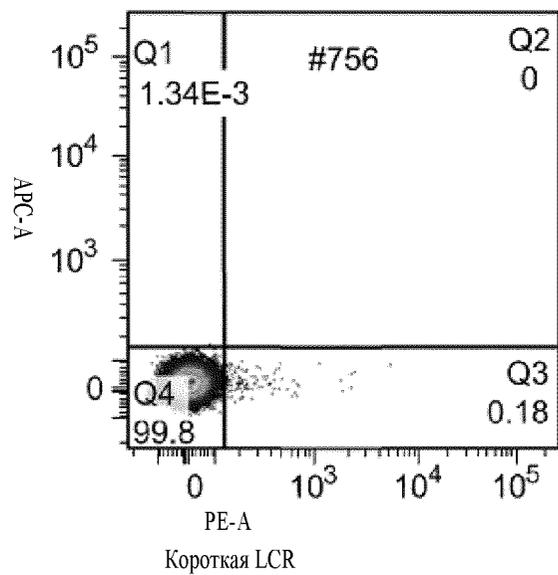
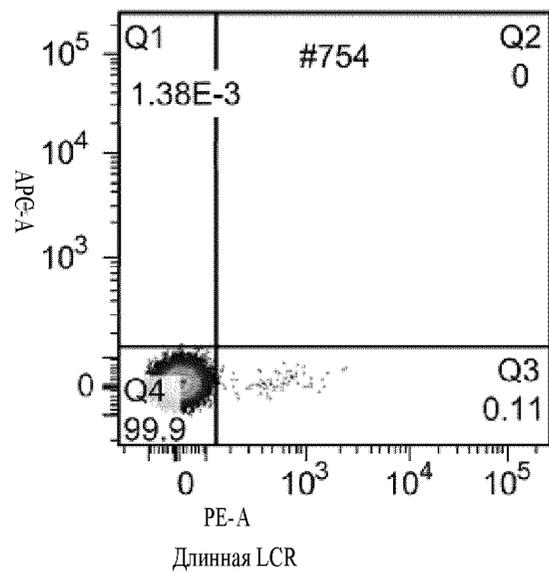
Фиг. 50



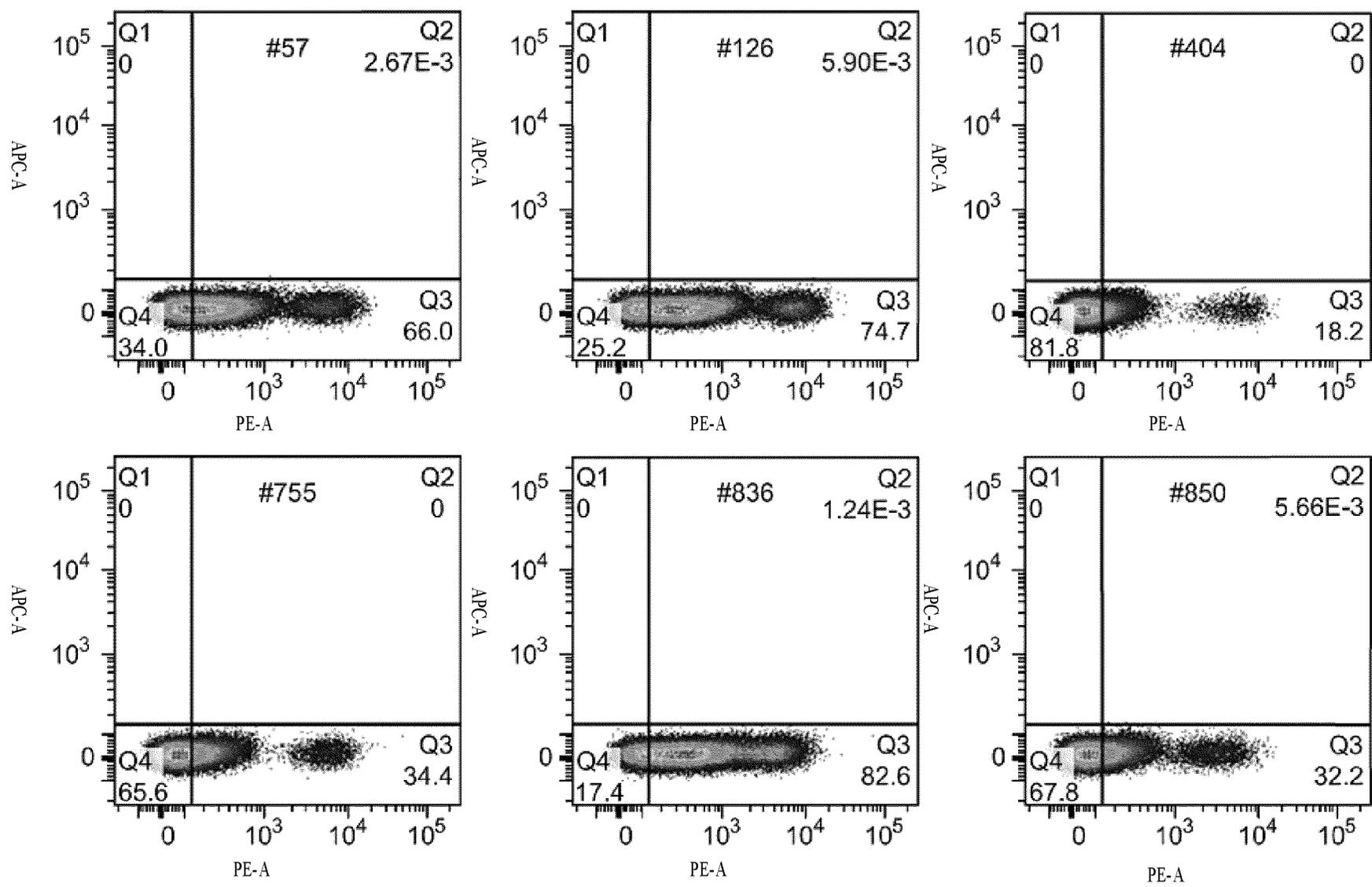
94/350

Длинная LCR

Фиг. 50, продолж.

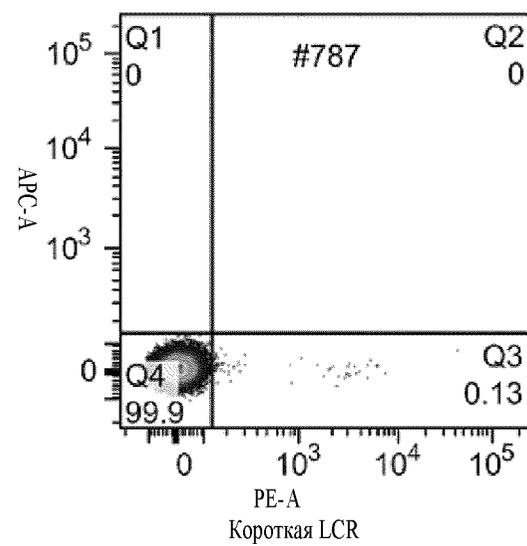
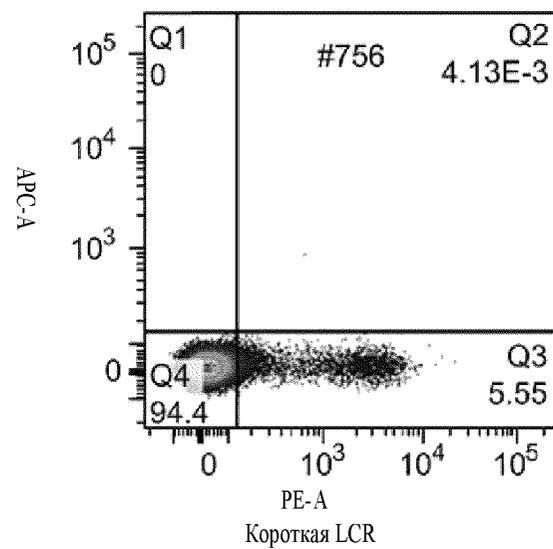
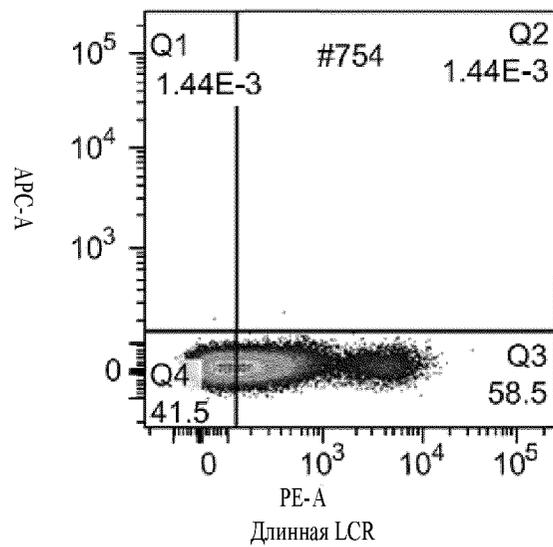


Фиг. 51



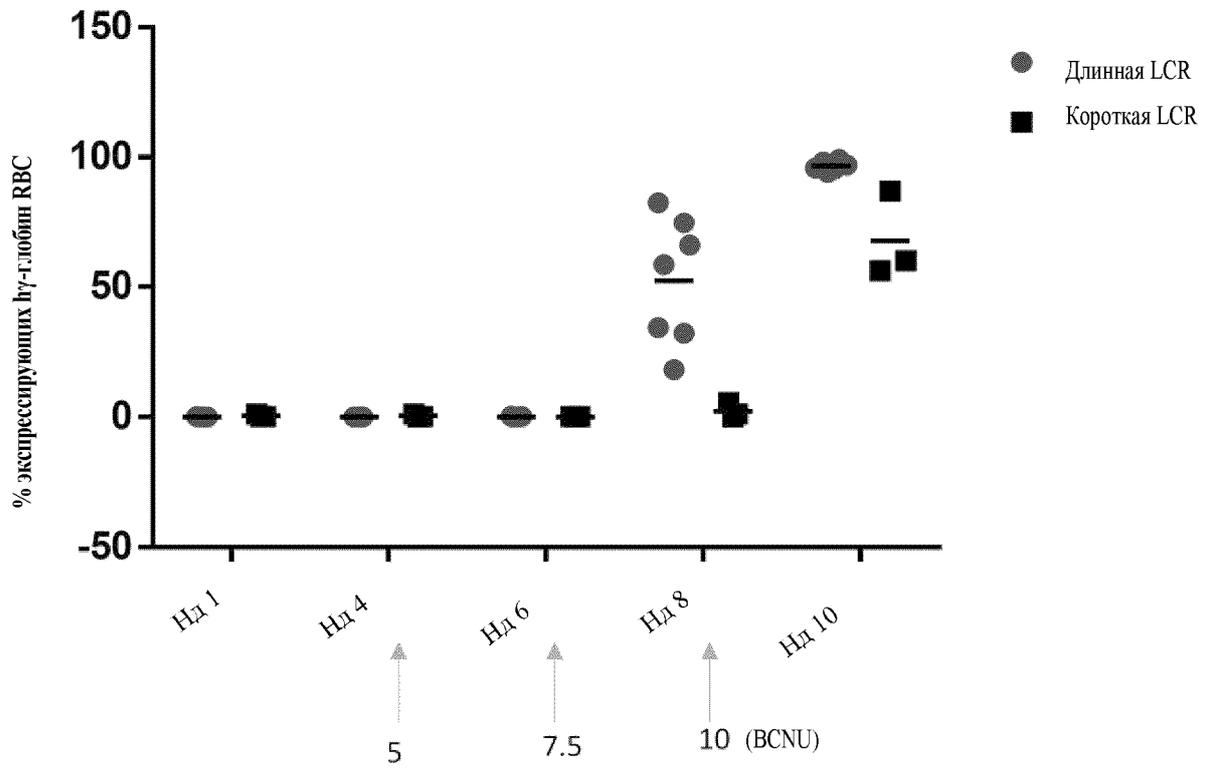
Длинная LCR

Фиг. 51, продолж.

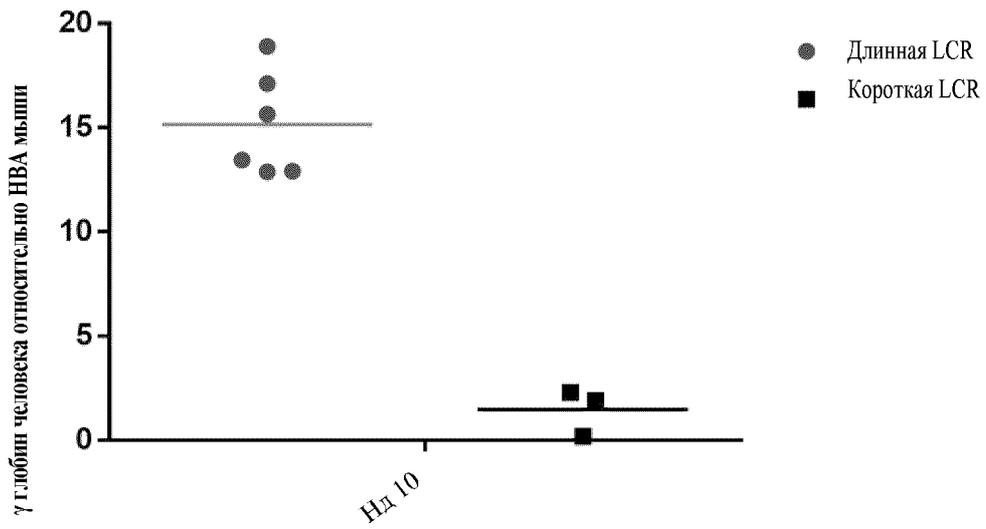


98/350

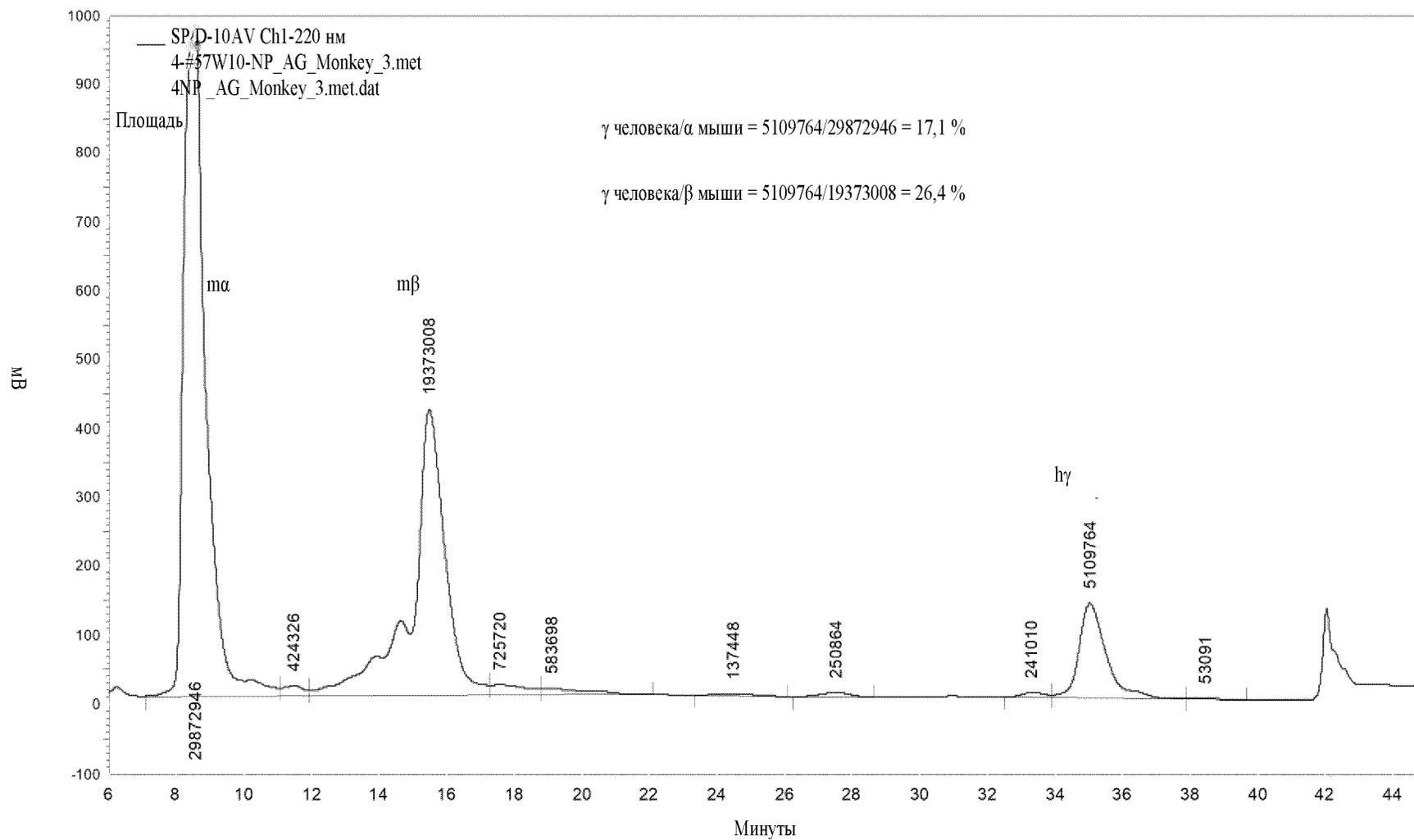
Фиг. 52



Фиг. 53



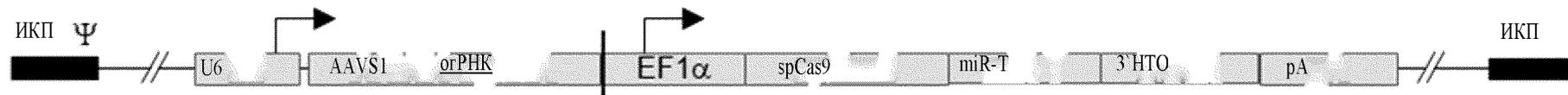
Фиг. 54



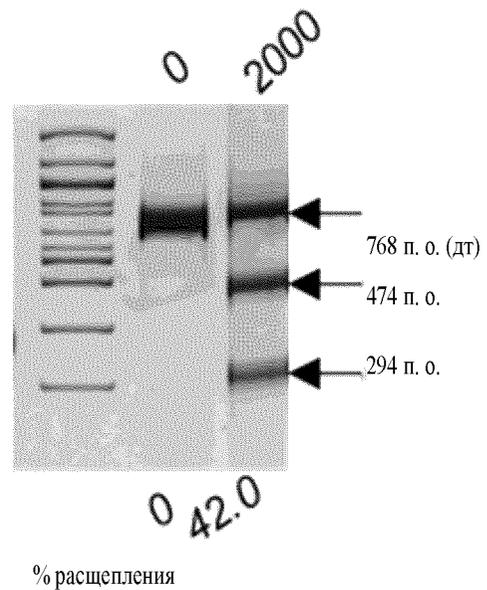
99/350

Фиг. 55А

HDAAd-CRISPR



Фиг. 55В



101/350

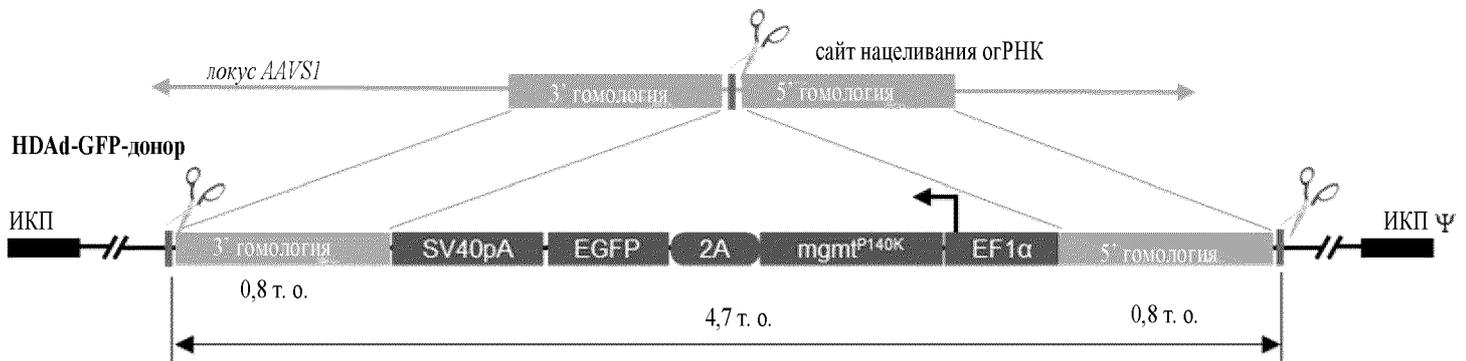
Фиг. 55С

↓

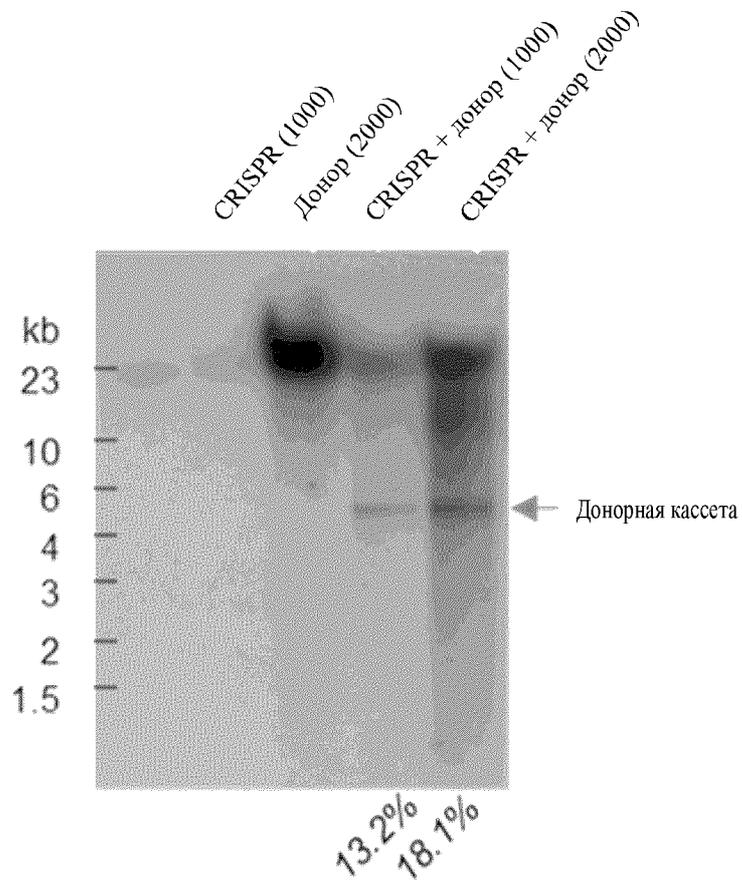
```
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTAGGGACAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTG-----GGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACA-----GATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTAGG-----GACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTA-----GGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTAG-----GGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGG-----CAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACT-----AGGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTAG-----GGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTAGGGACA-GATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTAGGGAC-GGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTT
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTAGGGACAGAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCC
TGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTAGGGACAGCAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATC
```

(SEQ ID NOs: 6-18)

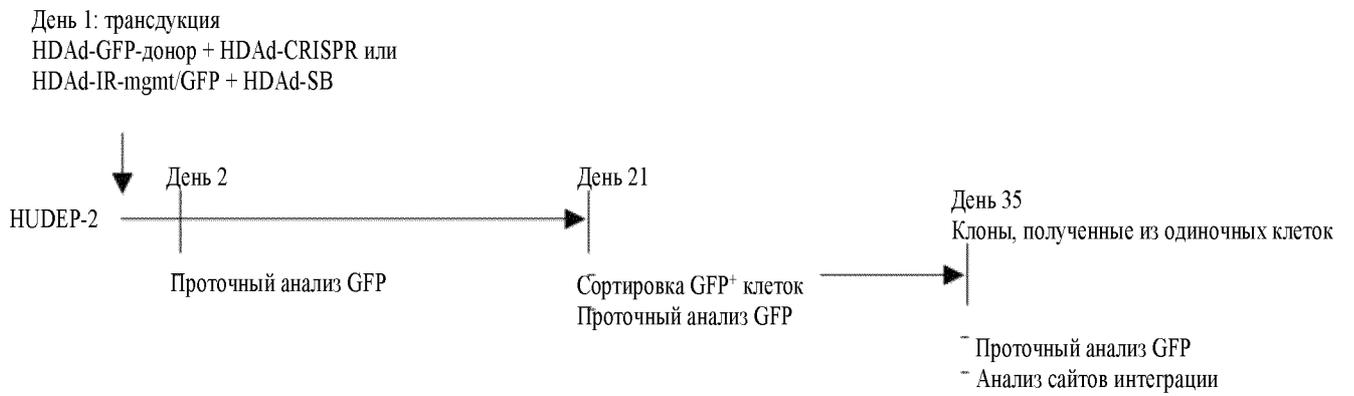
Фиг. 55D



Фиг. 55E



Фиг. 56A

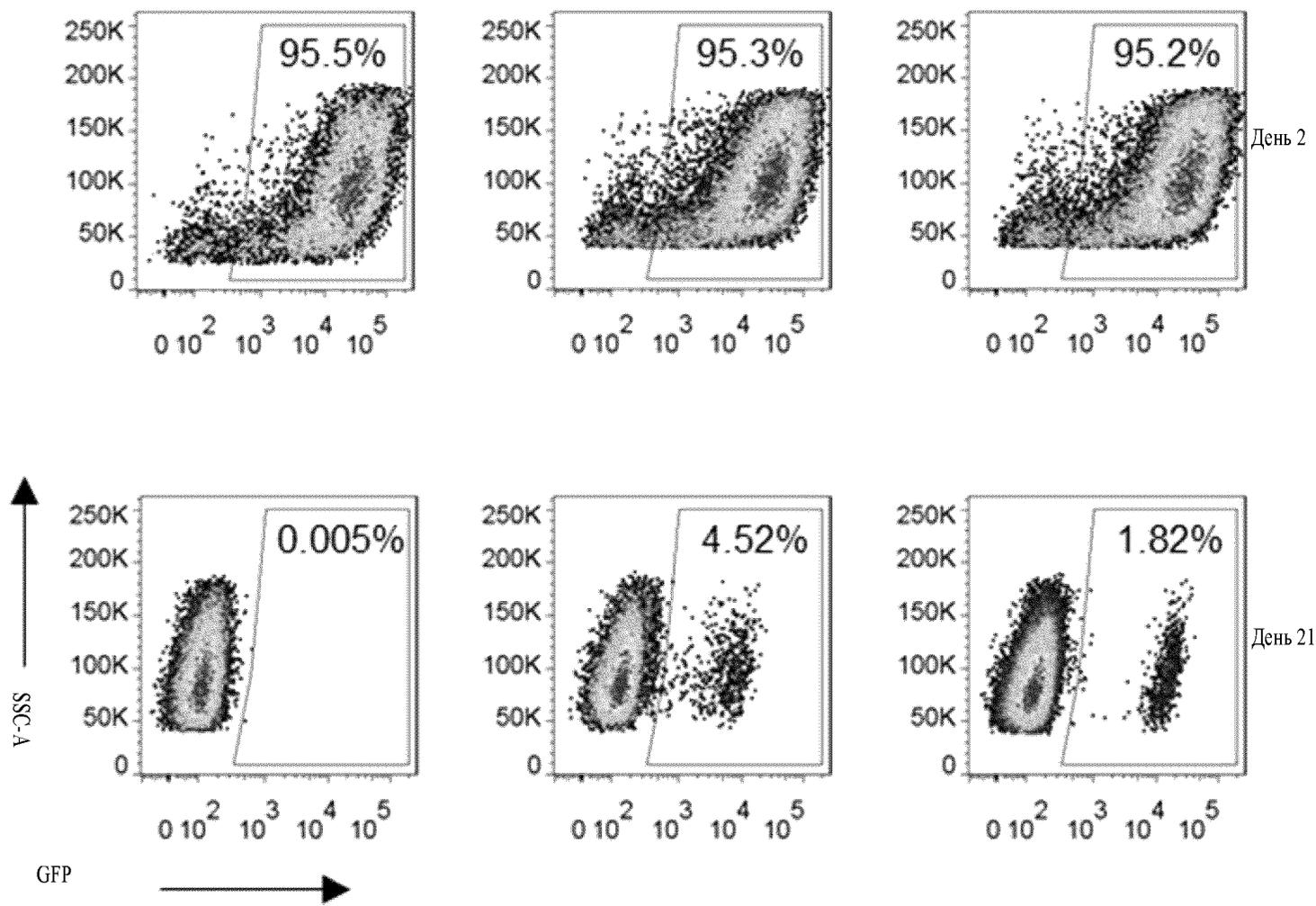


Фиг. 56В

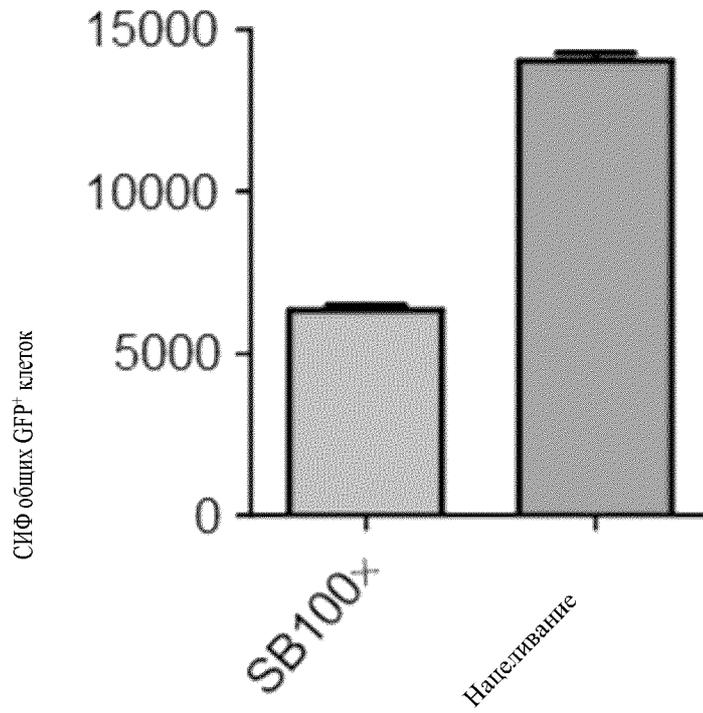
Только донорный вектор

SB100x-опосредованная интеграция

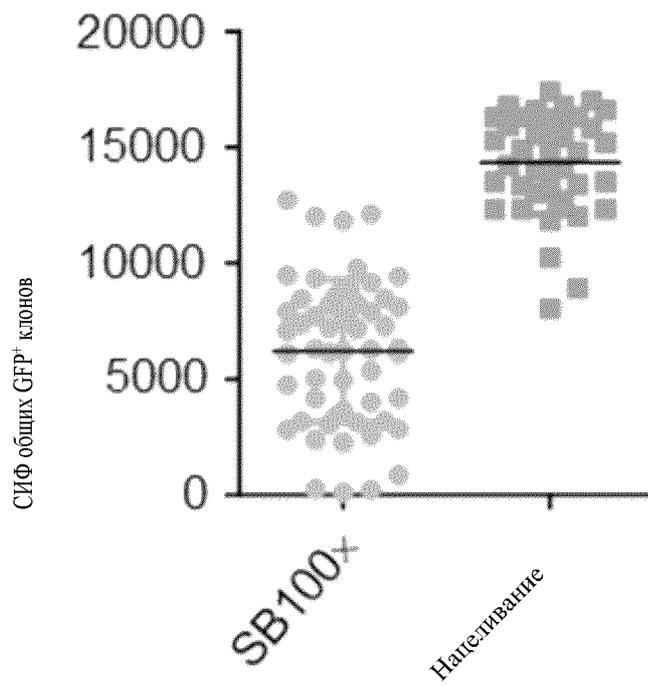
Нацеленная интеграция



Фиг. 56С

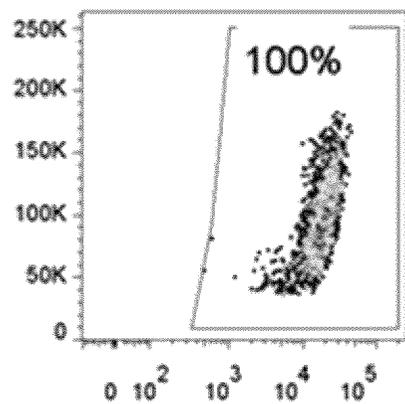


Фиг. 56D

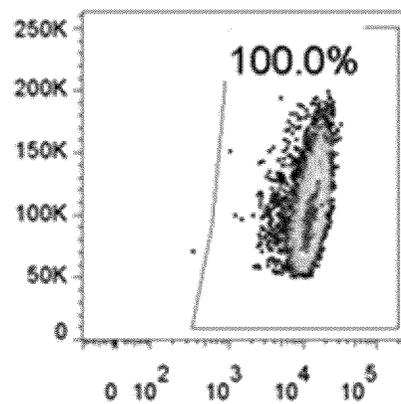


Фиг. 56Е

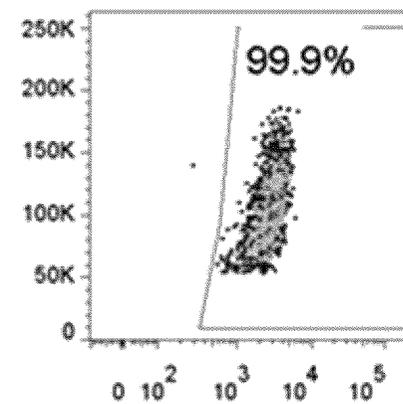
Нацеливание, клон №1



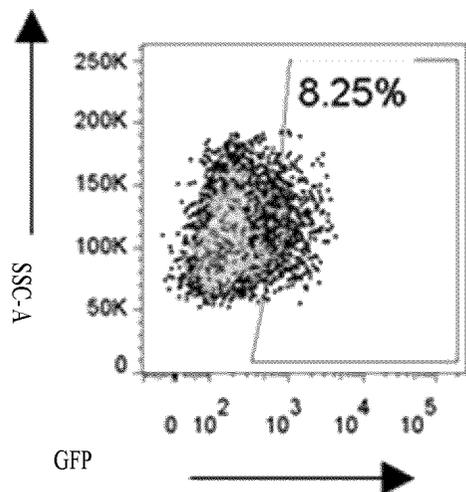
SB100x, клон №1



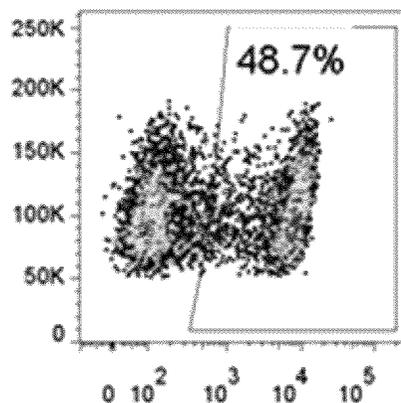
SB100x, клон №26



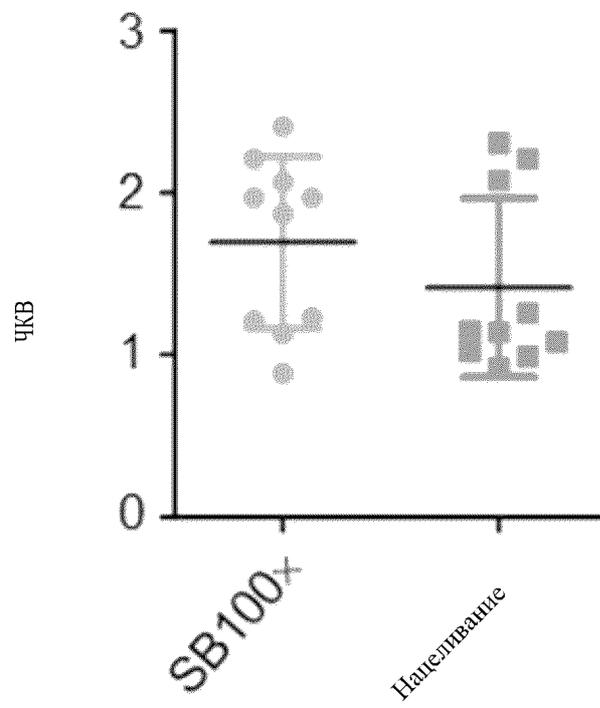
SB100x, клон №15



SB100x, клон №35



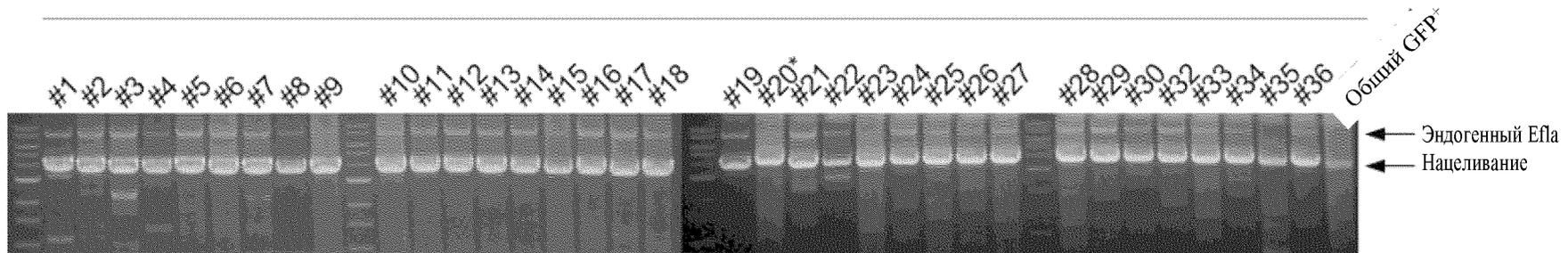
Фиг. 56F



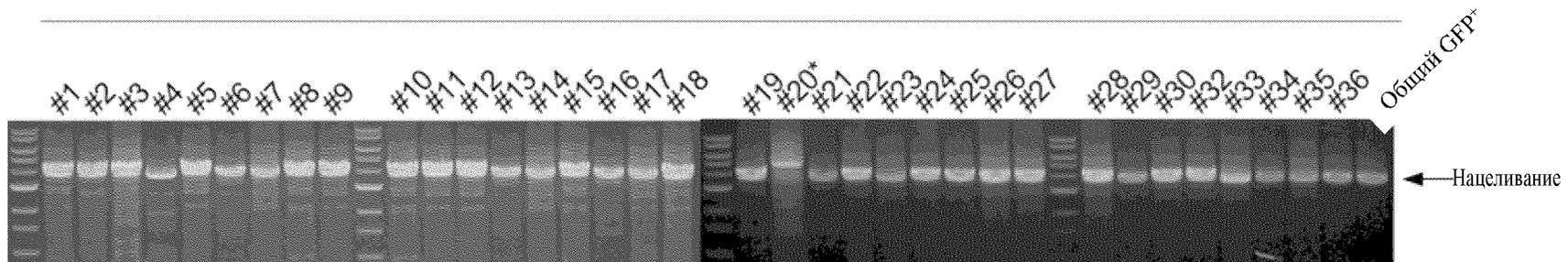
Фиг. 57А



5' соединение (праймеры Efl α)

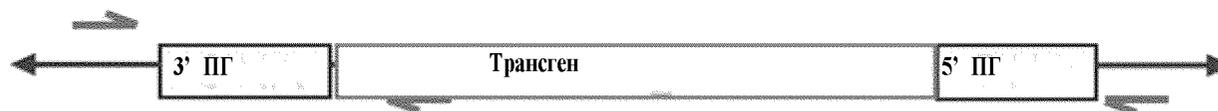


3' соединение (праймеры pA)

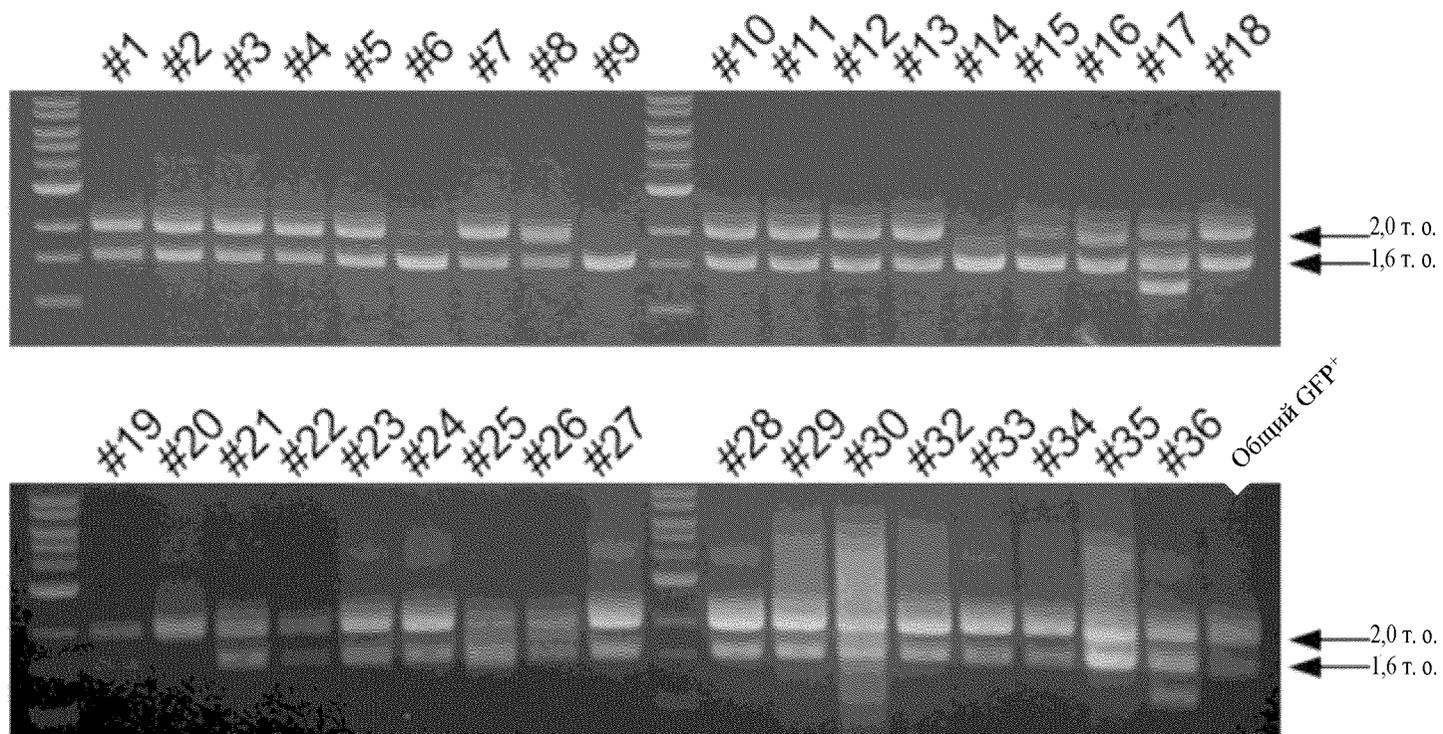


107/350

Фиг. 57В

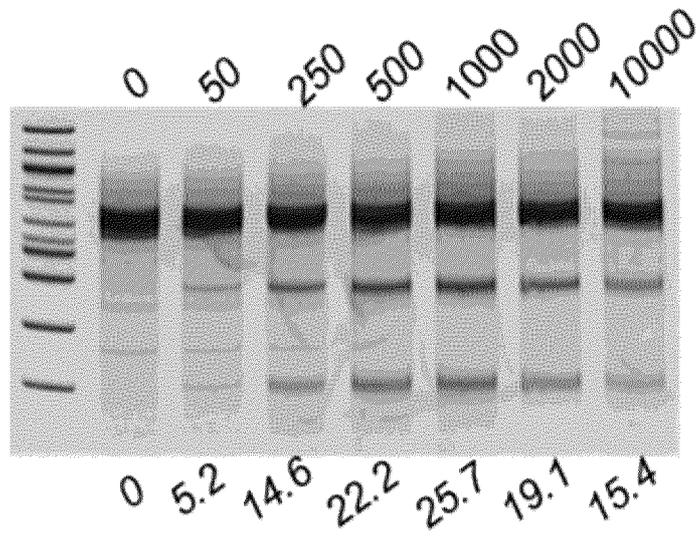


1,6 т. о.: биаллельная нацеленная интеграция
1,6 + 2,0 т. о.: моноаллельная нацеленная интеграция
2,0 т. о.: ненацеленная интеграция

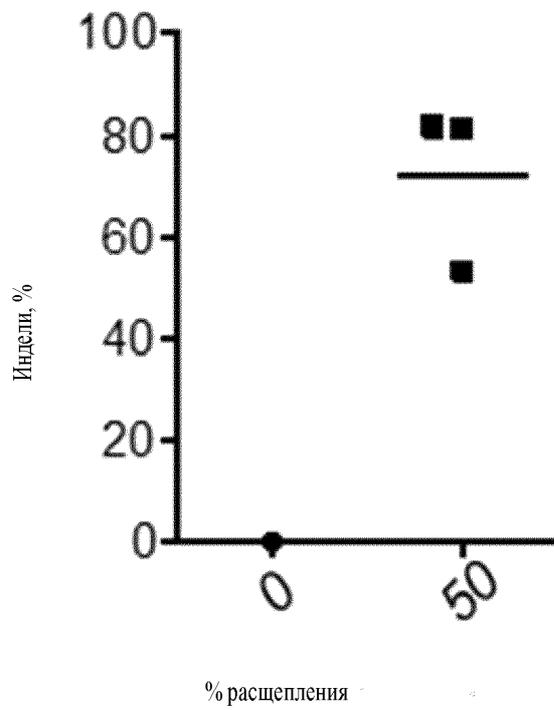


Фиг. 58А

HDA₁-CRISPR (вч/клетка)



Фиг. 58В

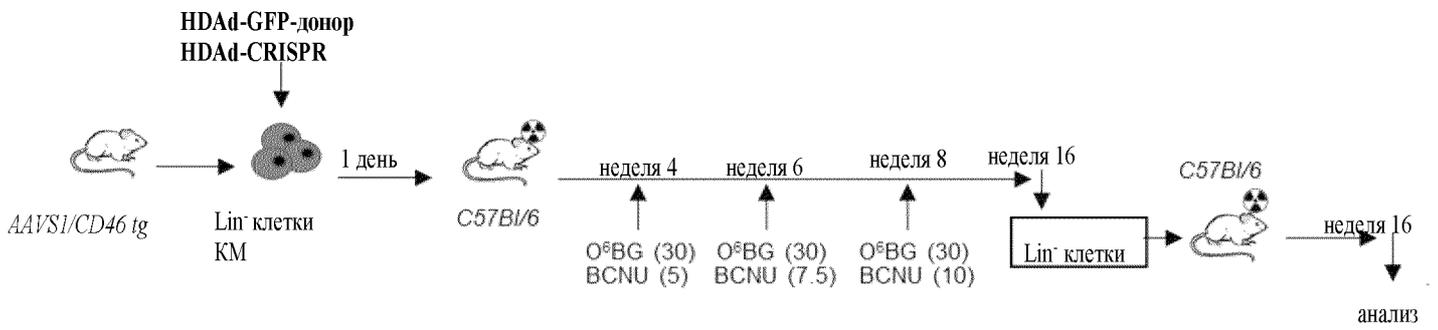


Фиг. 58С

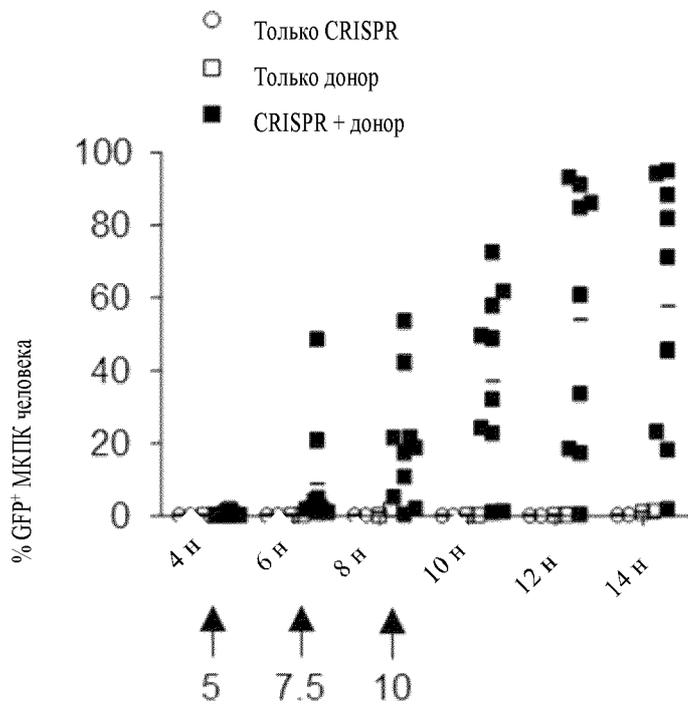
		число считываний	считываний
	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGGACAGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	0	19505 15.8%
1	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCC-----A CAGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-7	248 0.2%
2	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGACA-----GGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-5	10016 7.5%
3	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGACA-----GGTGA CAGA AAAATCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-5	899 0.7%
4	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAG-----GGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-5	703 0.5%
5	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGACA-----GGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-5	699 0.5%
6	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGACA-----GGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-5	300 0.2%
7	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGG-----GGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-4	418 0.3%
8	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGG--AGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	13995 10.5%
9	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAG---CAGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	10311 7.7%
10	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGG--CGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	1586 1.2%
11	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAG---CCGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	1113 0.8%
12	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGG--AGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	713 0.5%
13	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGG--AGTATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	524 0.4%
14	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAG---CAGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	503 0.4%
15	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGG--AGGATTGGTGA CAGA ACAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	361 0.3%
16	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAG---CAGTATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	335 0.3%
17	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAG---CAGGATTGGTGA CAGA ACAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-3	290 0.2%
18	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGAC--GATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	17441 13.1%
19	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGG--AGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	16863 12.7%
20	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGG--CAGGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	6392 4.8%
21	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGG--ATGATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	600 0.5%
22	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGAC--GCTTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	566 0.4%
23	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGG--AGGCTTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	559 0.4%
24	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGAC--GATTGGTGA CAGA CAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	452 0.3%
25	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGG--AGGATTGGTGA CAGA CAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	445 0.3%
26	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGAC--GATTGGTGC CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	378 0.3%
27	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGG--AGGATTGGTGC CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-2	318 0.2%
28	TGTCCCCTCCACCC CACA GTGGGGCCACTAGGGACA--GATTGGTGA CAGA AAAAGCCCCATCC TTAGGCCT CCTCCTTCCT	-1	544 0.4%

(SEQ ID NOs: 19-23, 21, 21, 26-30, 27, 32, 28, 34-47)

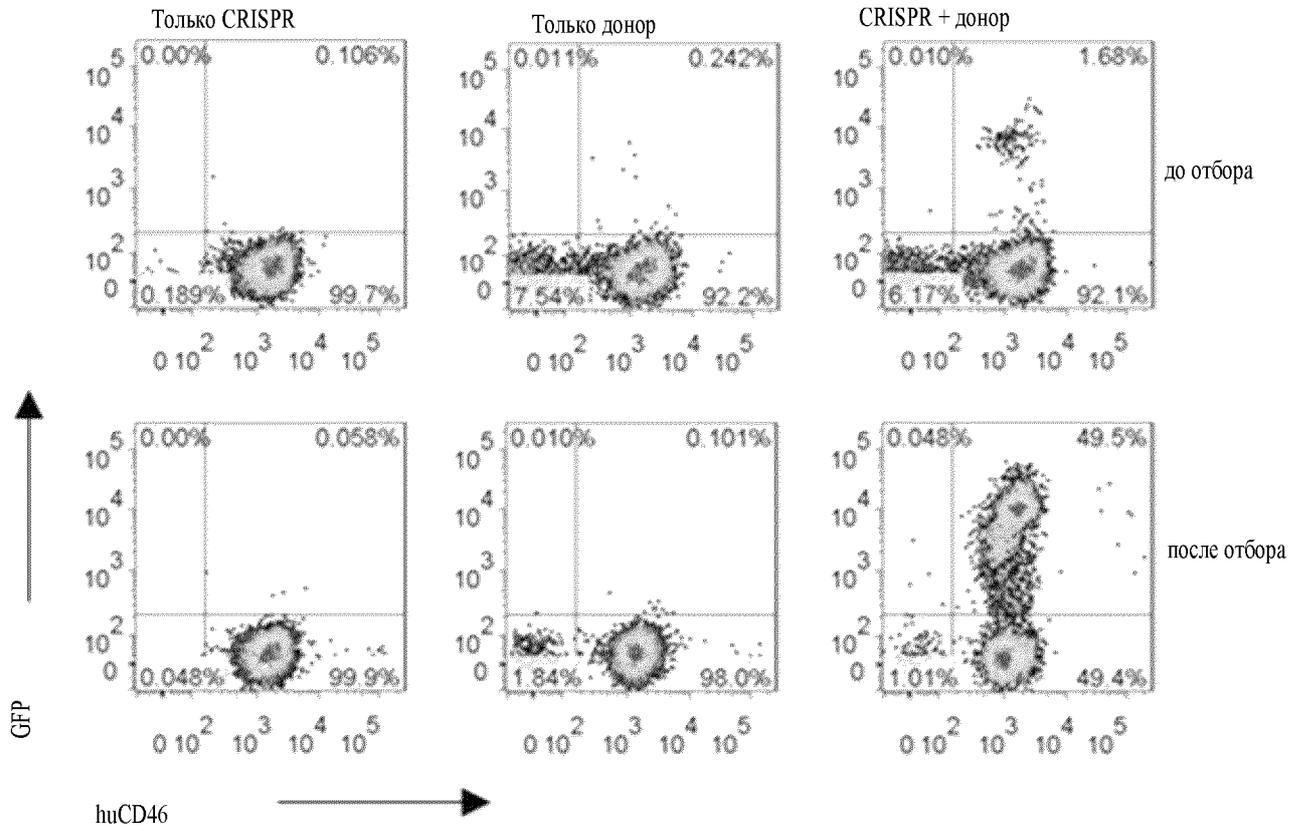
Фиг. 59А



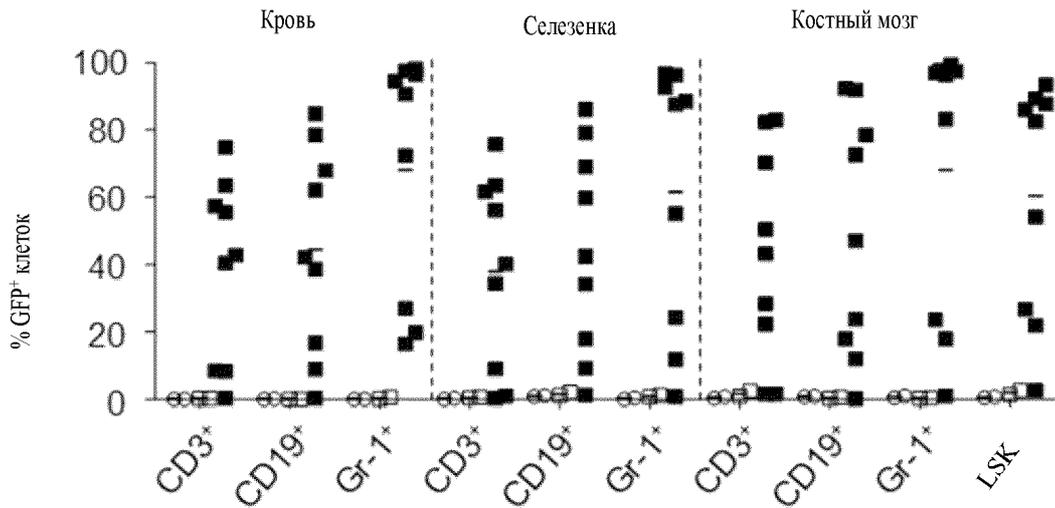
Фиг. 59В



Фиг. 59С

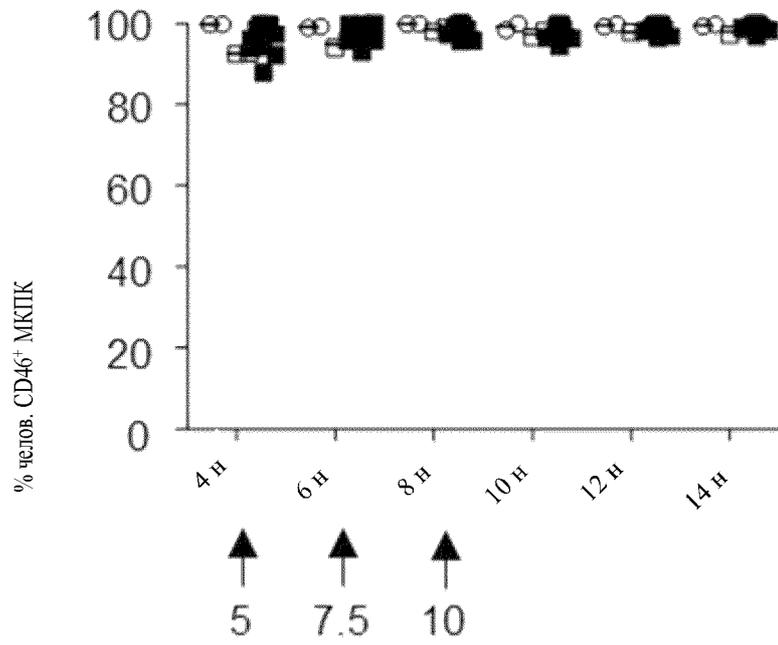


Фиг. 59D

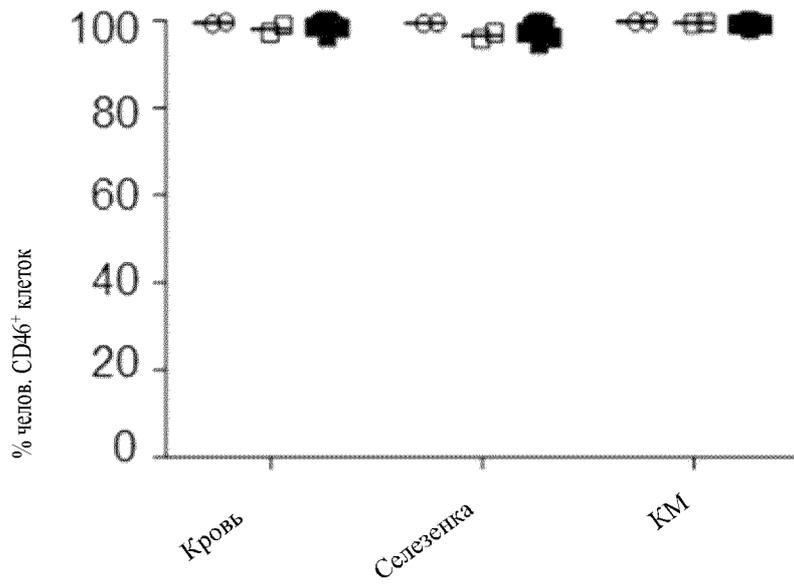


113/350

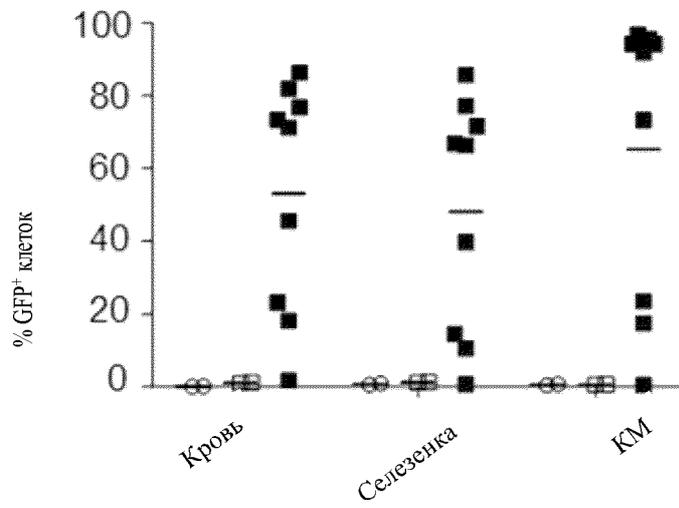
Фиг. 60А



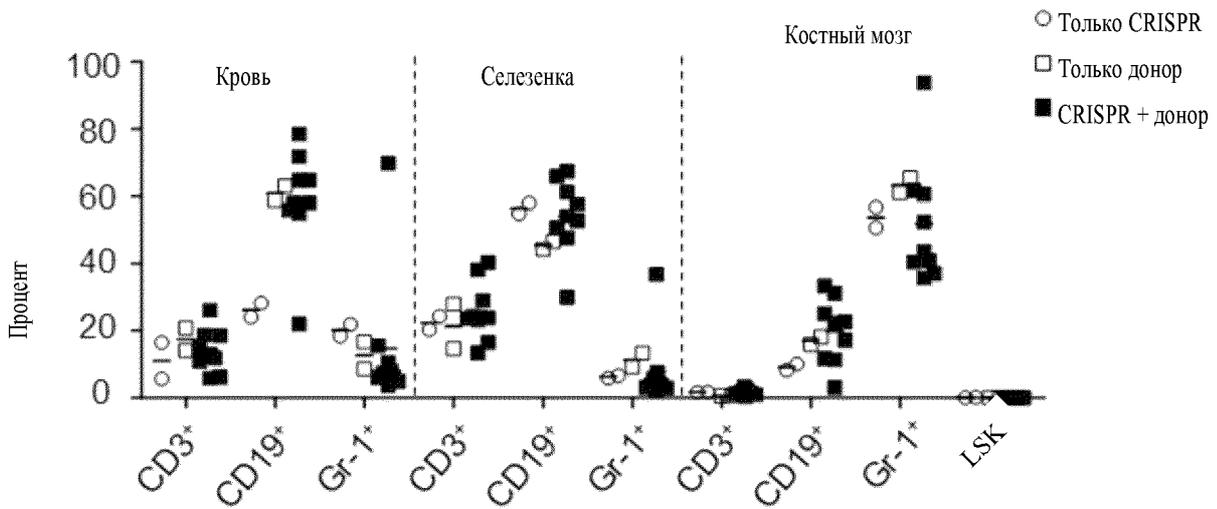
Фиг. 60В



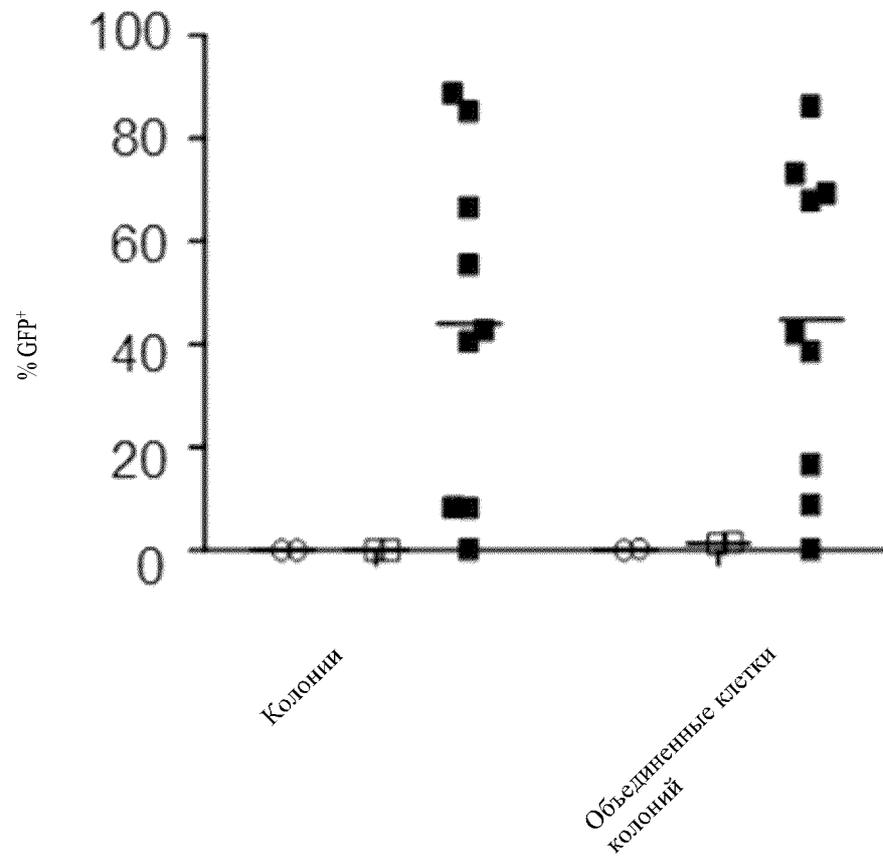
Фиг. 60С



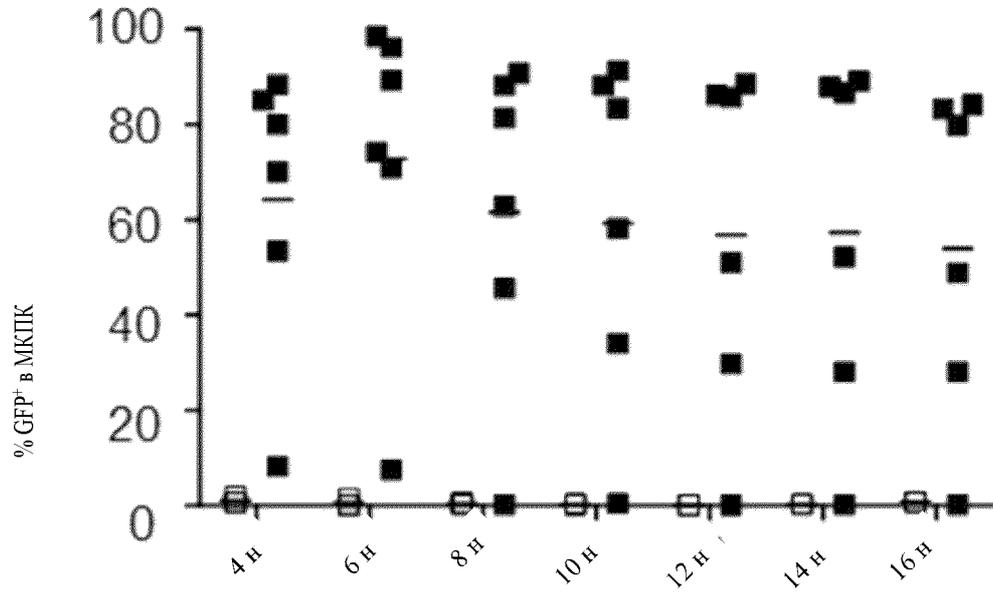
Фиг. 60D



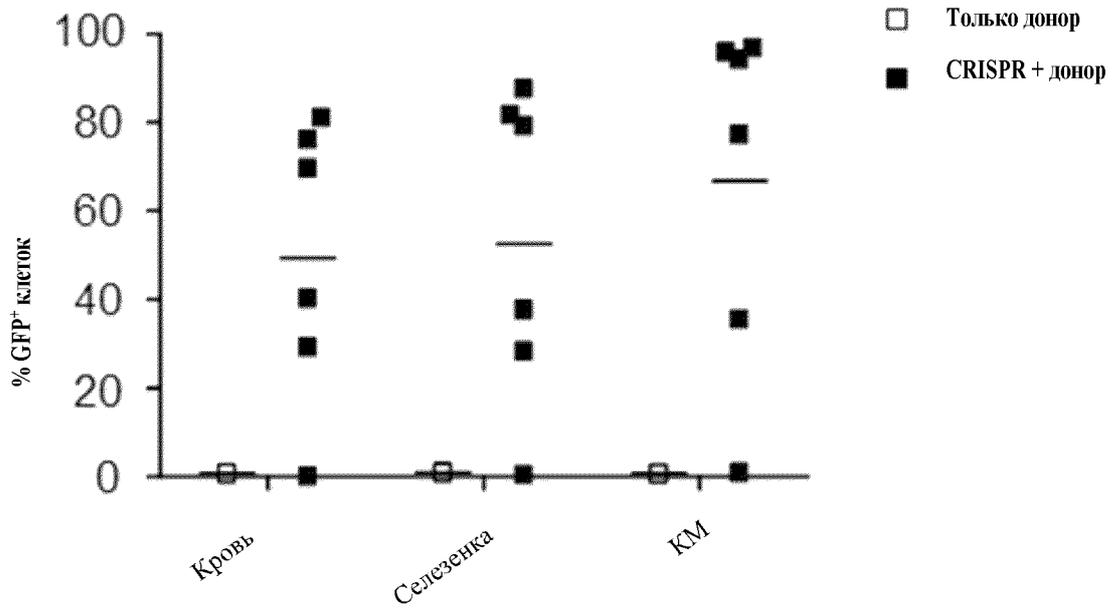
Фиг. 60E



Фиг. 61А

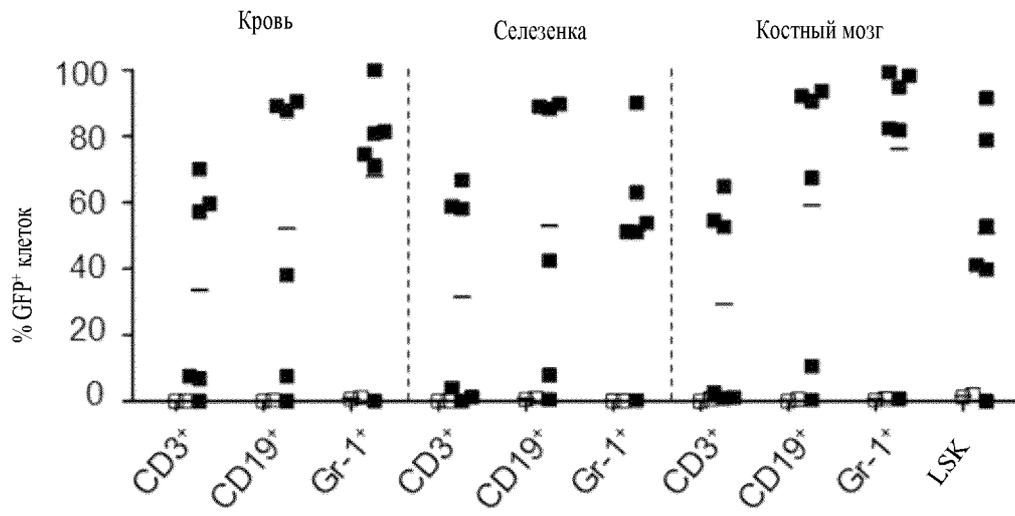


Фиг. 61В

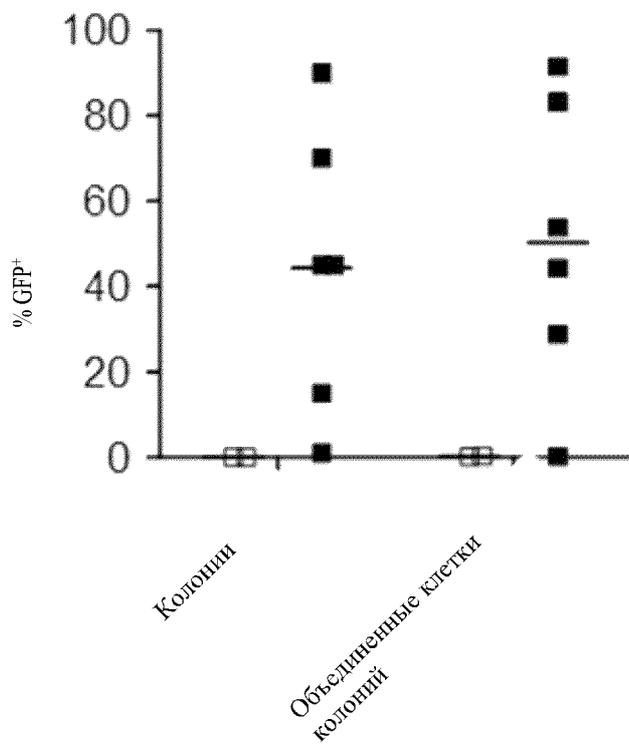


117/350

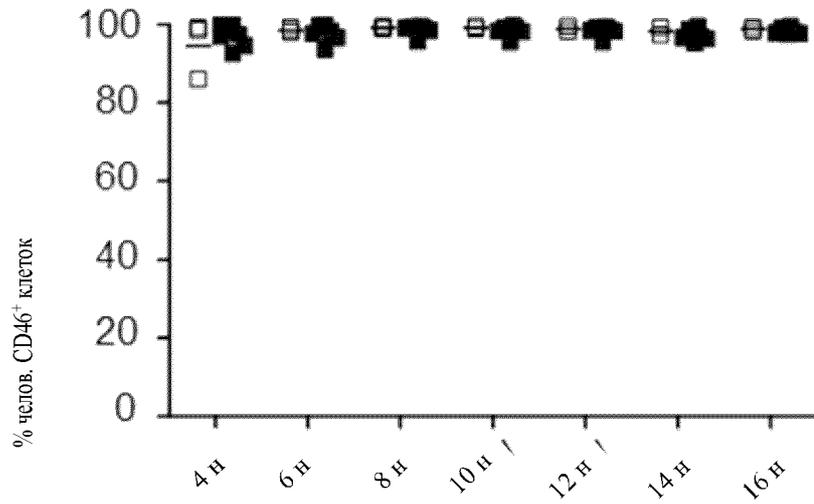
Фиг. 61С



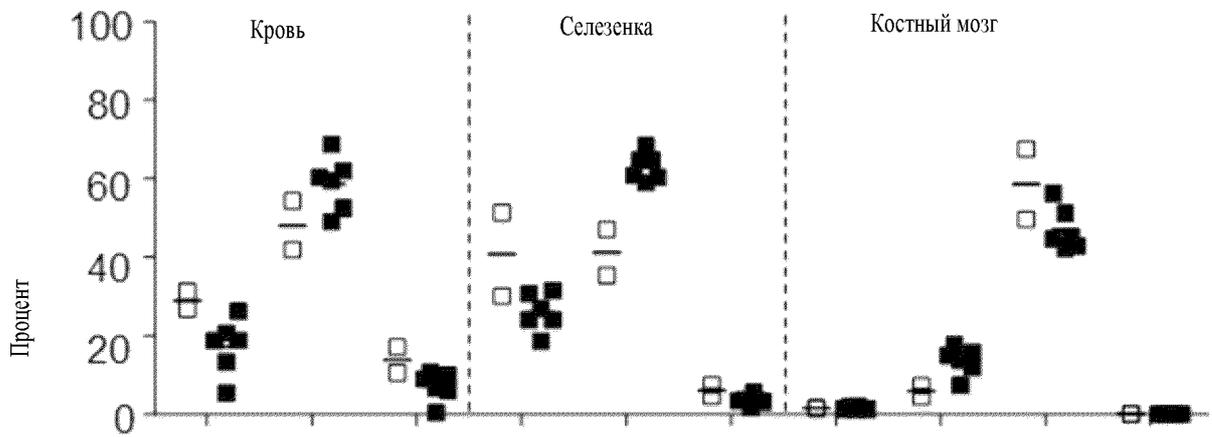
Фиг. 61D



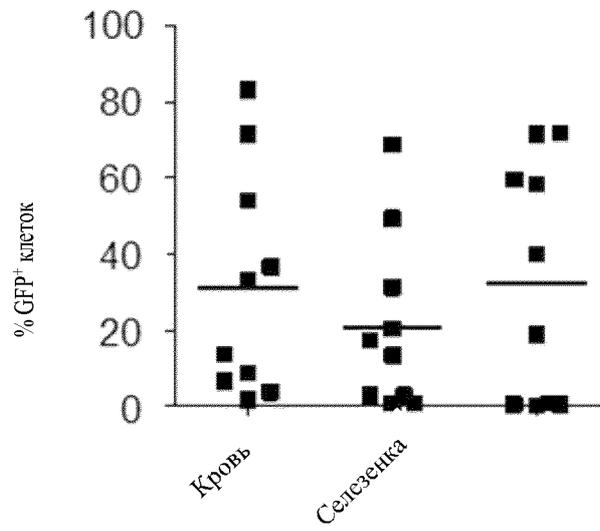
Фиг. 61E



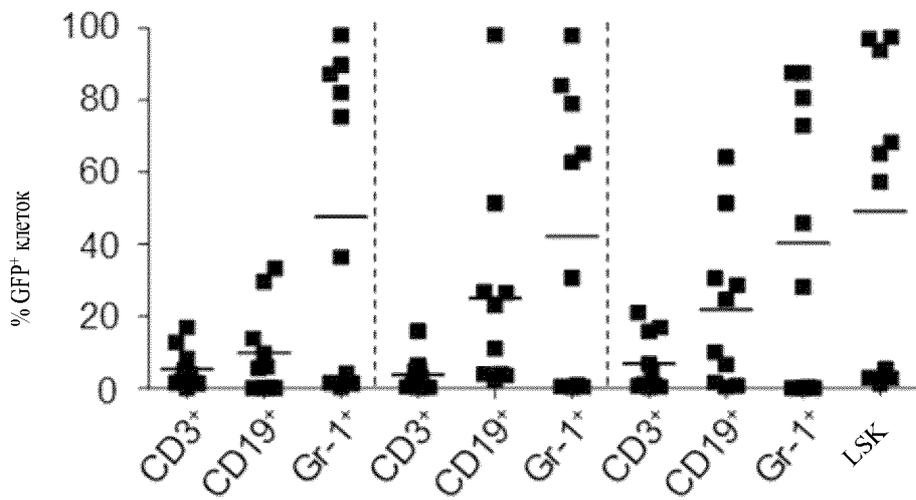
Фиг. 61F



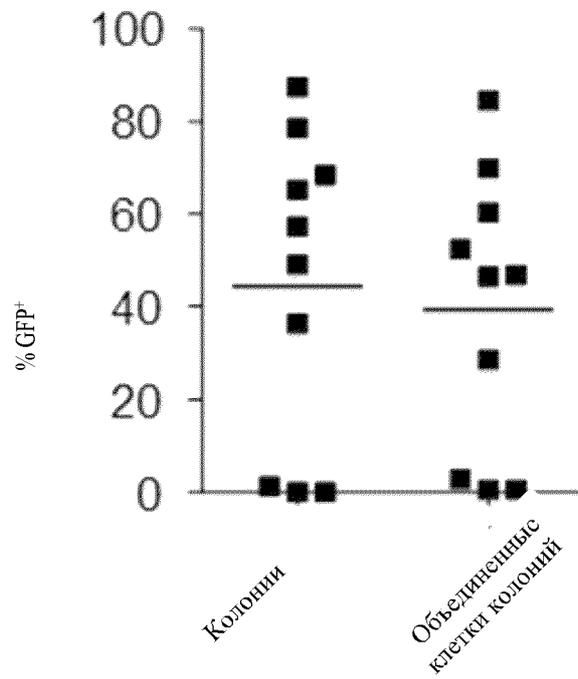
Фиг. 62С



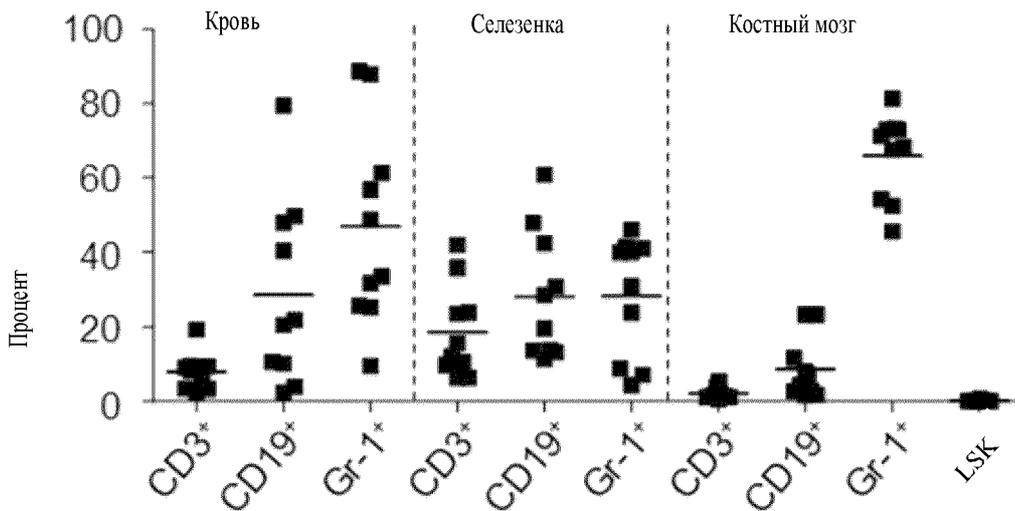
Фиг. 62D



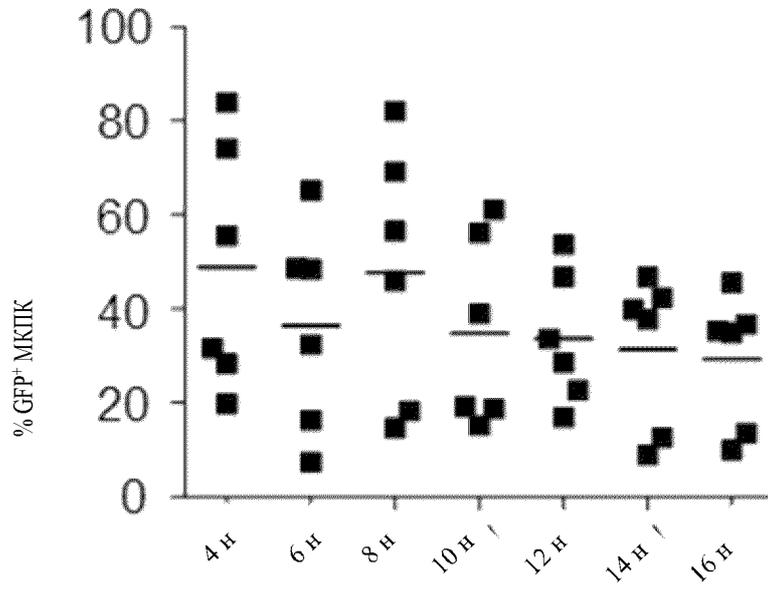
Фиг. 62E



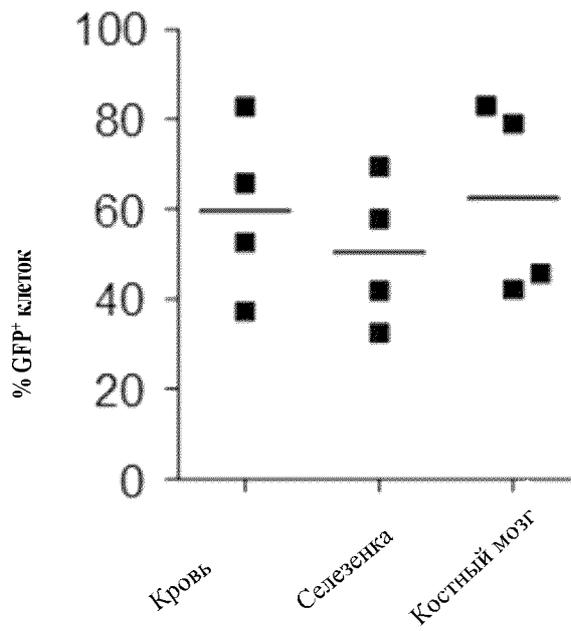
Фиг. 62F



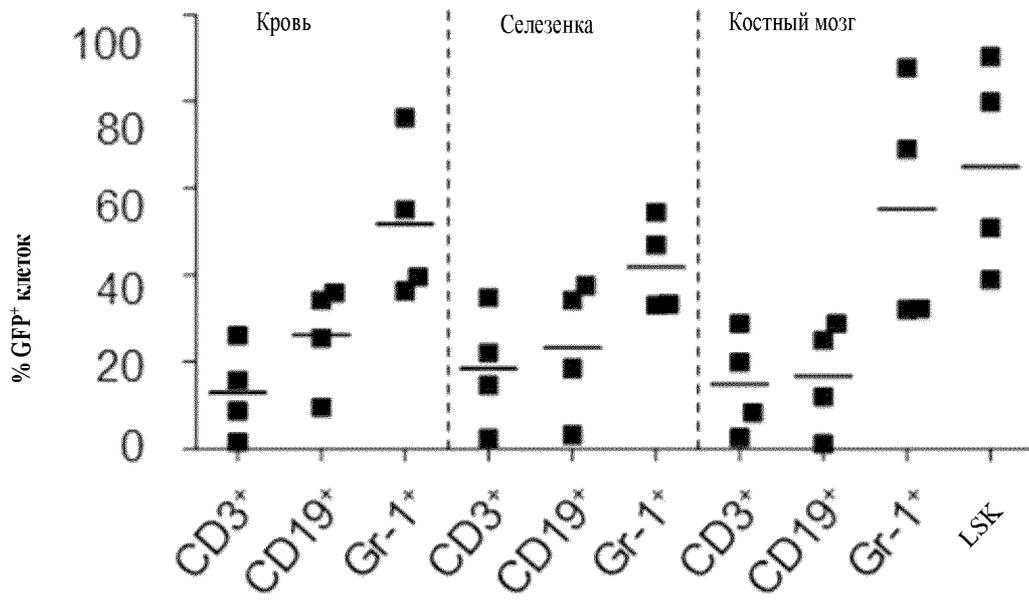
Фиг. 63А



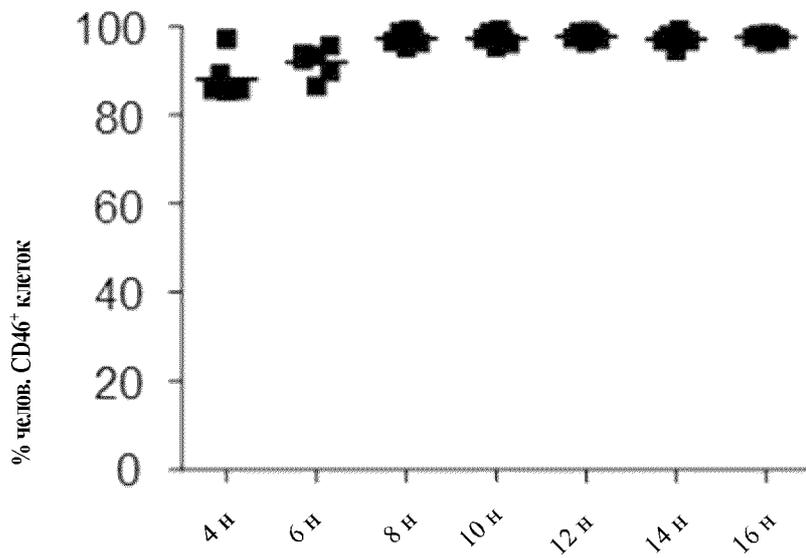
Фиг. 63В



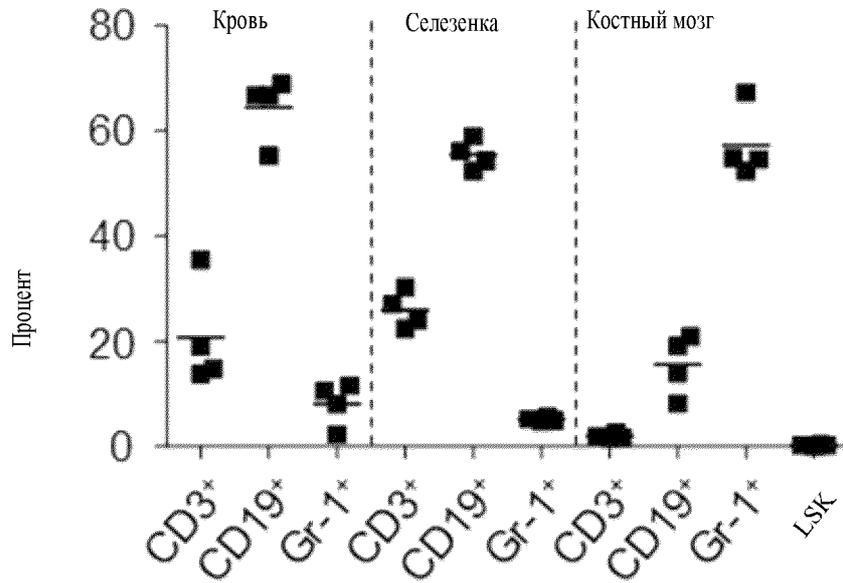
Фиг. 63С



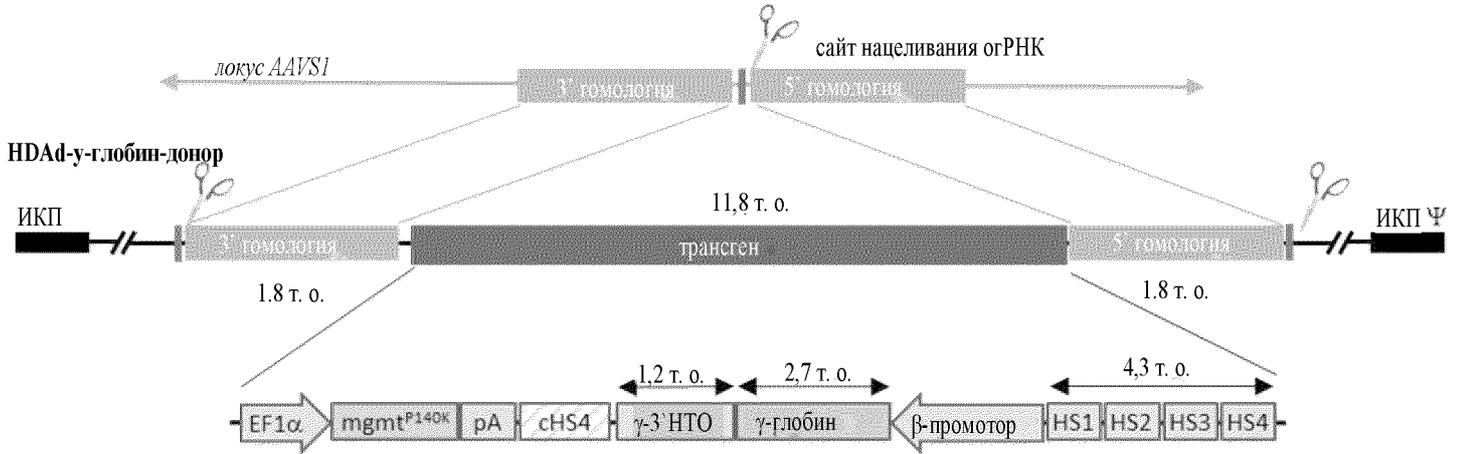
Фиг. 63D



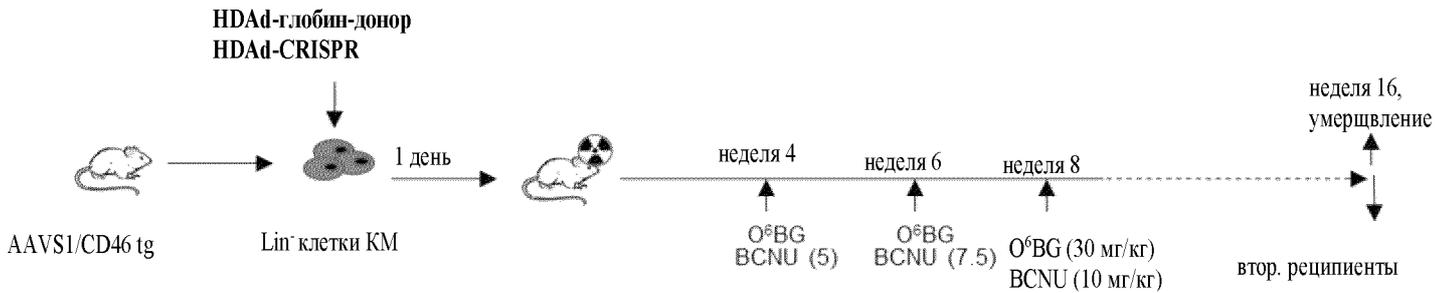
Фиг. 63Е



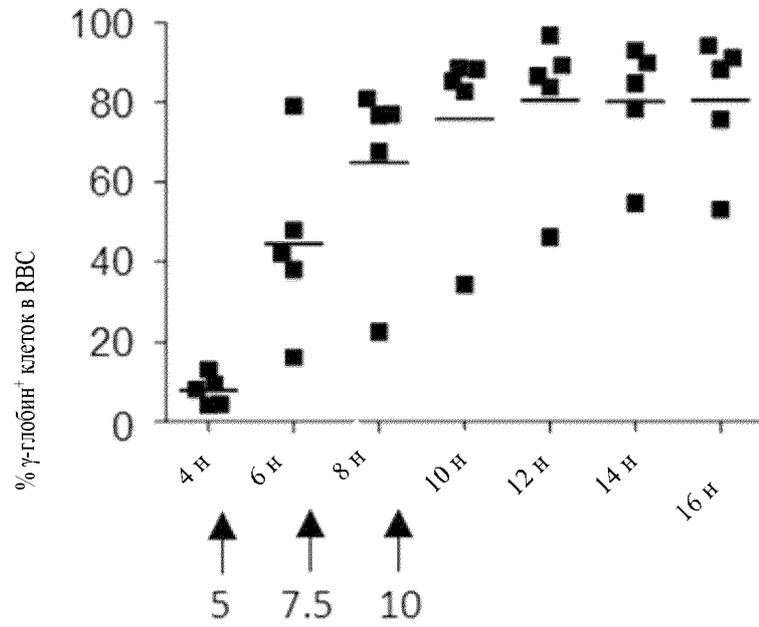
Фиг. 64А



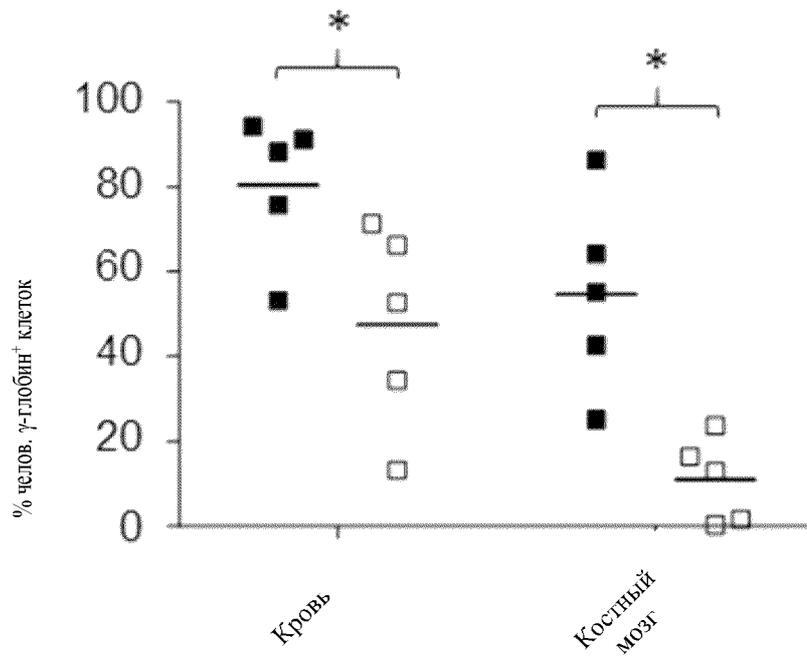
Фиг. 64В



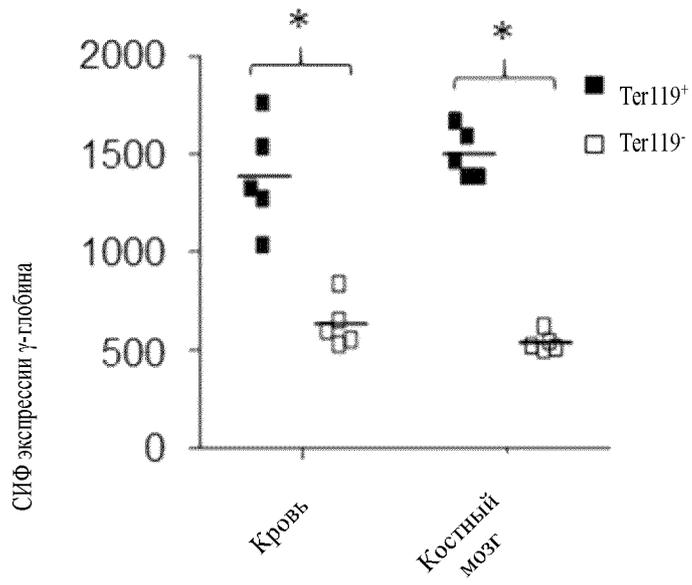
Фиг. 64С



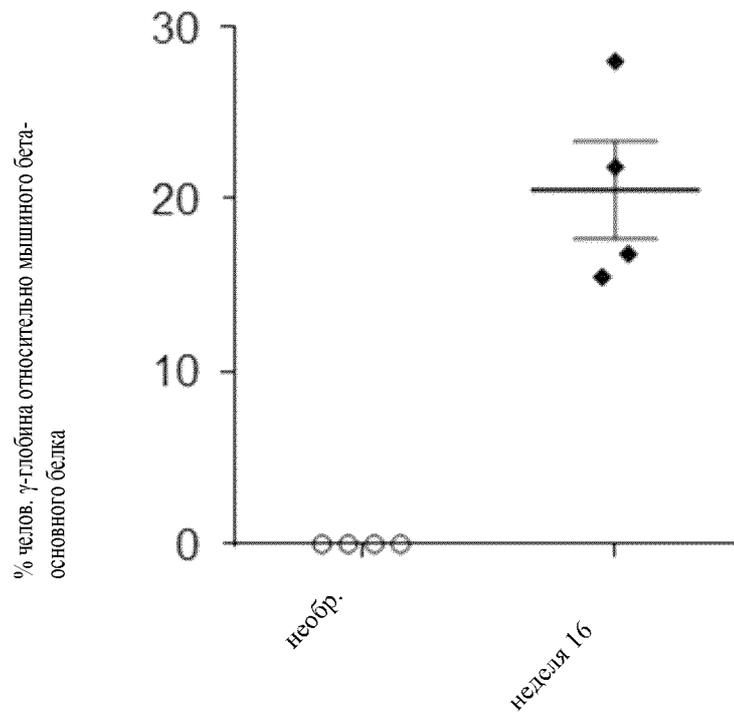
Фиг. 64D



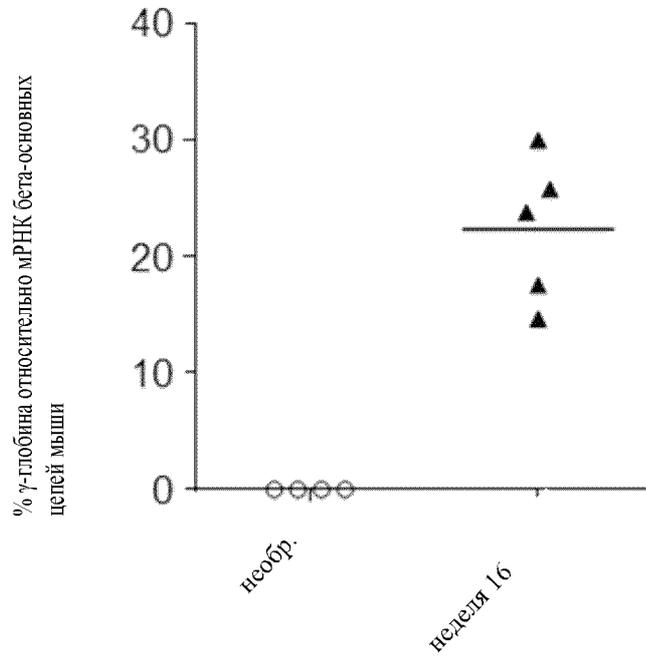
Фиг. 64Е



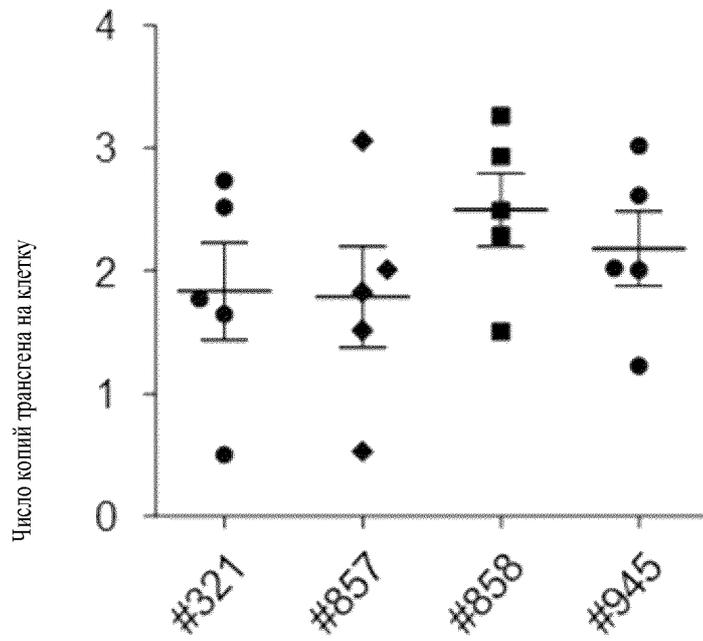
Фиг. 64F



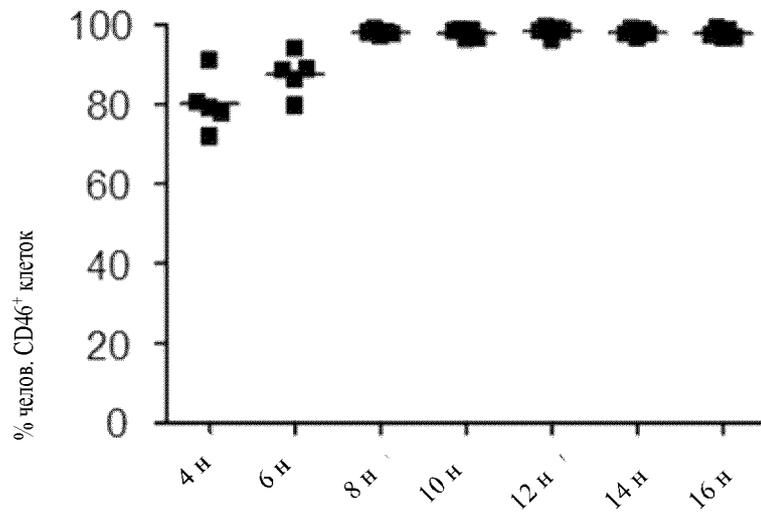
Фиг. 64Г



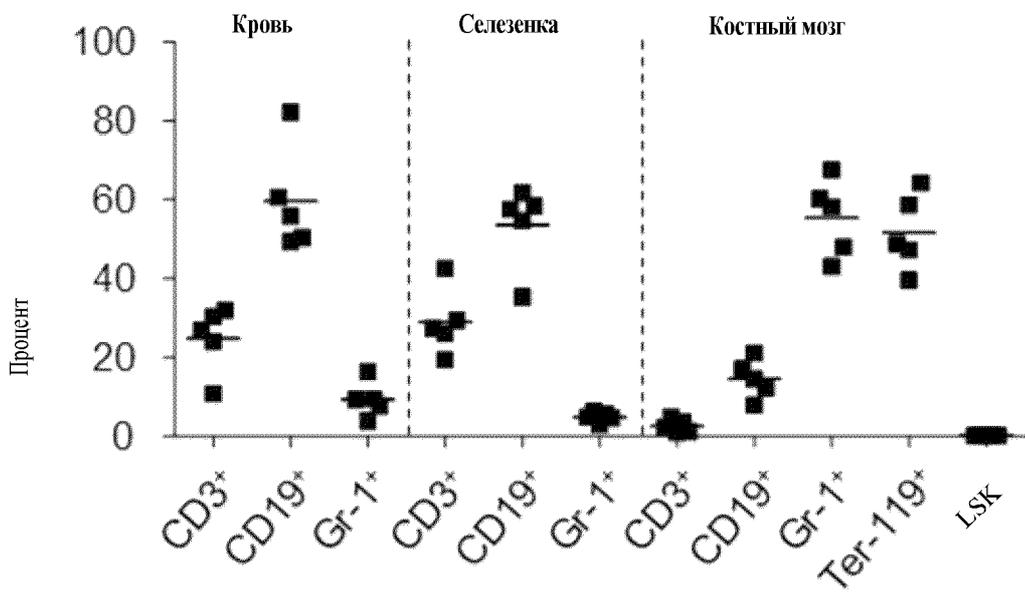
Фиг. 64Н



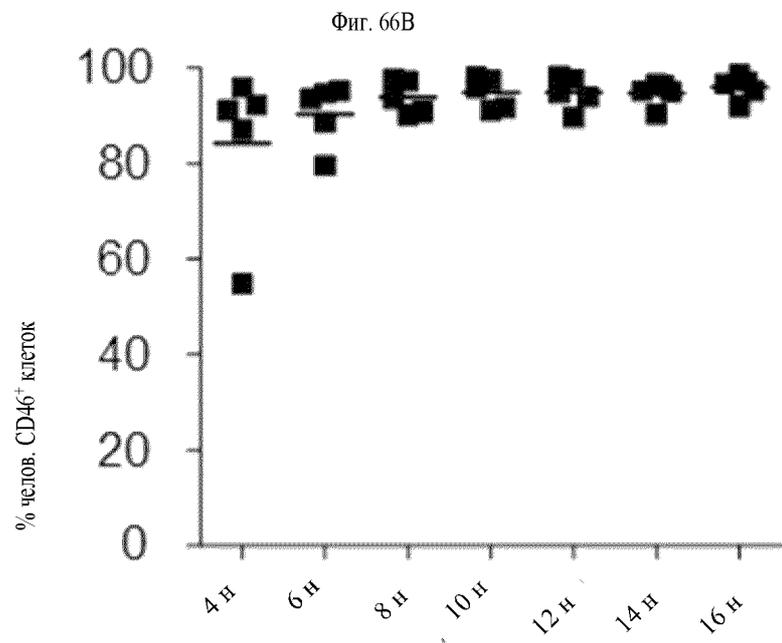
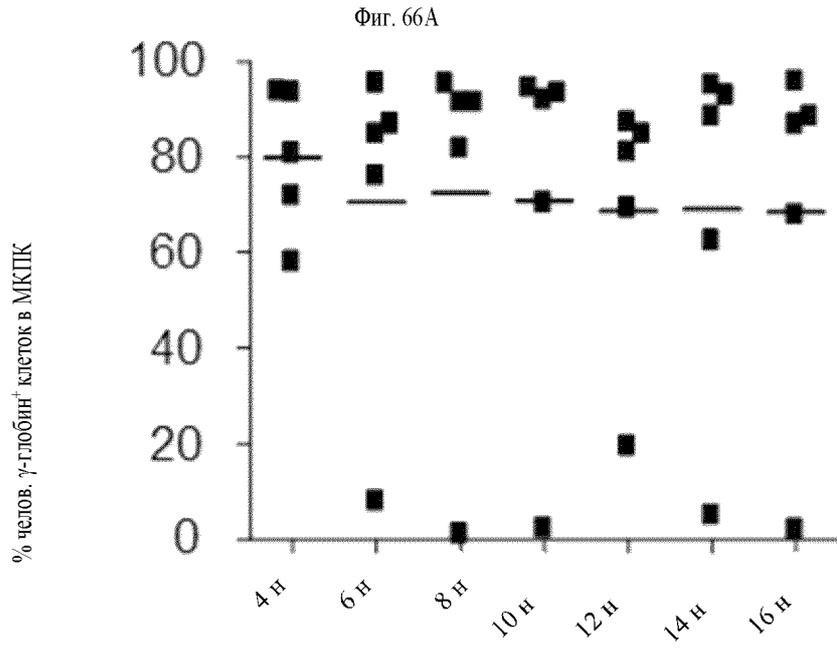
Фиг. 65А



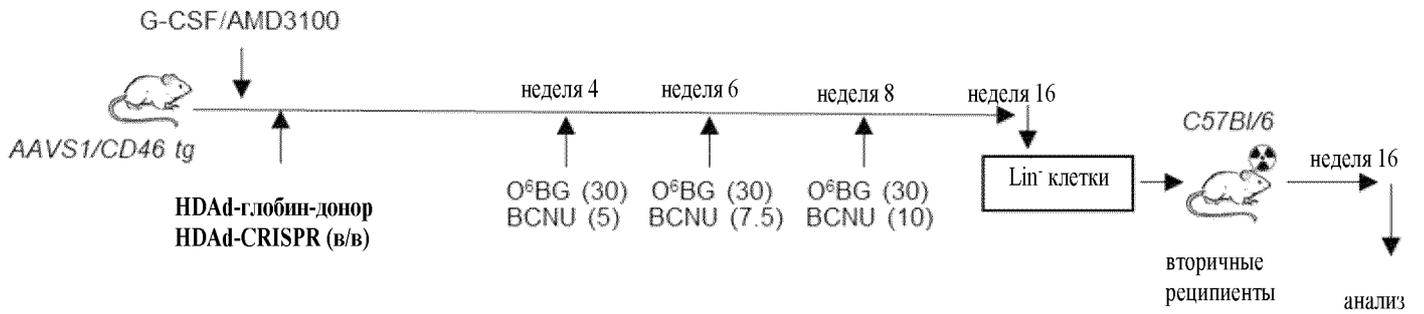
Фиг. 65В



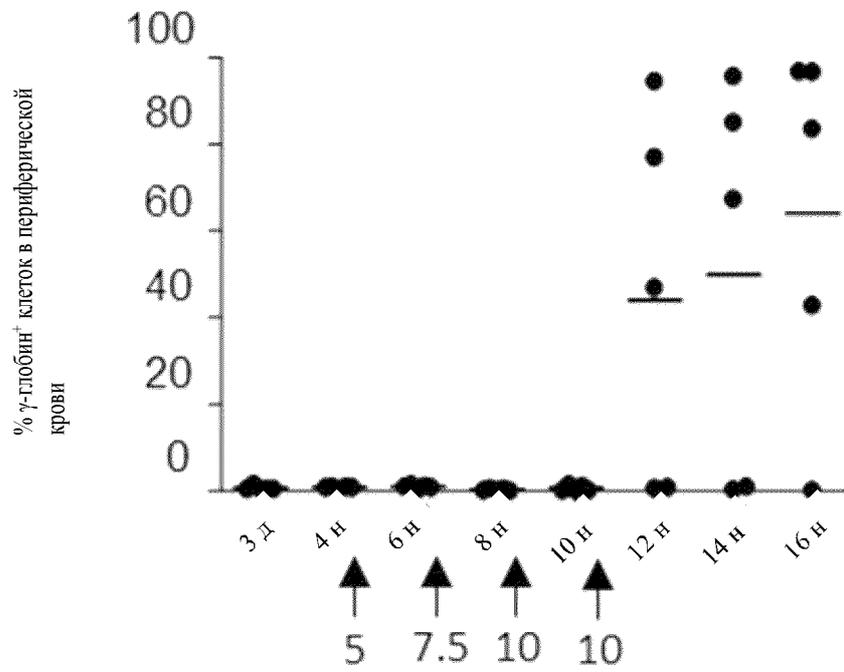
129/350



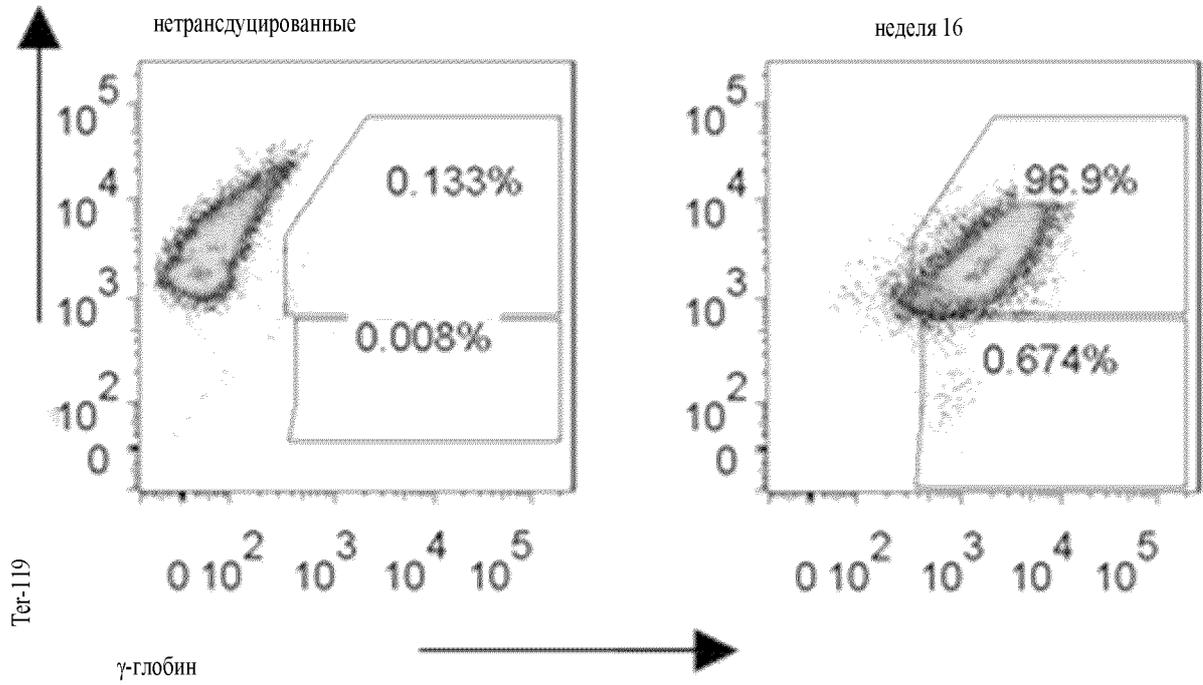
Фиг. 67А



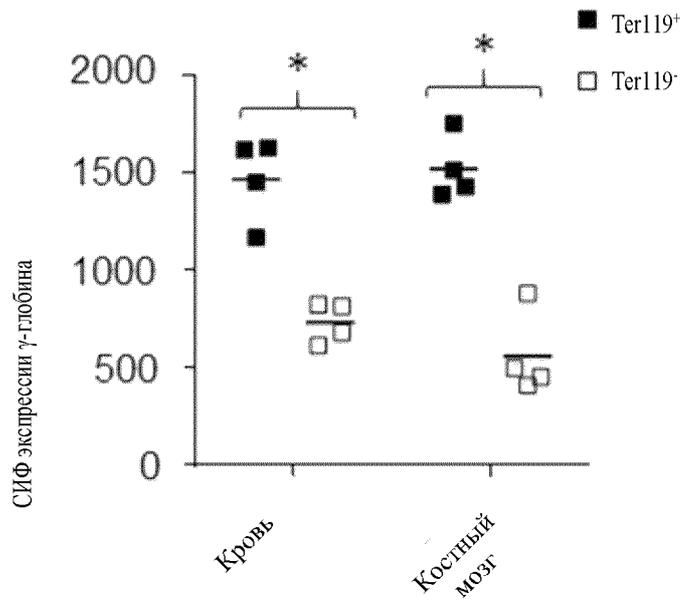
Фиг. 67В



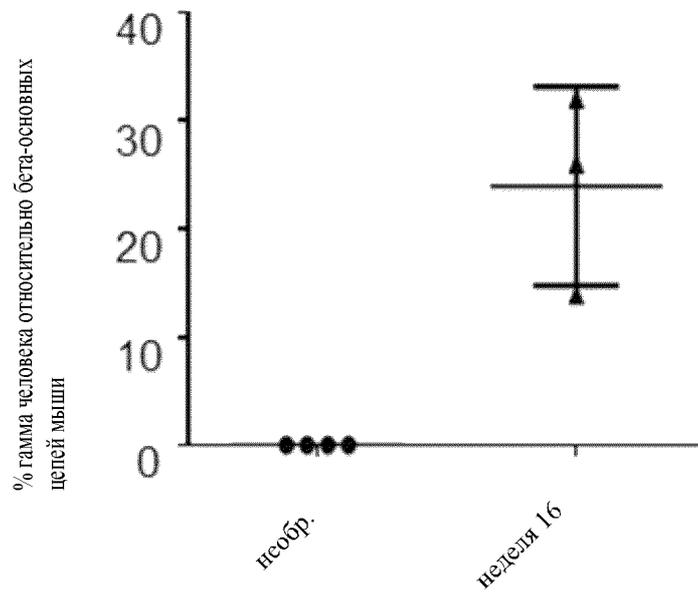
Фиг. 67С



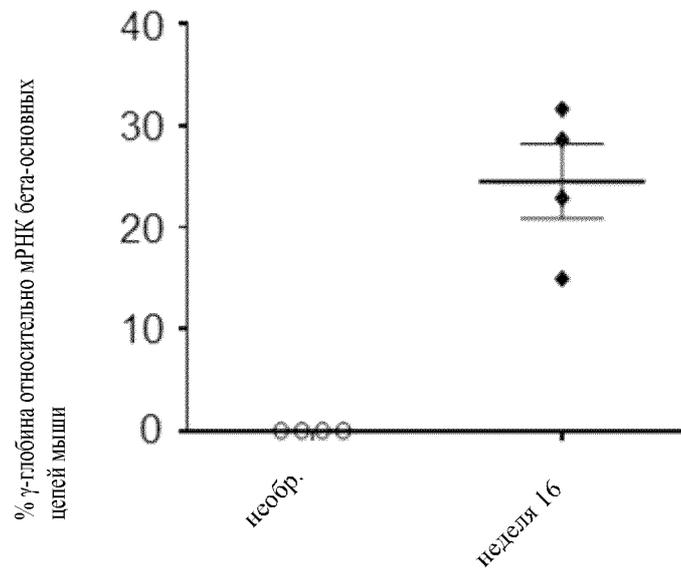
Фиг. 67D



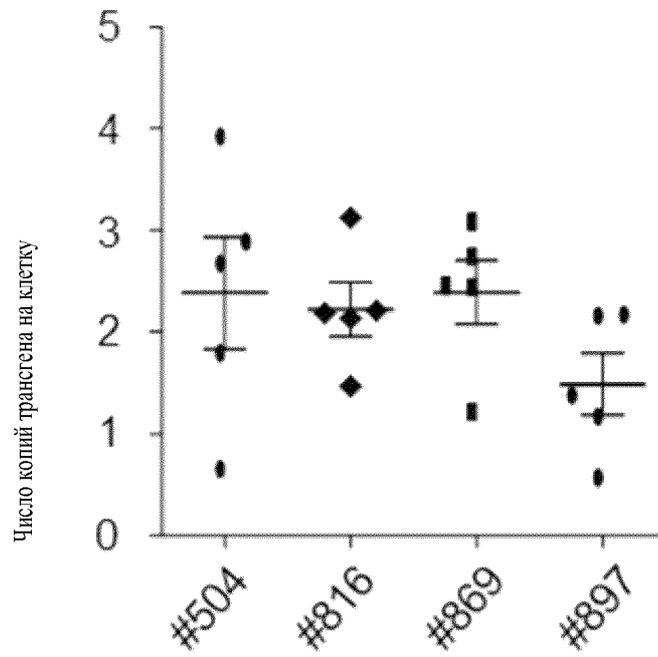
Фиг. 67E



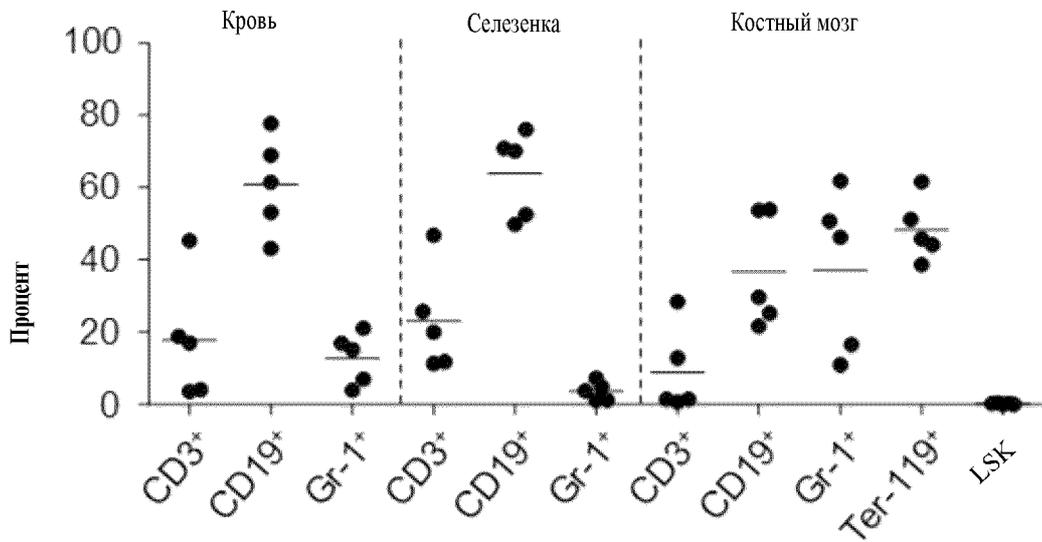
Фиг. 67F



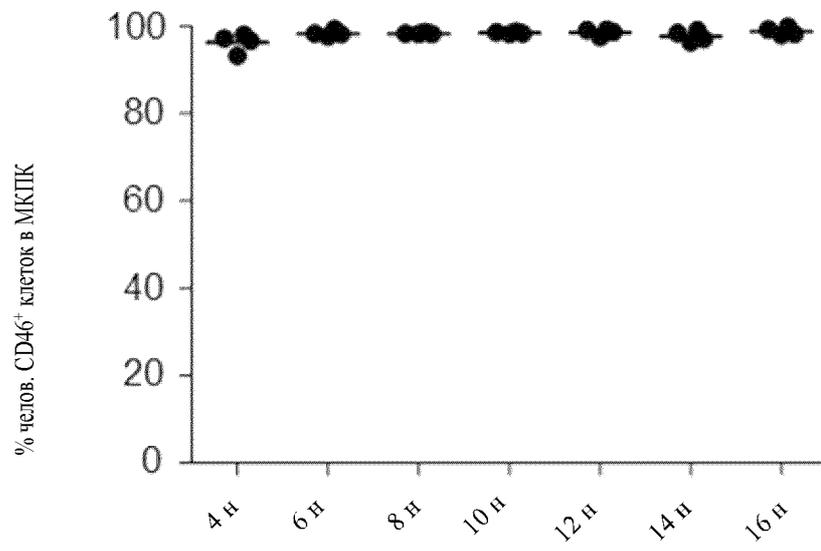
Фиг. 67G



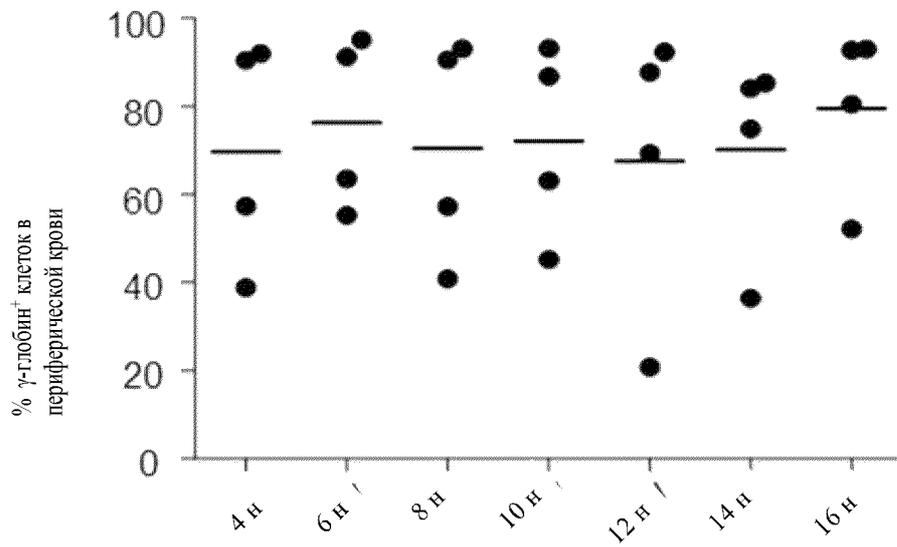
Фиг. 67H



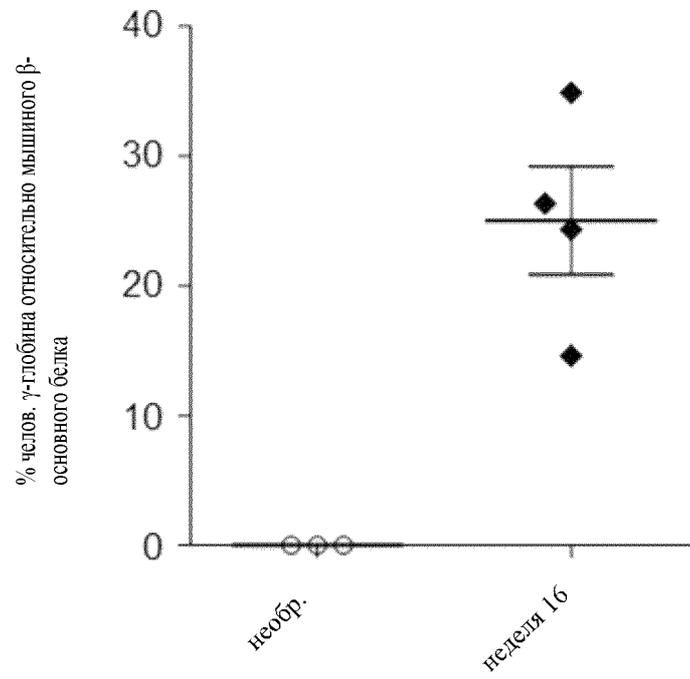
Фиг. 68А



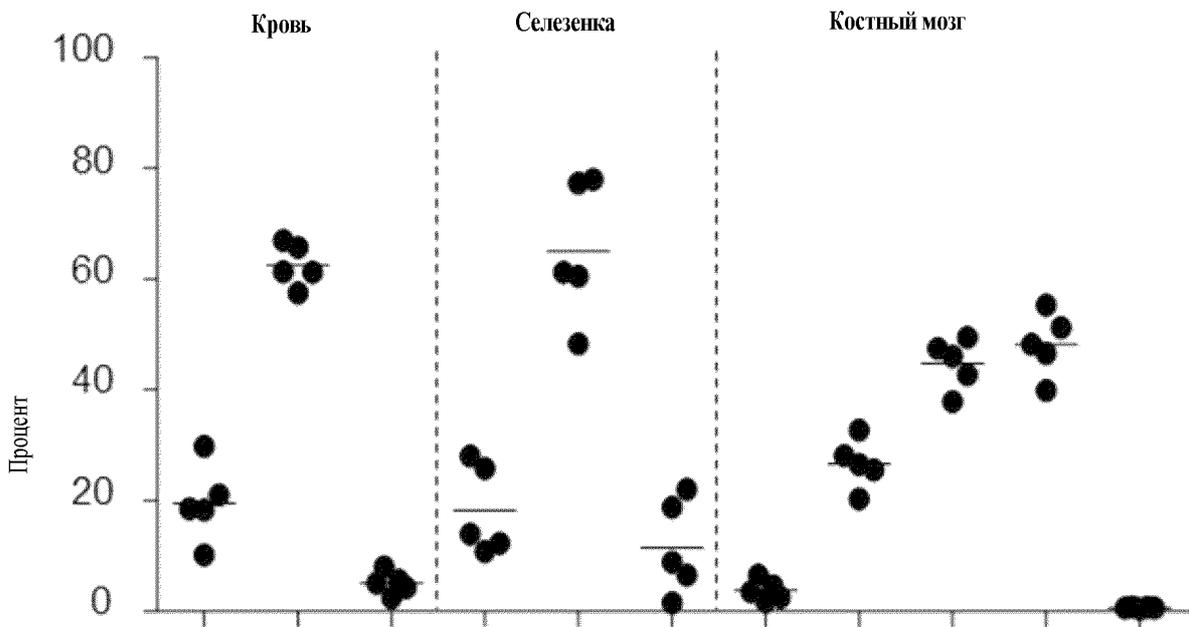
Фиг. 68В



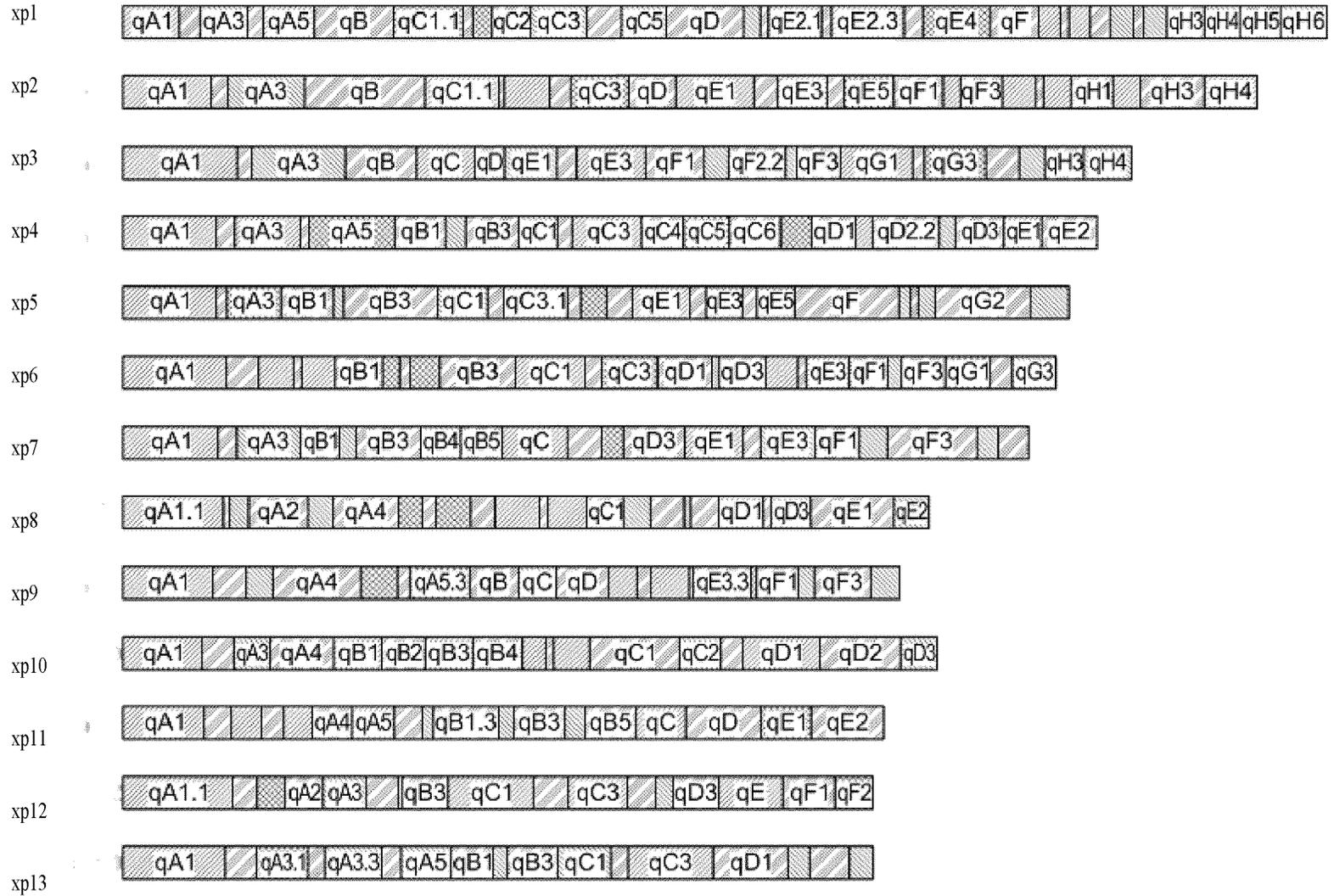
Фиг. 68С



Фиг. 68D

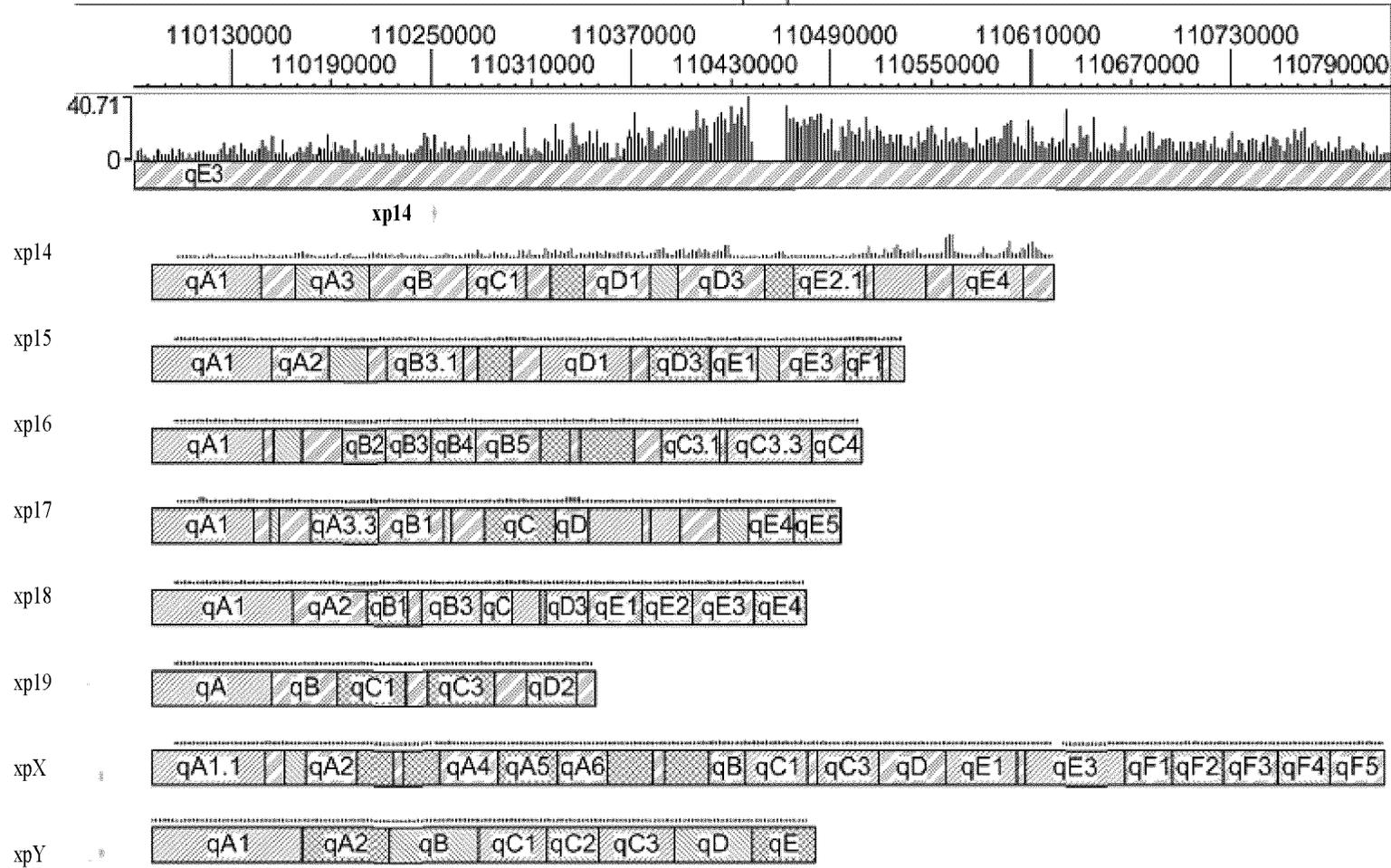


Фиг. 69А



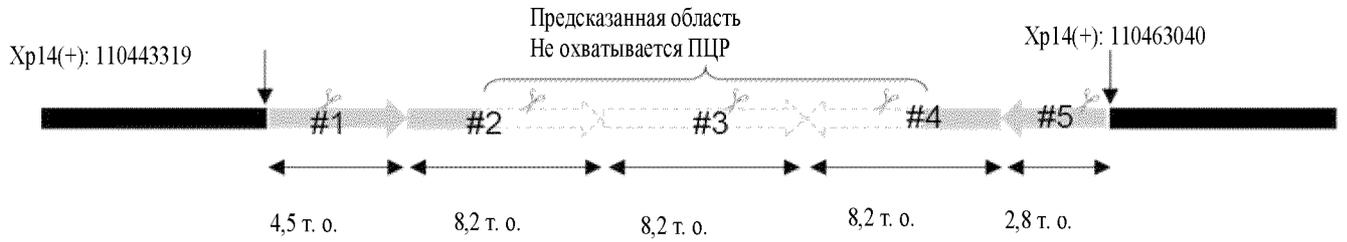
Фиг. 69В

18 т. о.

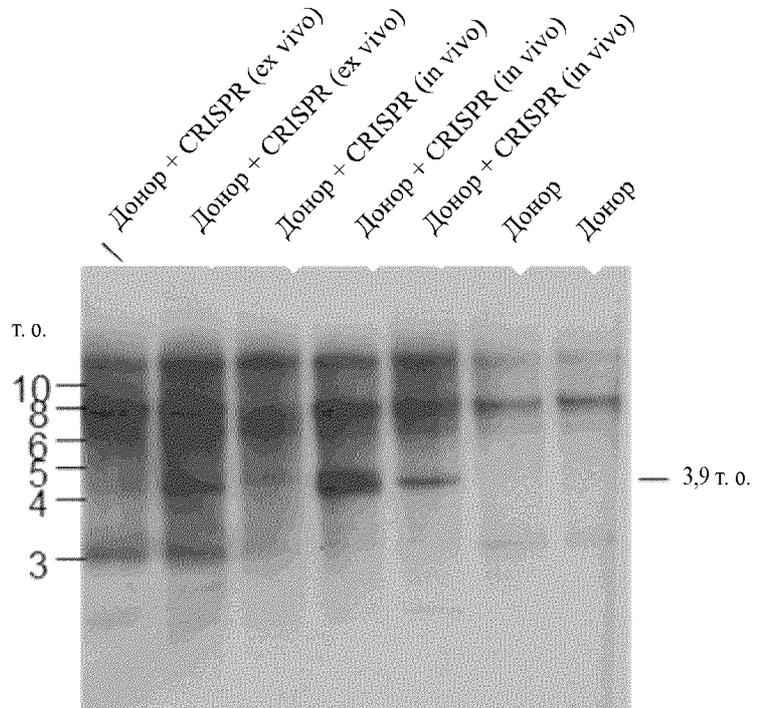
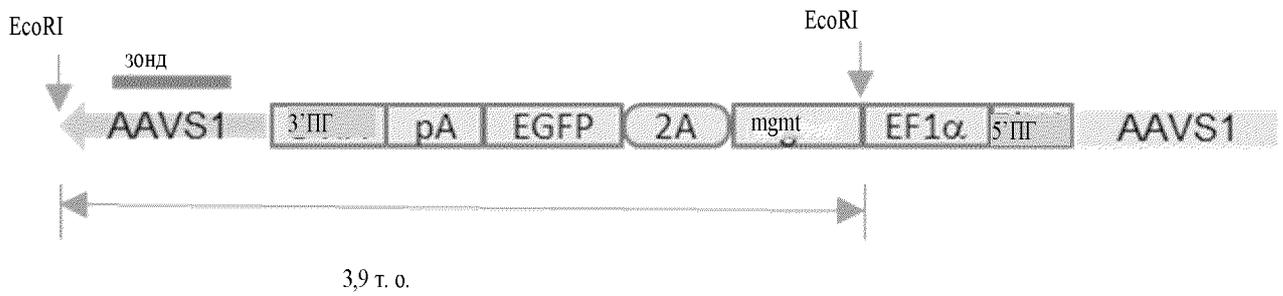


138/350

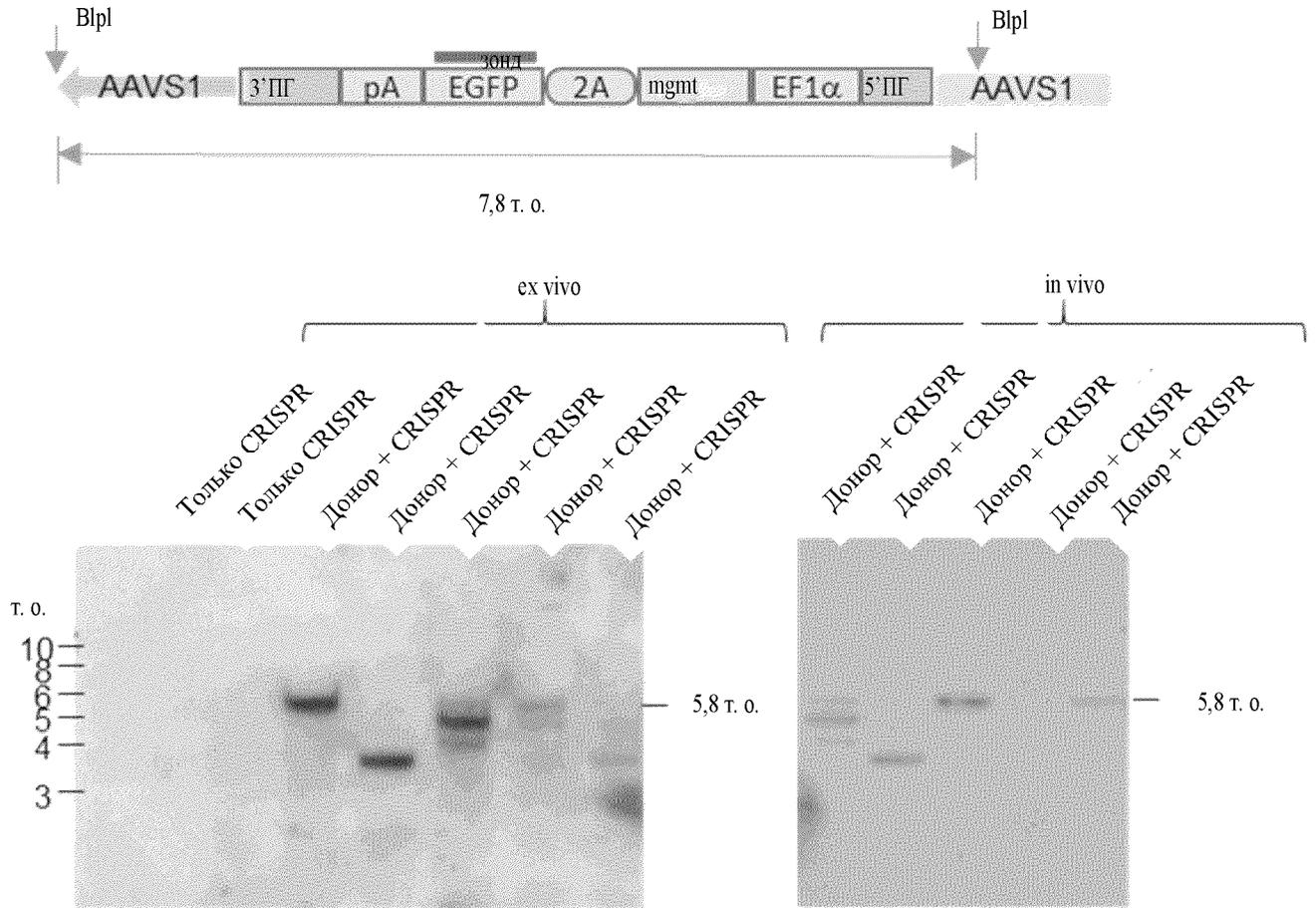
Фиг. 70



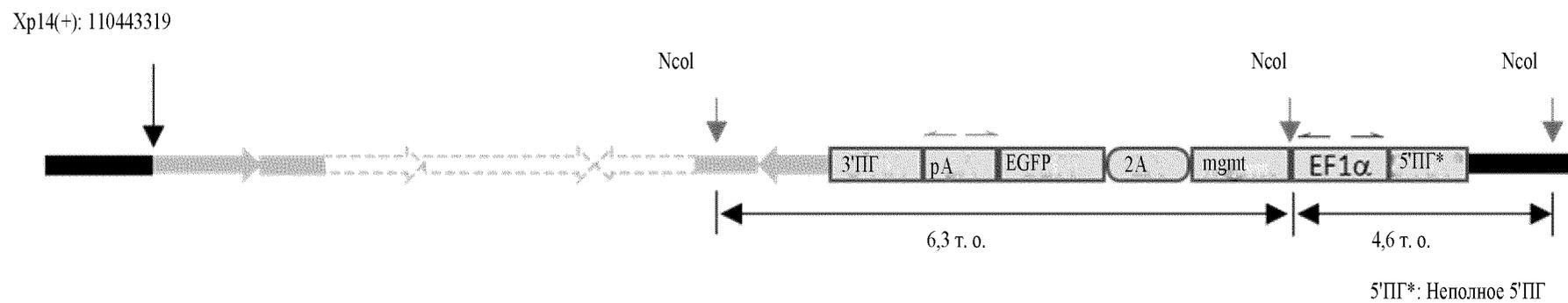
Фиг. 71А



Фиг. 71В

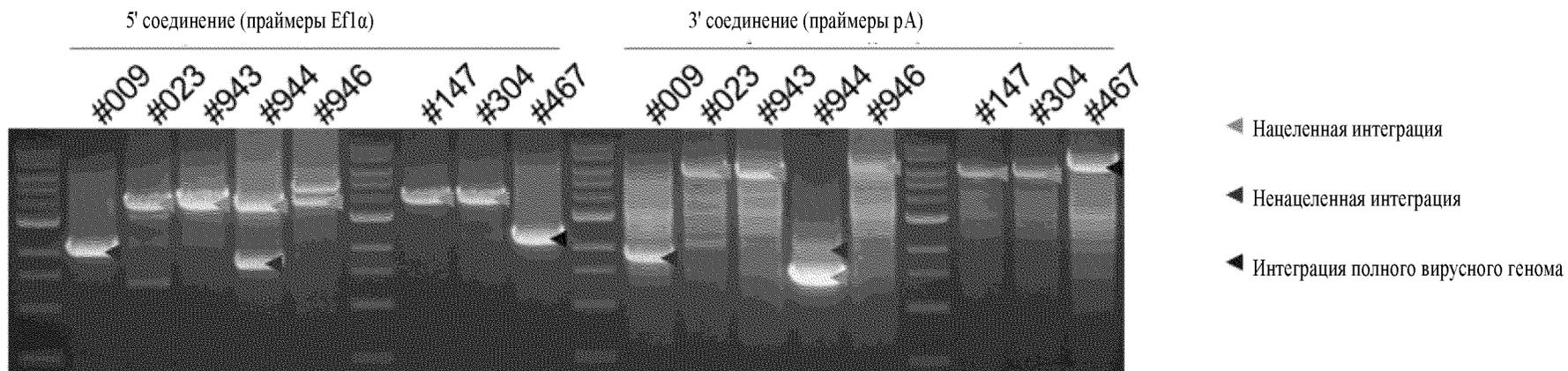


Фиг. 72А



Фиг. 72В

Общие клетки костного мозга

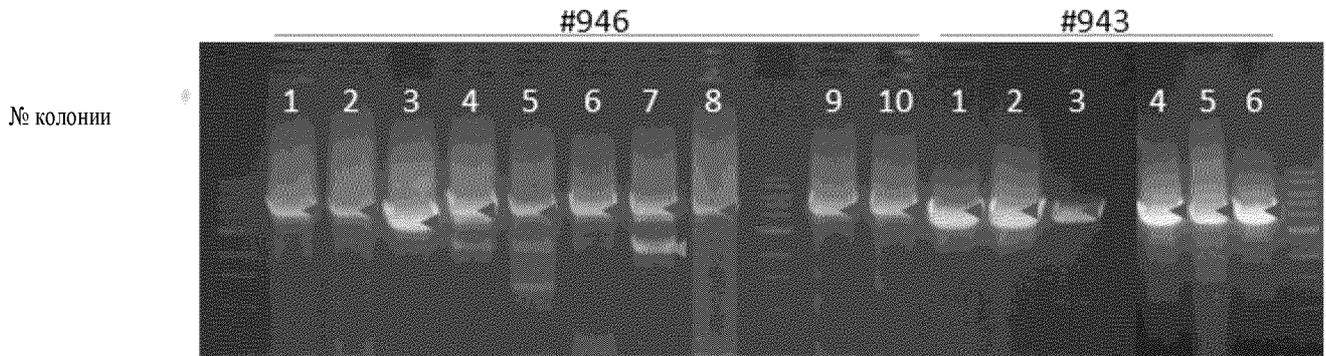


142/350

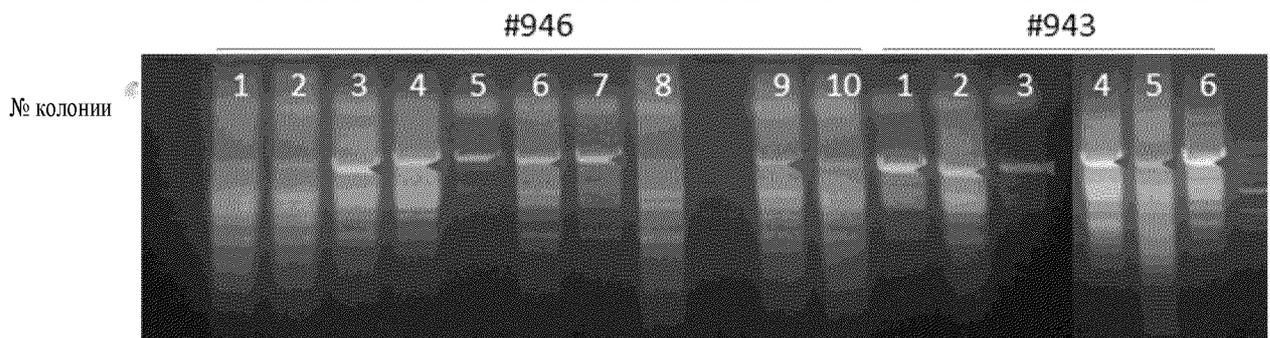
Фиг. 72С

Одиночные GFP⁺ колонии

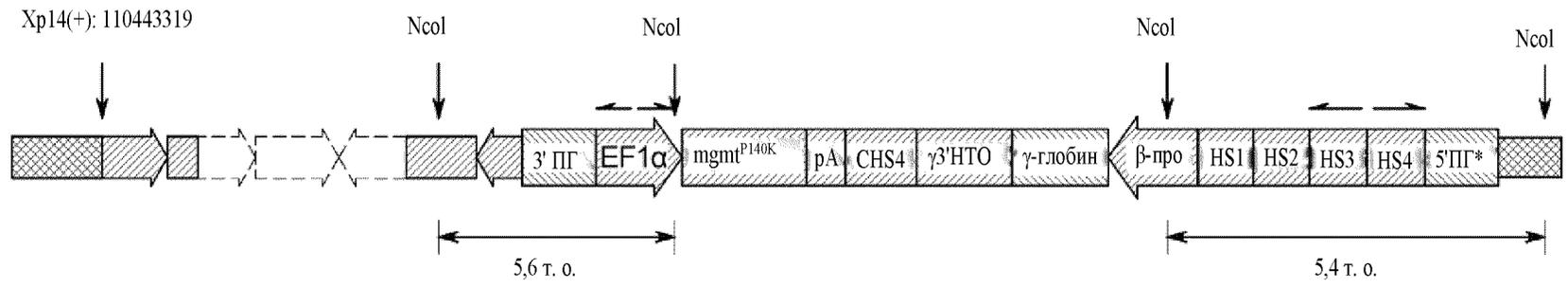
5' соединение (праймеры Eflα)



3' соединение (праймеры рА)



Фиг. 73А

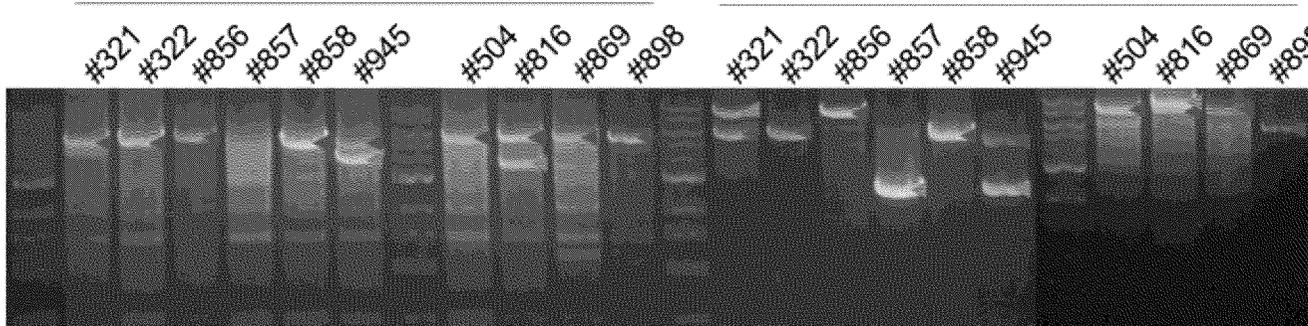


5'ПГ*: Неполное 5'ПГ

Фиг. 73В

5' соединение (праймеры HS4)

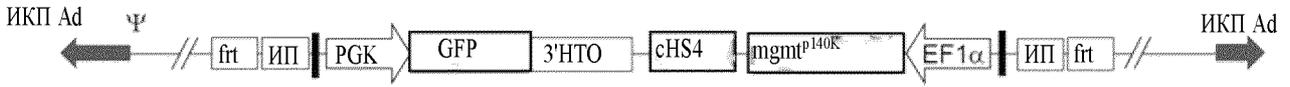
3' соединение (праймеры Ef1α)



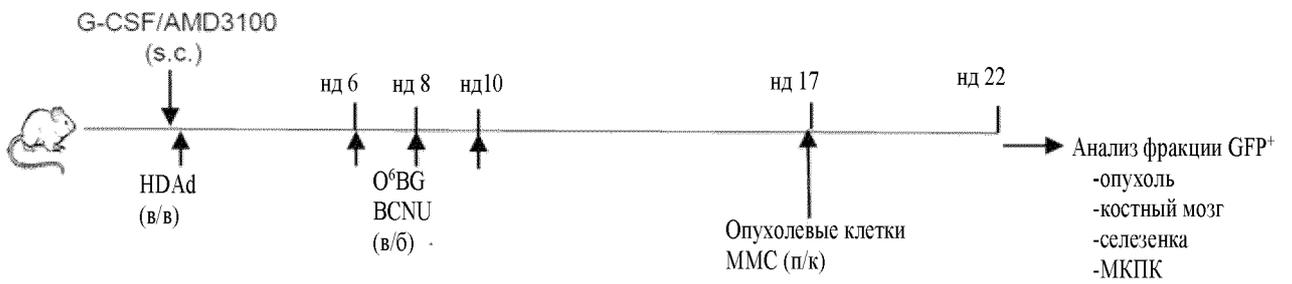
- ▲ Нацеленная интеграция
- ▲ Ненацеленная интеграция
- ▲ Интеграция полного вирусного генома

Фиг. 74А

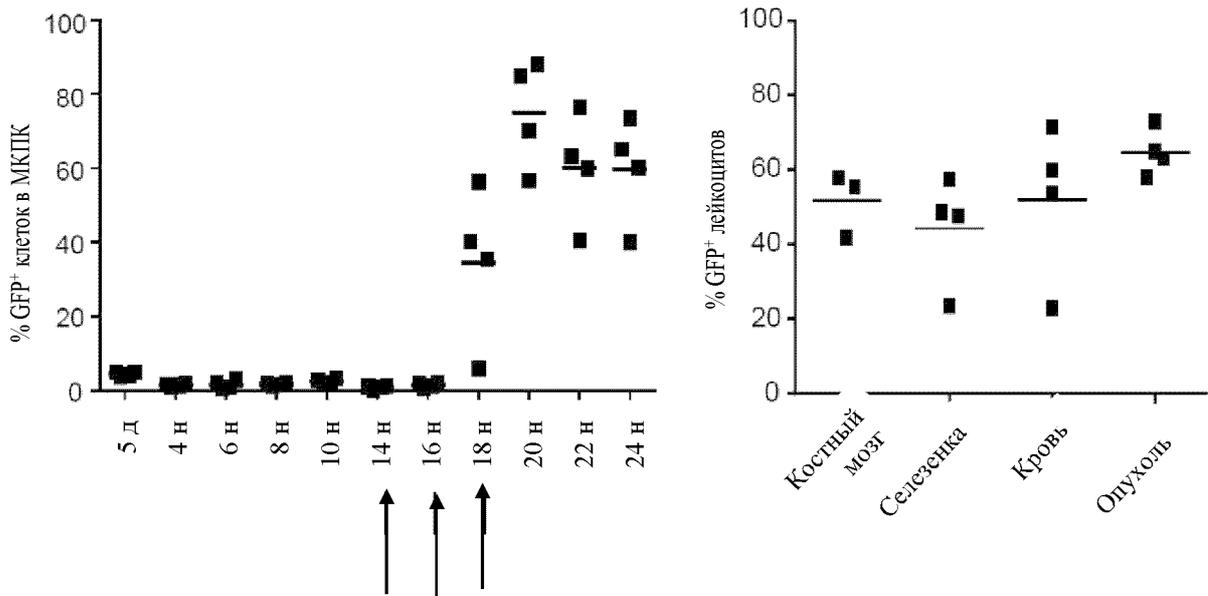
HDAd-GFP/mgmt



HDAd-SB

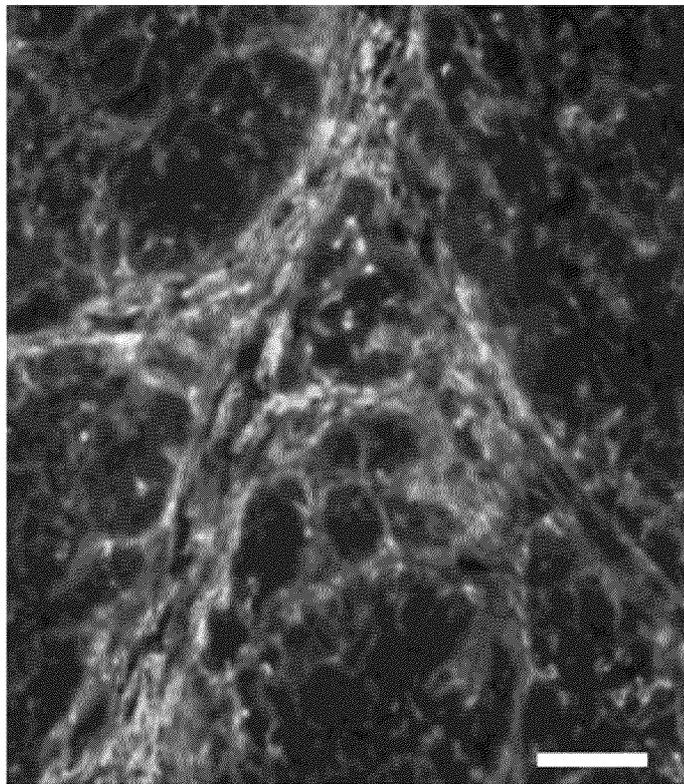


Фиг. 74В



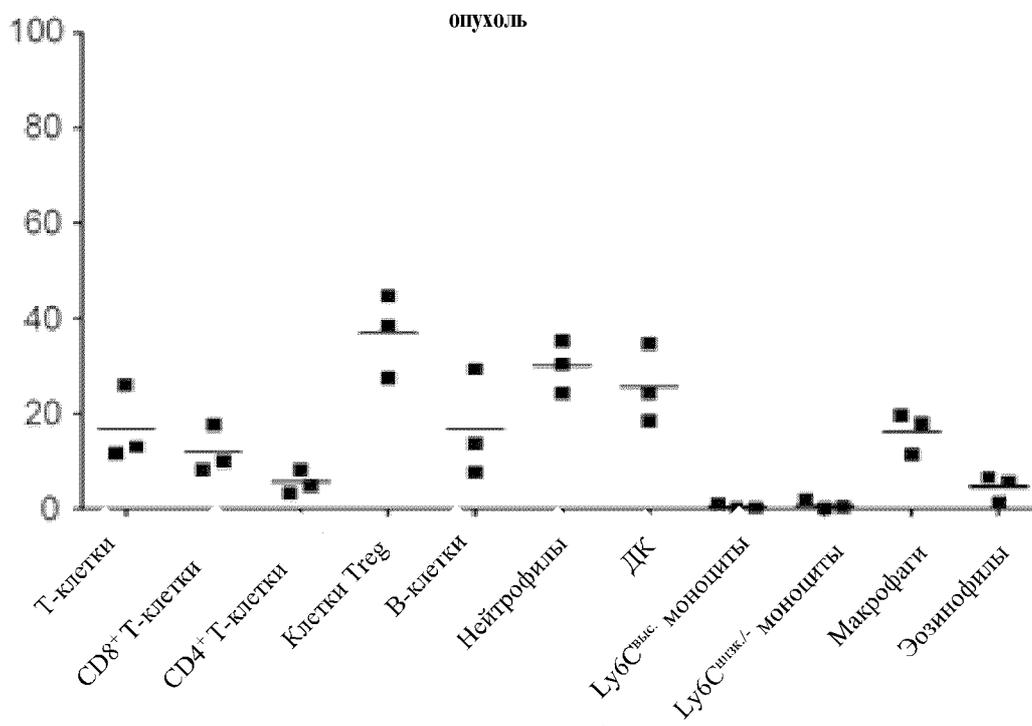
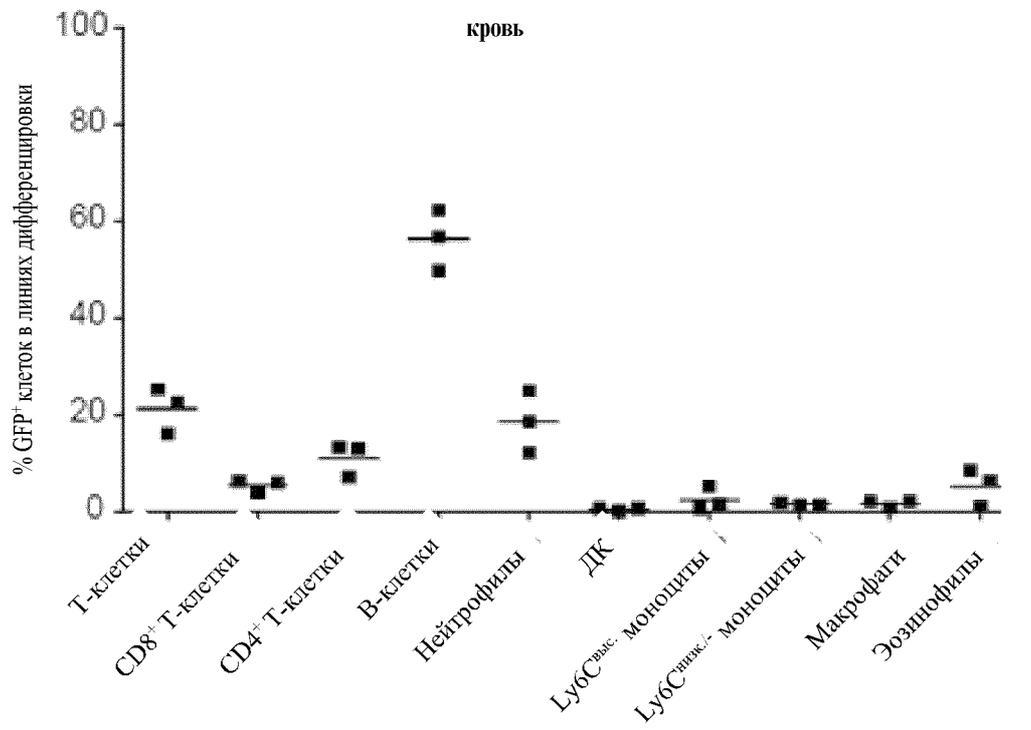
145/350

Фиг. 74С



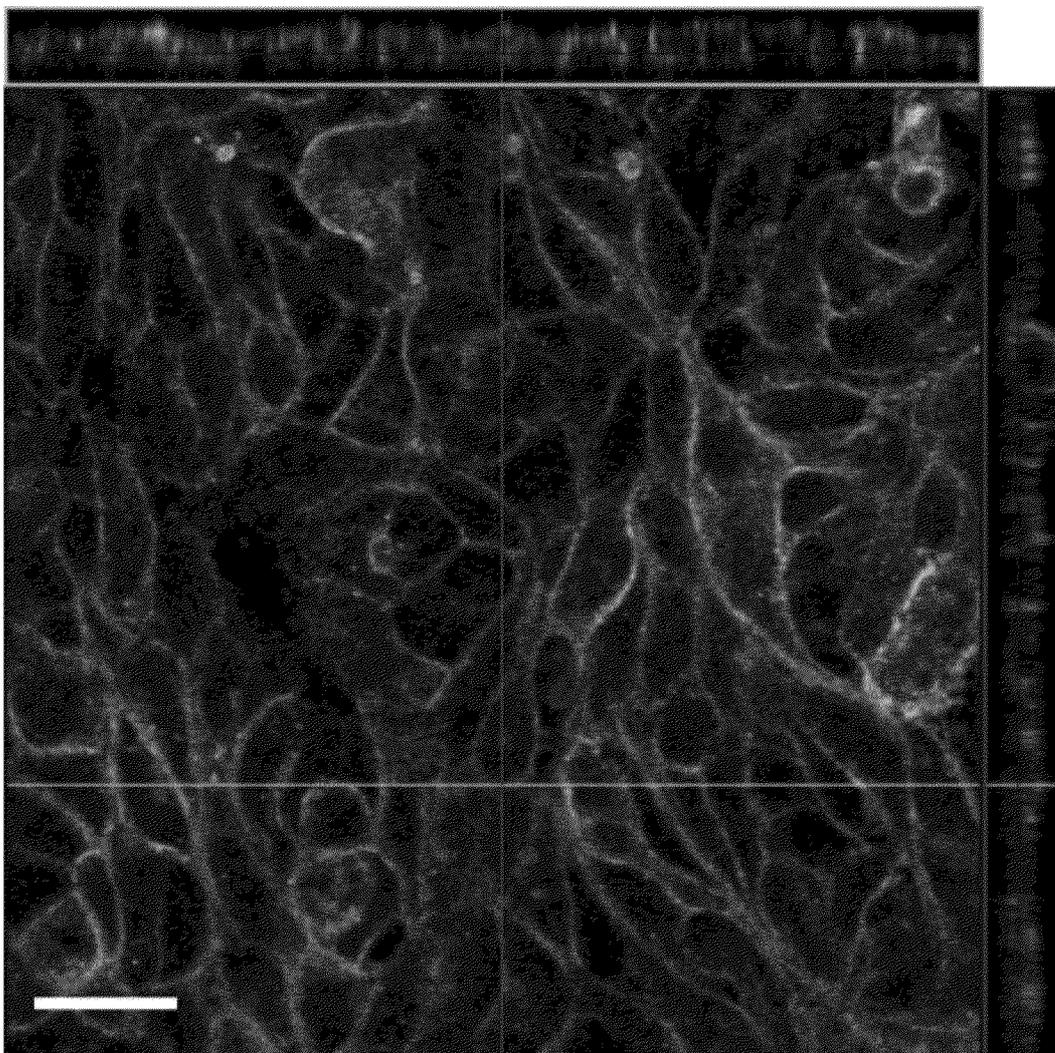
GFP/ламинин

Фиг. 74D

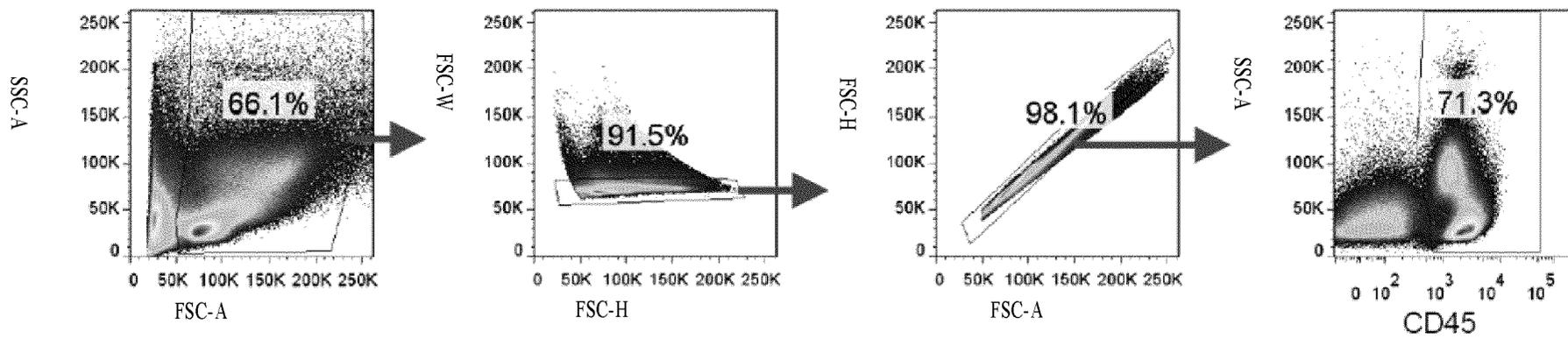


147/350

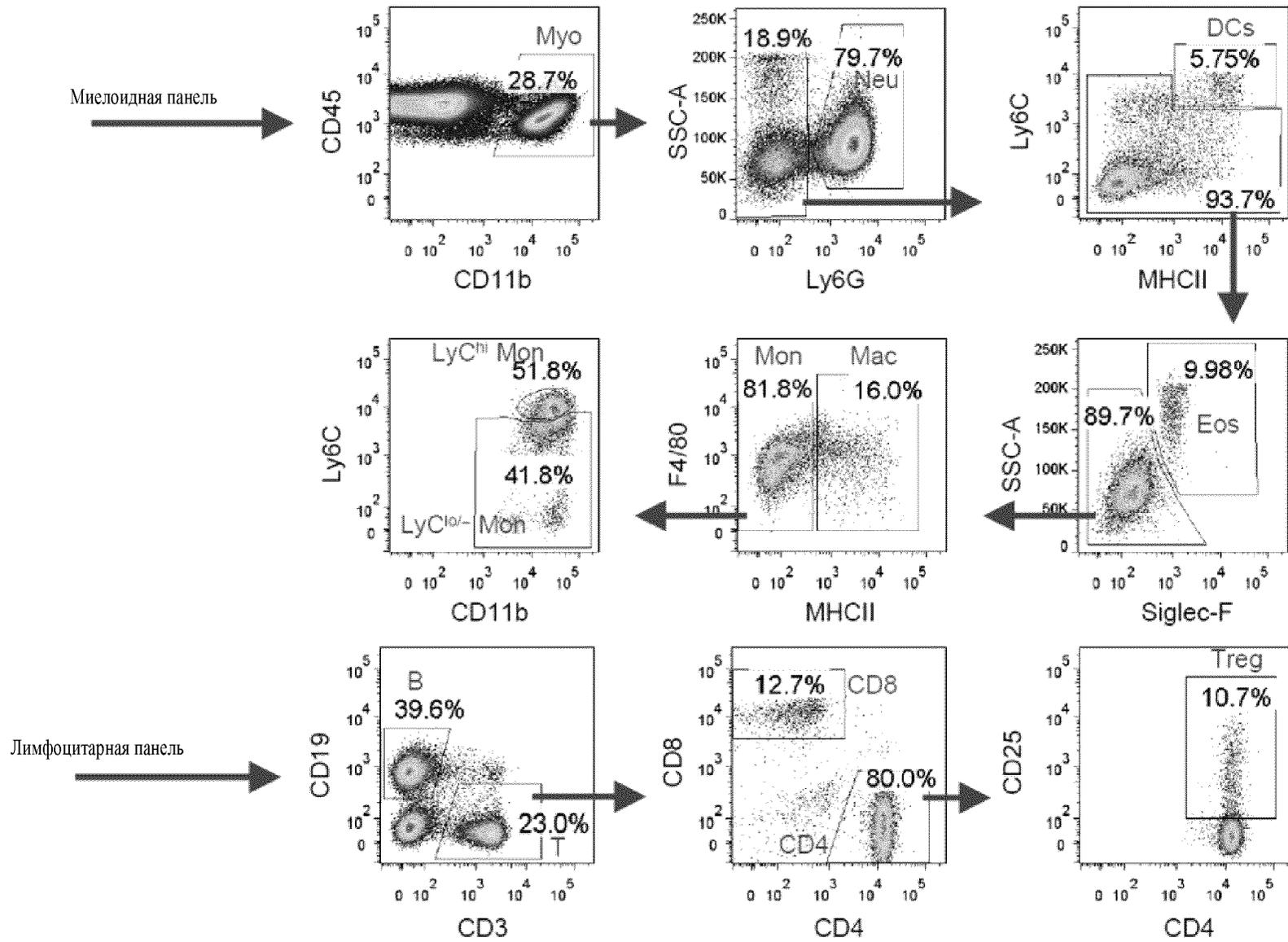
Фиг. 75



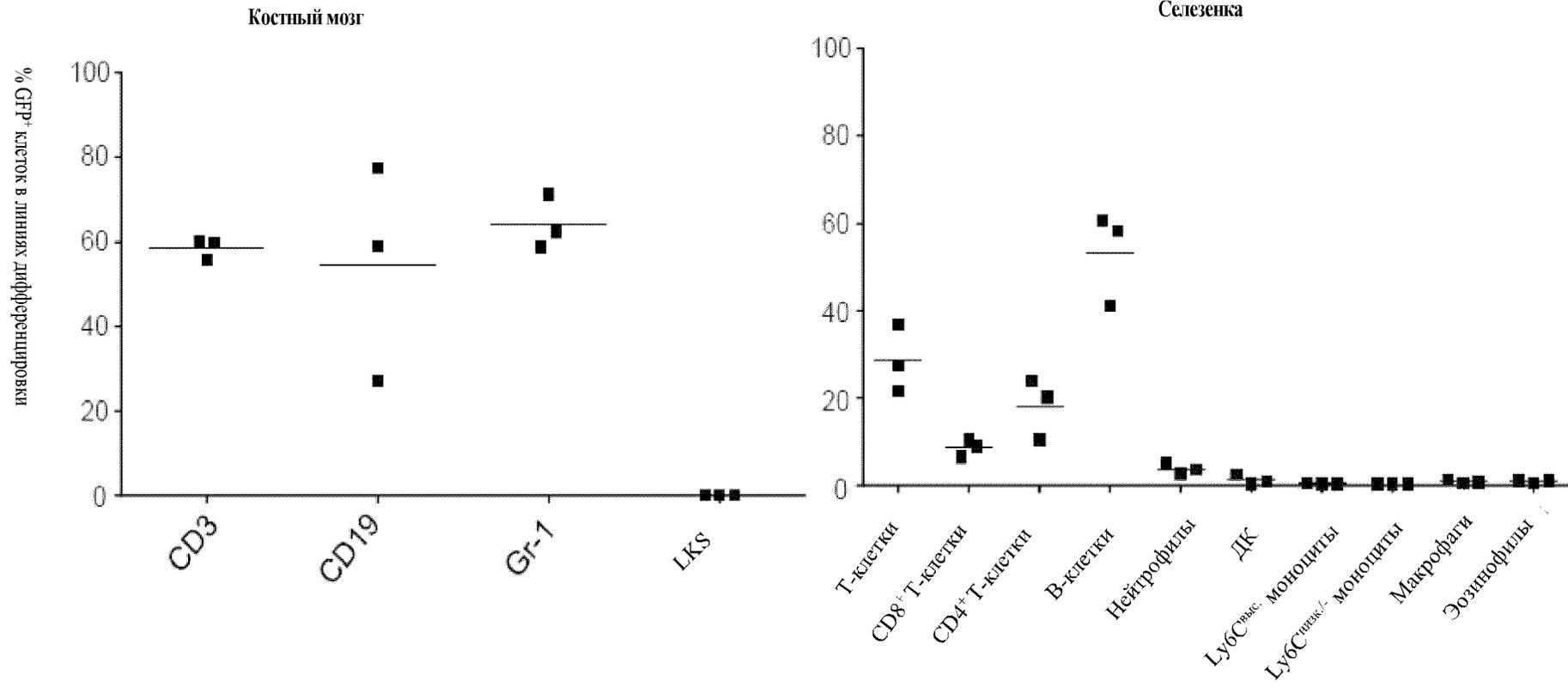
Фиг. 76



Фиг. 76, продолж.

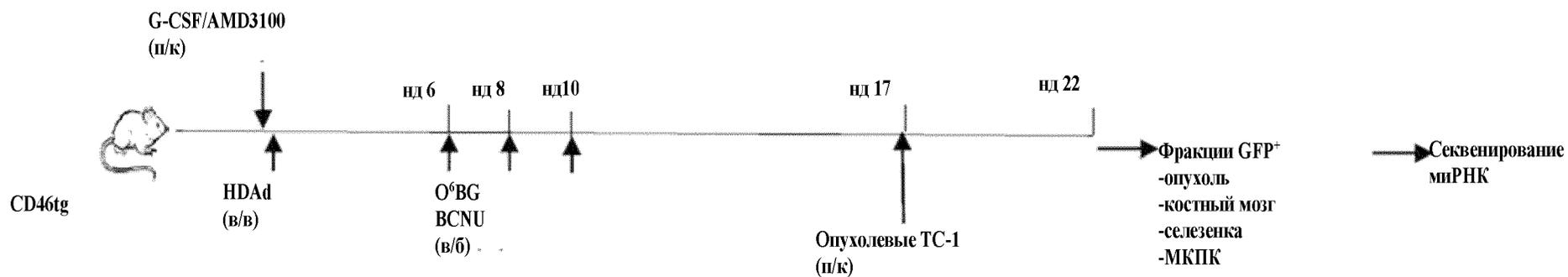


Фиг. 77

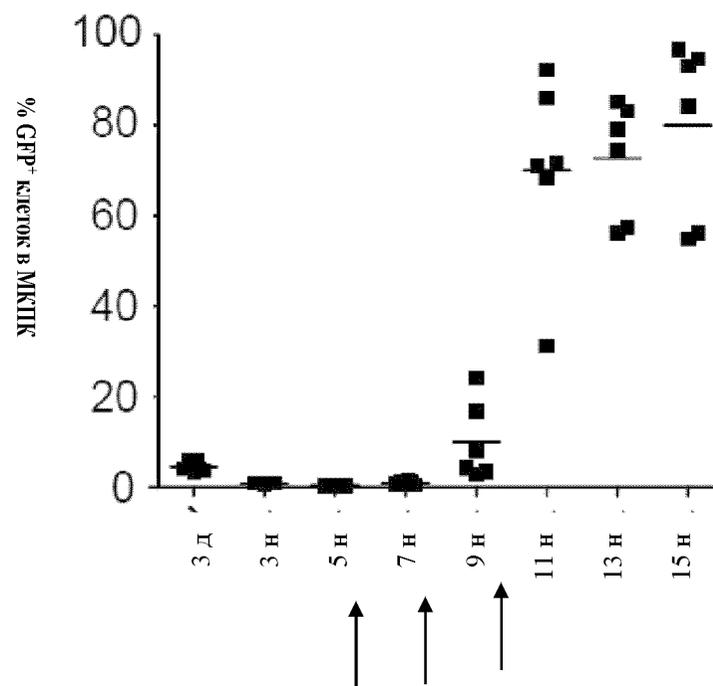


150/350

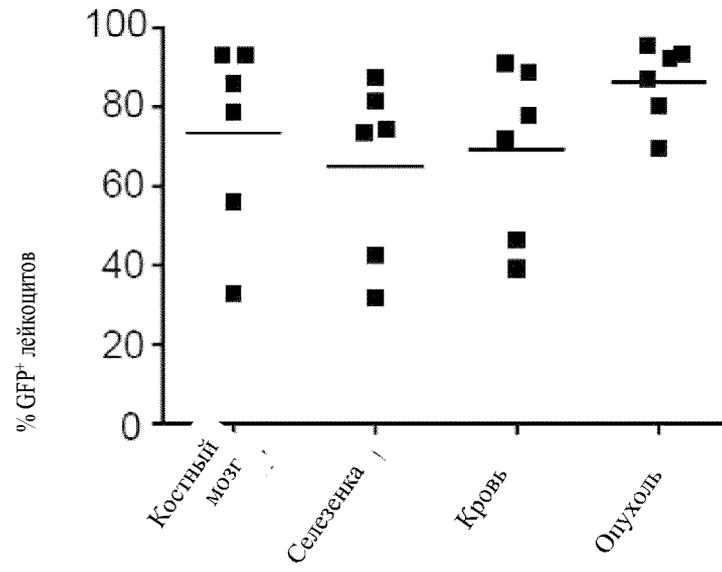
Фиг. 78А



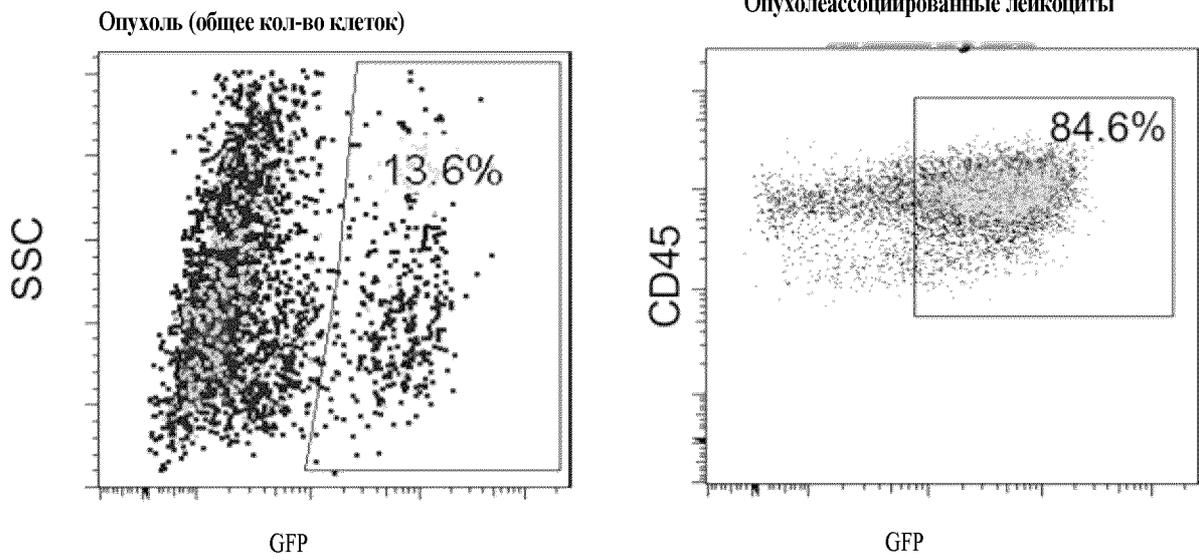
Фиг. 78В



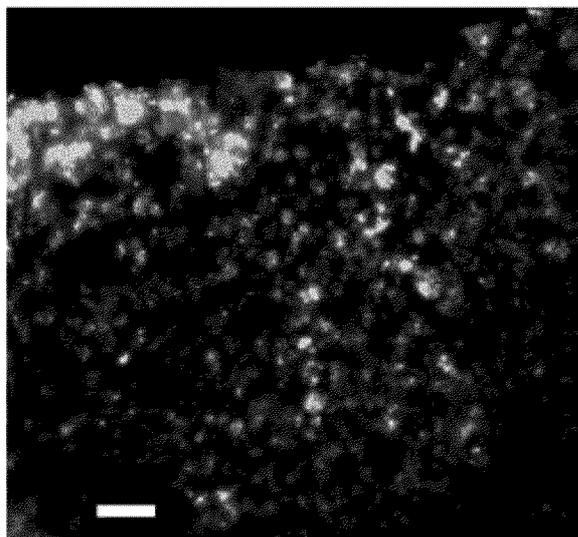
Фиг. 78С



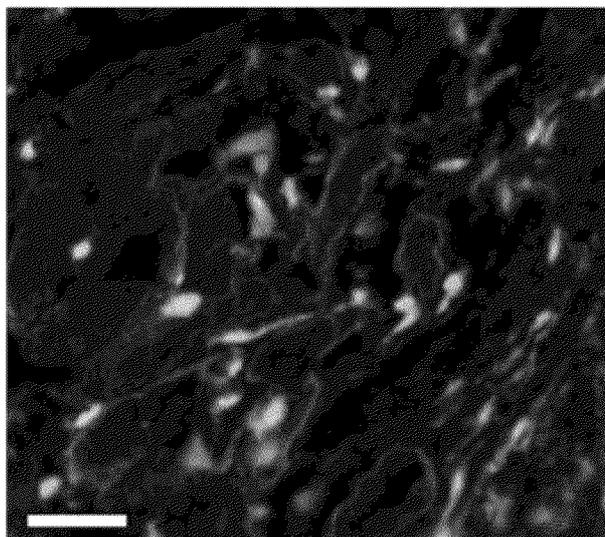
Фиг. 78D



Фиг. 78Е

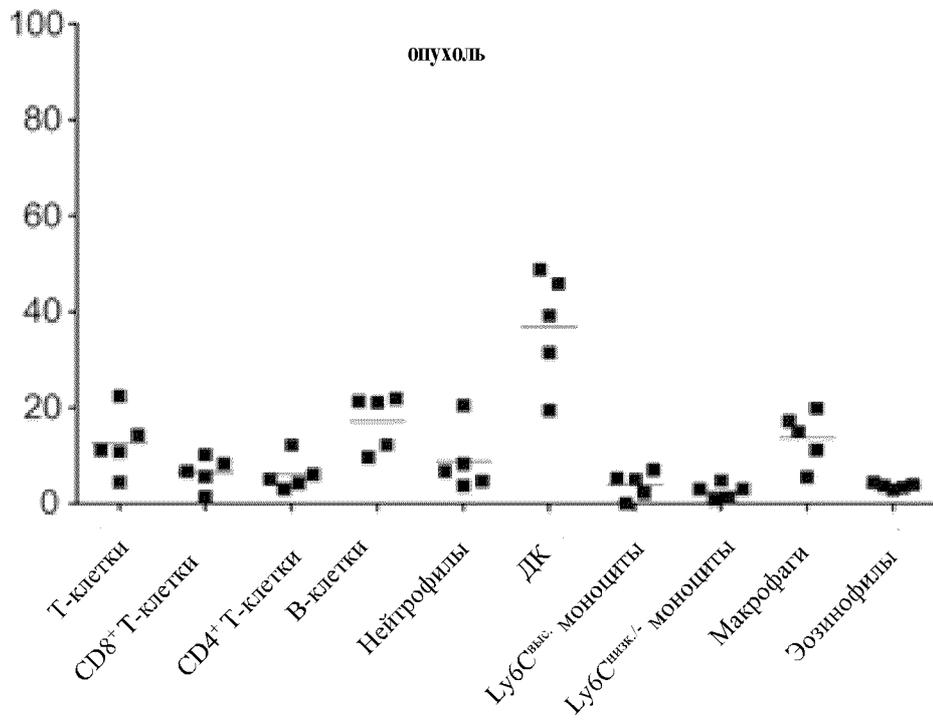
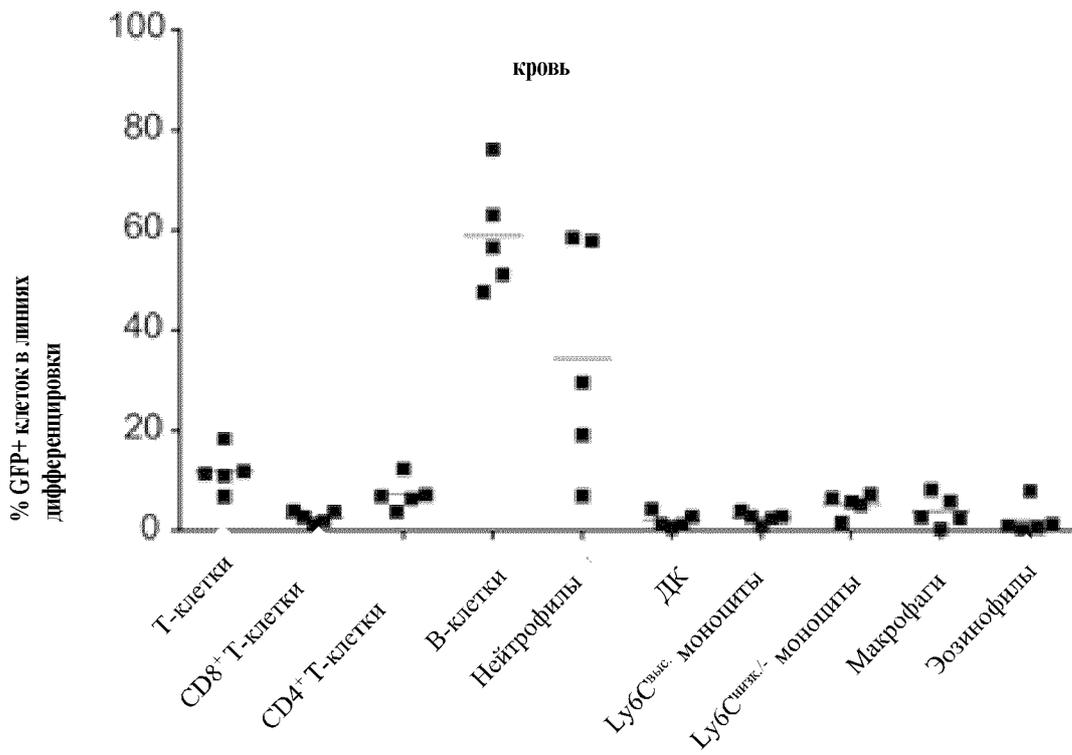


GFP

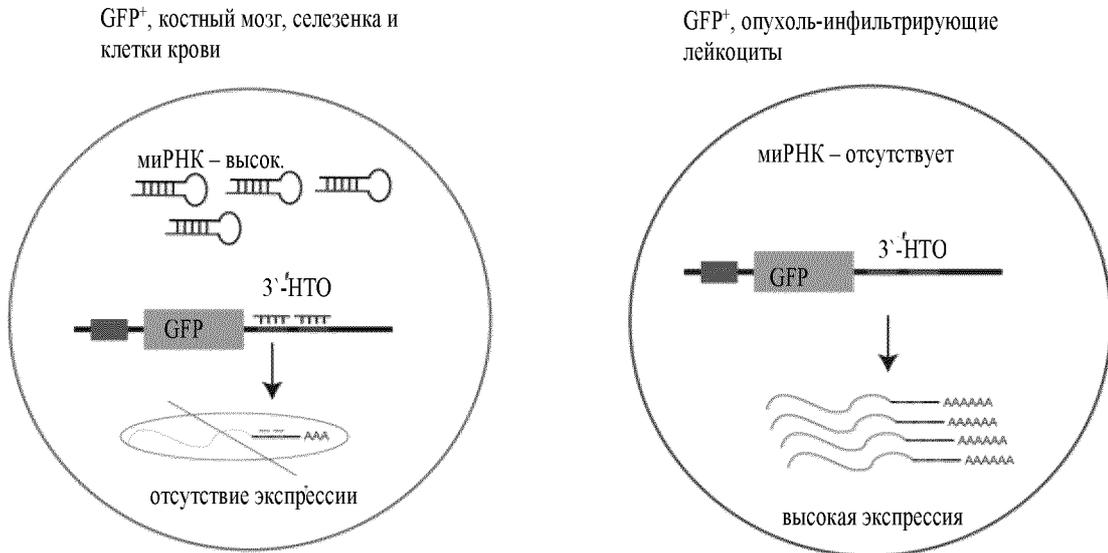


GFP/ламнин

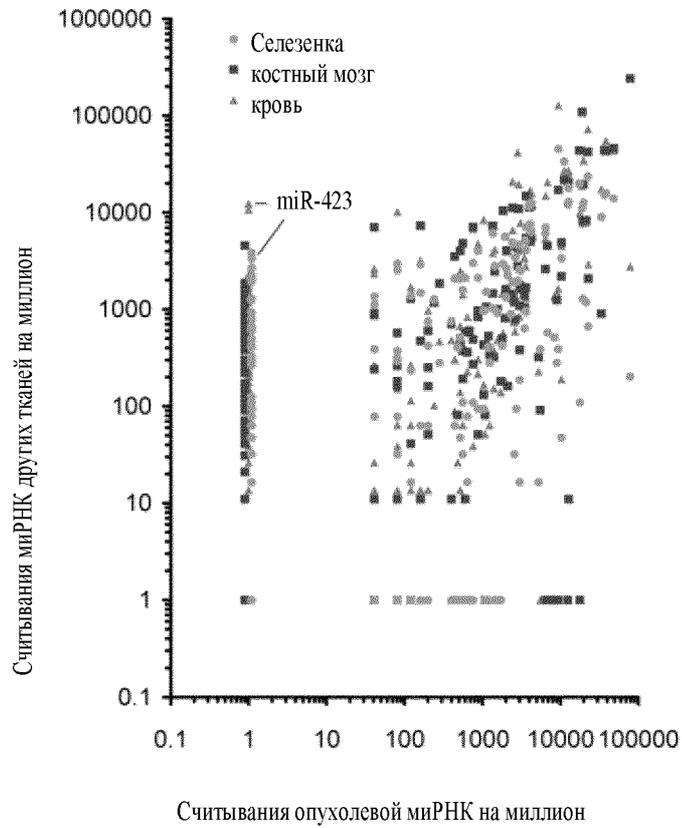
Фиг. 78F

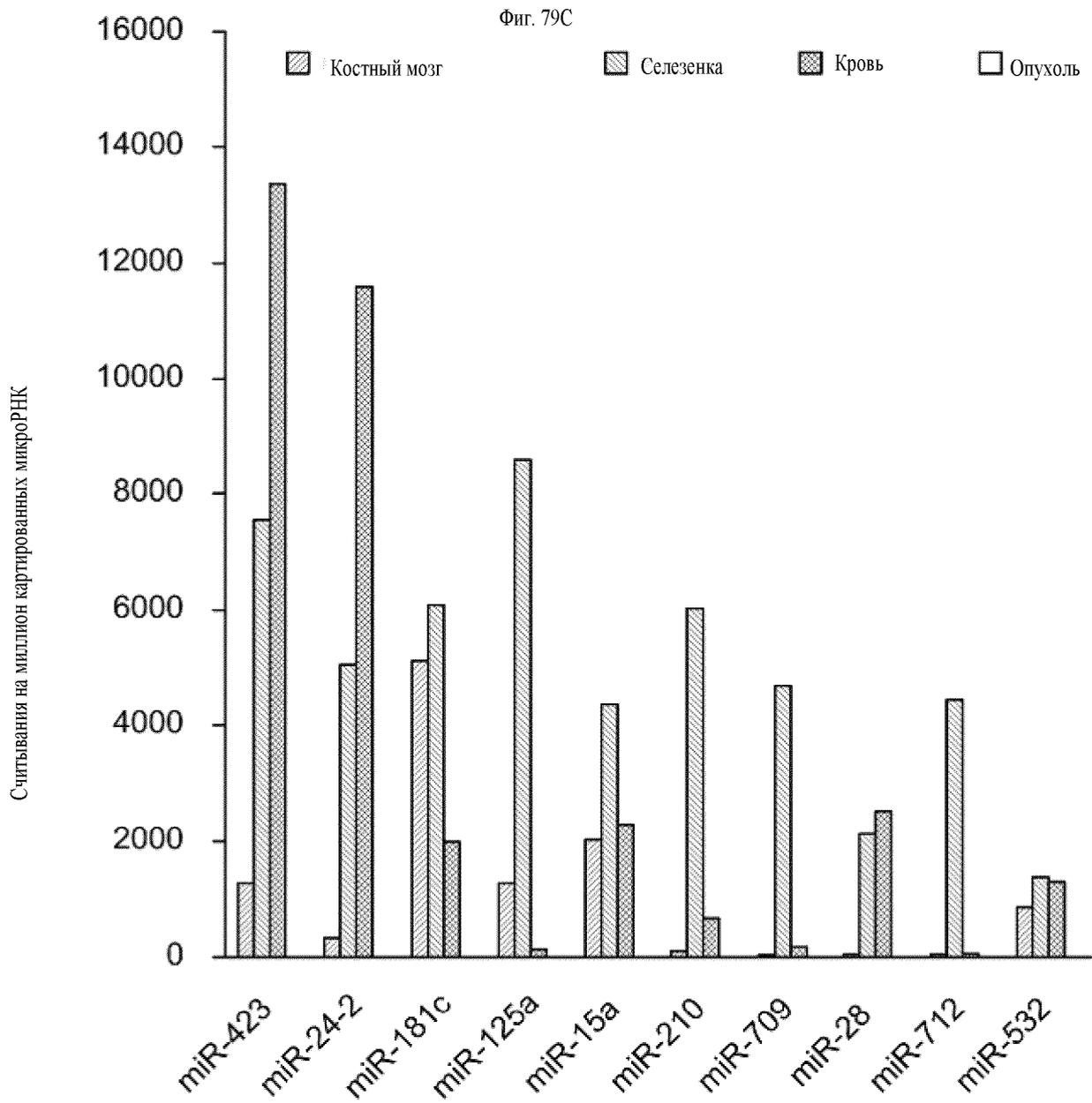


Фиг. 79А

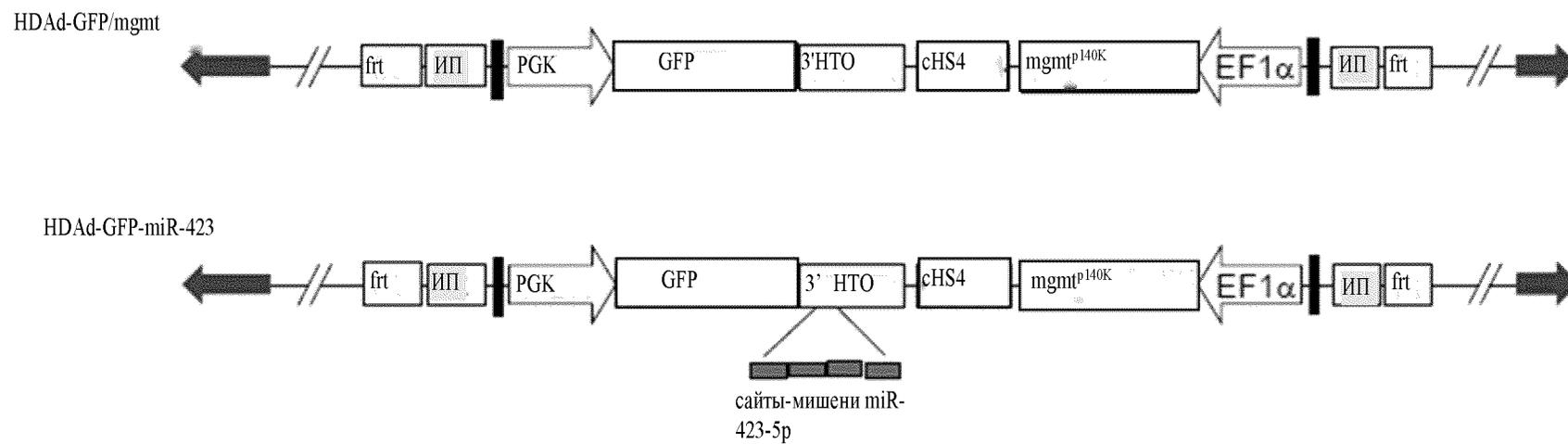


Фиг. 79В

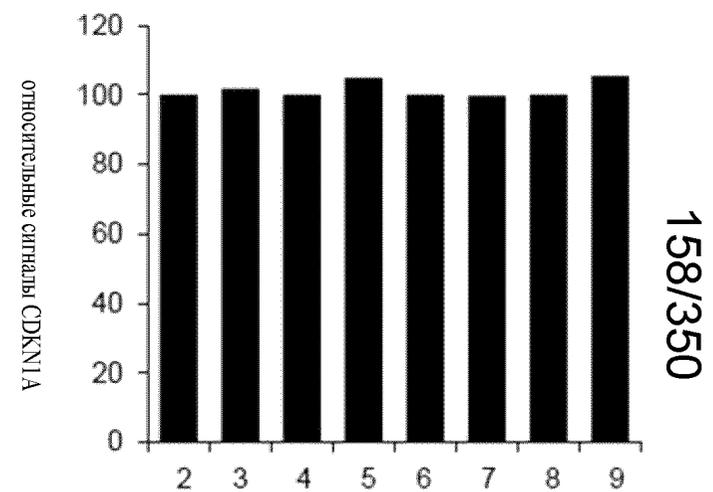
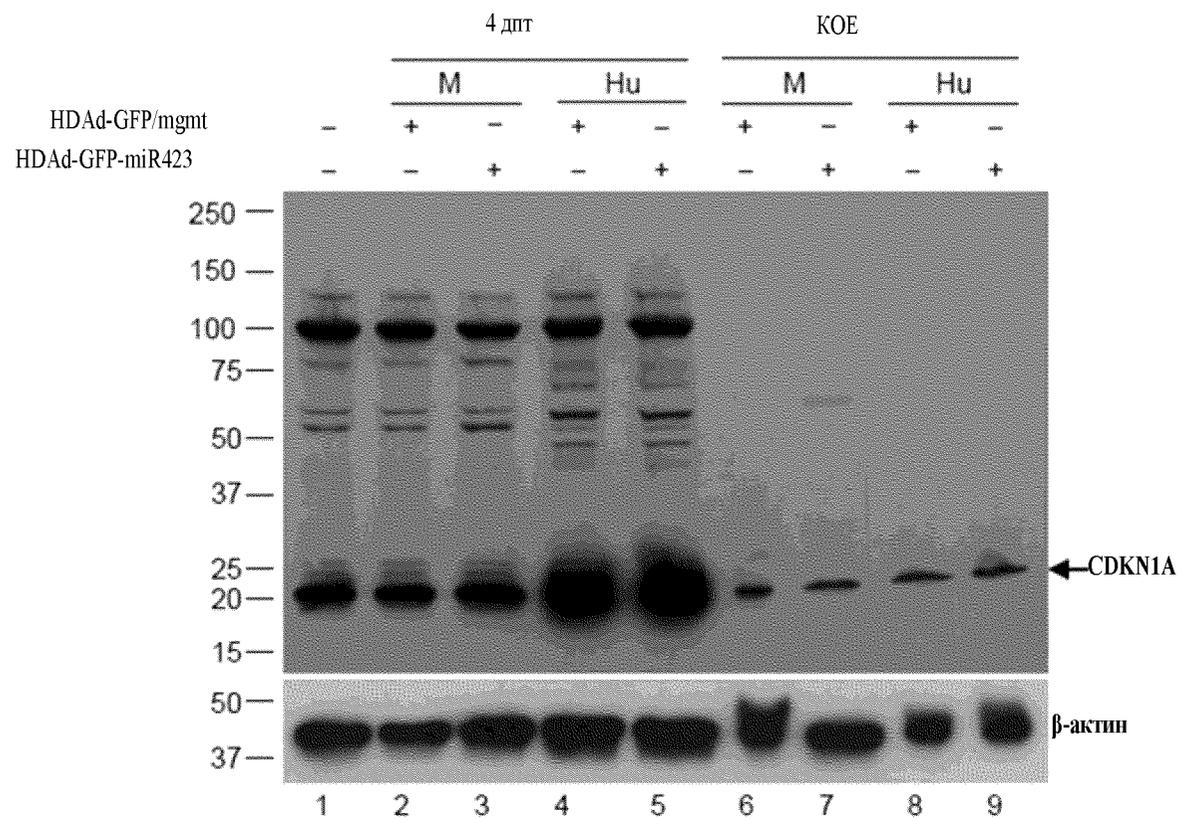




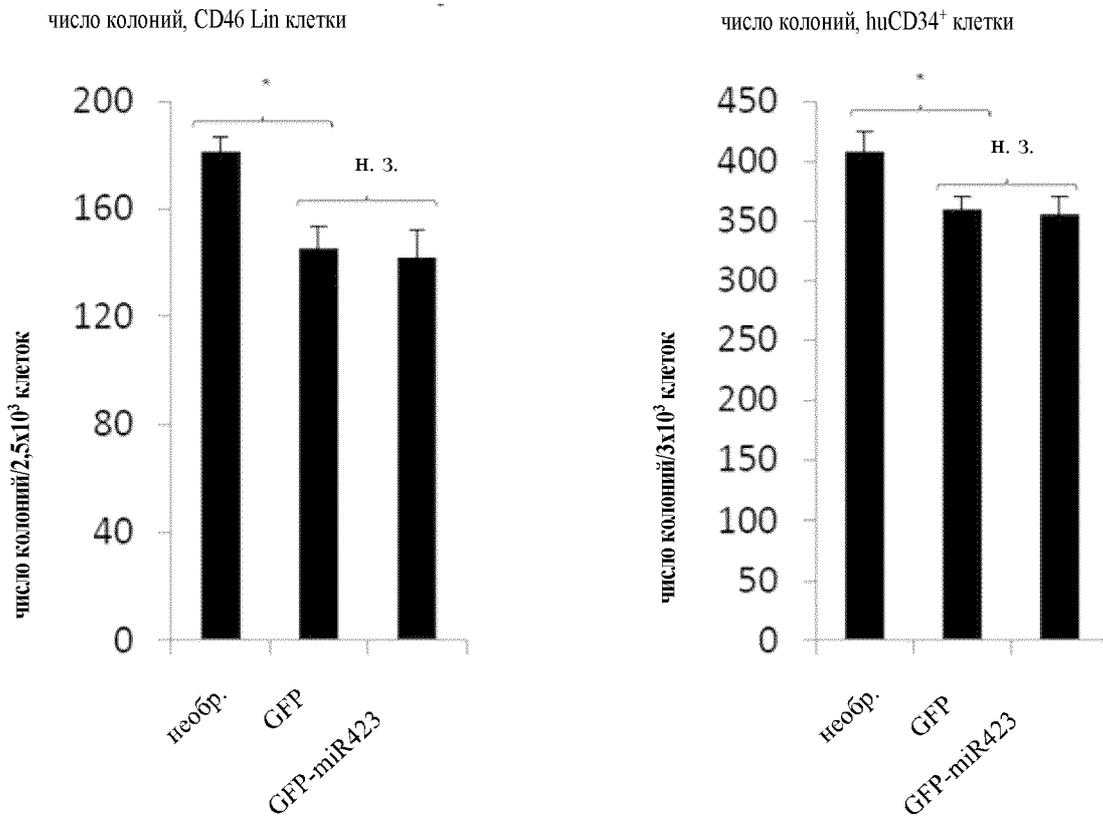
Фиг. 80А



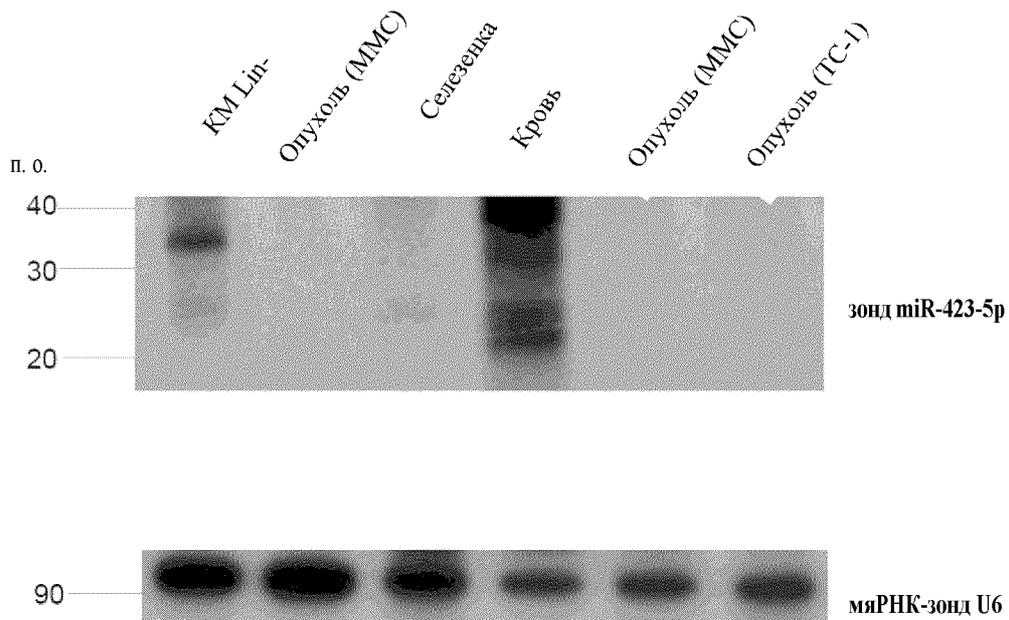
Фиг. 80В



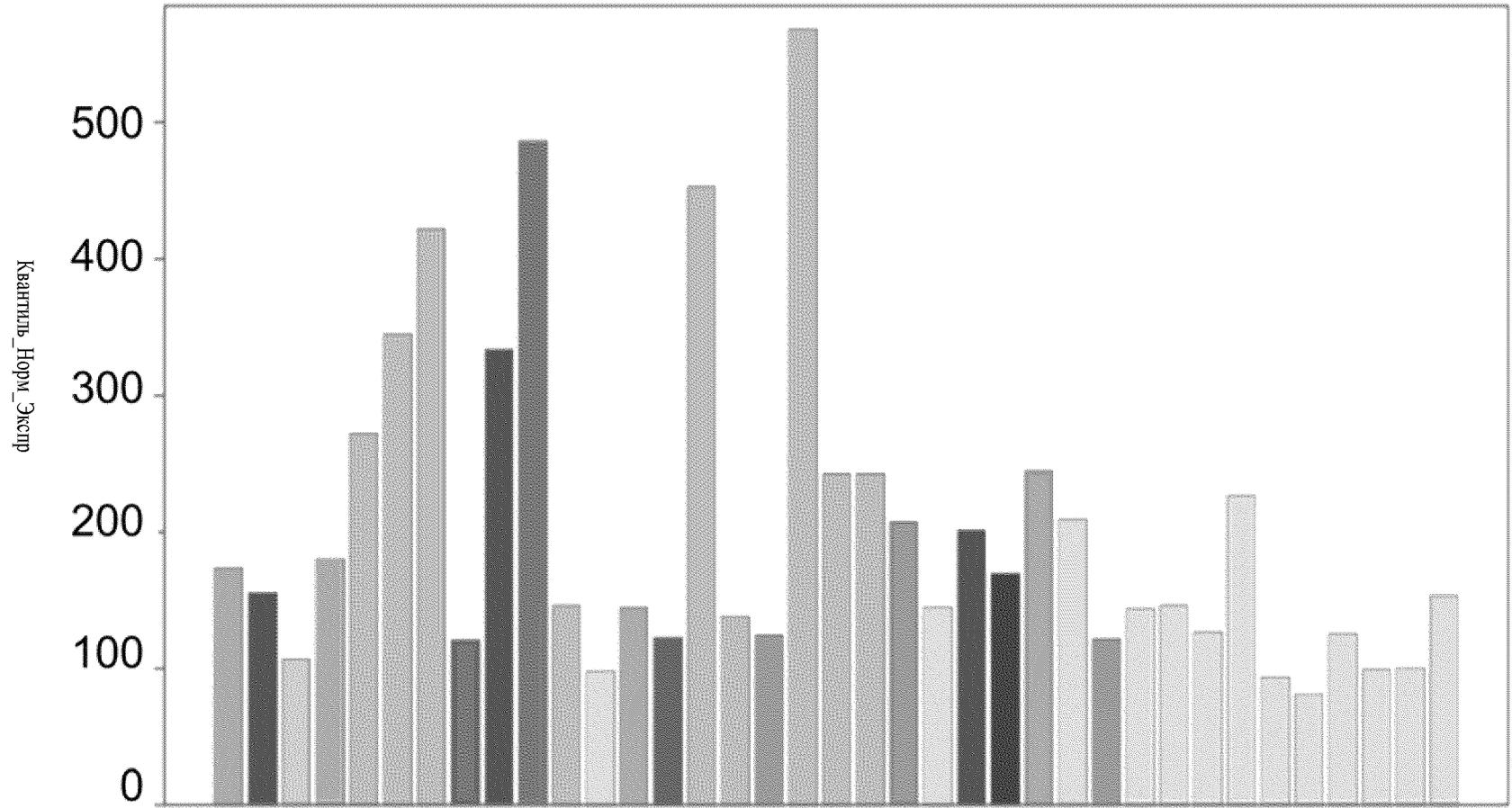
Фиг. 80С



Фиг. 81

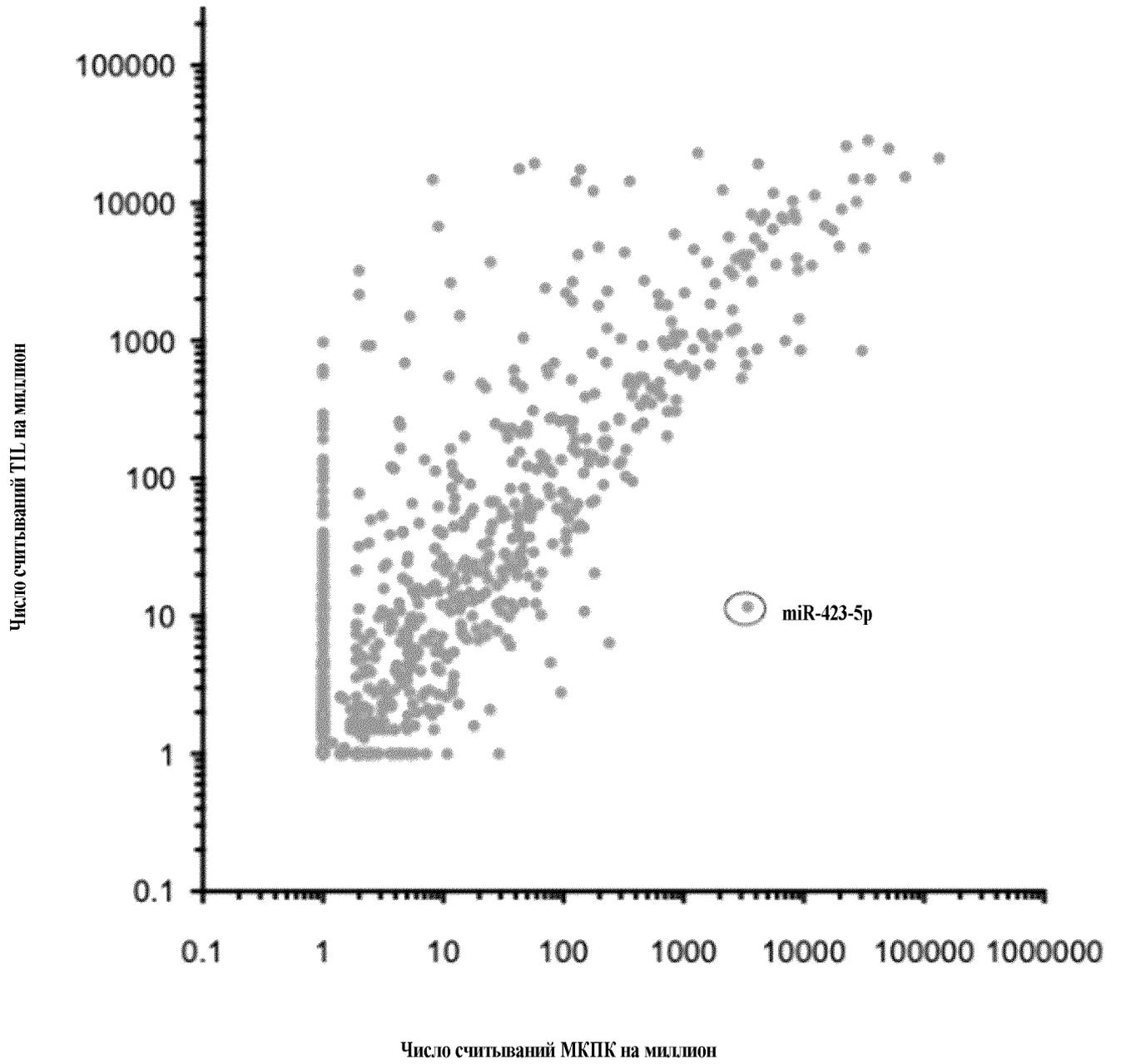


Фиг. 82А

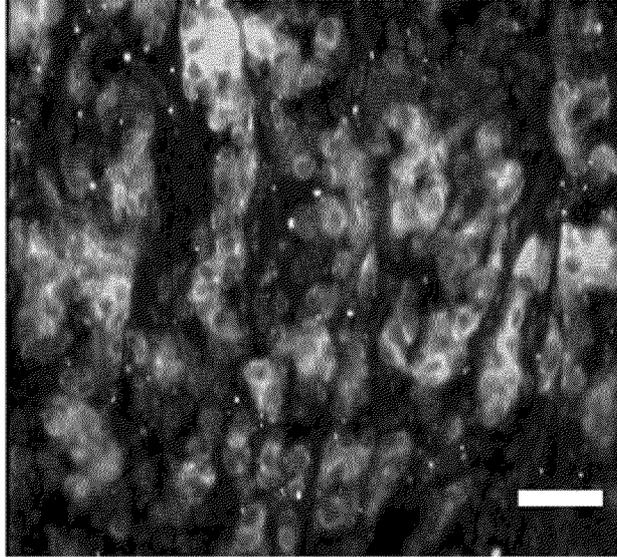


161/350

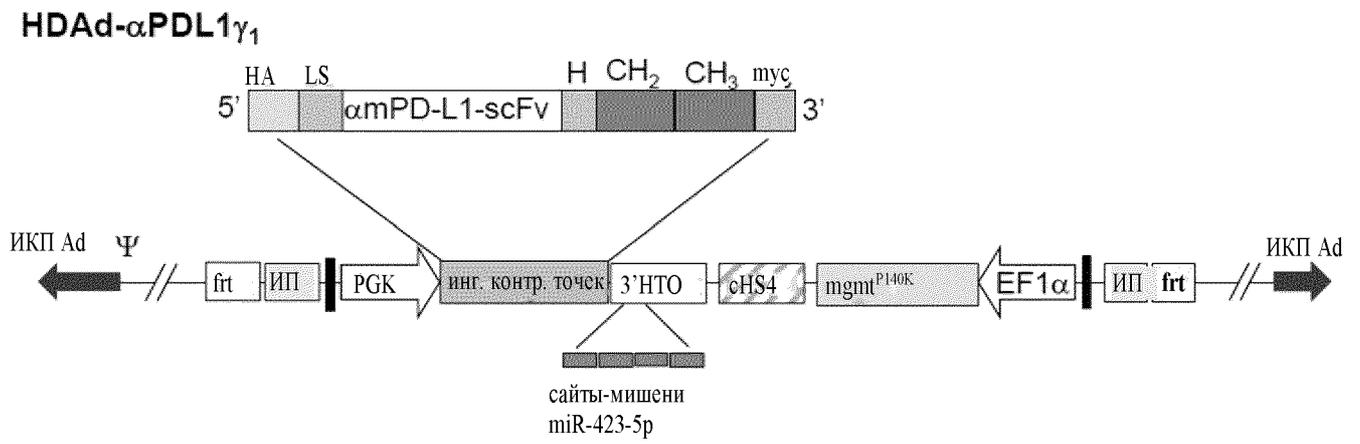
Фиг. 82В



Фиг. 83А

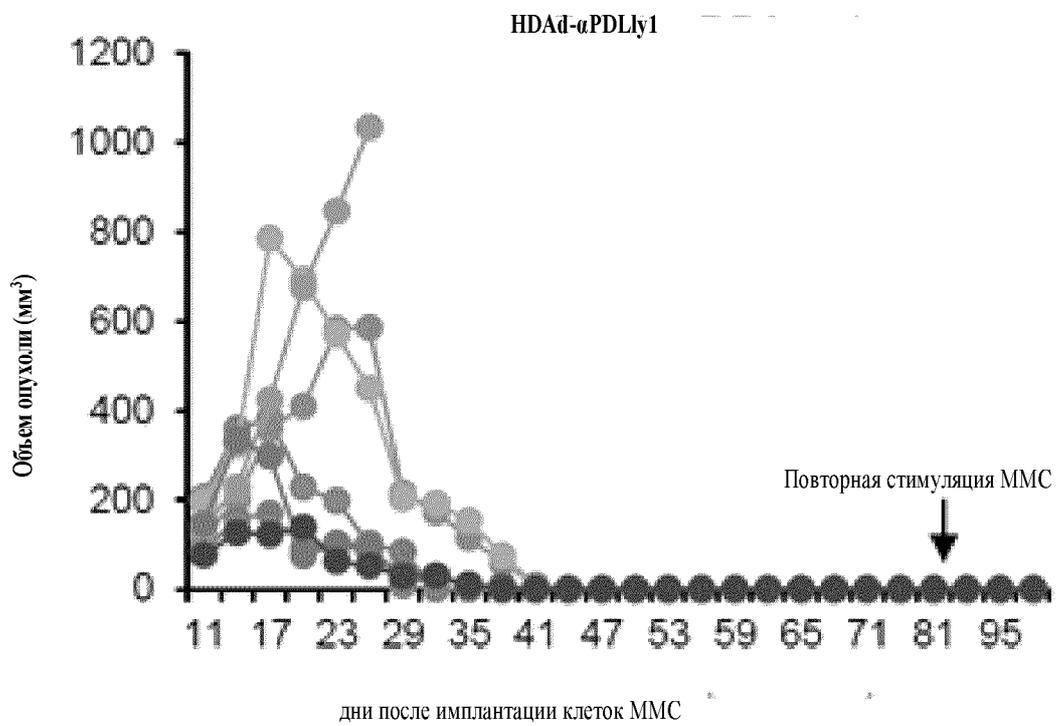
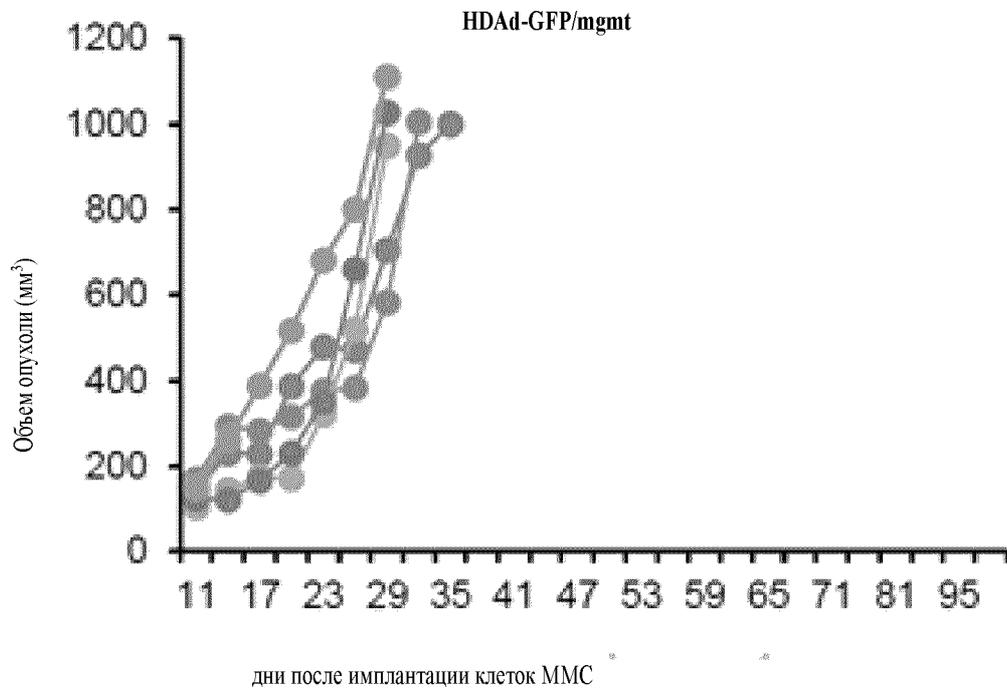


Фиг. 83В

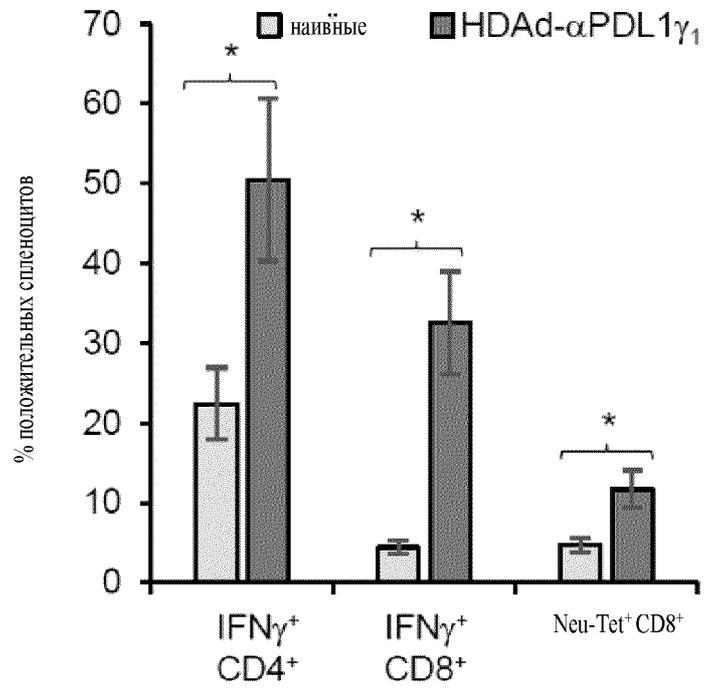


163/350

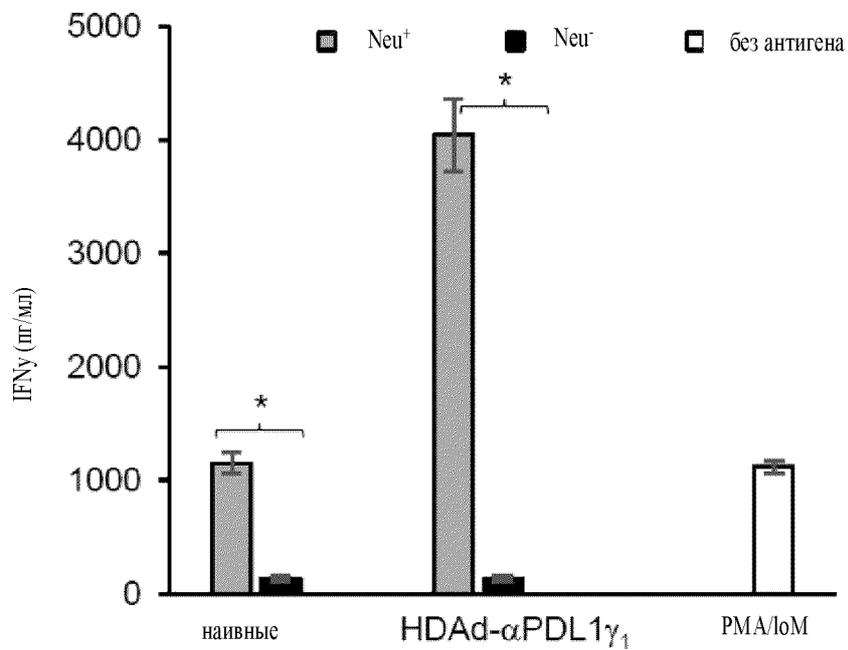
Фиг. 83С



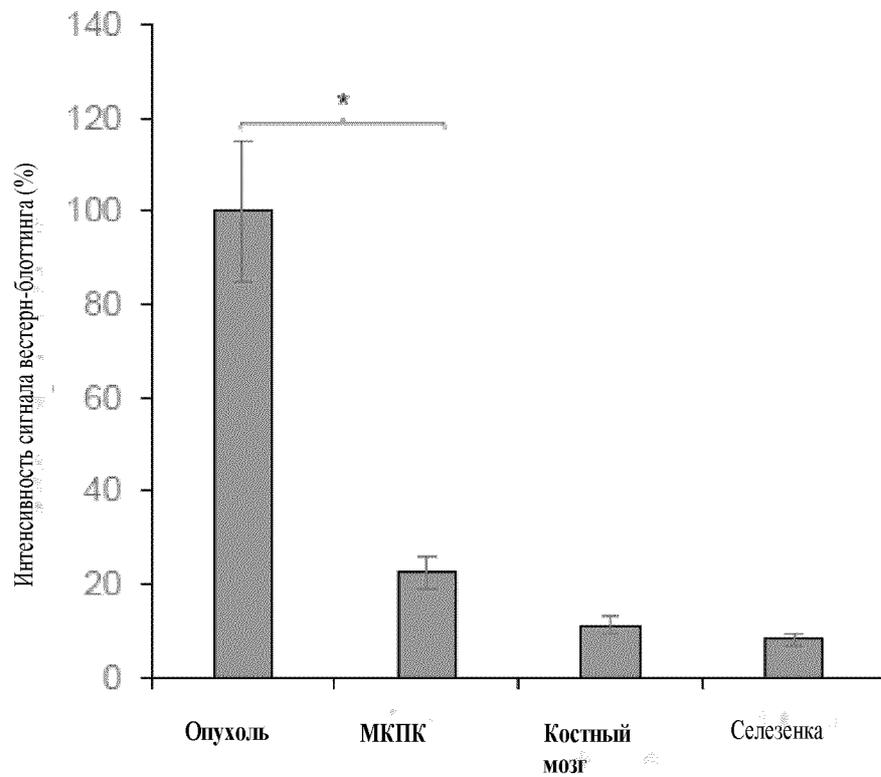
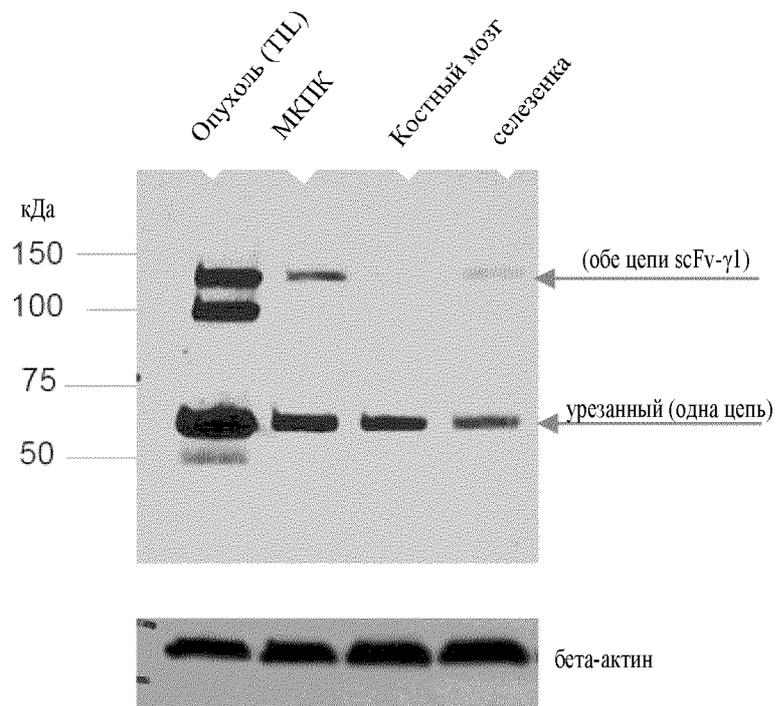
Фиг. 83D



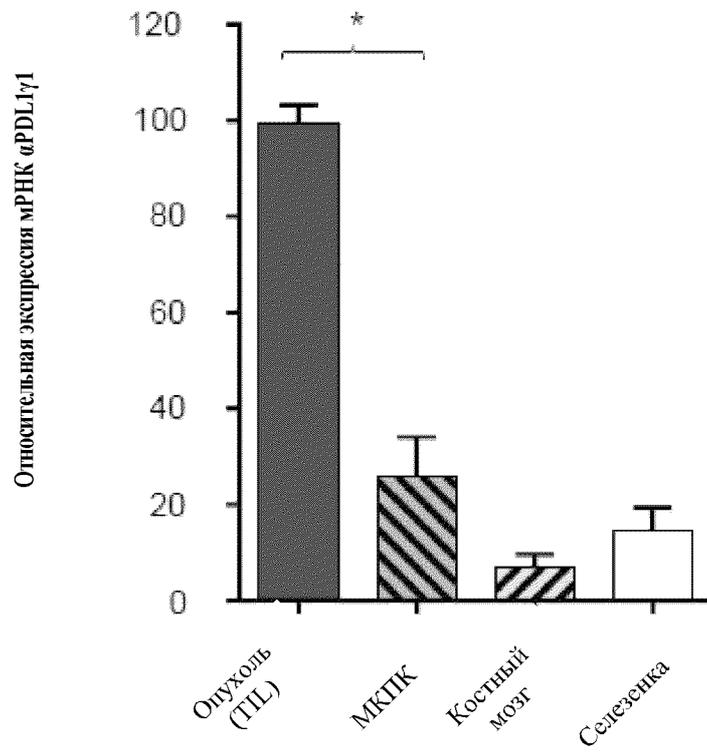
Фиг. 83E



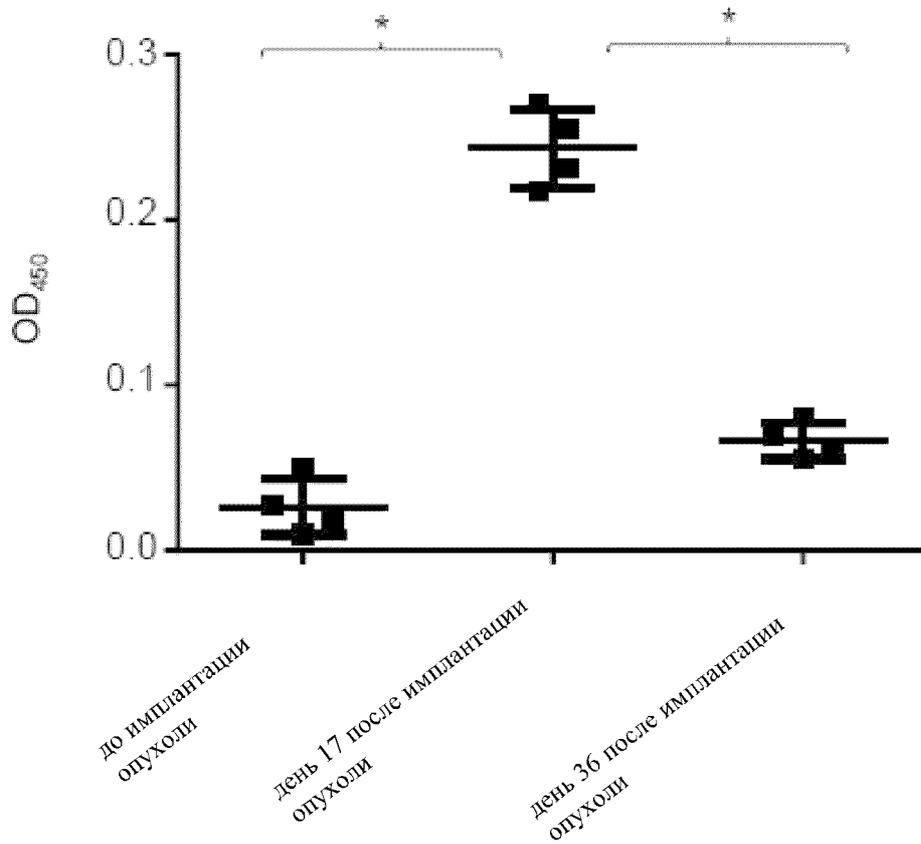
Фиг. 84А



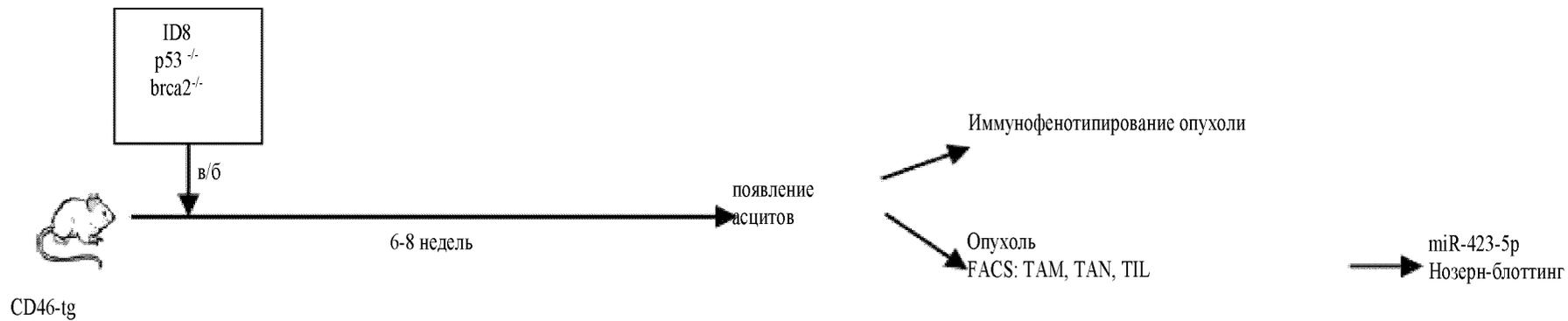
Фиг. 84В



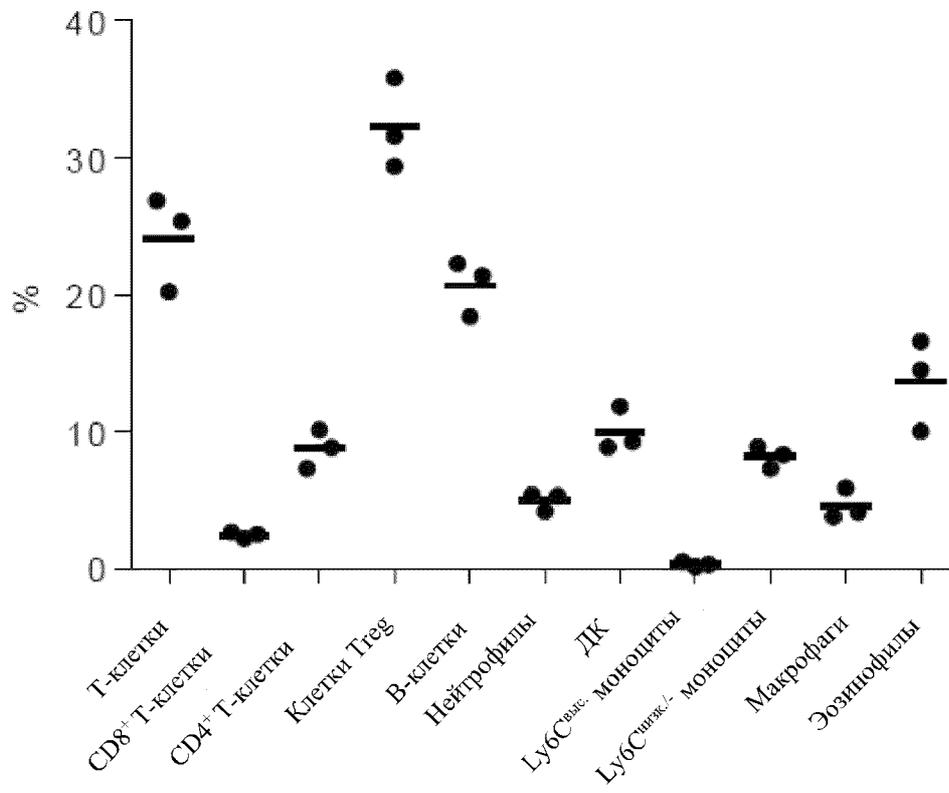
Фиг. 84С



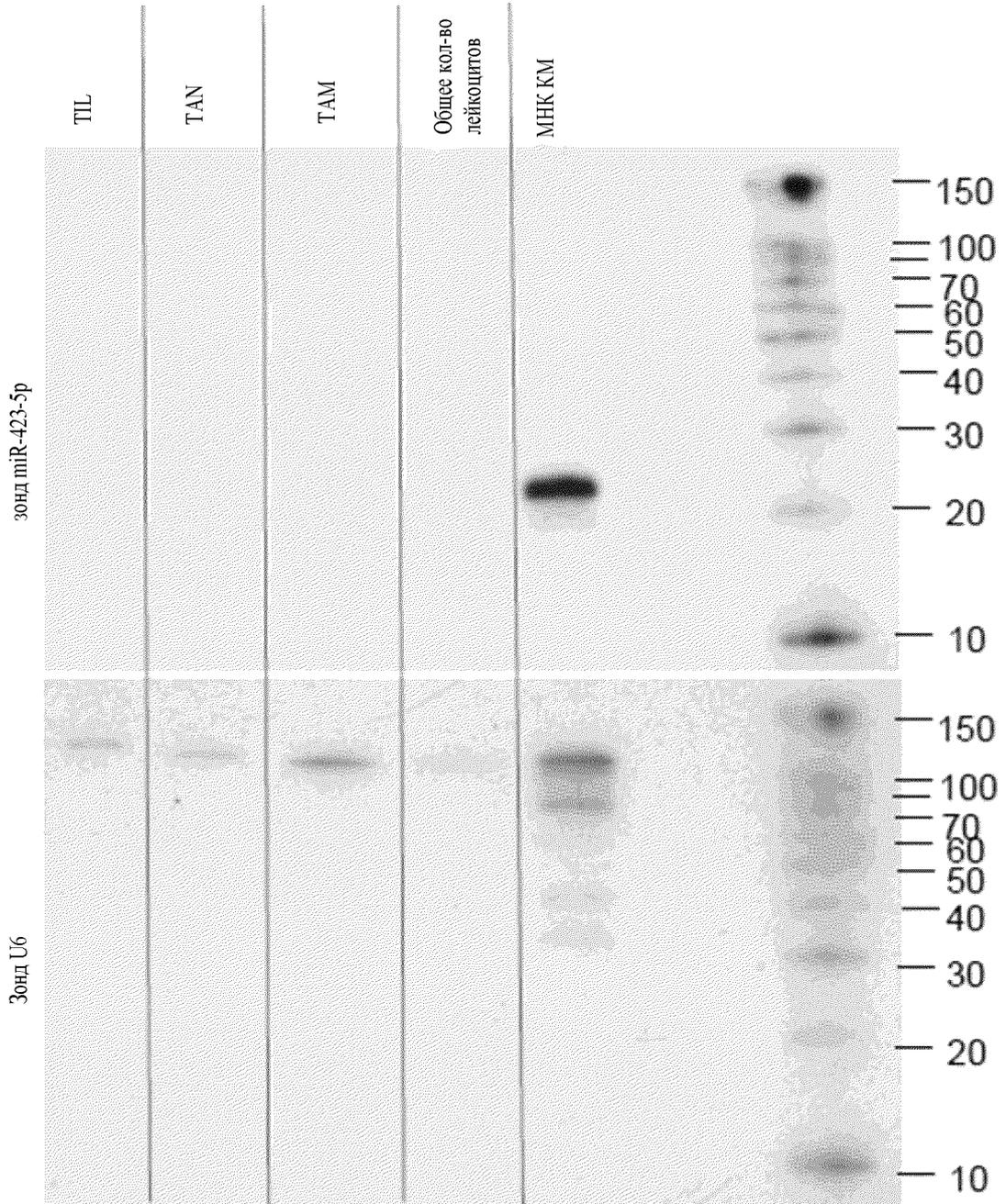
Фиг. 85А



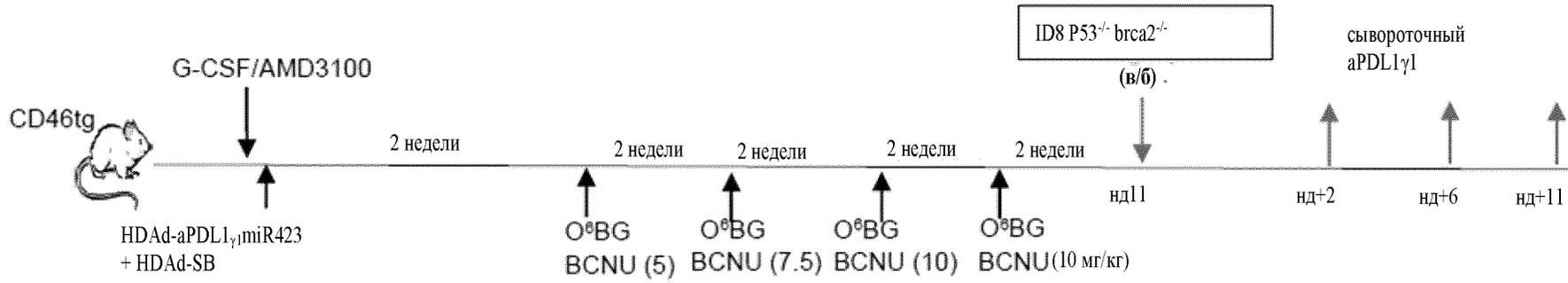
Фиг. 85В



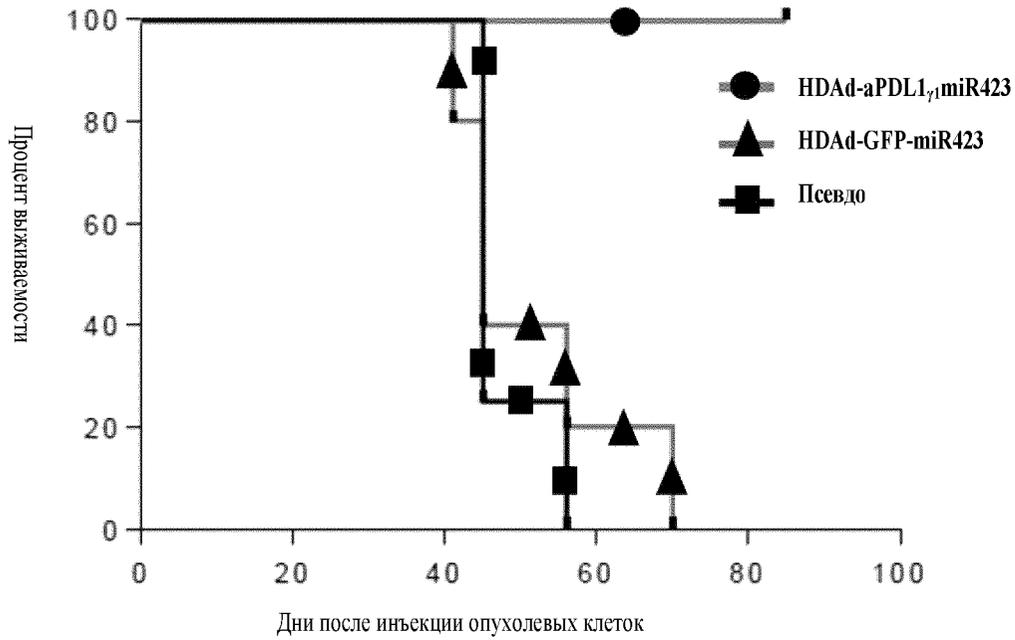
Фиг. 85С



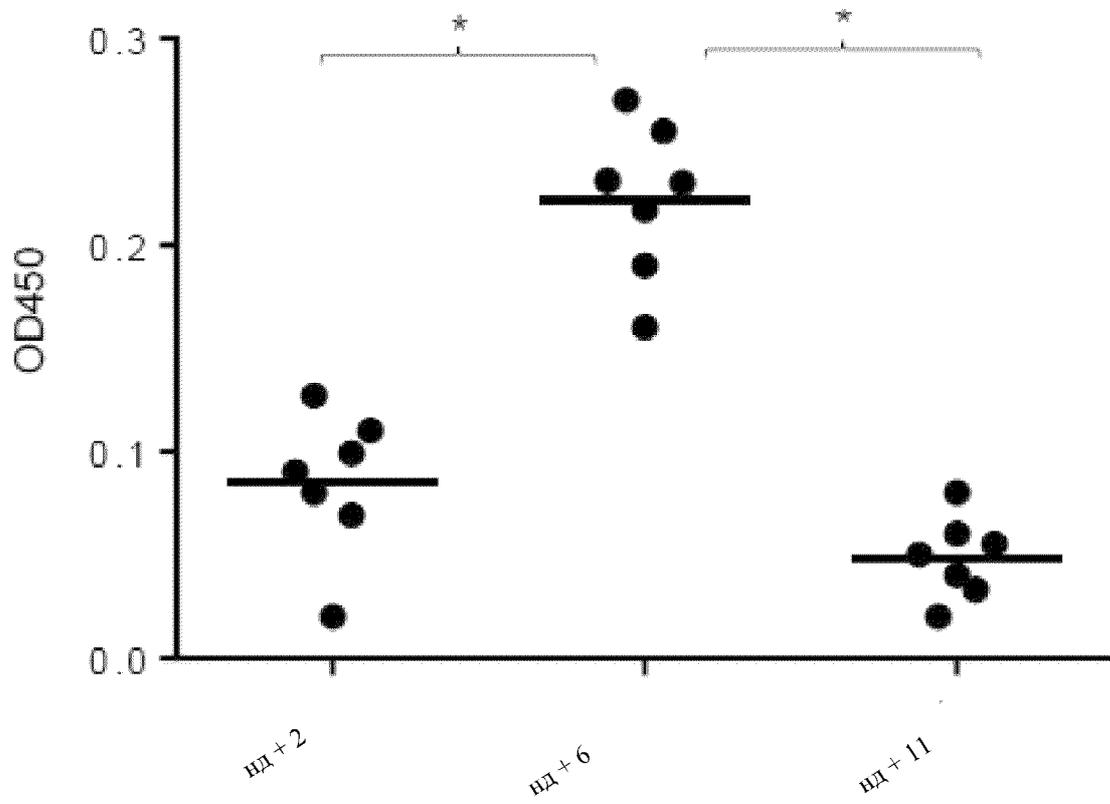
Фиг. 85D



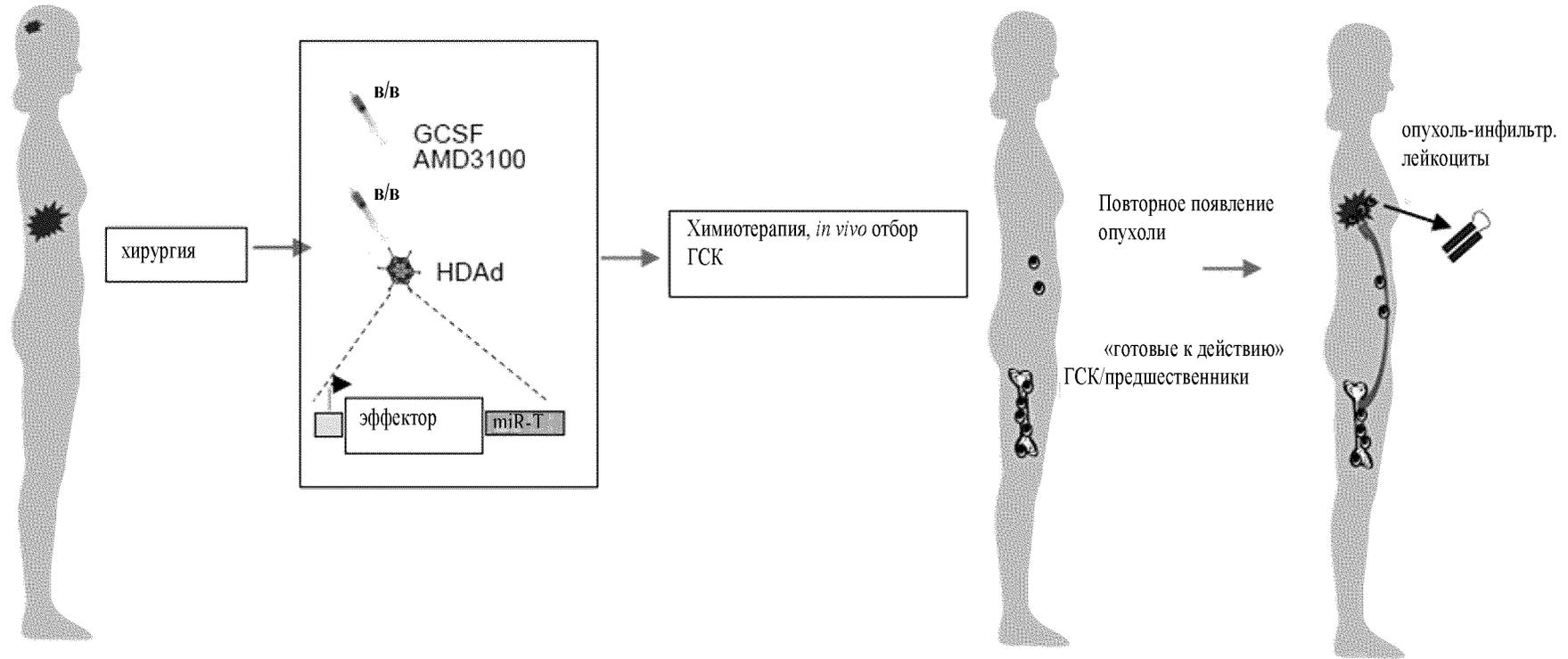
Фиг. 85E



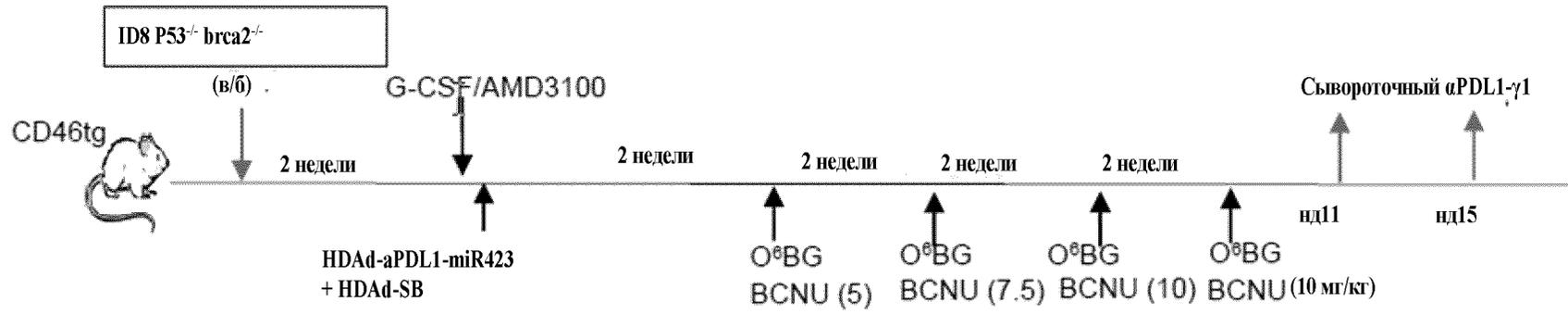
Фиг. 85F



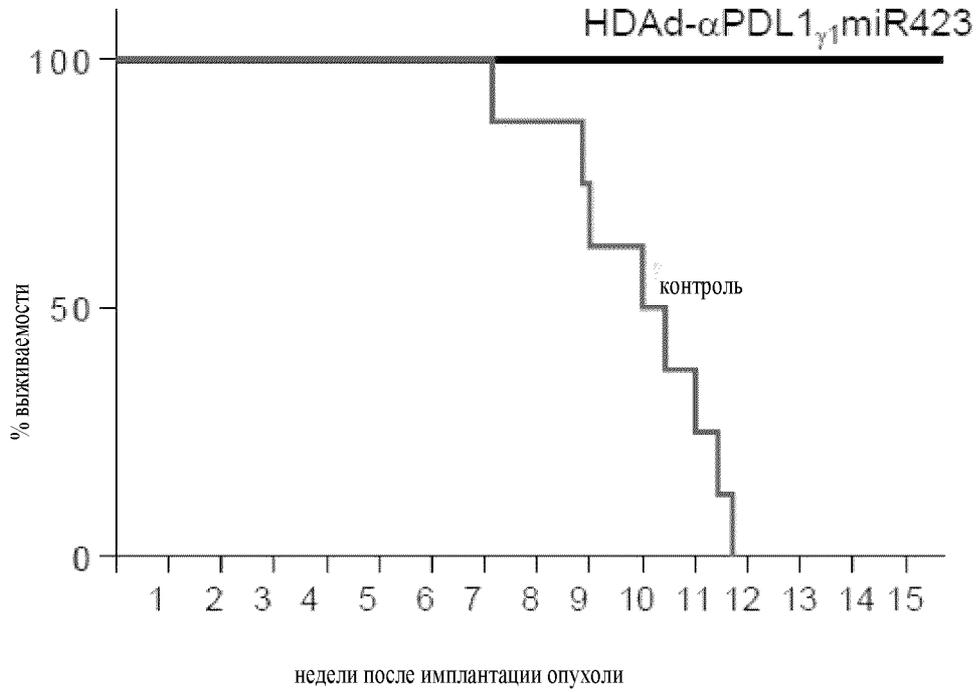
Фиг. 86А



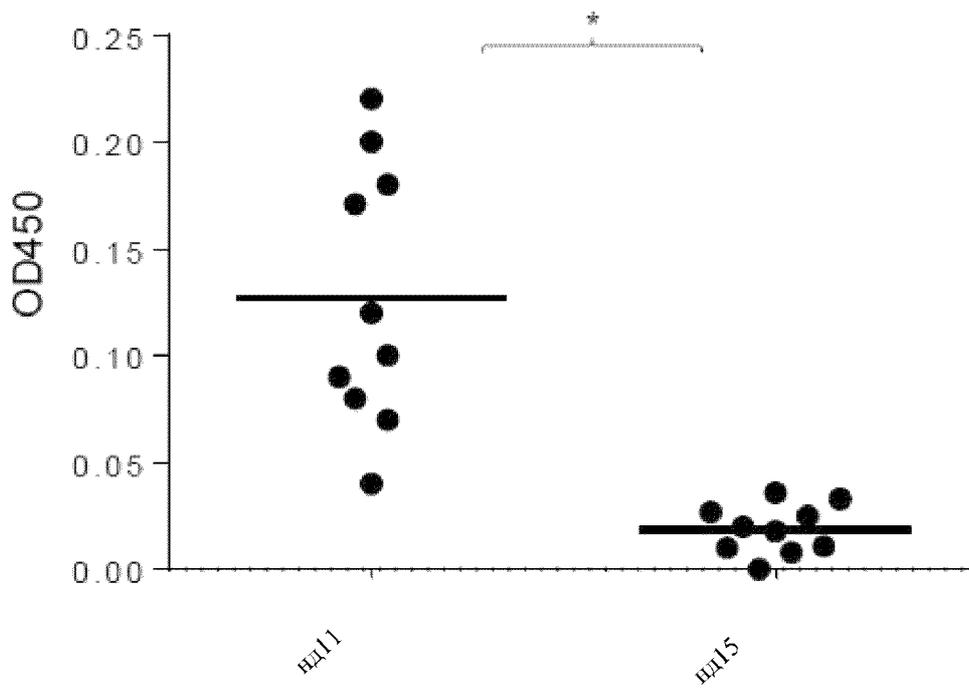
Фиг. 86В



Фиг. 86С



Фиг. 86D



175/350

Фиг. 87А

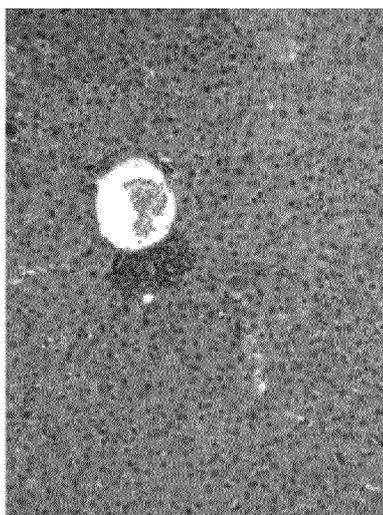


Фиг. 87В

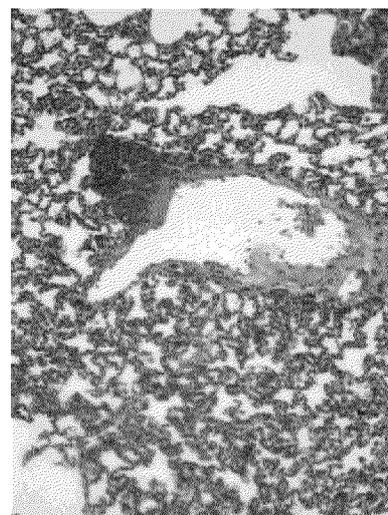
почка



печень

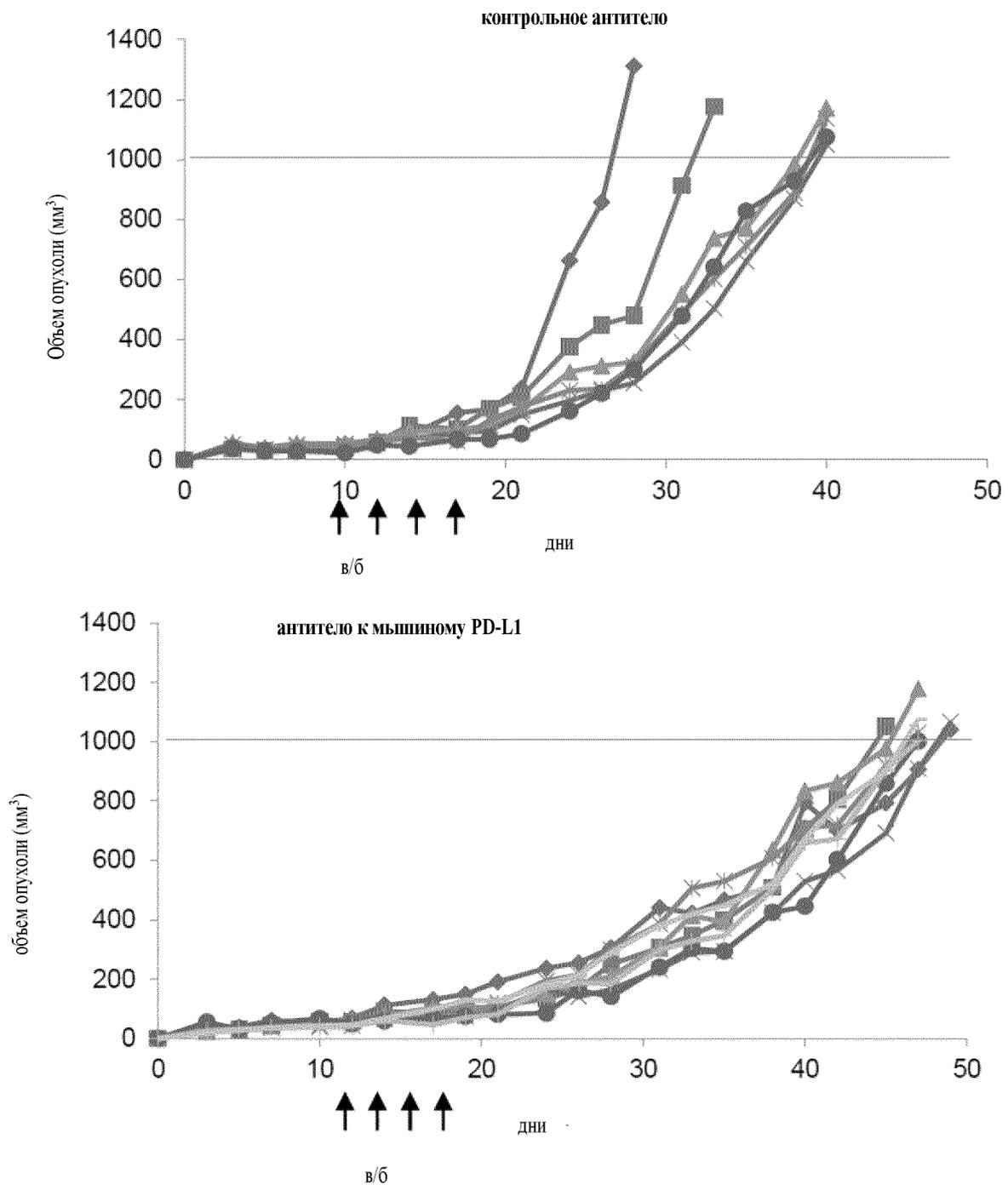


легкое



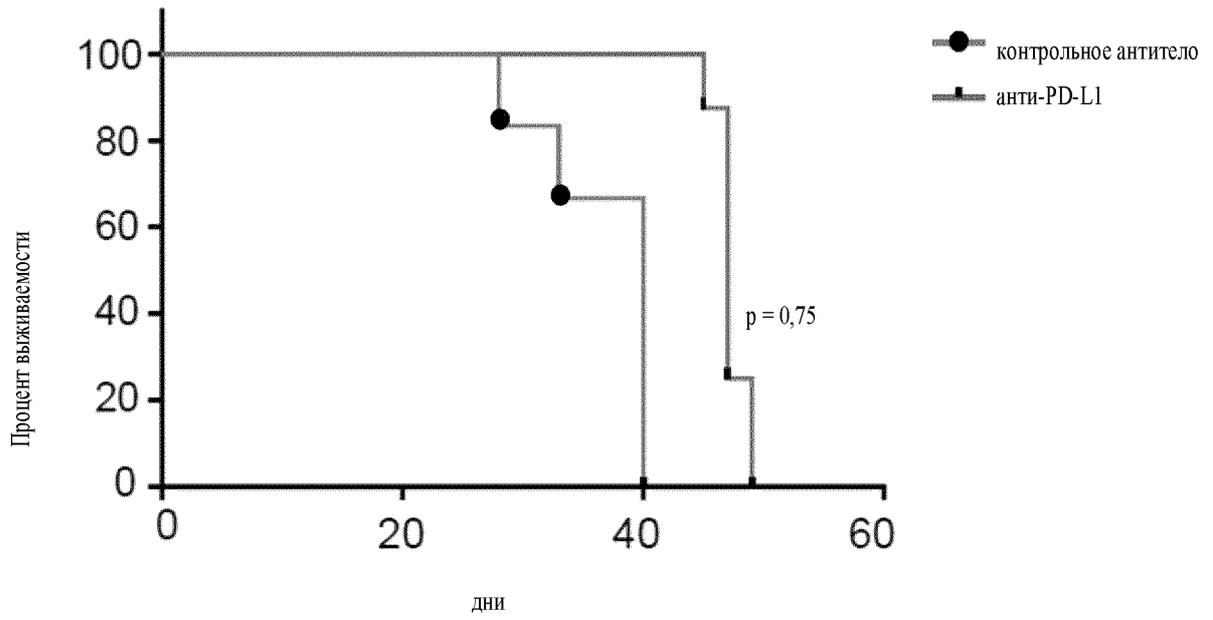
176/350

Фиг. 88А

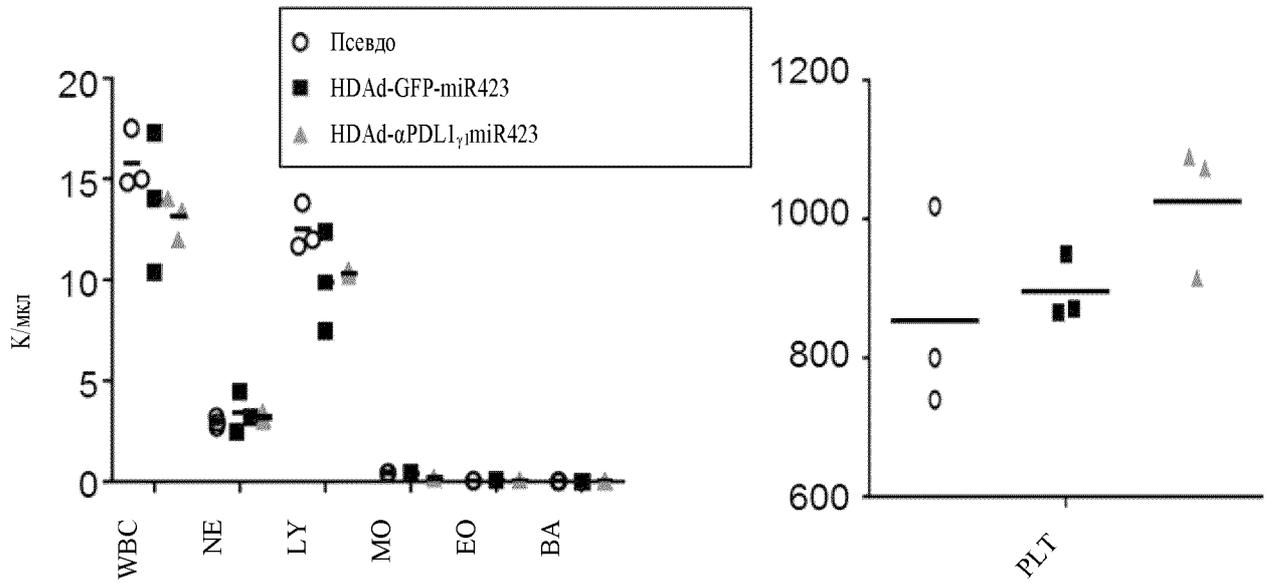


177/350

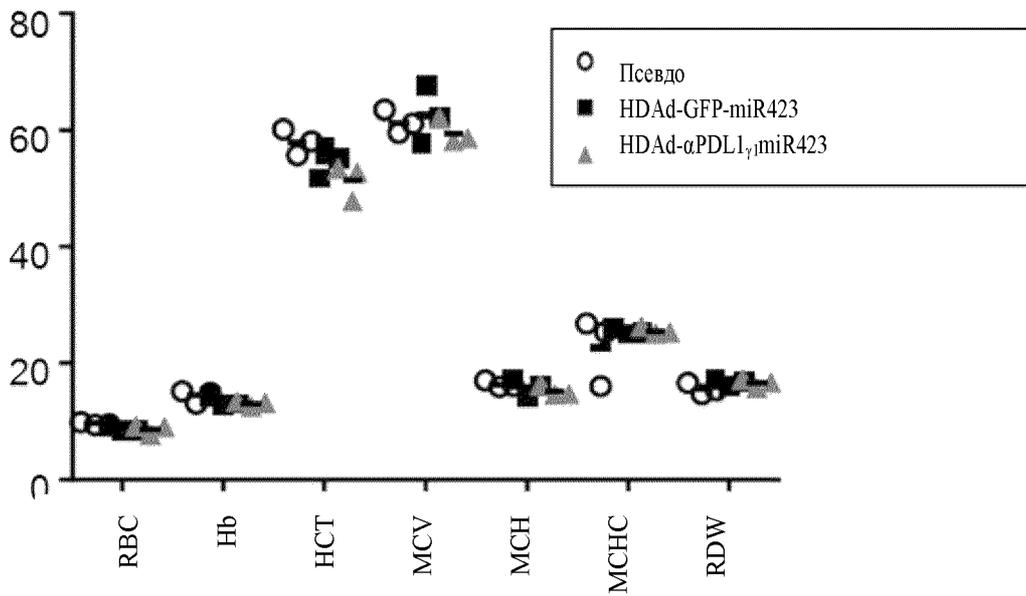
Фиг. 88В



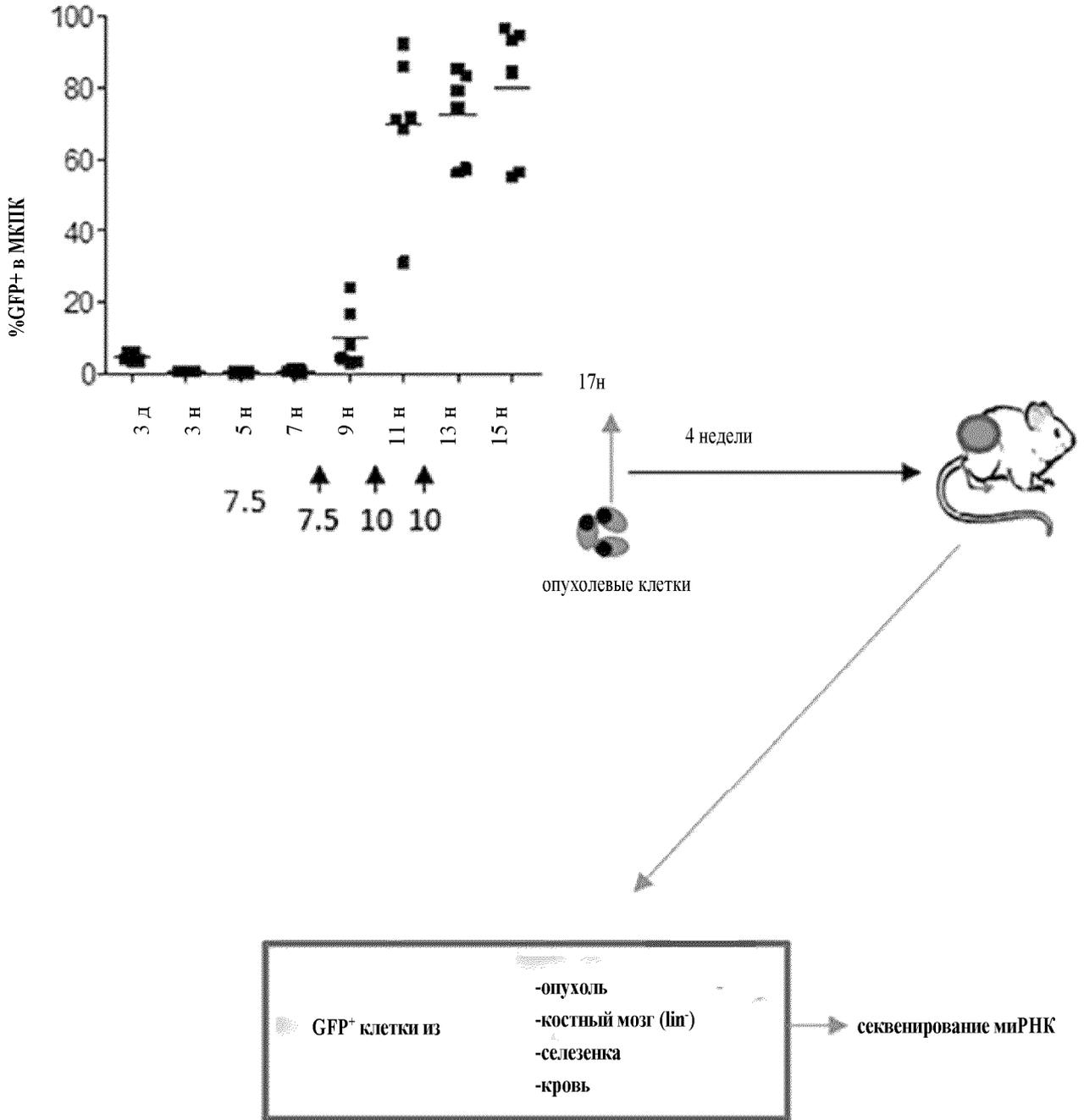
Фиг. 88С



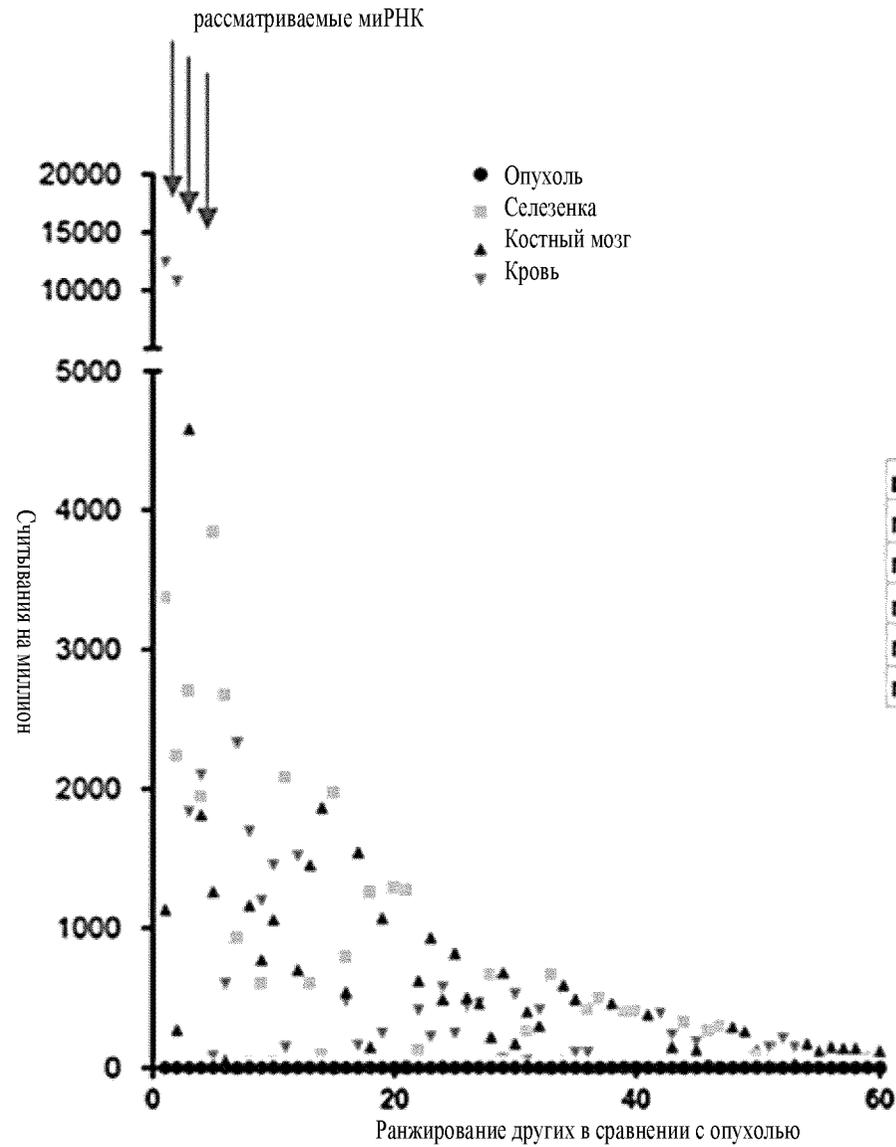
Фиг. 88D



Фиг. 88E

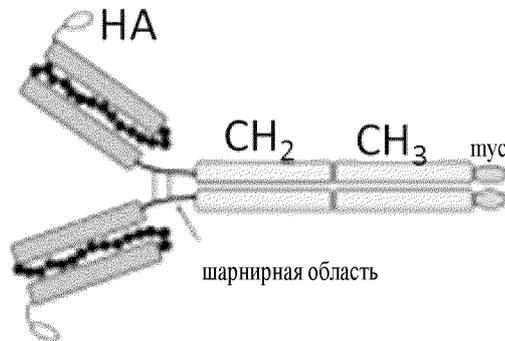
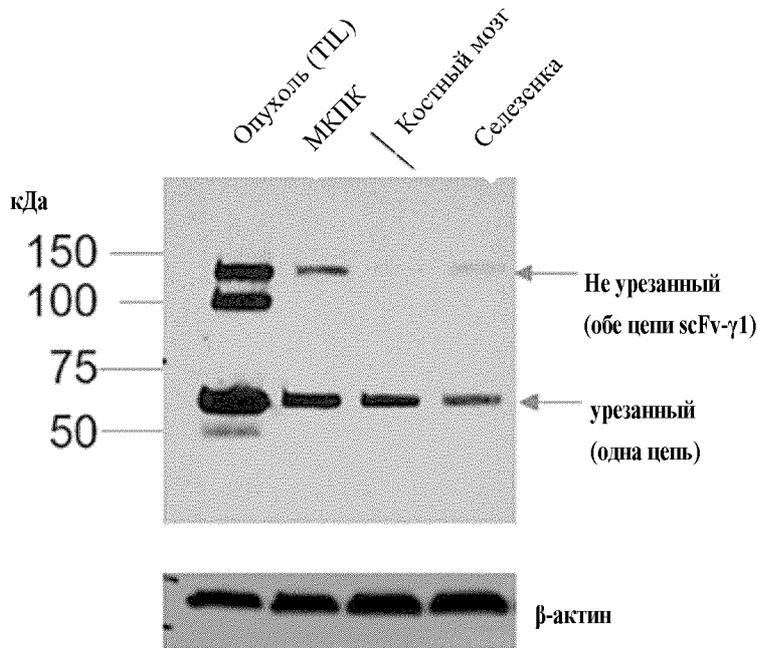


Фиг. 88Е, продолж.

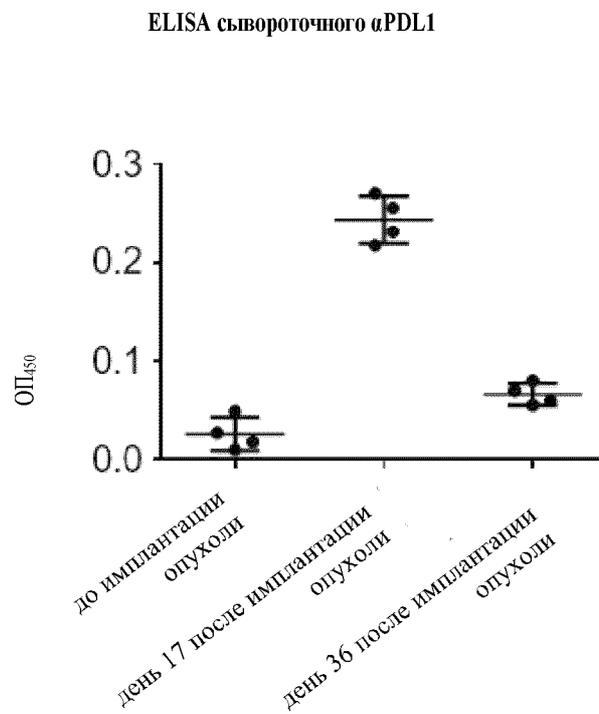
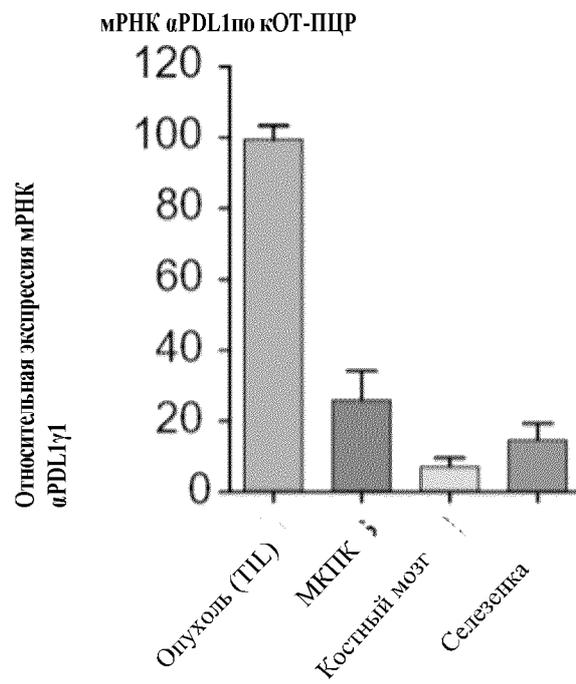


miRNA	Опухоль	Селезенка	КМ	Кровь
mir-423	100	7563.82	1263.47	13350.56
mir-24-2	100	5019.65	302.65	11586.12
mir-181c	100	6065.20	5106.75	1970.61
mir-125a	100	8609.37	1408.71	83.07
mir-15a	100	4357.46	2023.19	2257.84

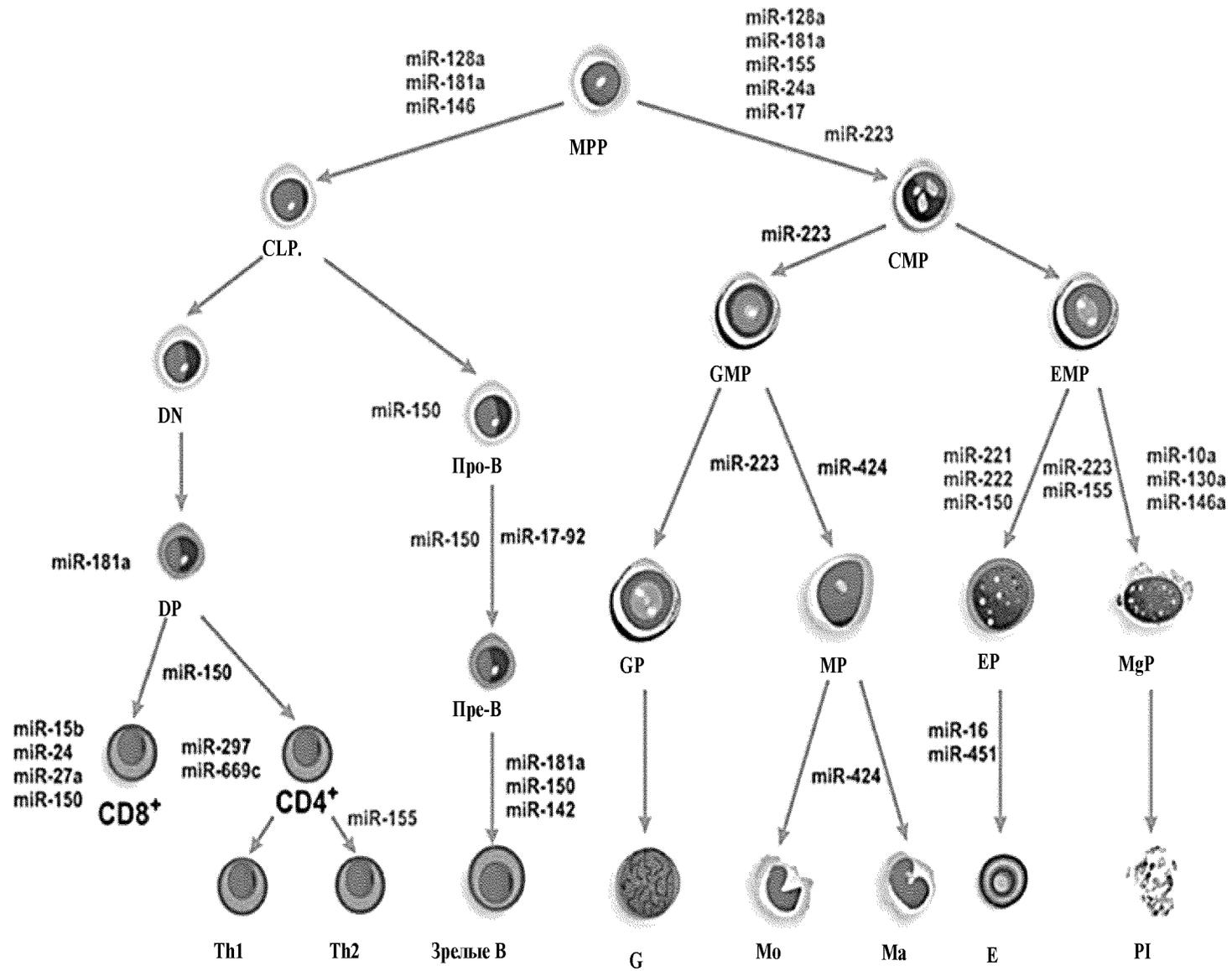
Вестерн-блоттинг α PDL1



Фиг. 88F, продолж.



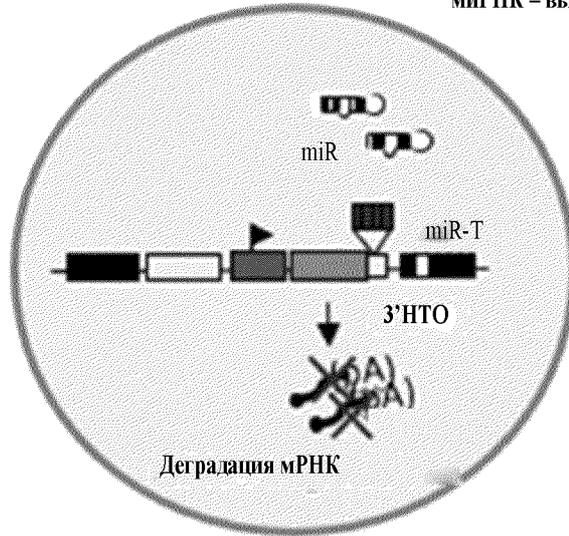
Фиг. 88G



Фиг. 88G, продолж.

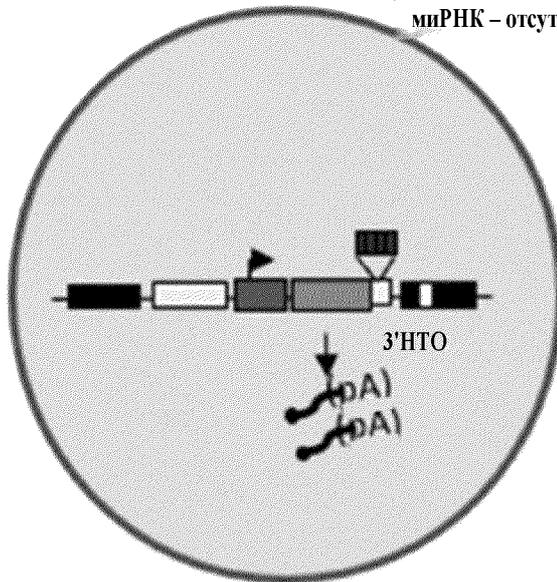
костный мозг и клетки крови

миРНК – высок.

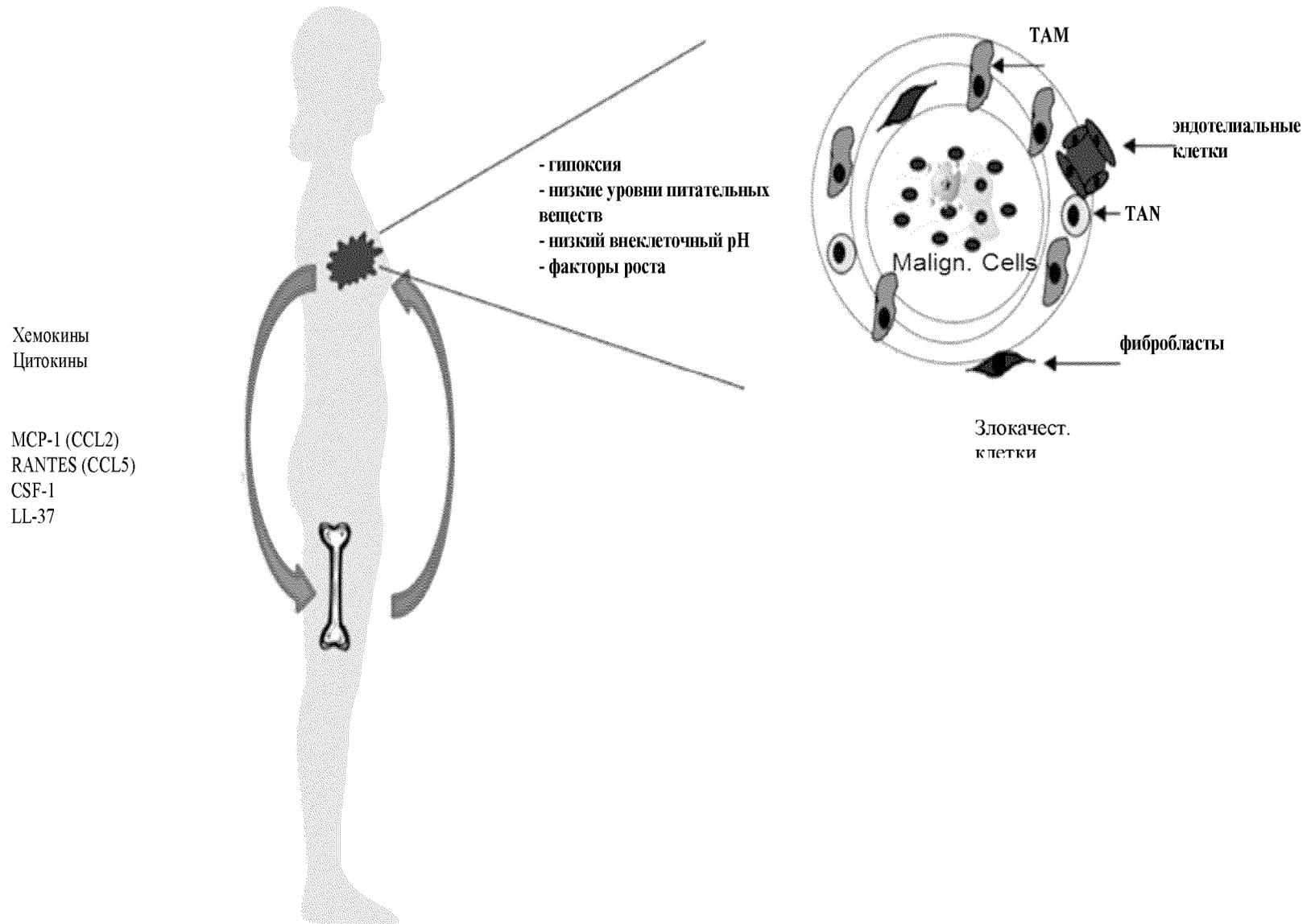


опухоль-инфильтрирующие TAN/TAM

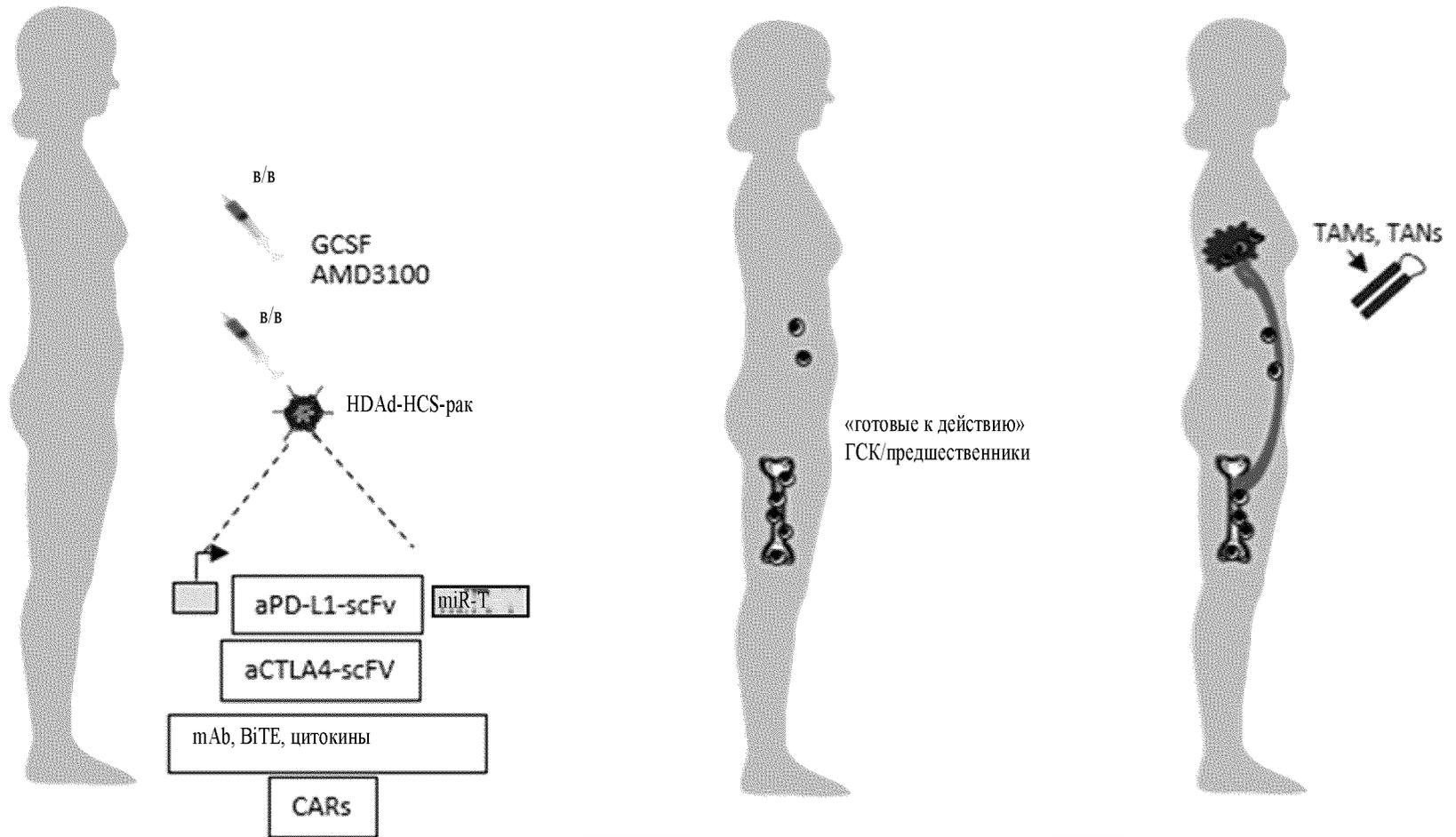
миРНК – отсутствует



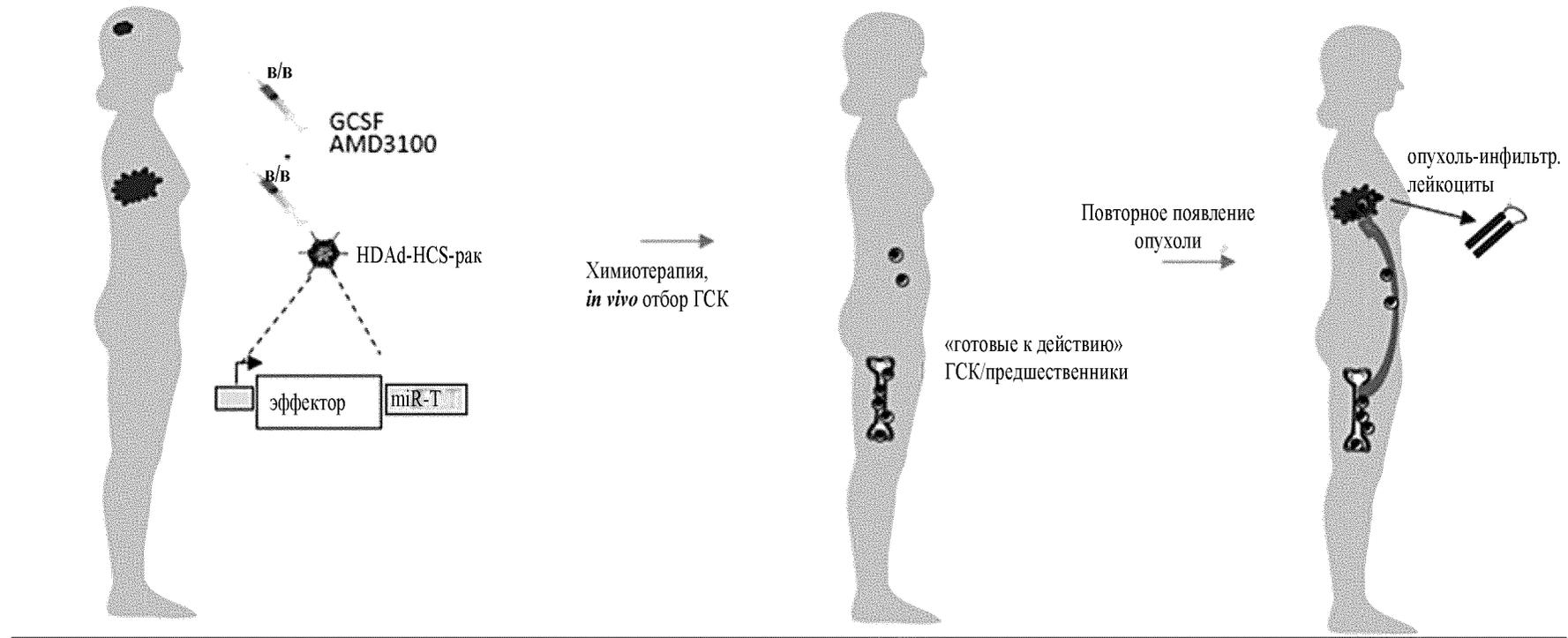
Фиг. 88Н



Фиг. 88Н, продолж.



Фиг. 88Н, продолж.

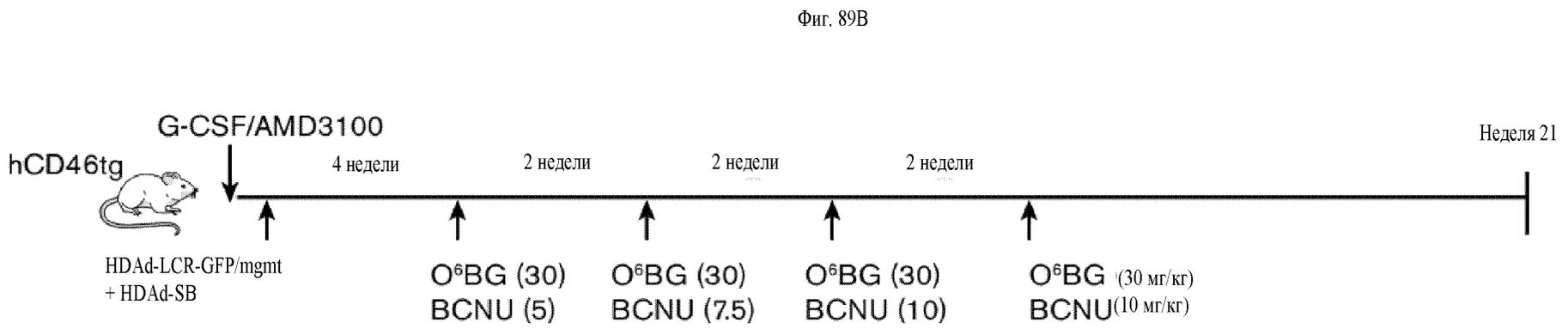
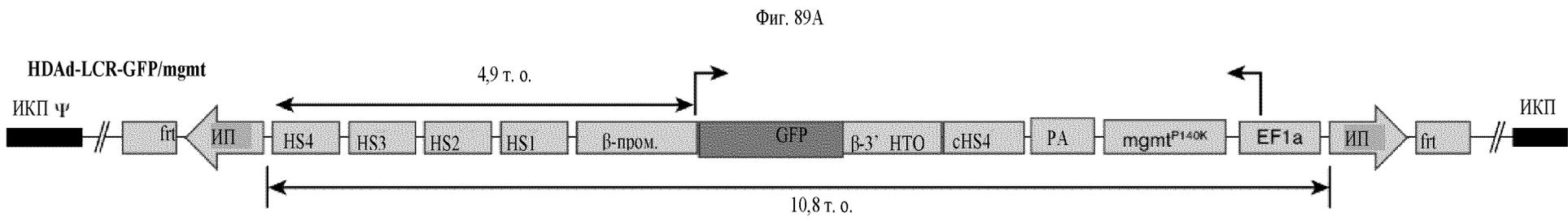


187/350

Биопсия:

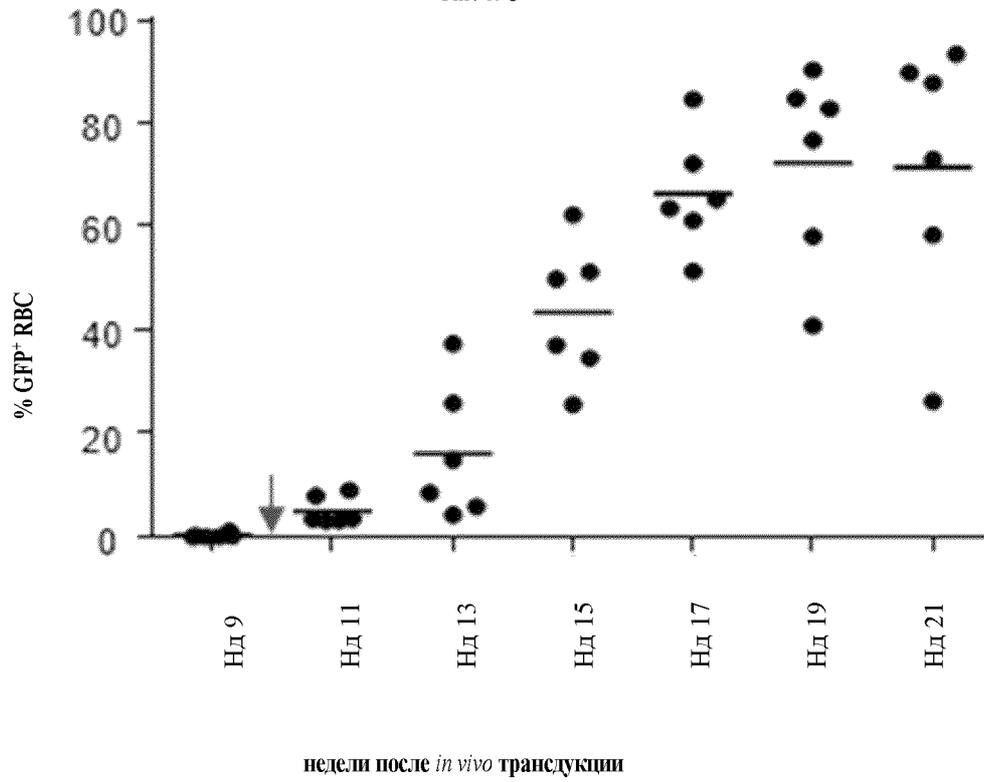
- >иммунофенотип известен → выбор оптимального иммуно-эффекторного гена
- >неоантигены известны → персонализированные CAR/ViTE

-трудно лечить полностью развитые опухоли

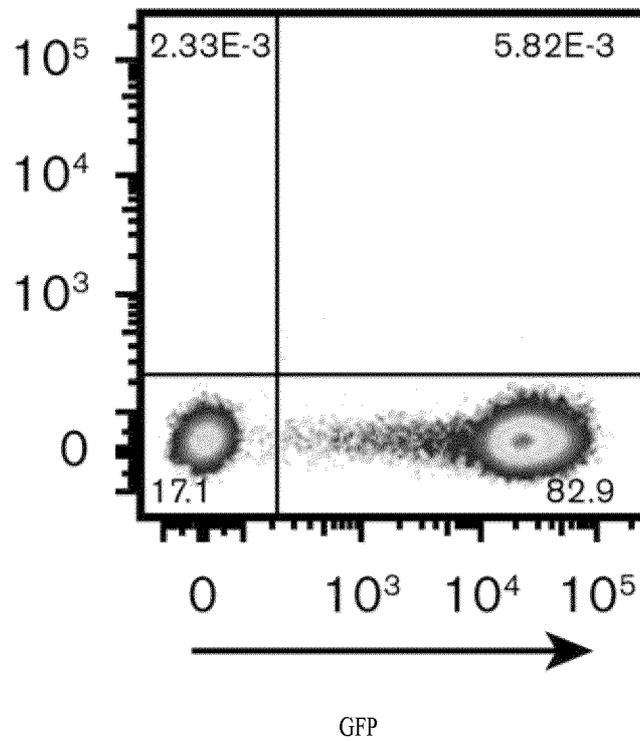


188/350

Фиг. 89С

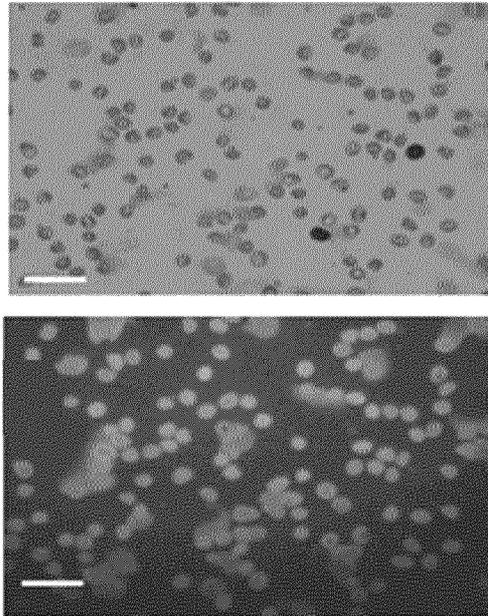


Фиг. 89D

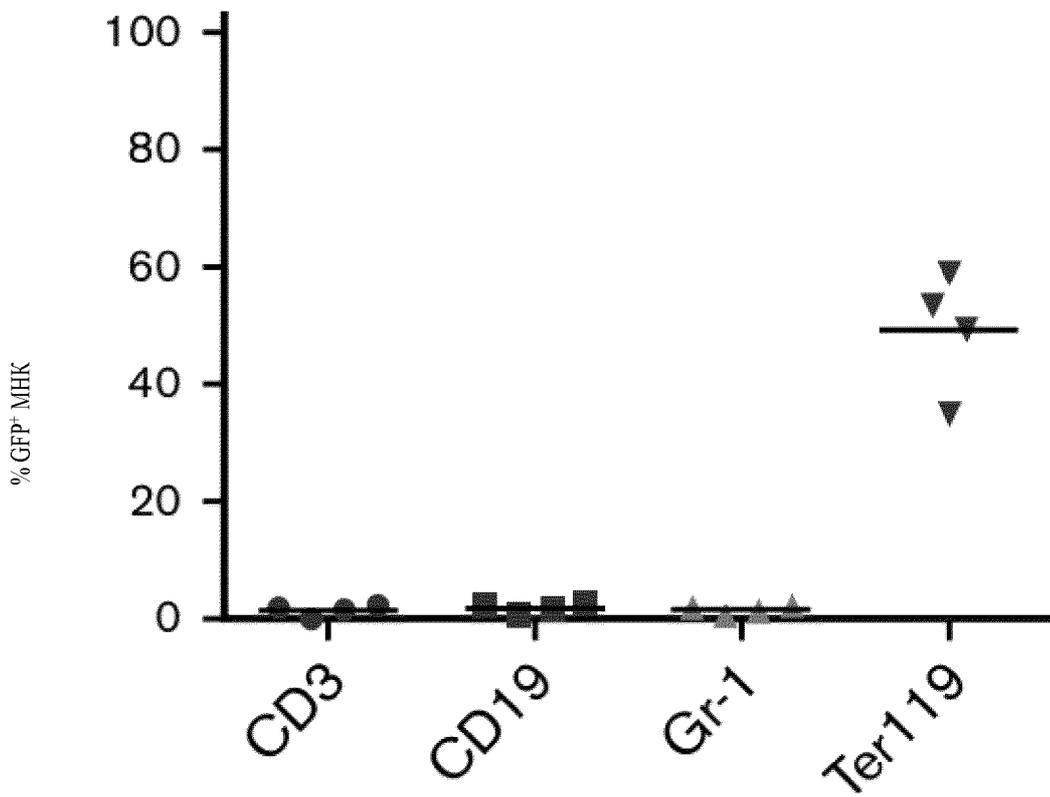


190/350

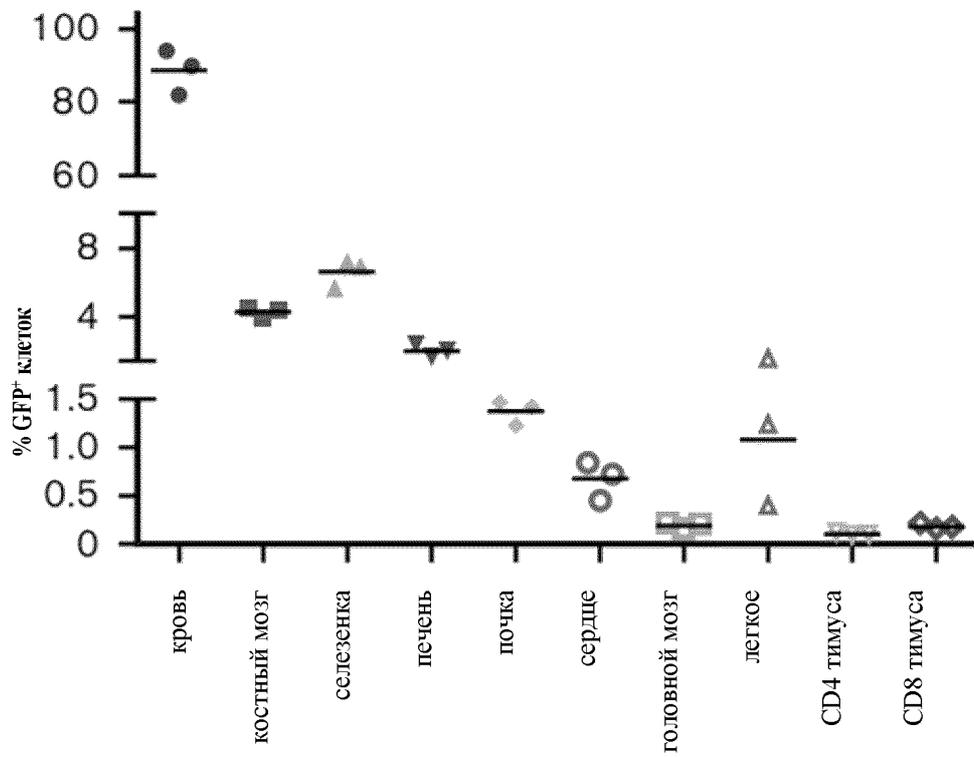
Фиг. 89E



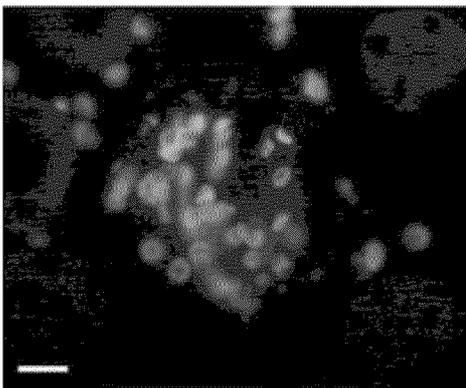
Фиг. 89F



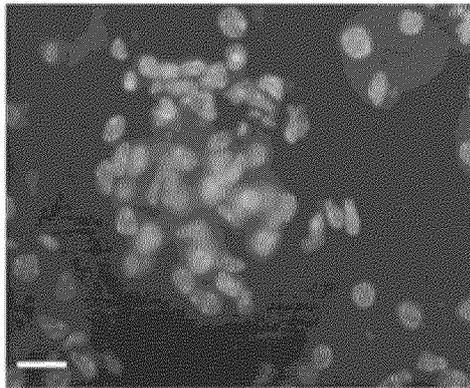
Фиг. 89G



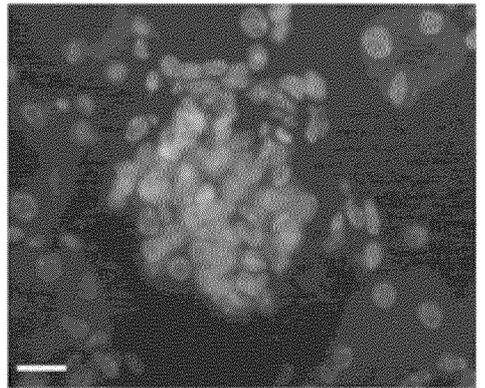
Фиг. 89H



GFP



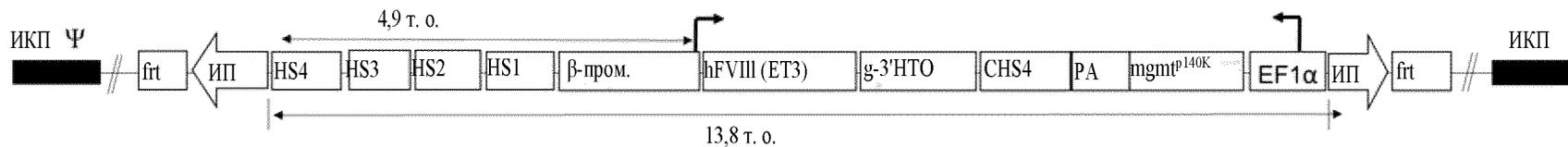
ДАФИ (ядра)



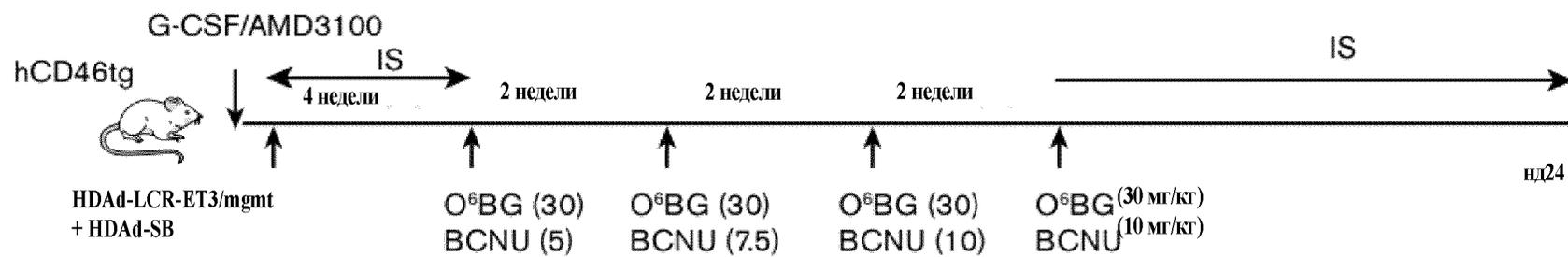
ДАФИ (наложение)

Фиг. 90А

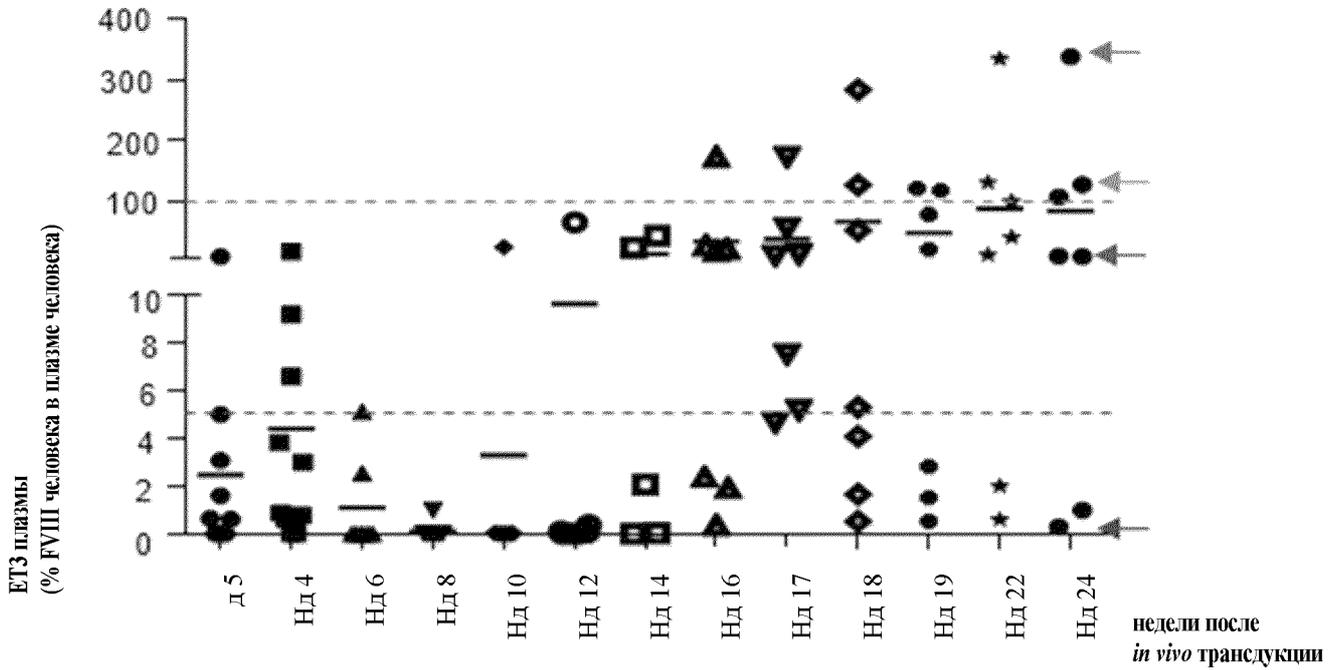
HDAAd-LCR-ET3/mgmt



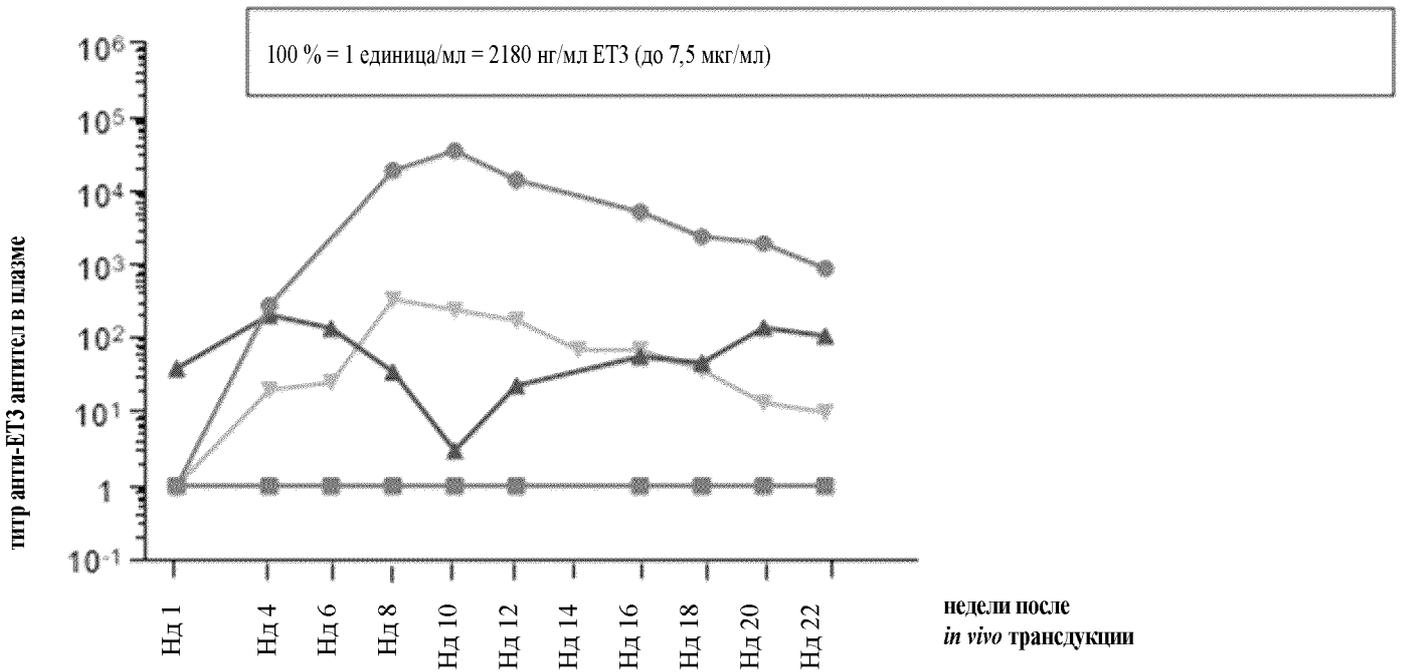
Фиг. 90В



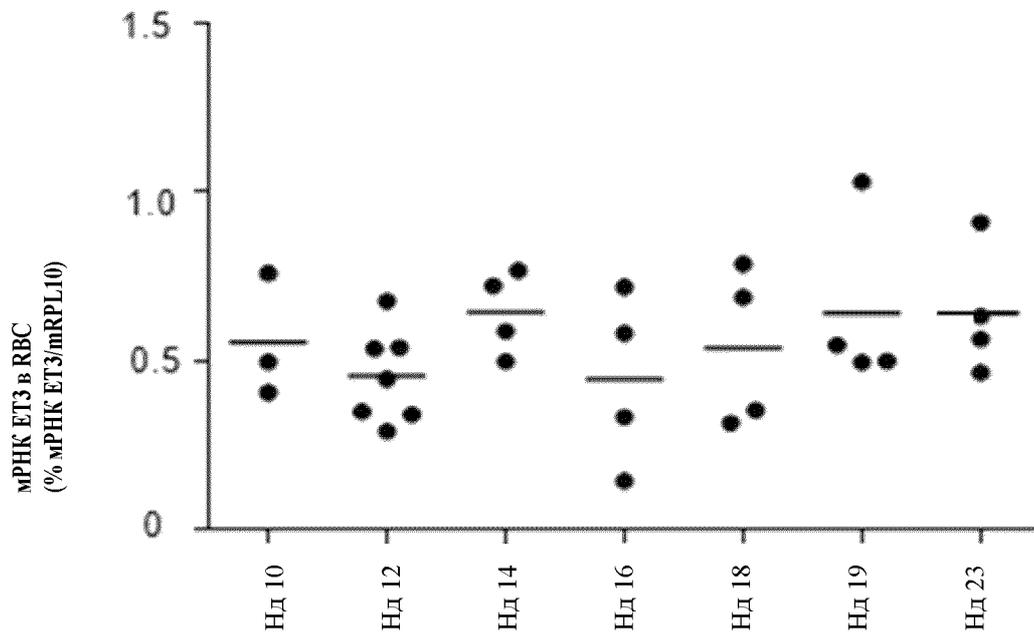
Фиг. 90С



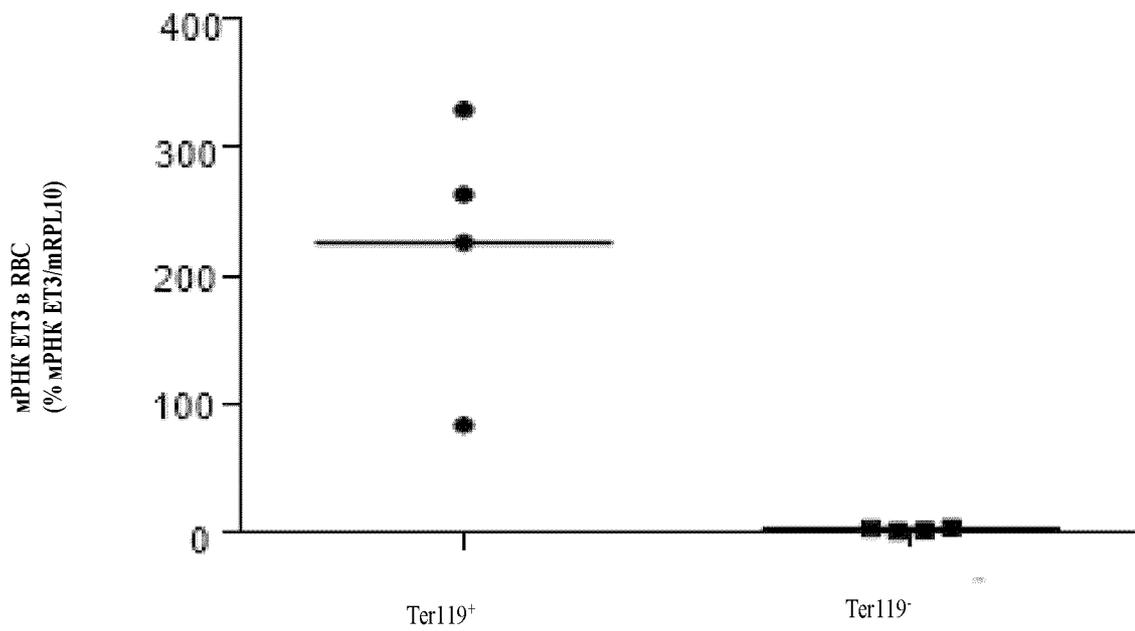
Фиг. 90D



Фиг. 90E

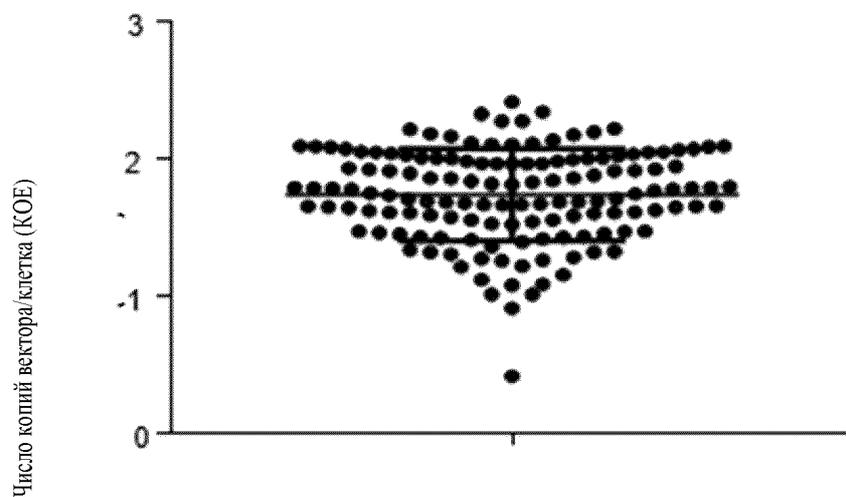


Фиг. 90F

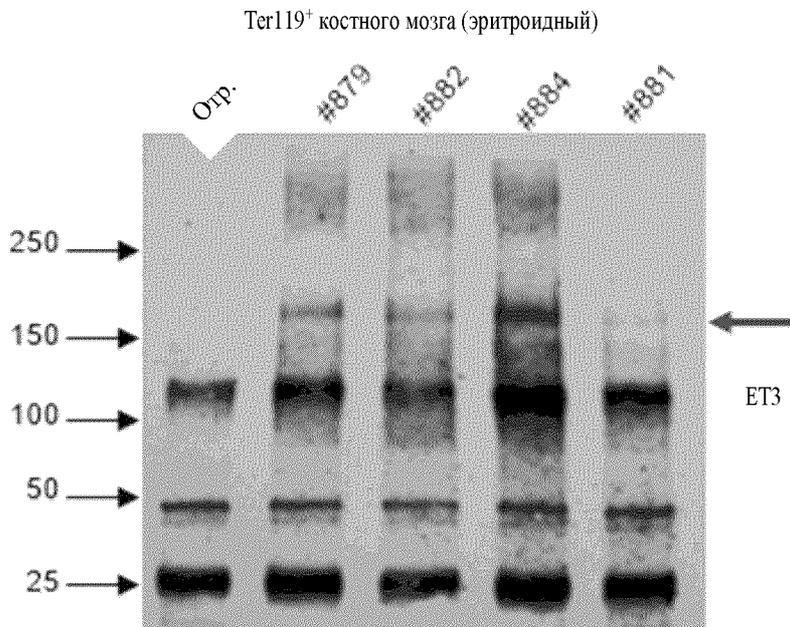
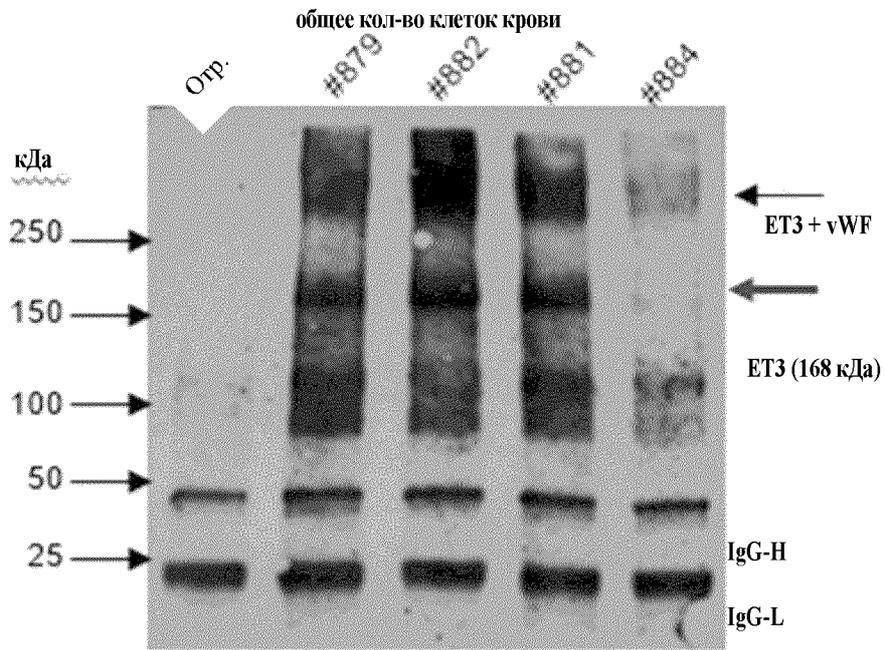


195/350

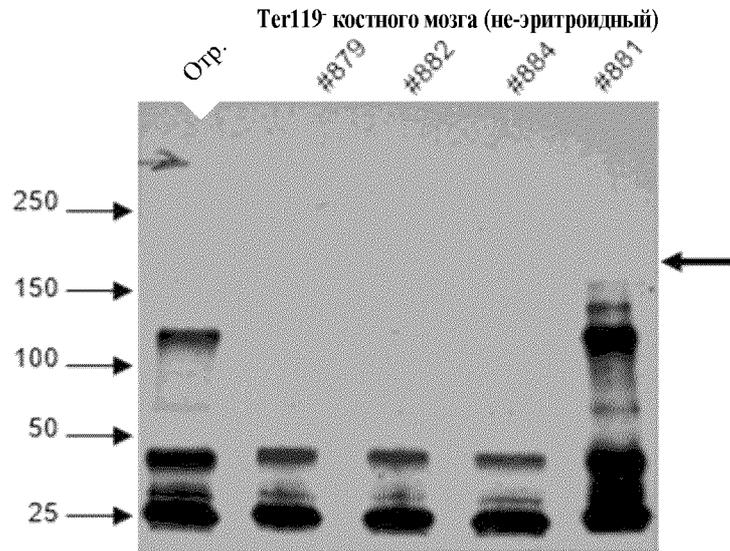
Фиг. 90G



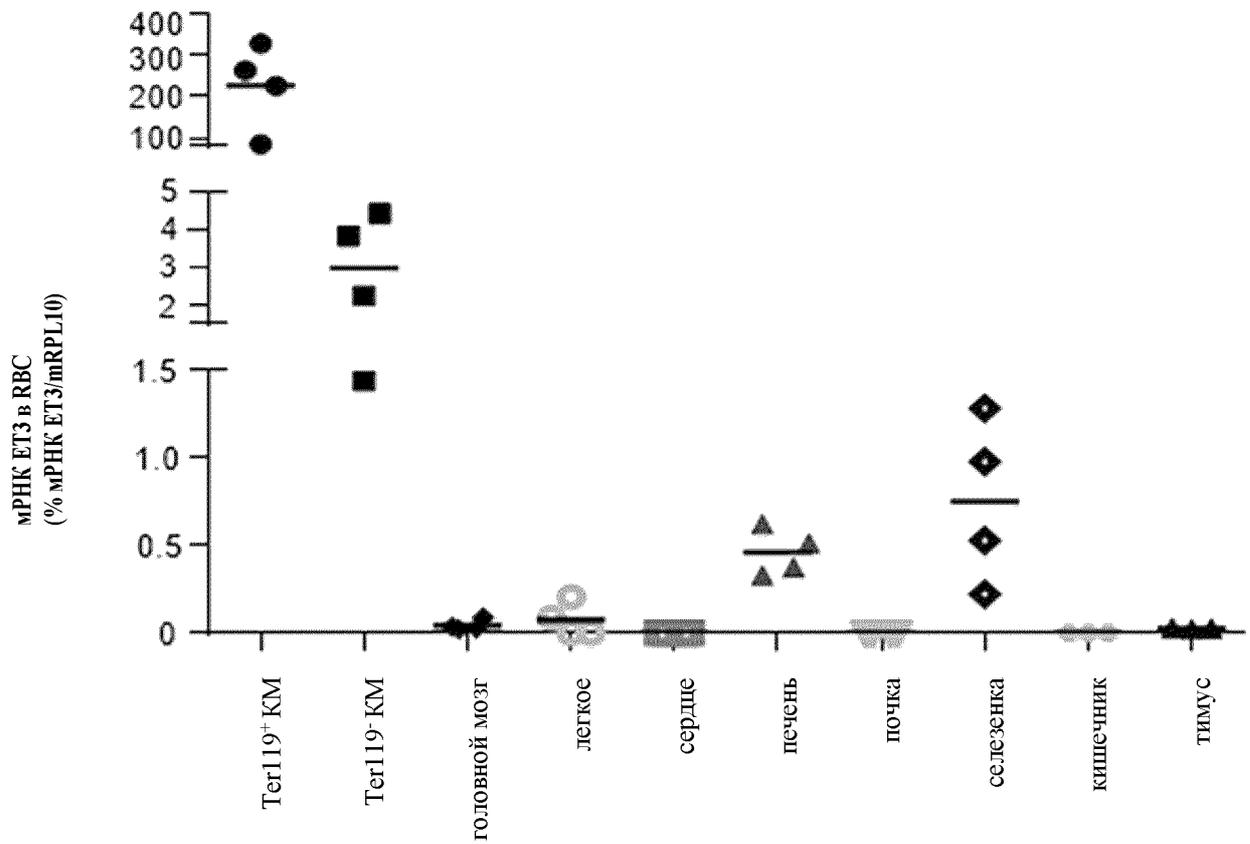
Фиг. 90Н



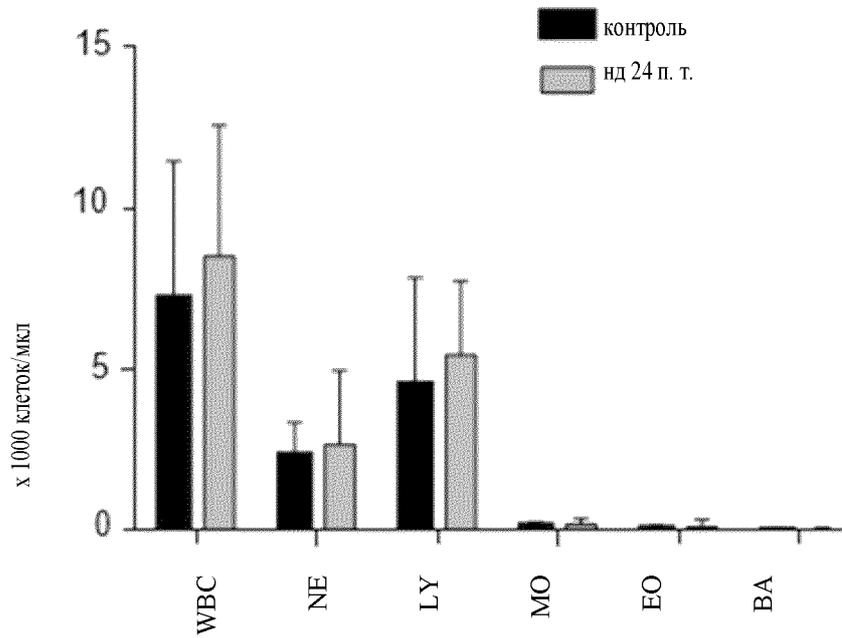
Фиг. 90H, продолж.



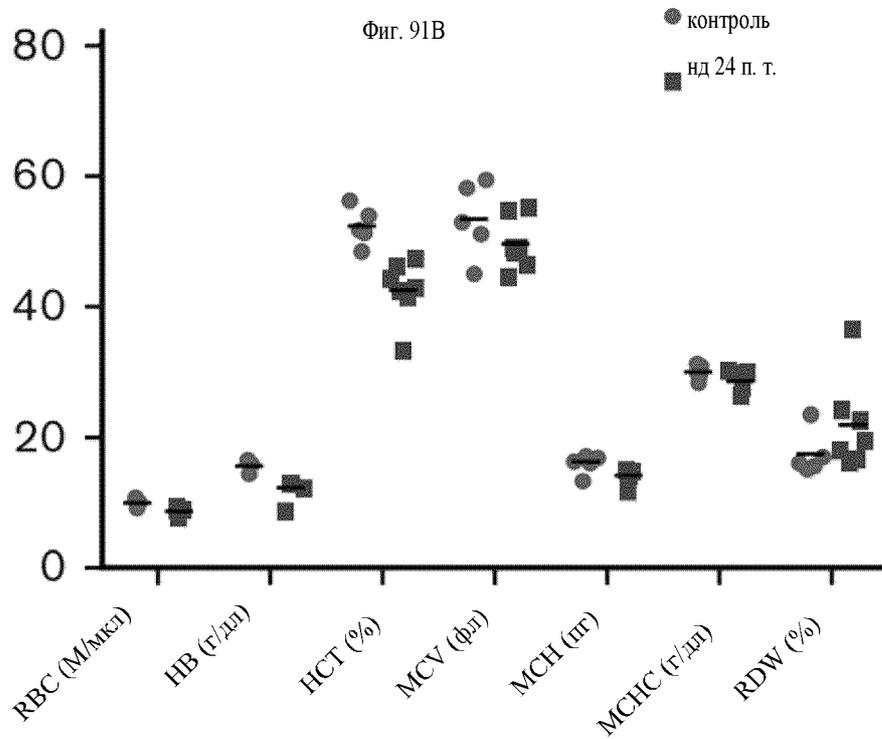
Фиг. 90I



Фиг. 91А

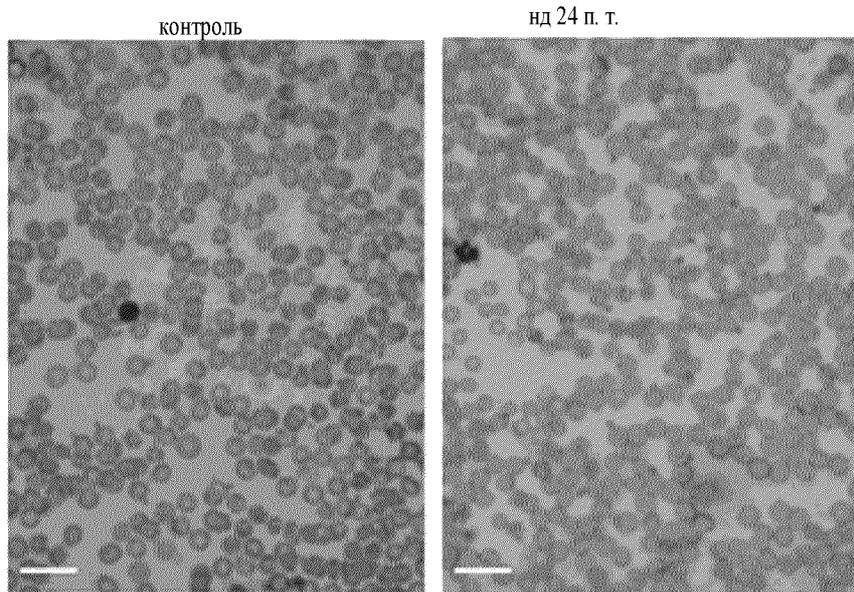


Фиг. 91В

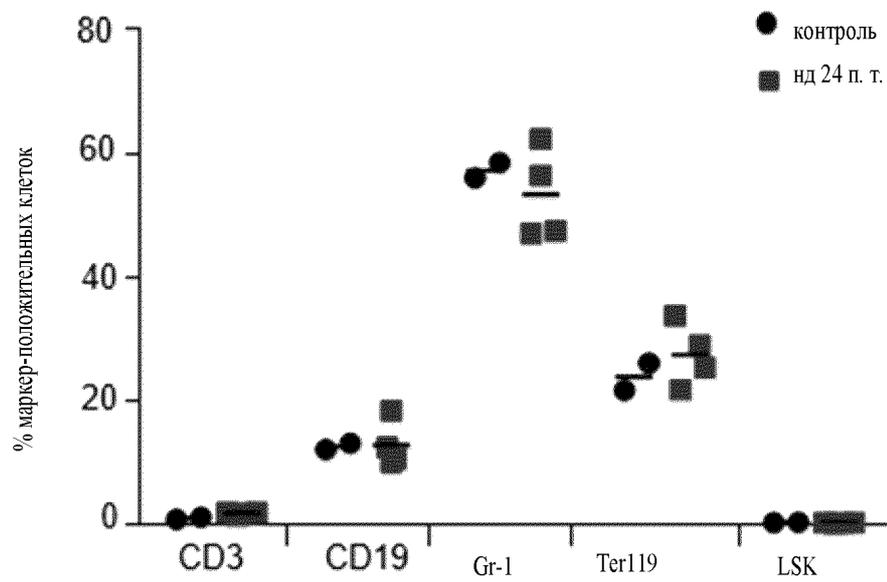


199/350

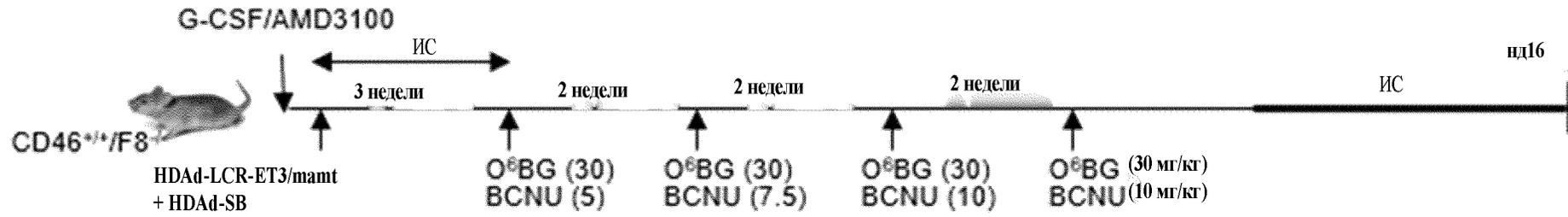
Фиг. 91С



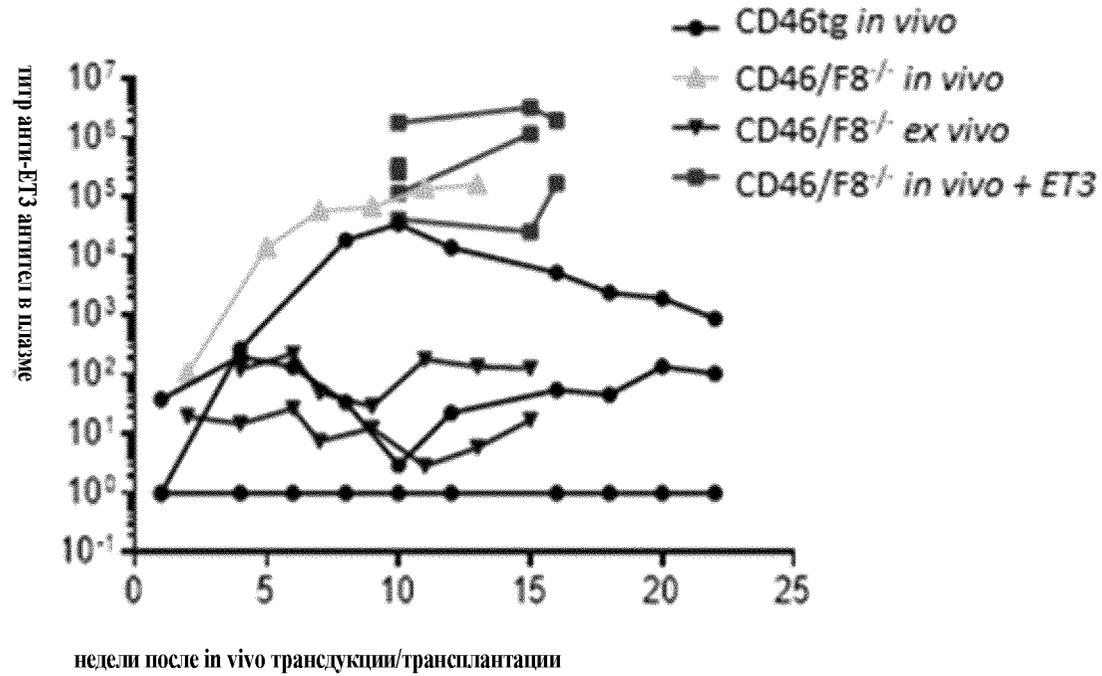
Фиг. 91D



Фиг. 92А

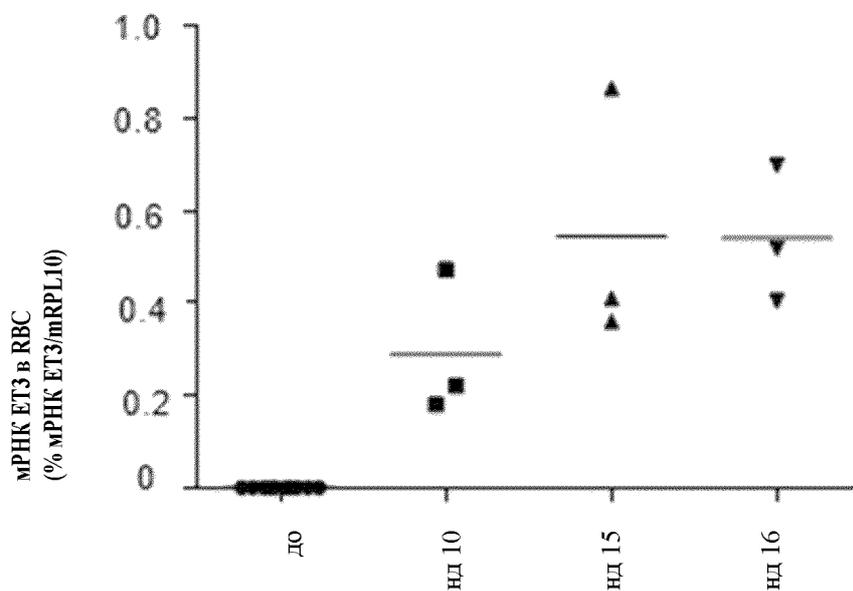


Фиг. 92В

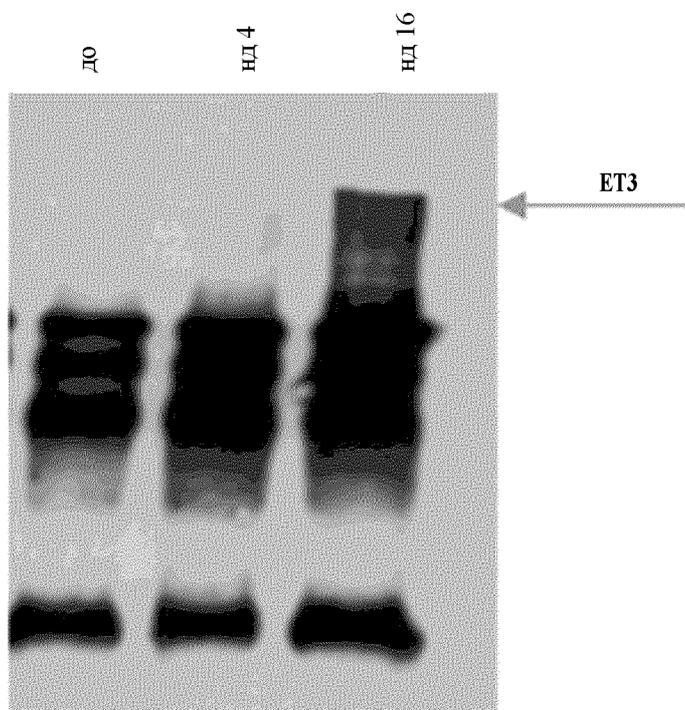


201/350

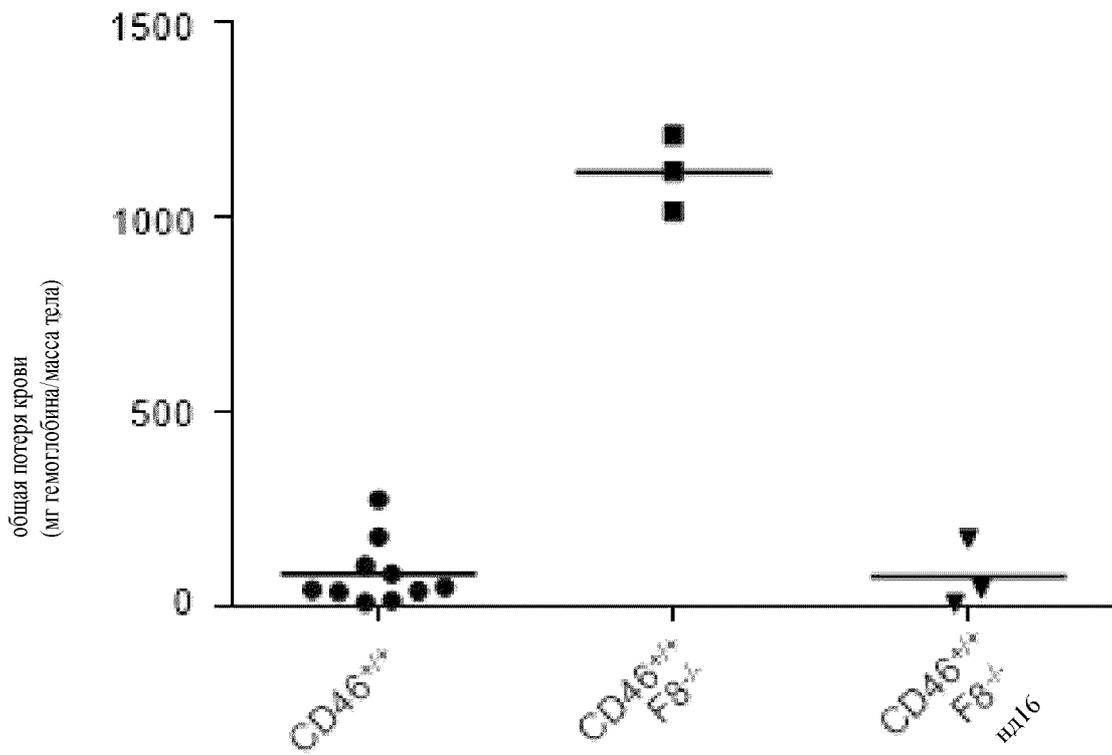
Фиг. 92С



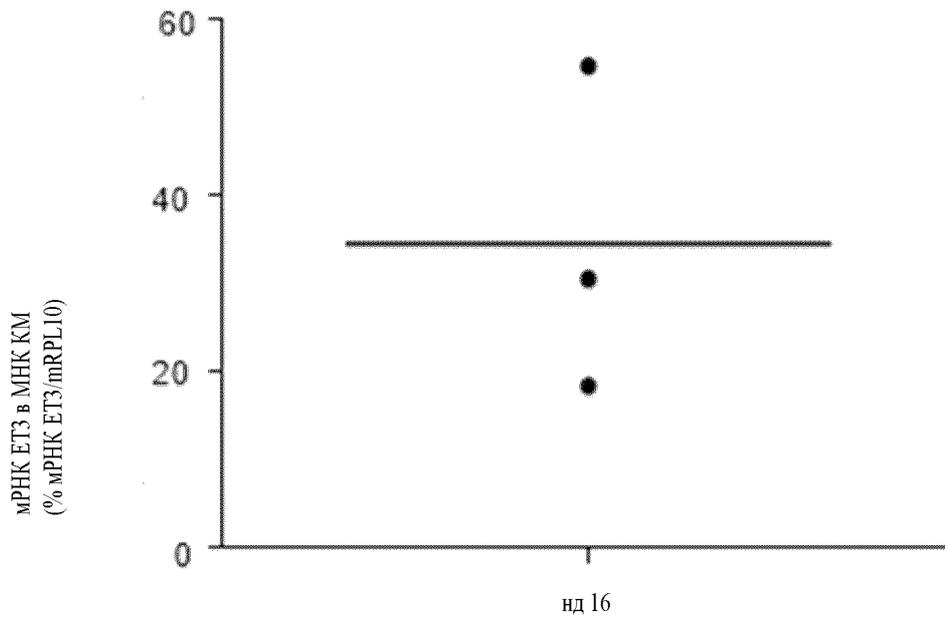
Фиг. 92D



Фиг. 92E

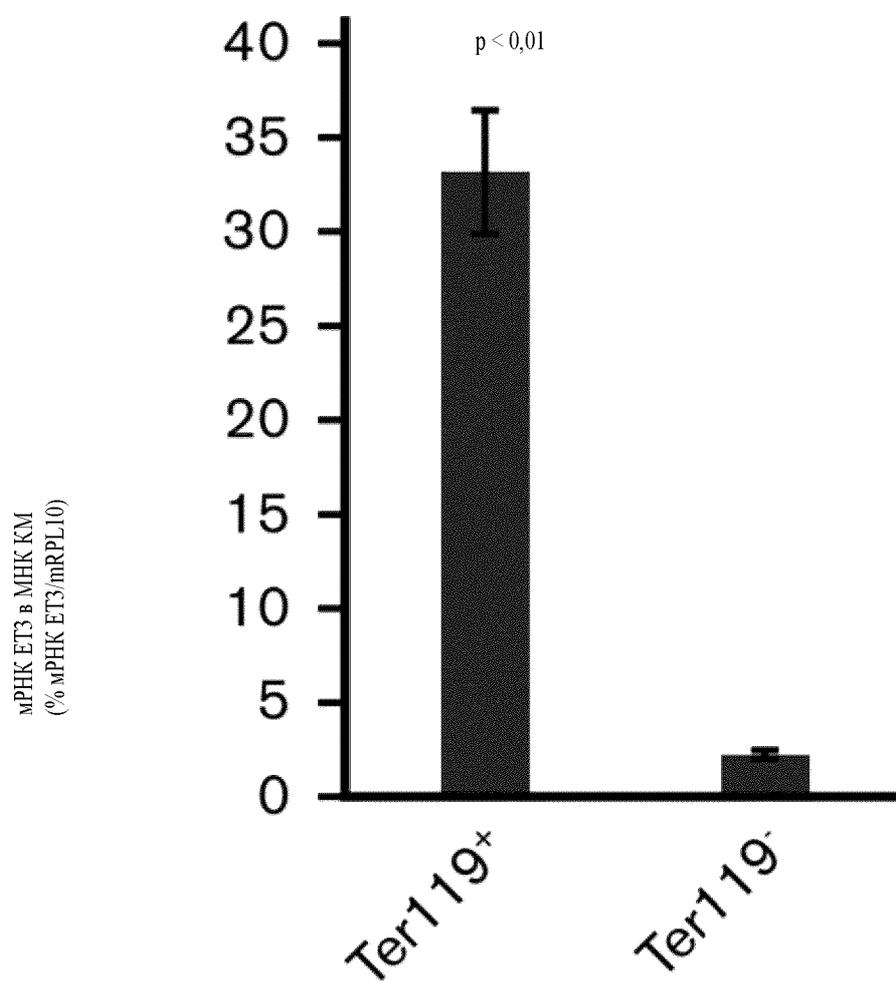


Фиг. 92F

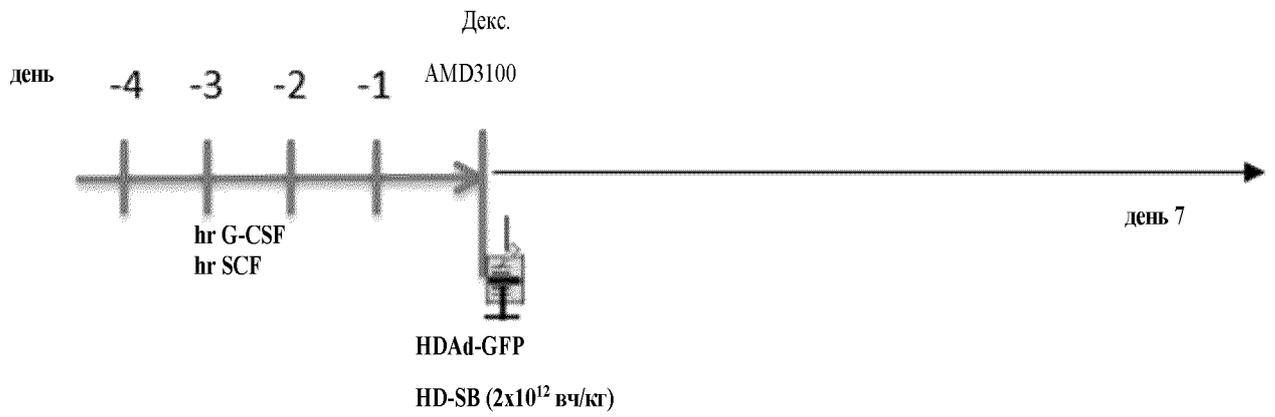


203/350

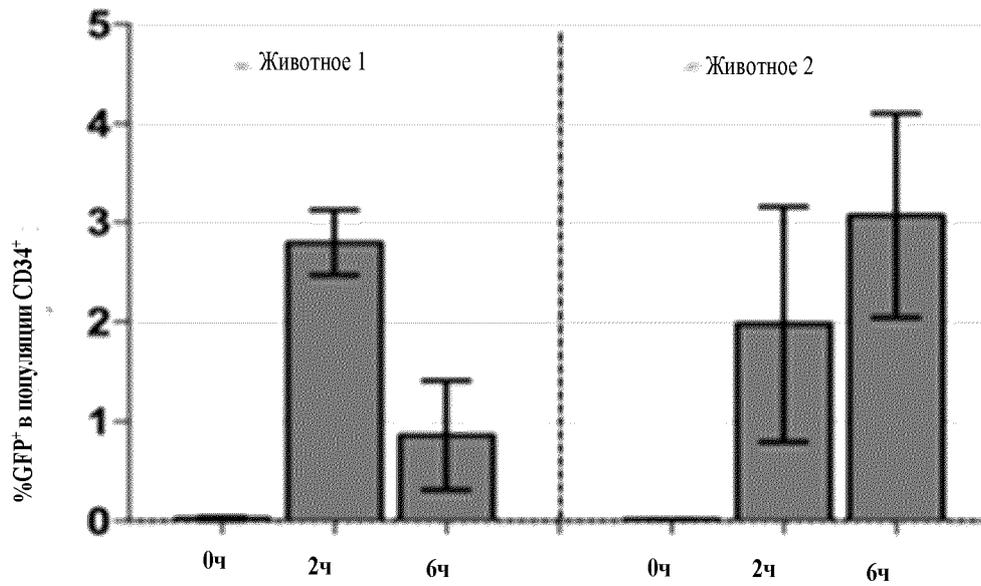
Фиг. 92G



Фиг. 93А

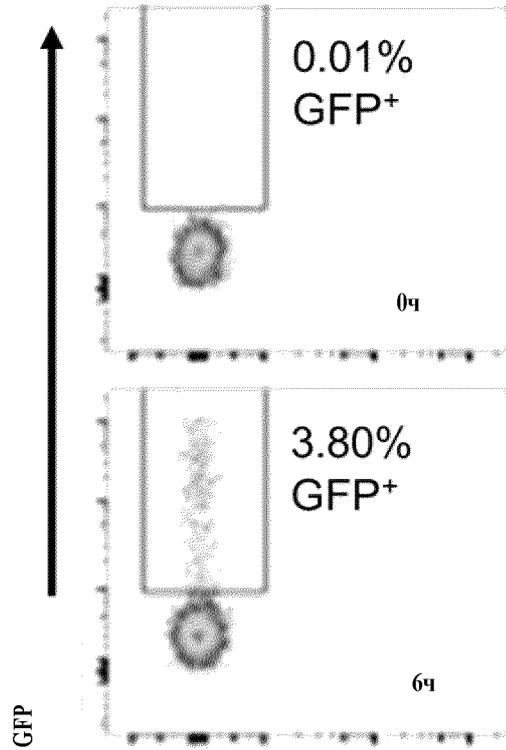


Фиг. 93В

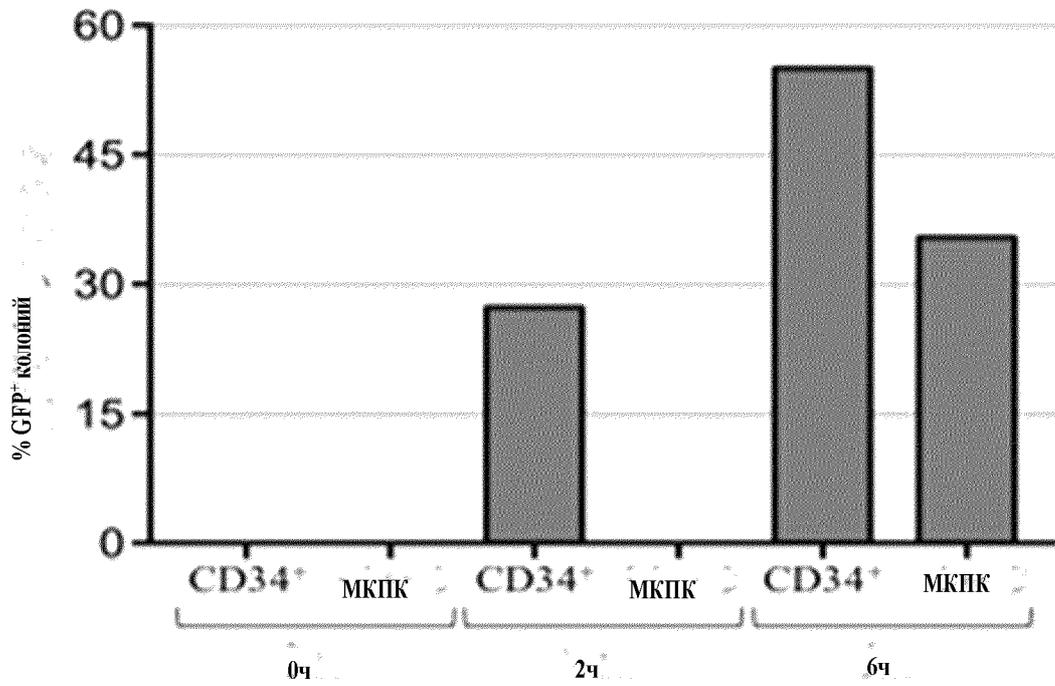


205/350

Фиг. 93С



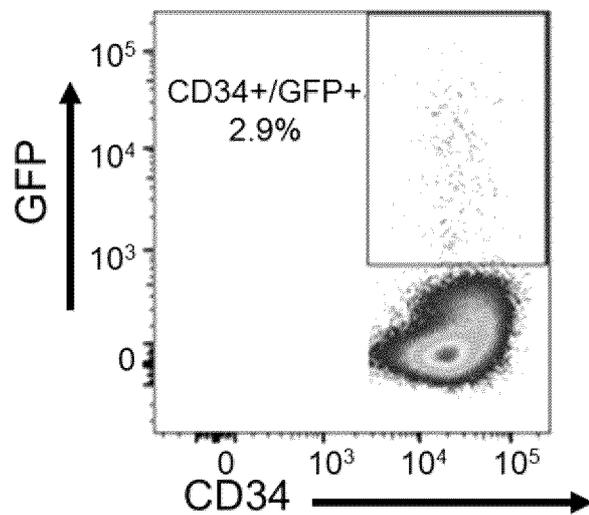
Фиг. 93D

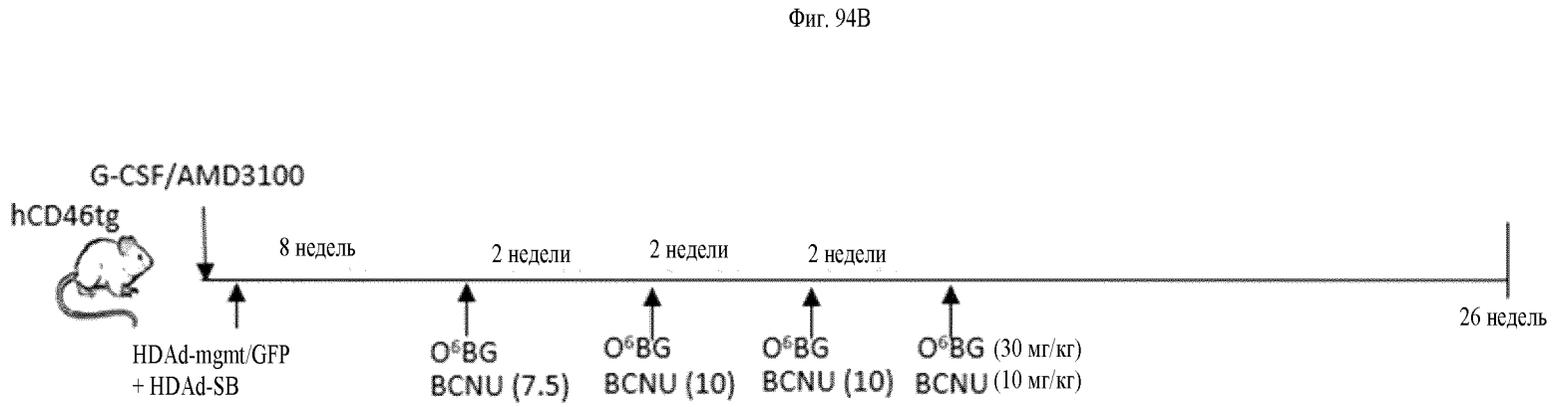
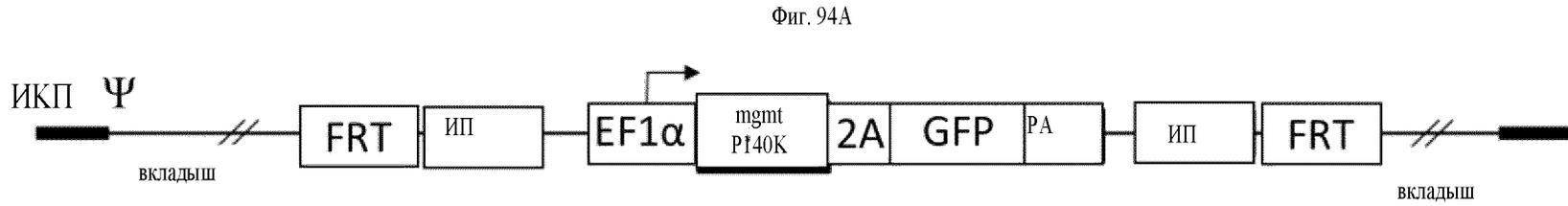


206/350

Фиг. 93E

Костный мозг (день 3)



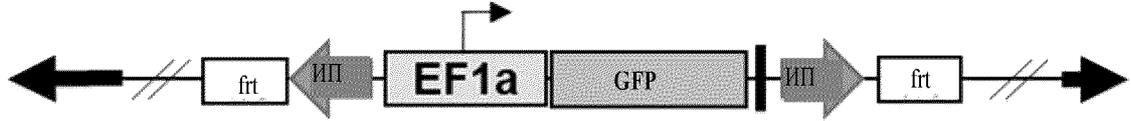


207/350

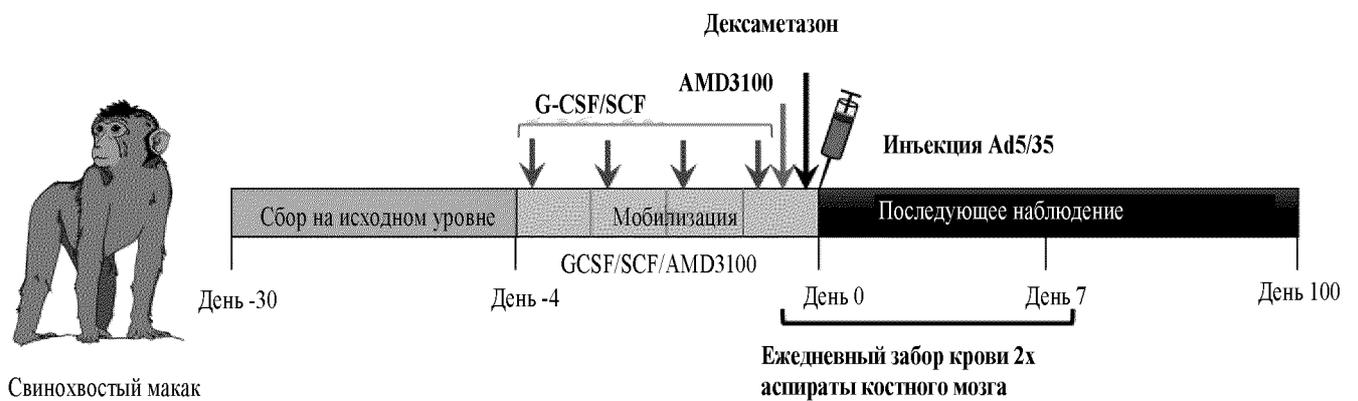
209/350

Фиг. 94Е

Ad5/35 - GFP



Фиг. 94F



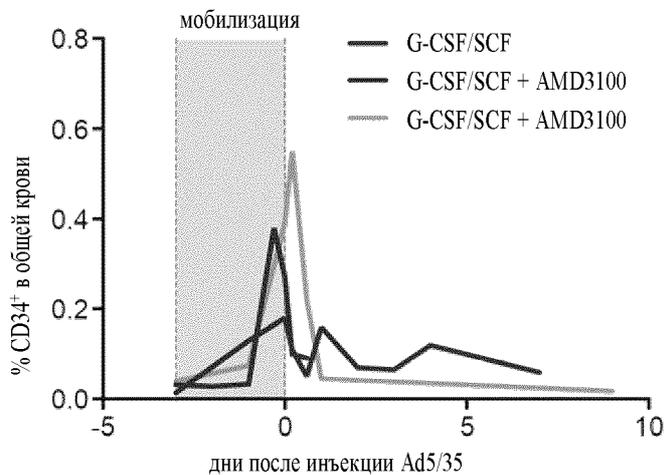
Фиг. 94G

ID животного	G-CSF	SCF	AMD3100	Доза
Z12406	50 мкг/кг	50 мкг/кг	-	2×10^{12} вч/кг
Z13126	50 мкг/кг	50 мкг/кг	4 мг/кг	4×10^{12} вч/кг
Z15263	50 мкг/кг	50 мкг/кг	4 мг/кг	3×10^{12} вч/кг

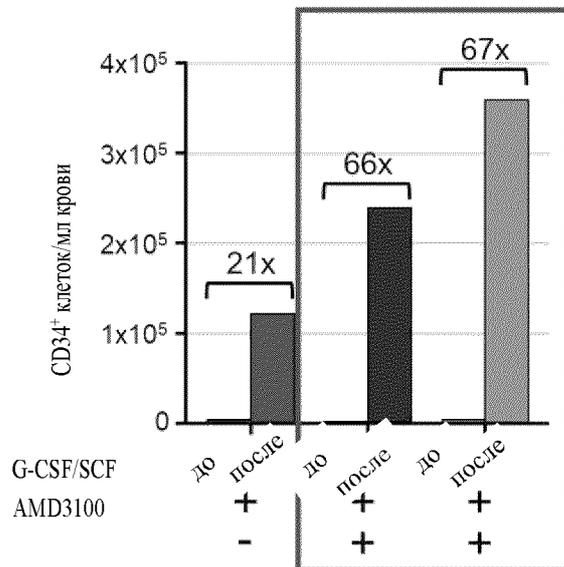
210/350

Фиг. 94H

Уровни стволовых клеток в периферической крови

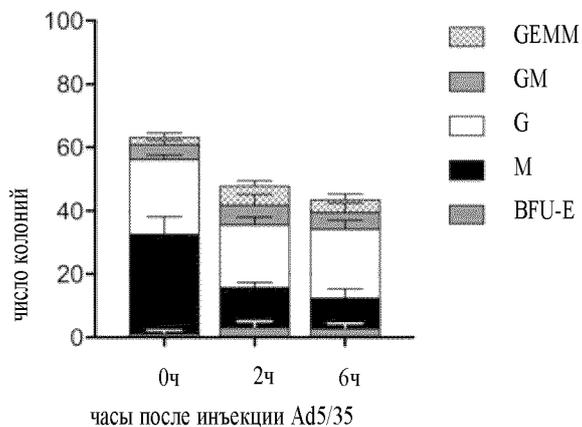
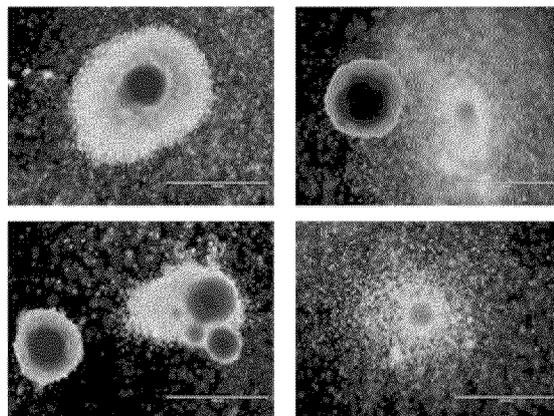
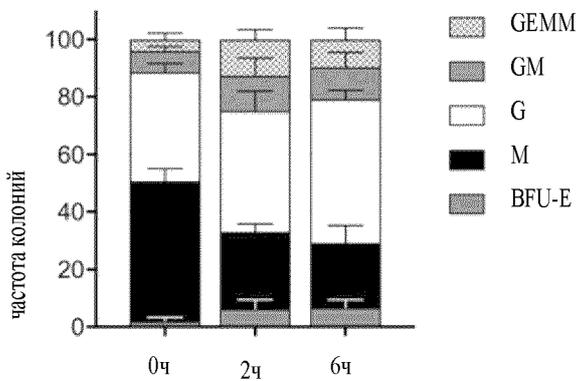


Число стволовых клеток

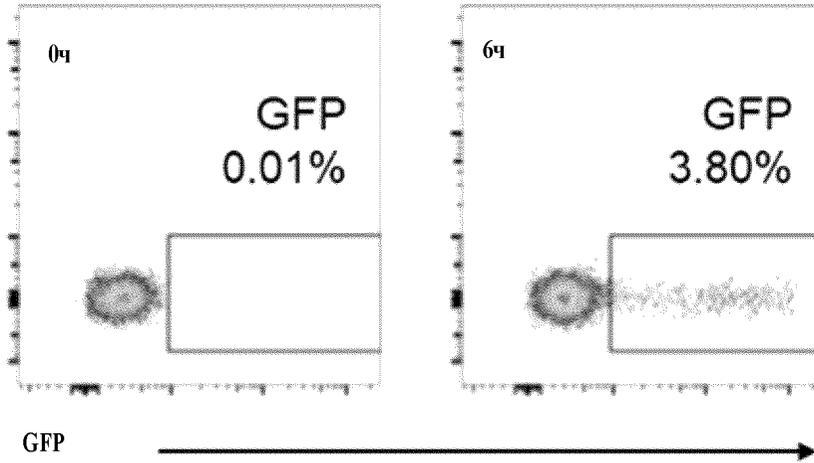


Фиг. 94I

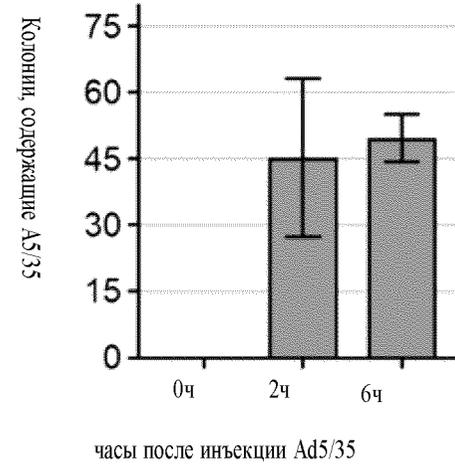
Потенциал к образованию колоний мобилизованных CD34



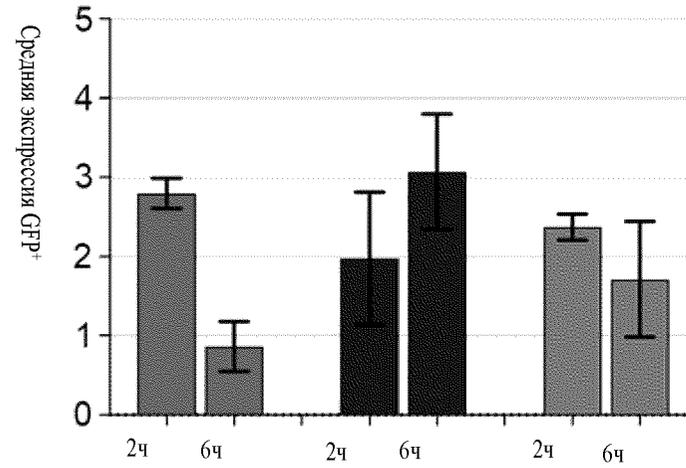
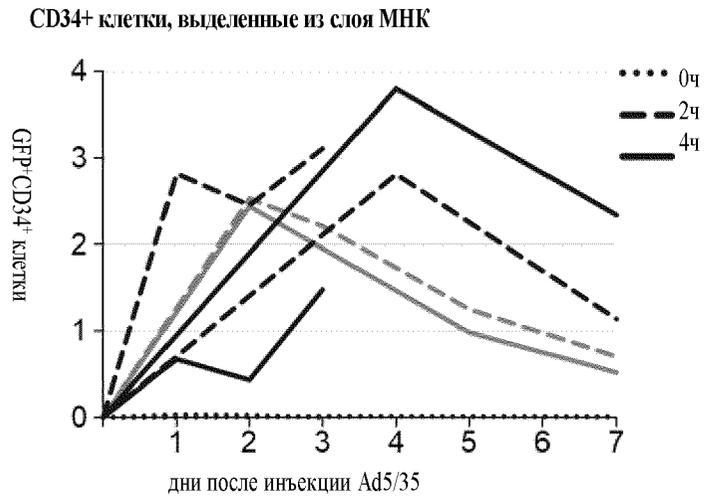
Фиг. 94J



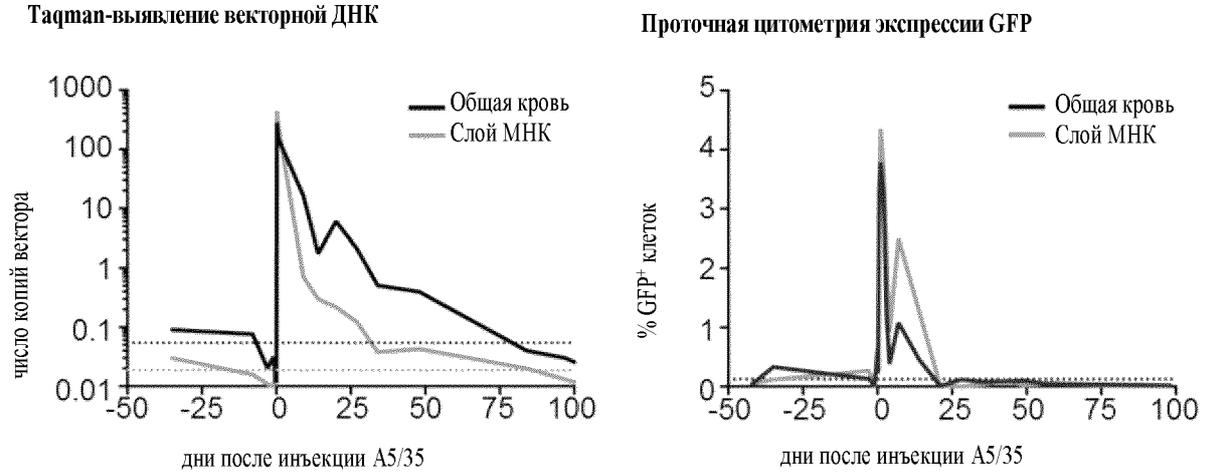
Частота трансдуцированных колоний



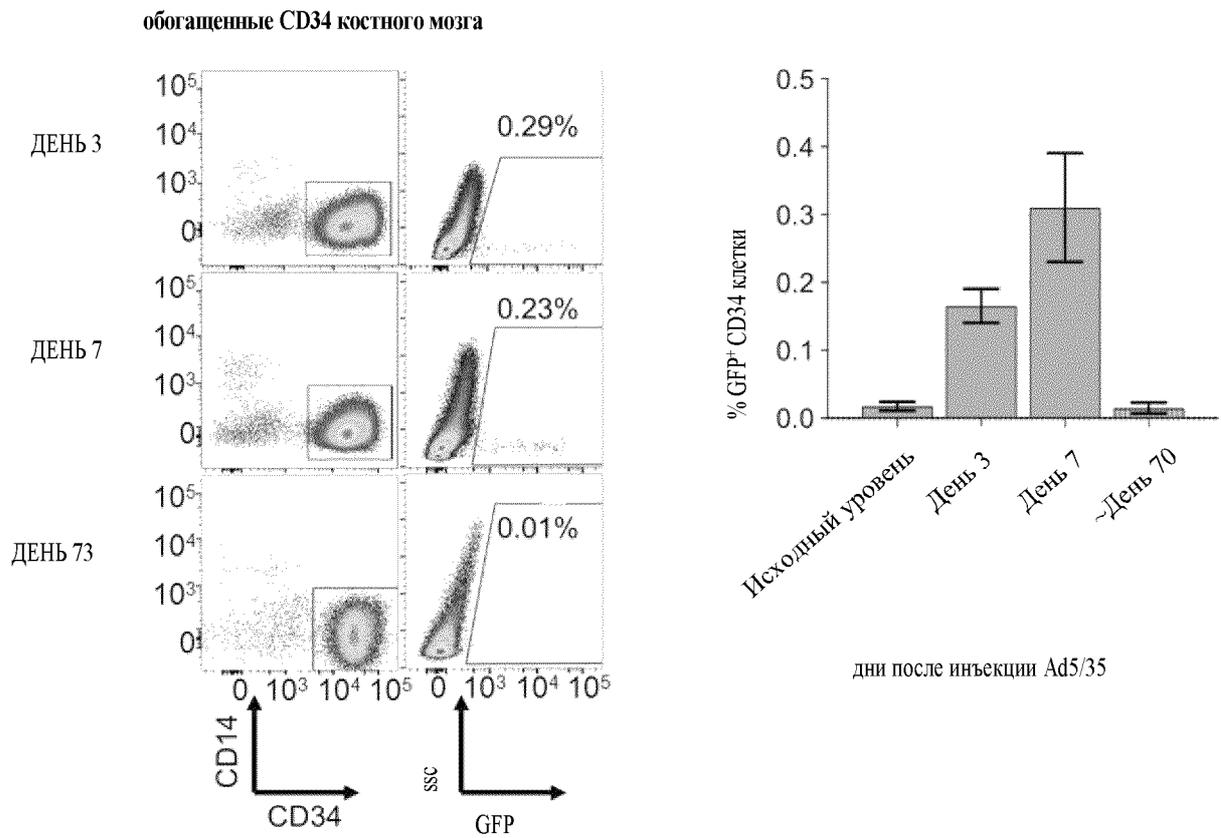
Фиг. 94К



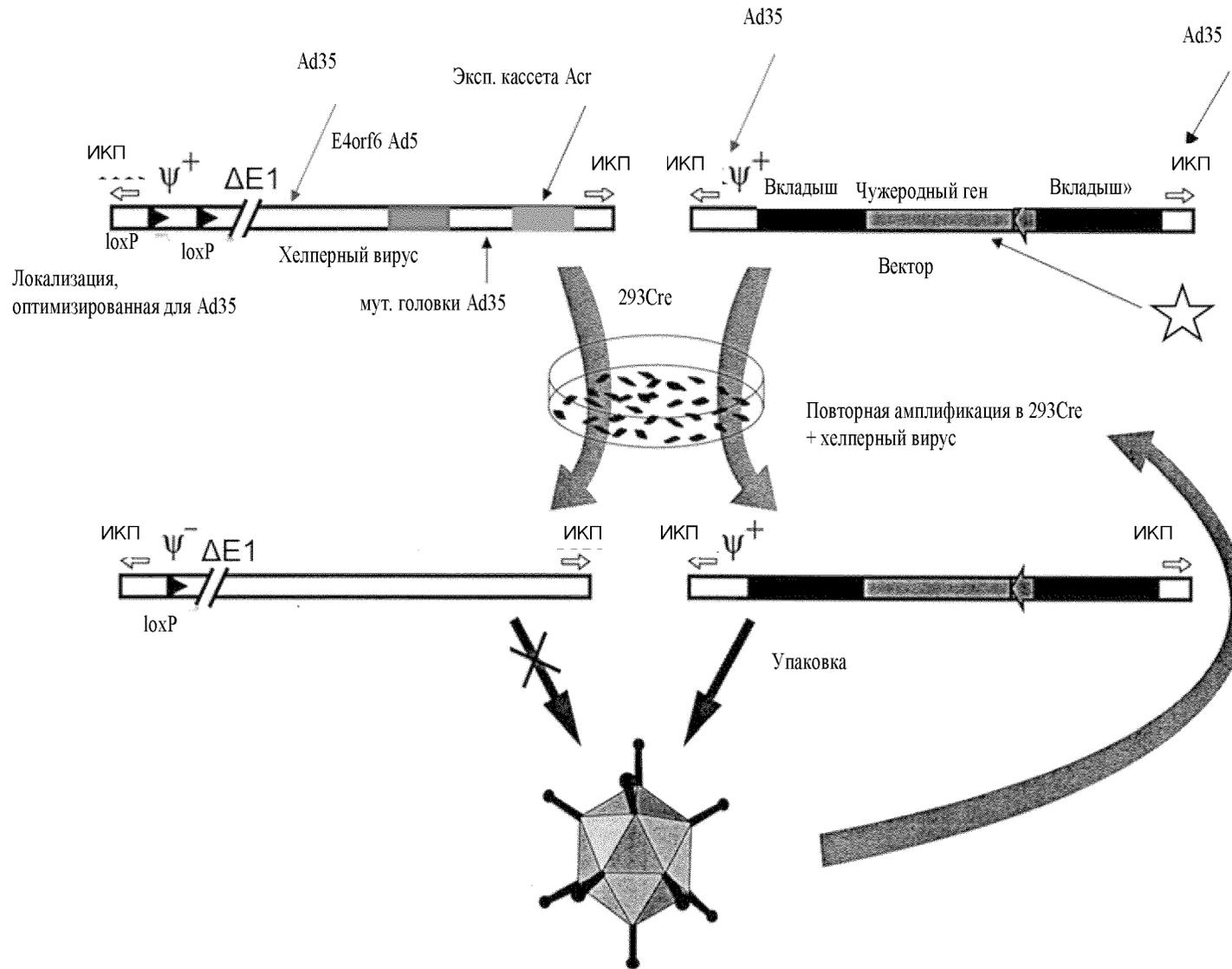
Фиг. 94L



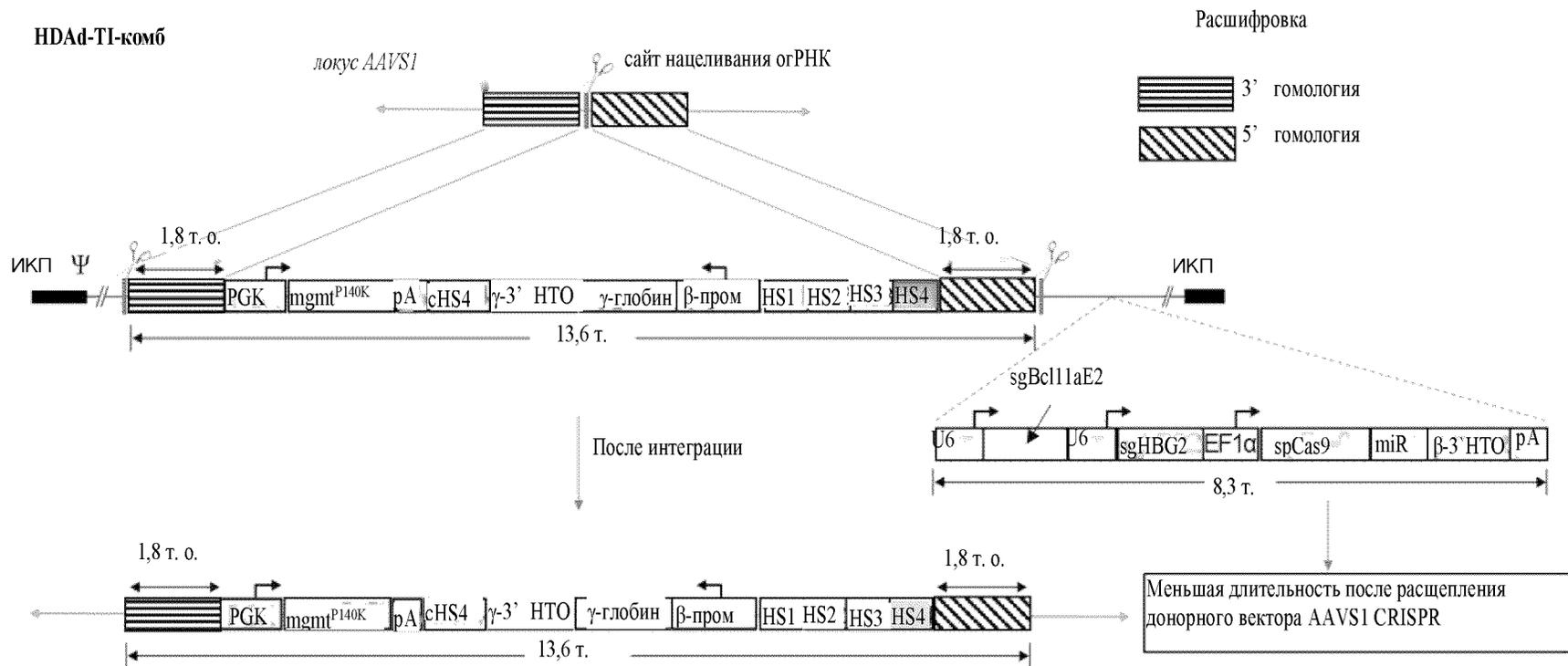
Фиг. 94М



Фиг. 95

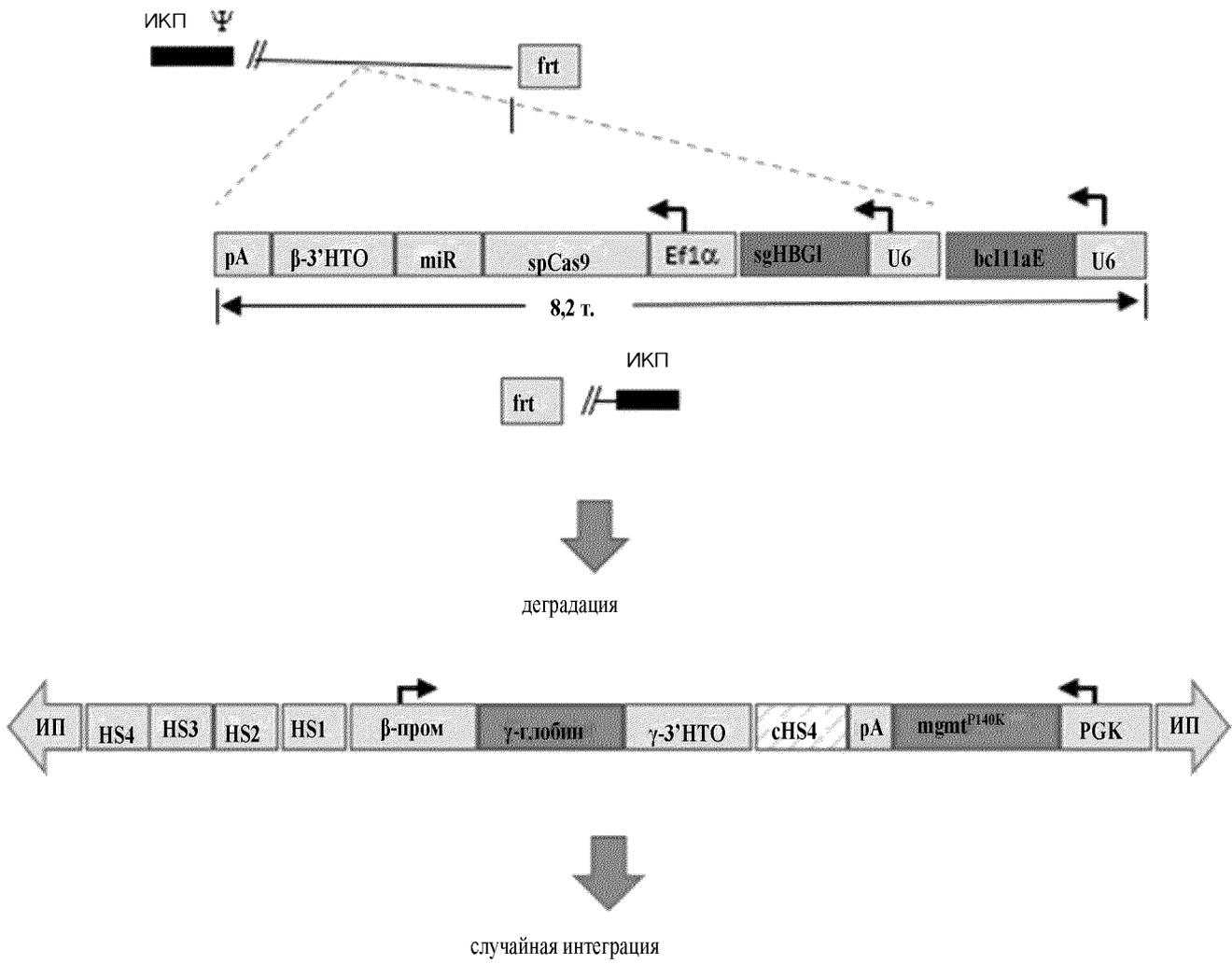


Фиг. 96

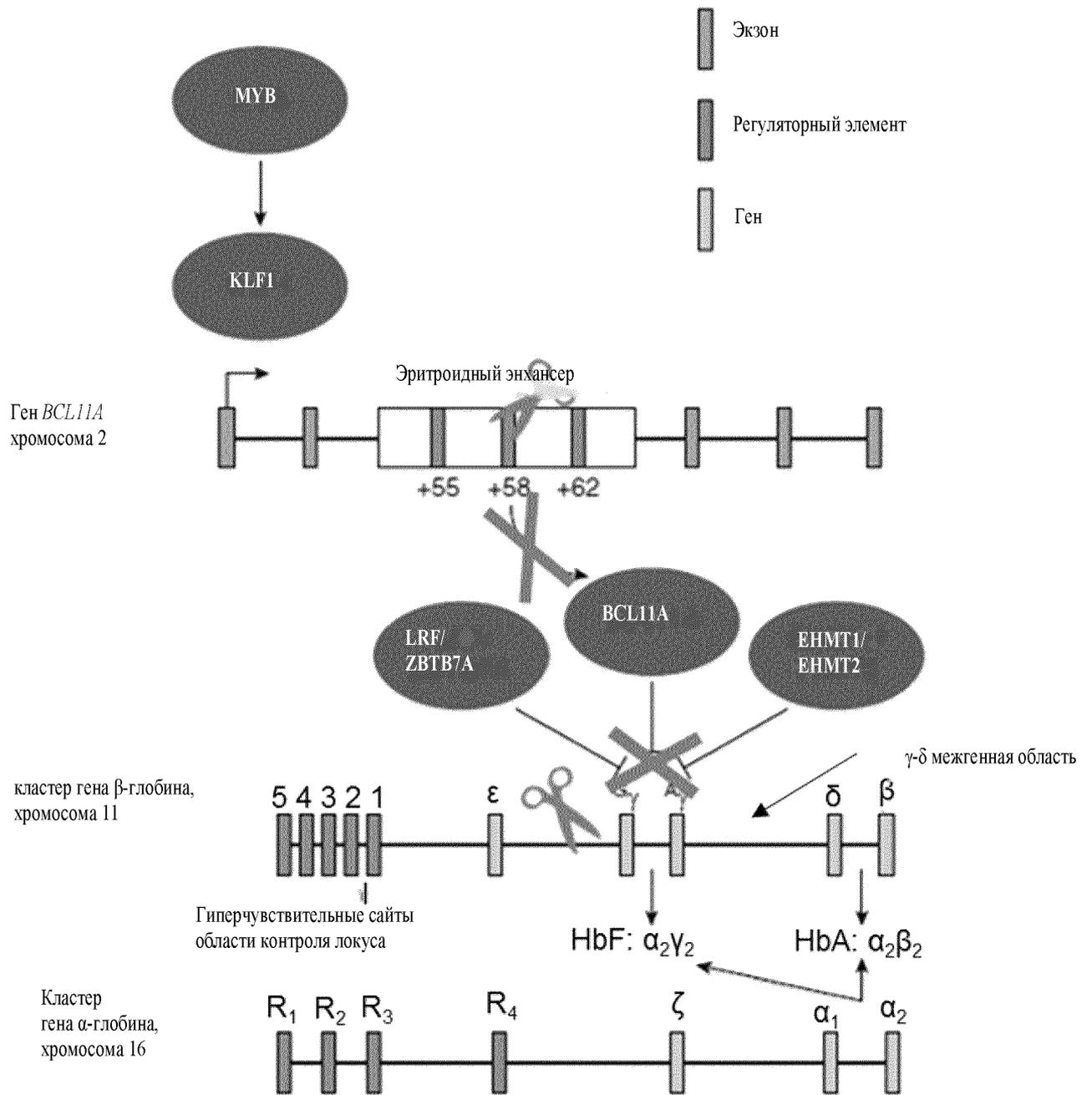


214/350

Фиг. 97А

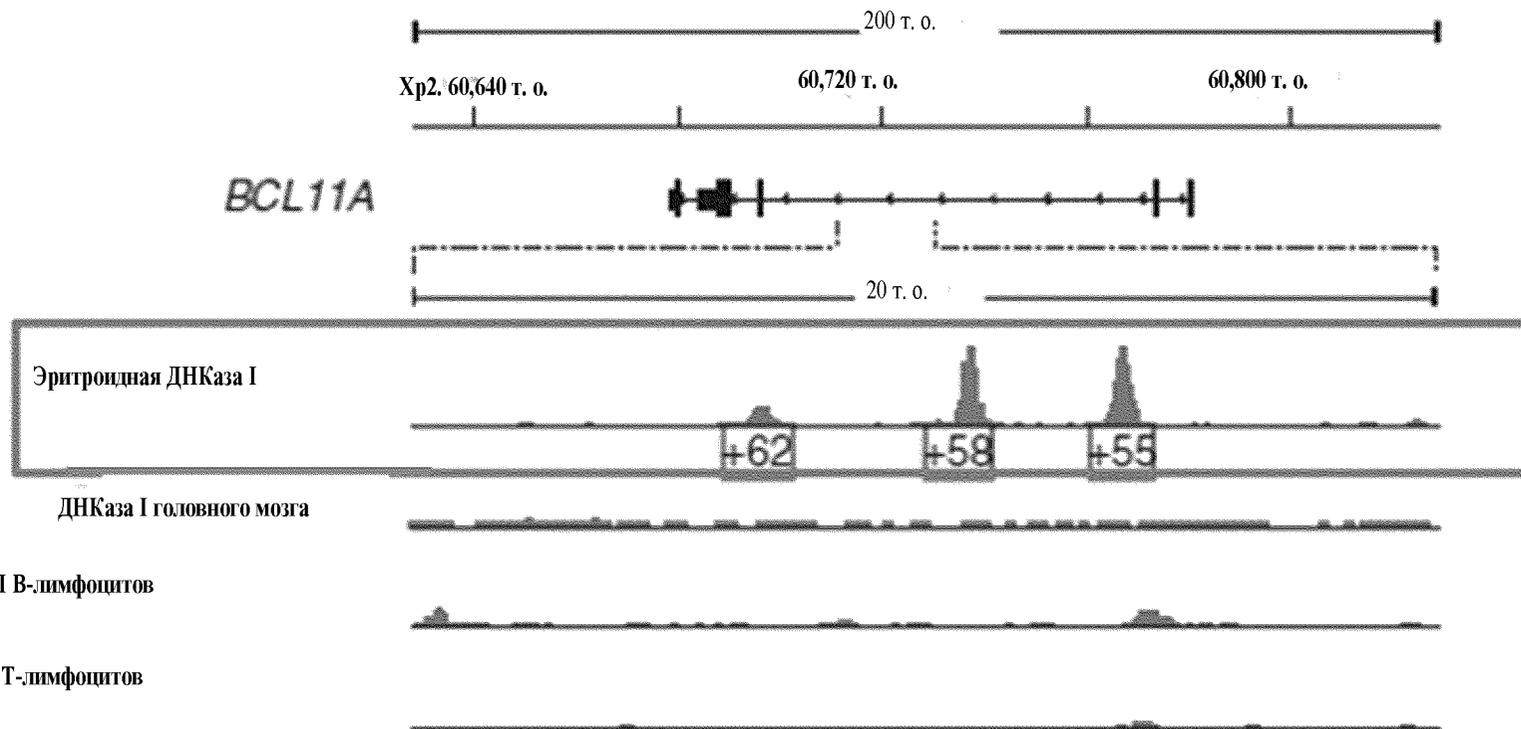


Фиг. 97В

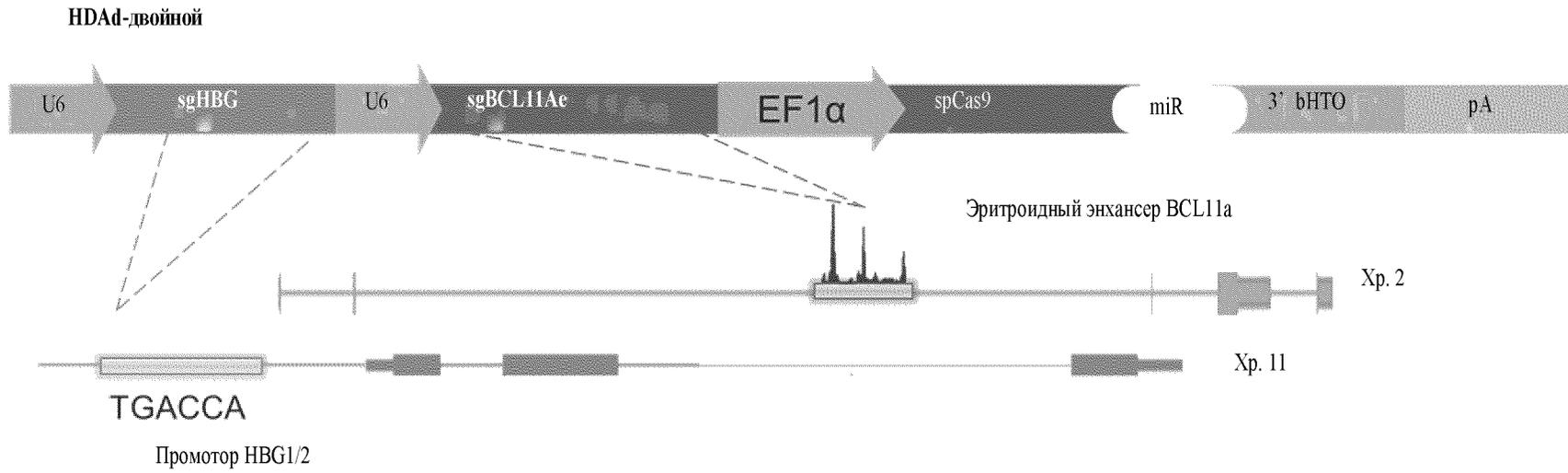


Фиг. 97С

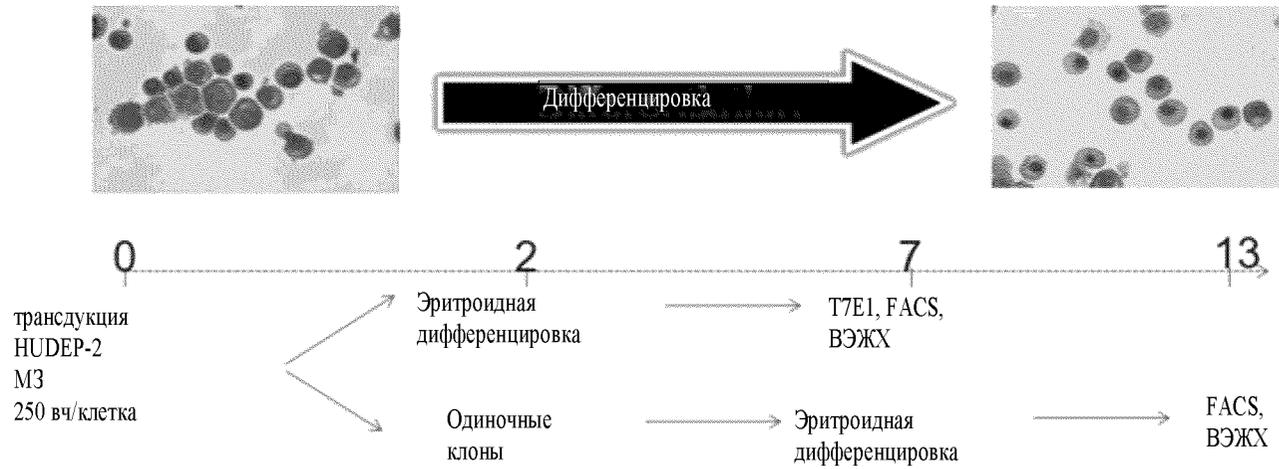
Эритроид-специфический энхансер BCL11A



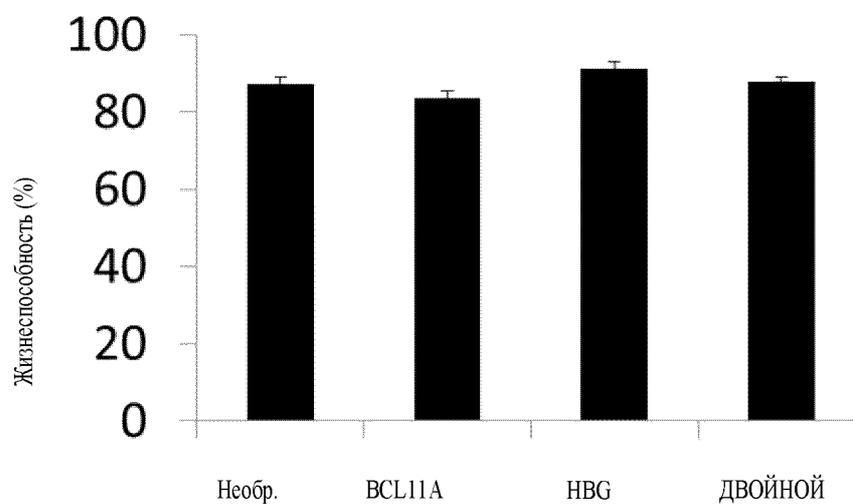
Фиг. 98В



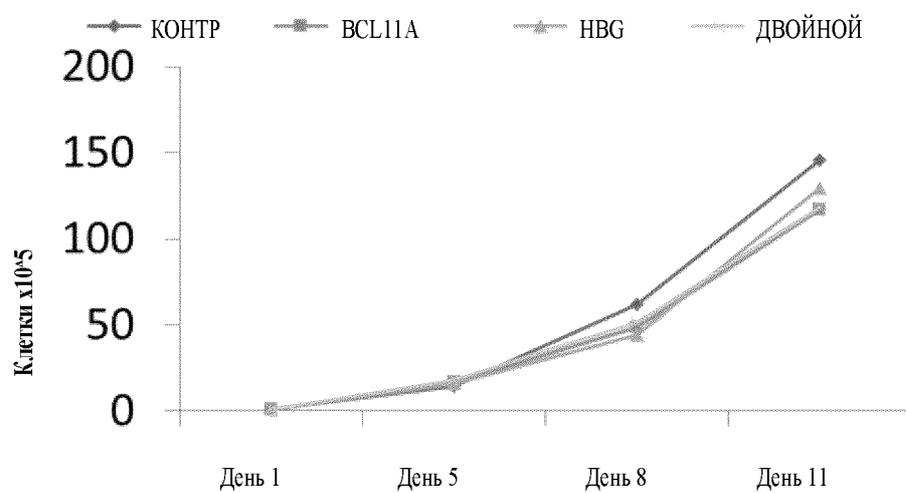
Фиг. 98С



Фиг. 98D

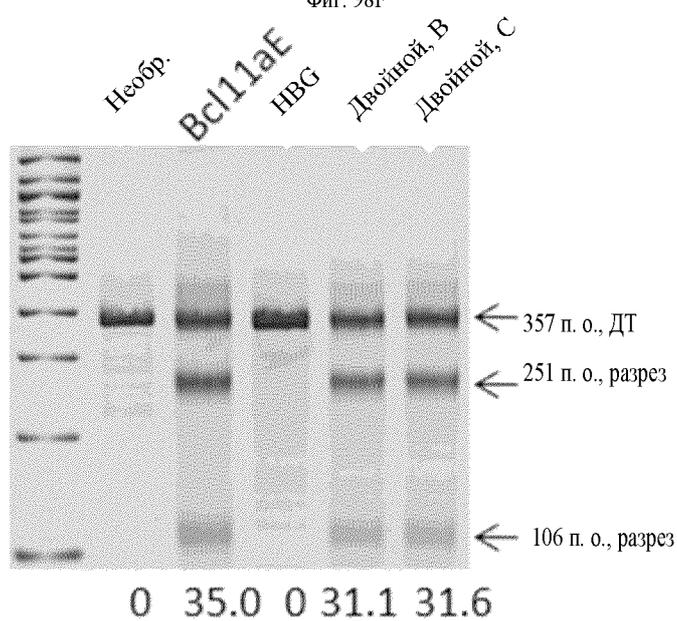


Фиг. 98E

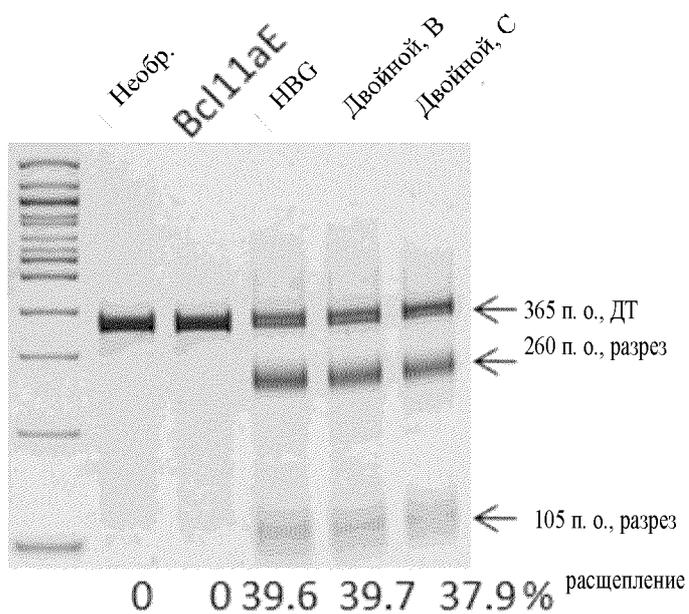


221/350

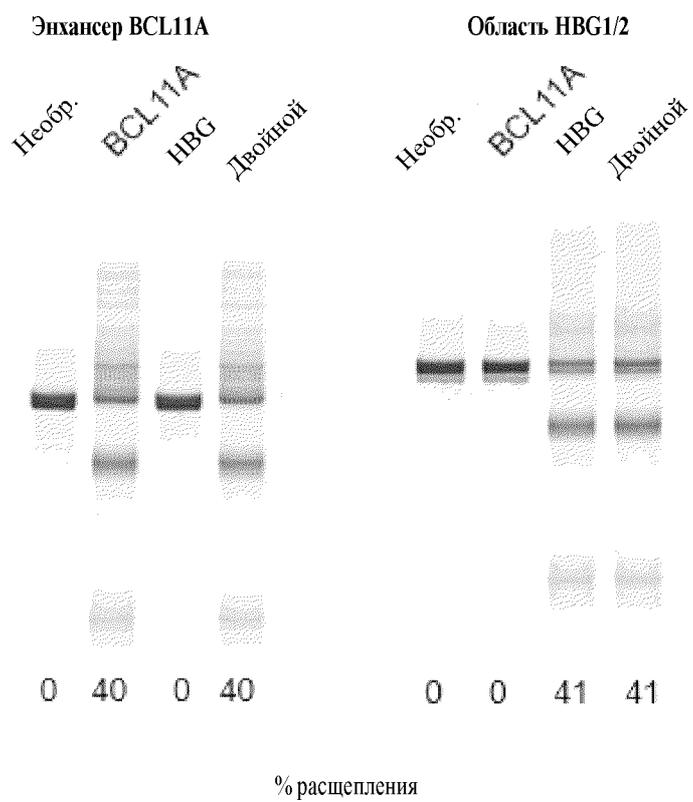
Фиг. 98F



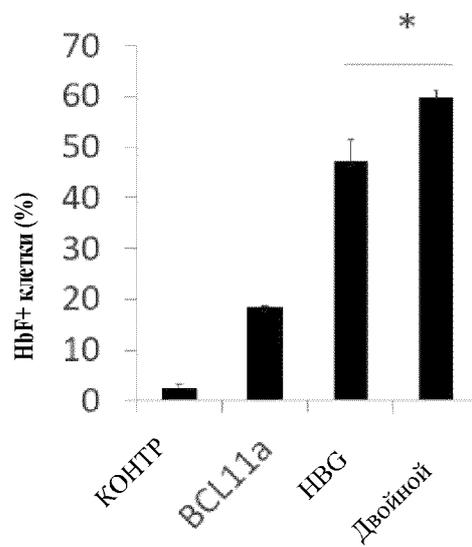
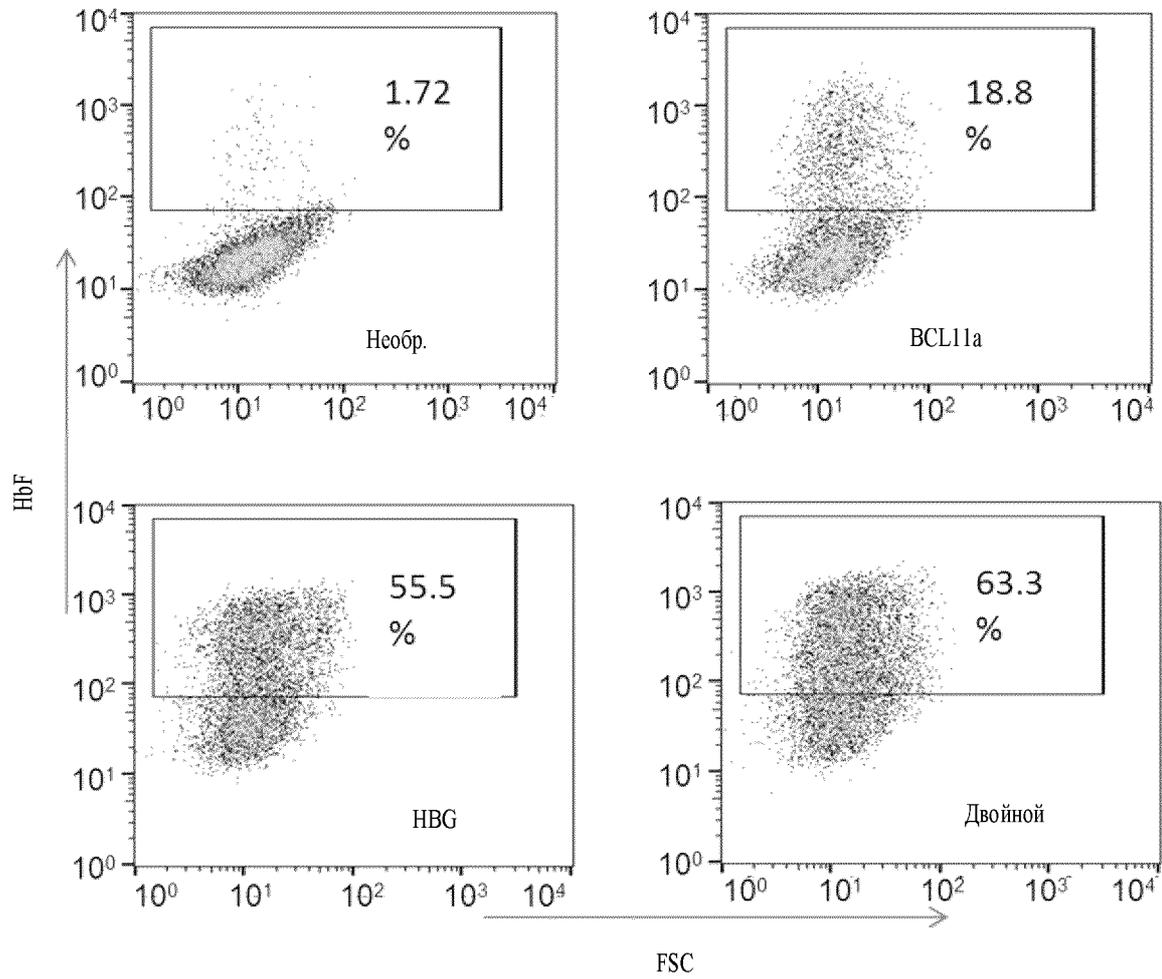
Фиг. 98G



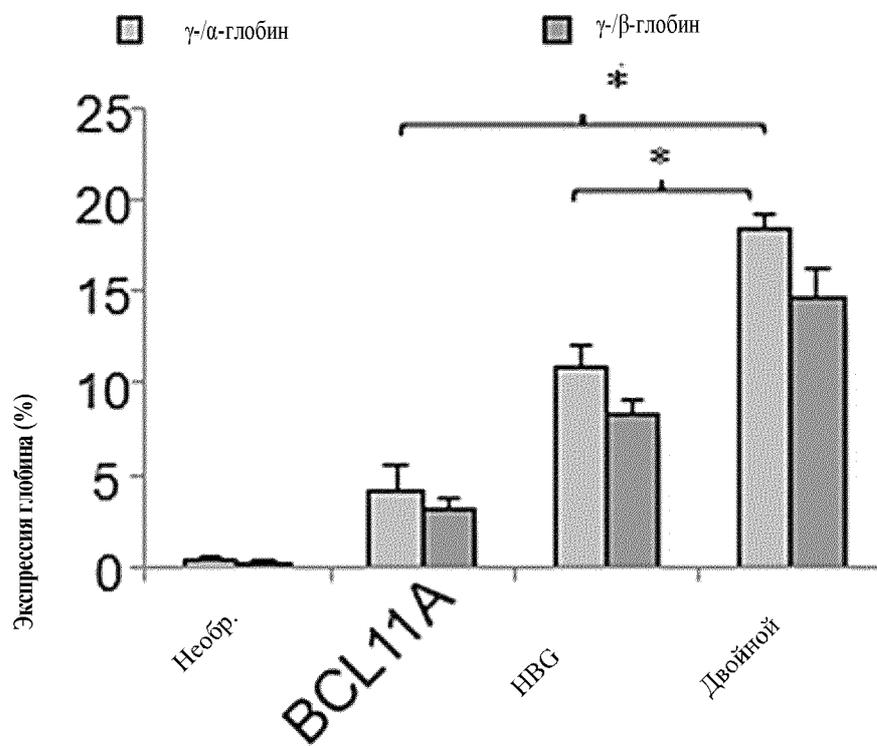
Фиг. 98Н



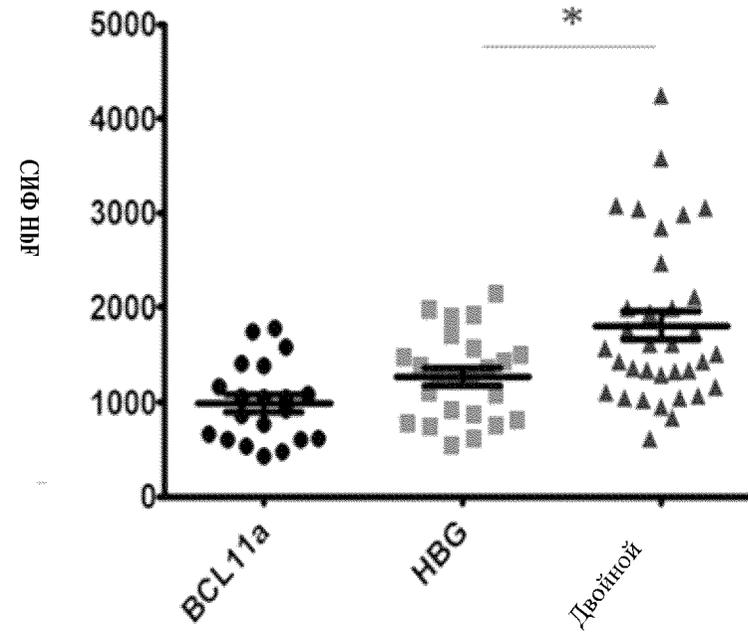
Фиг. 98I



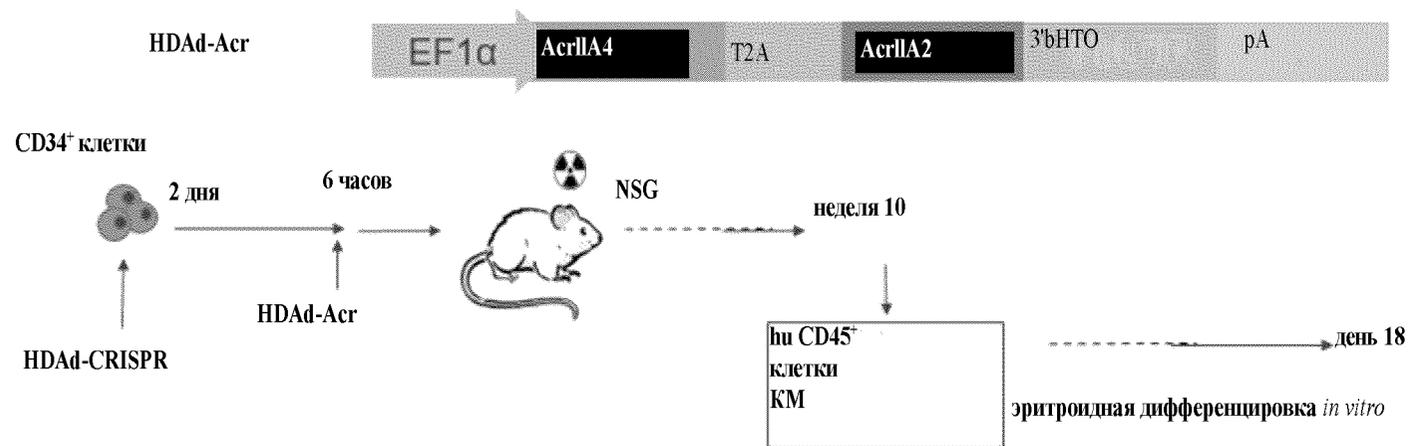
Фиг. 98J

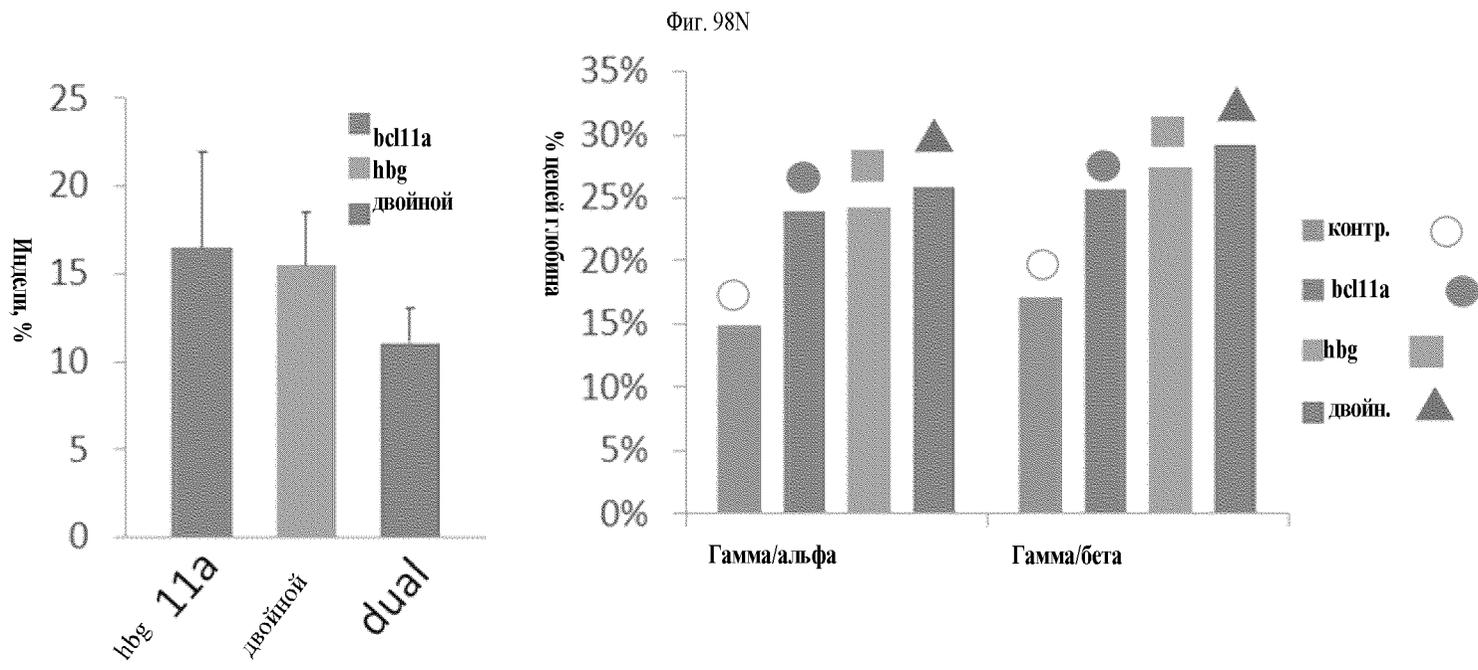
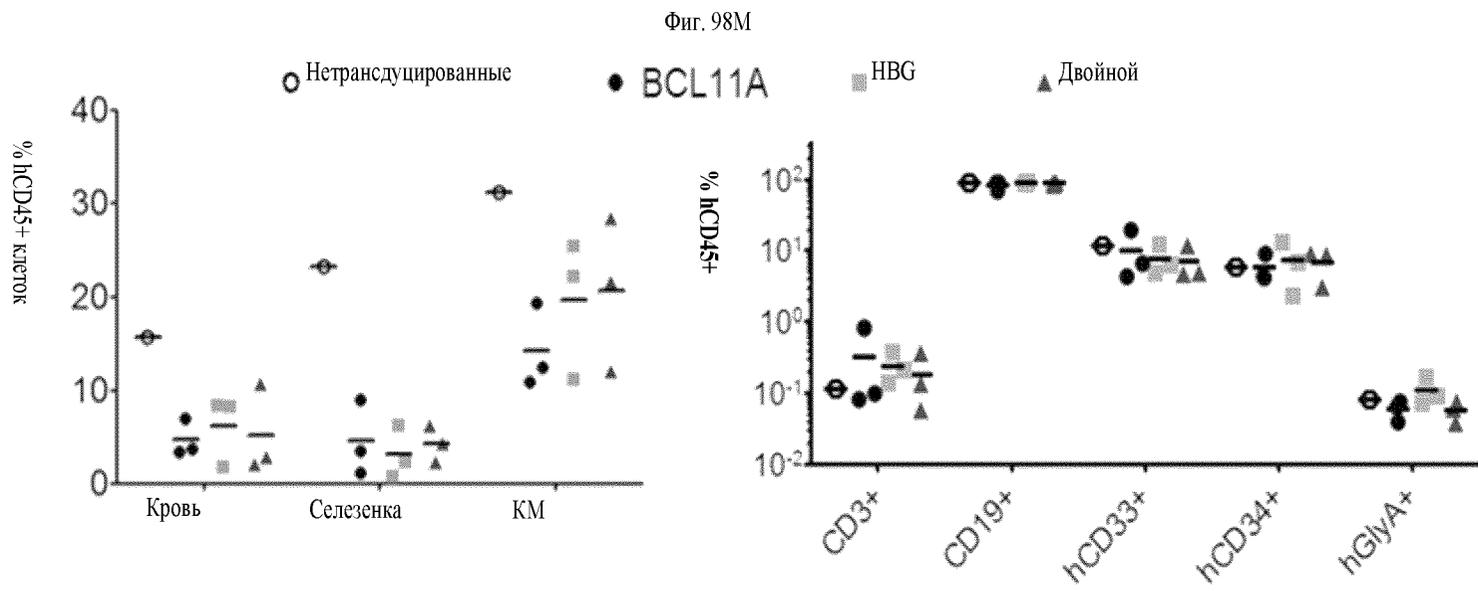


Фиг. 98K

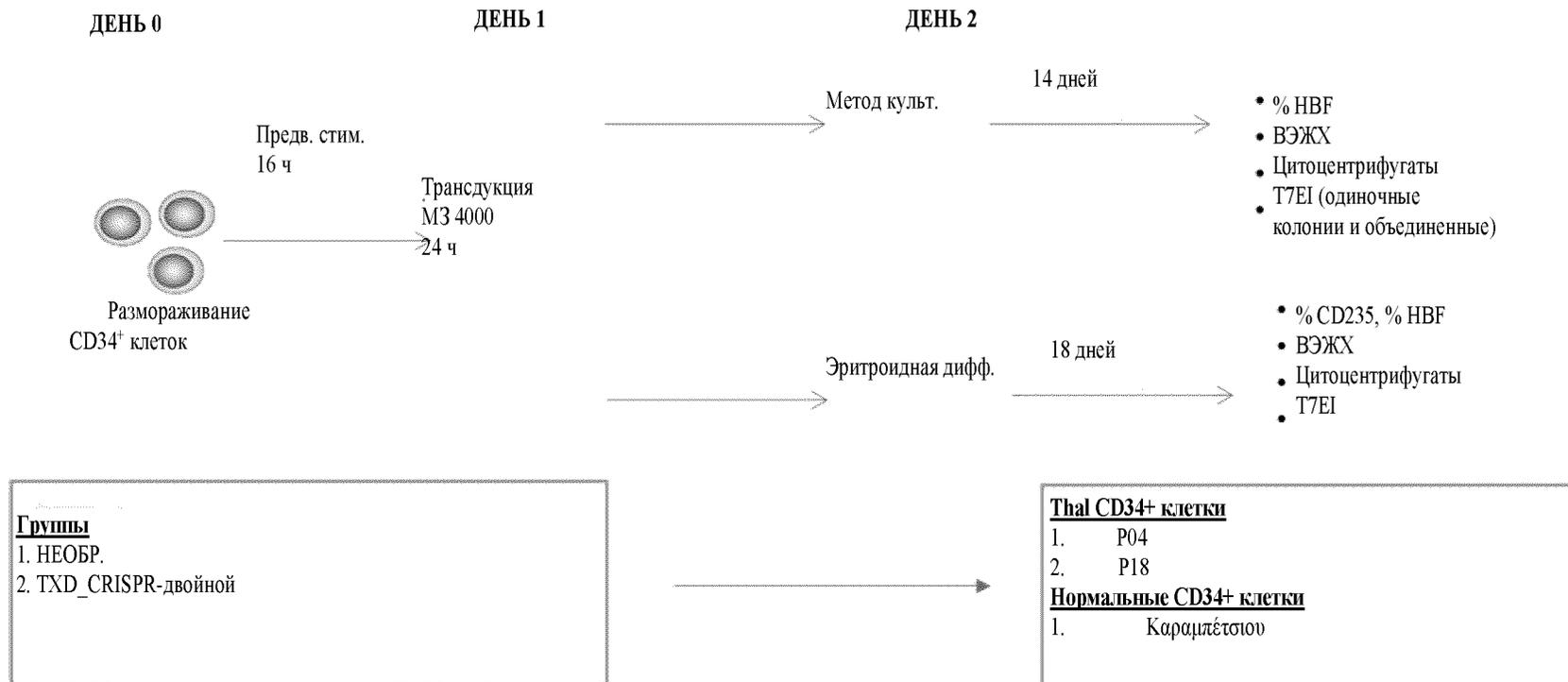


Фиг. 98L

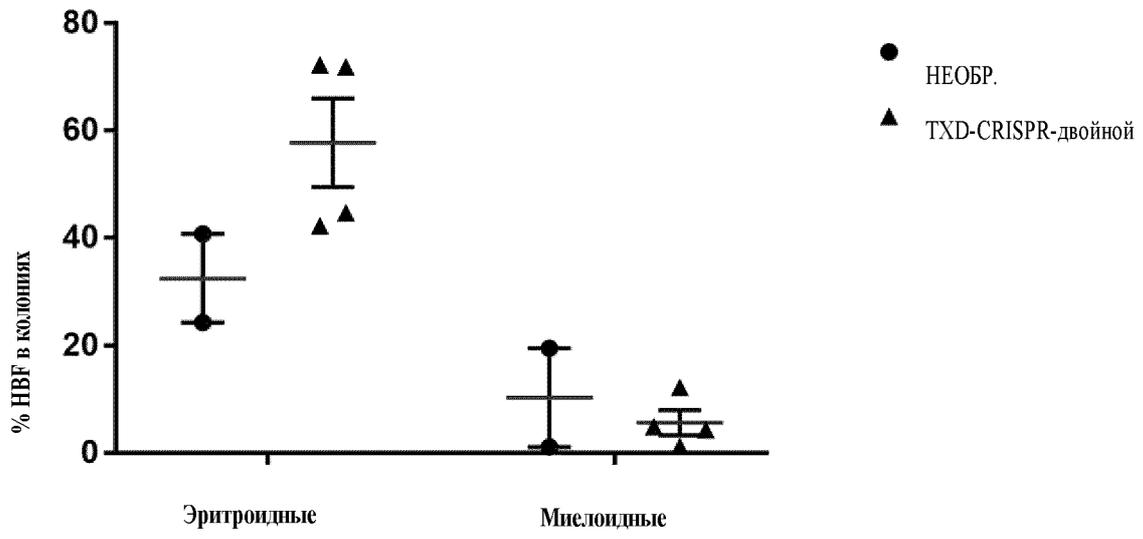




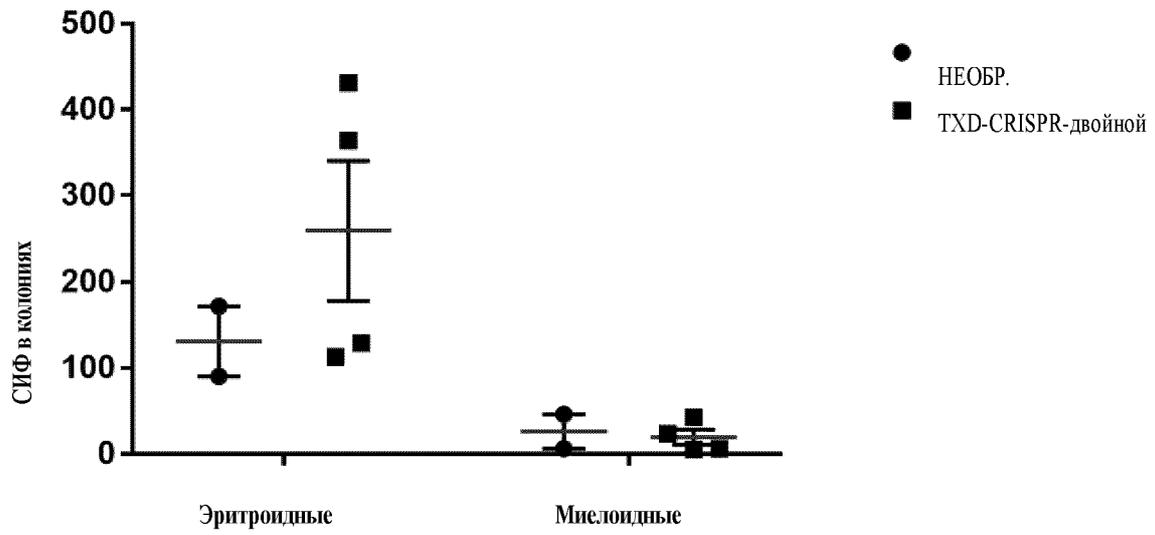
Фиг. 99А



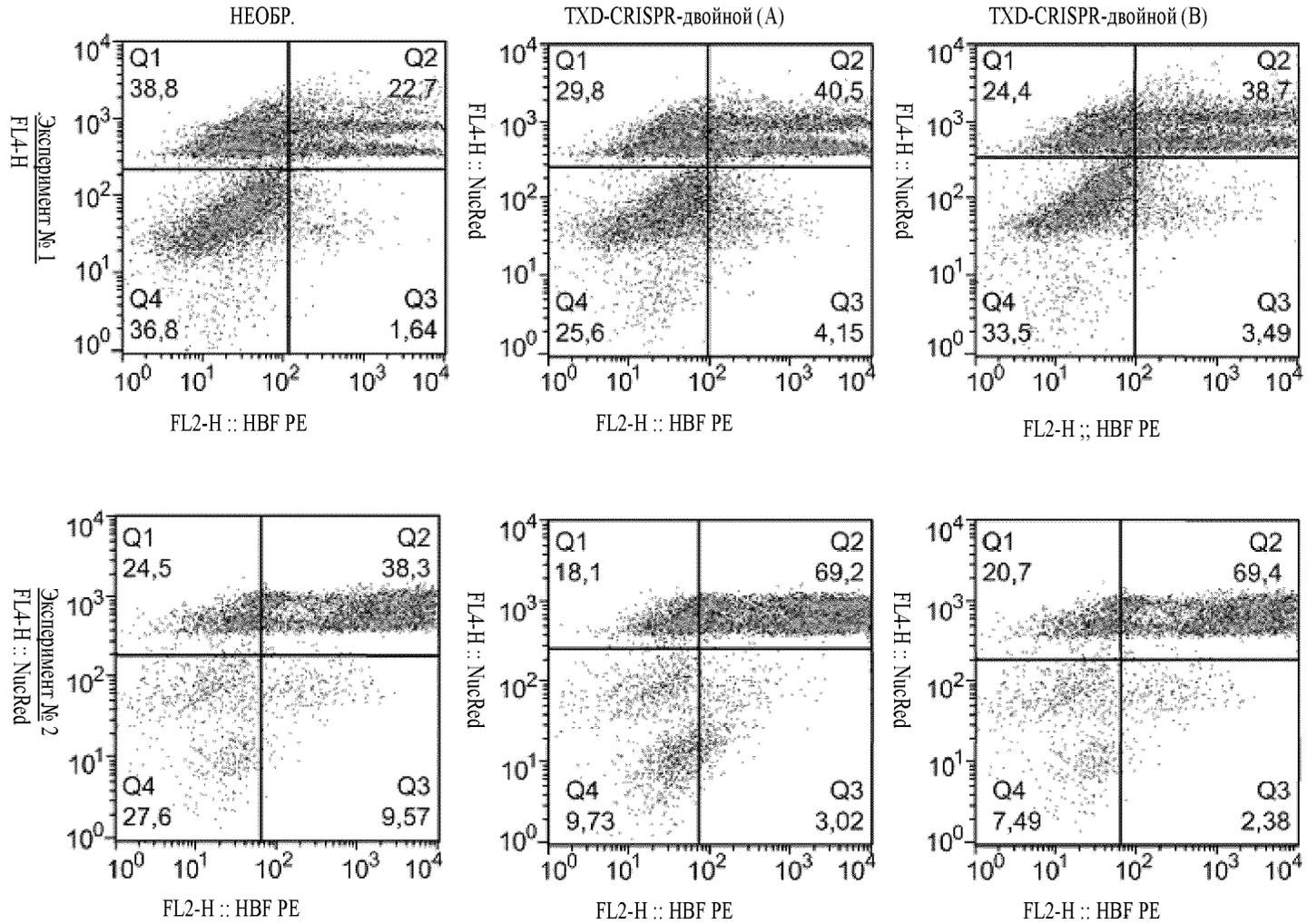
Фиг. 99В



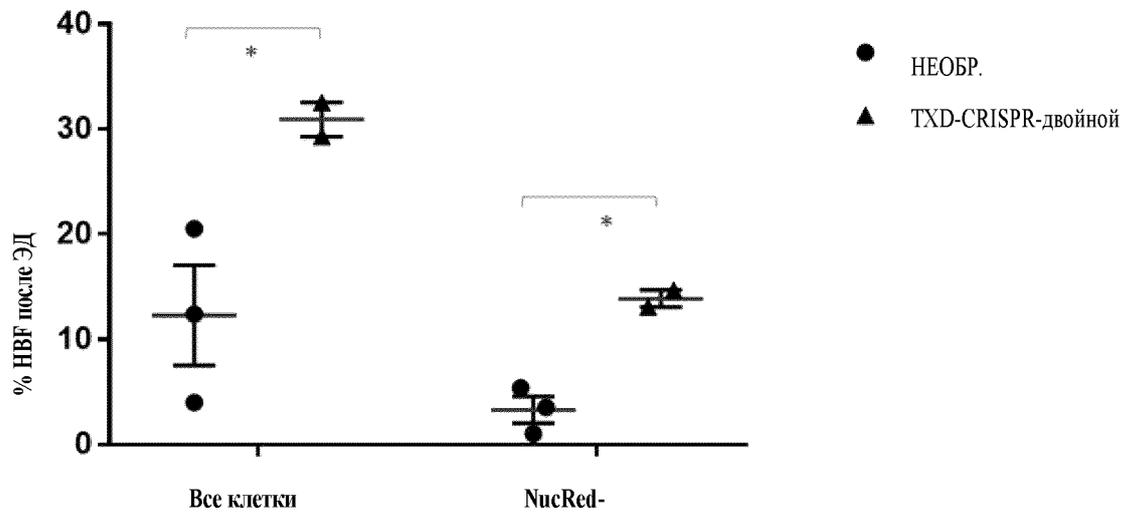
Фиг. 99С



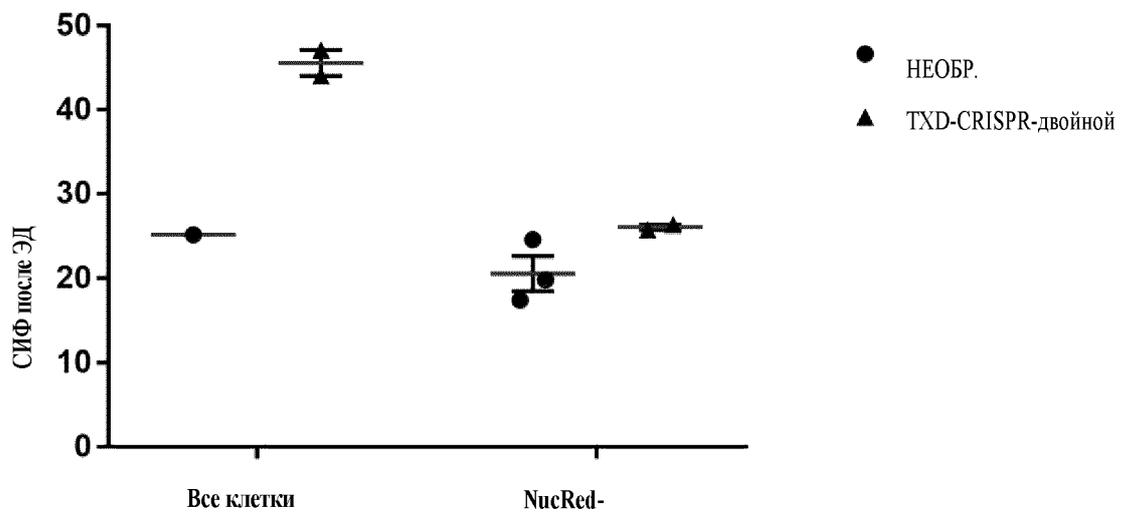
Фиг. 99D



Фиг. 99E

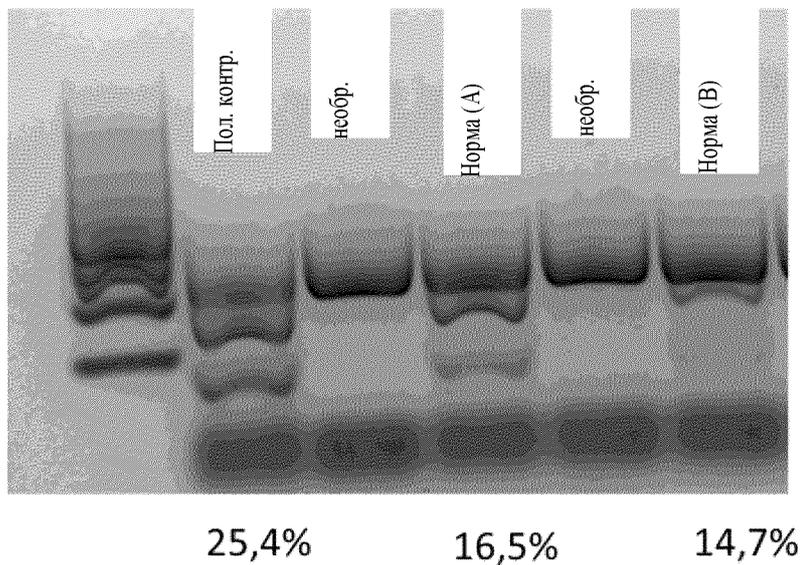


Фиг. 99F

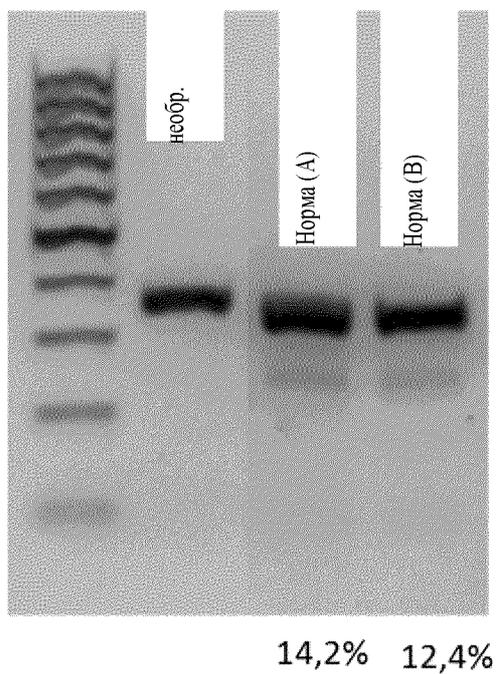


231/350

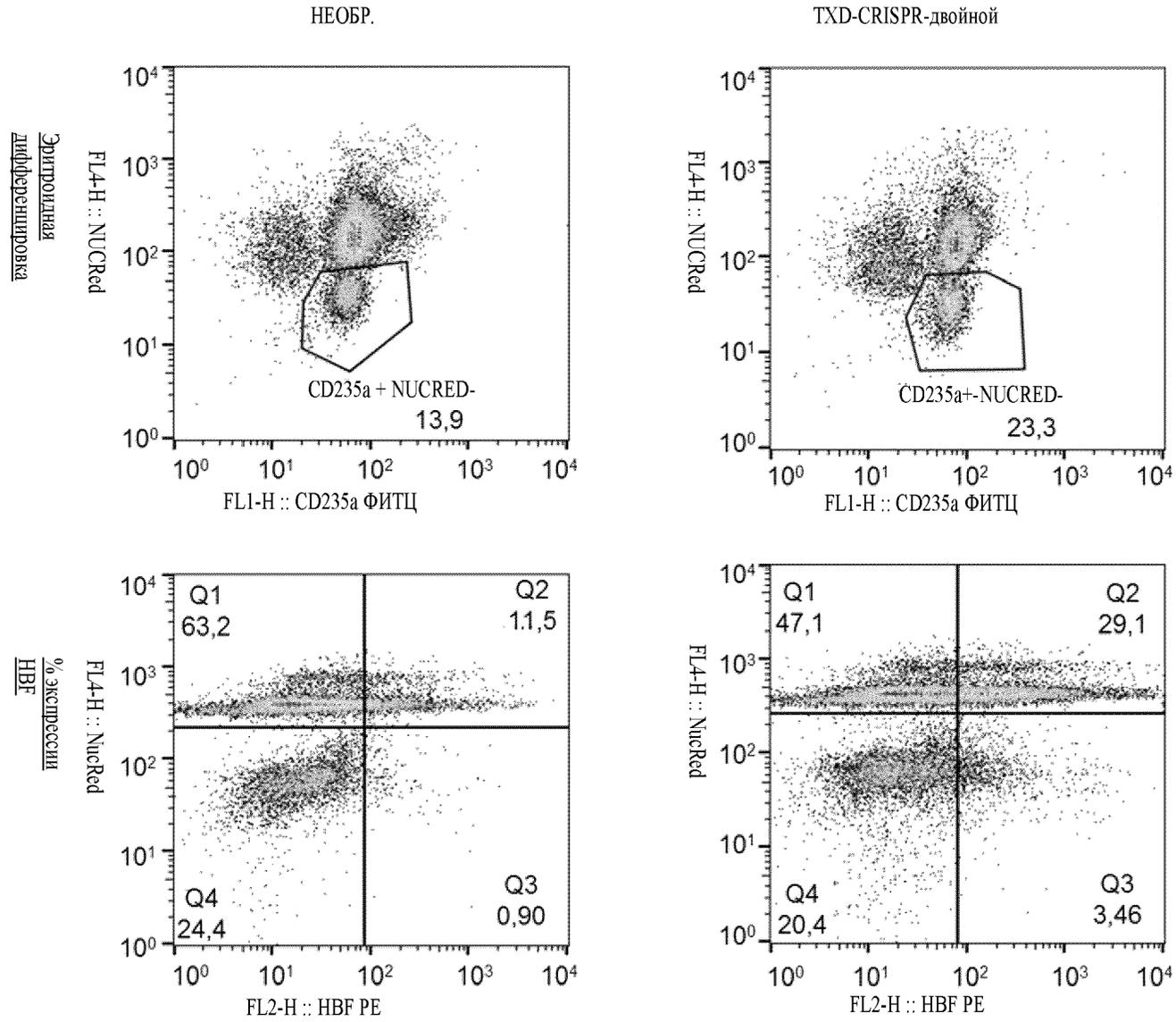
Фиг. 99G



Фиг. 99H

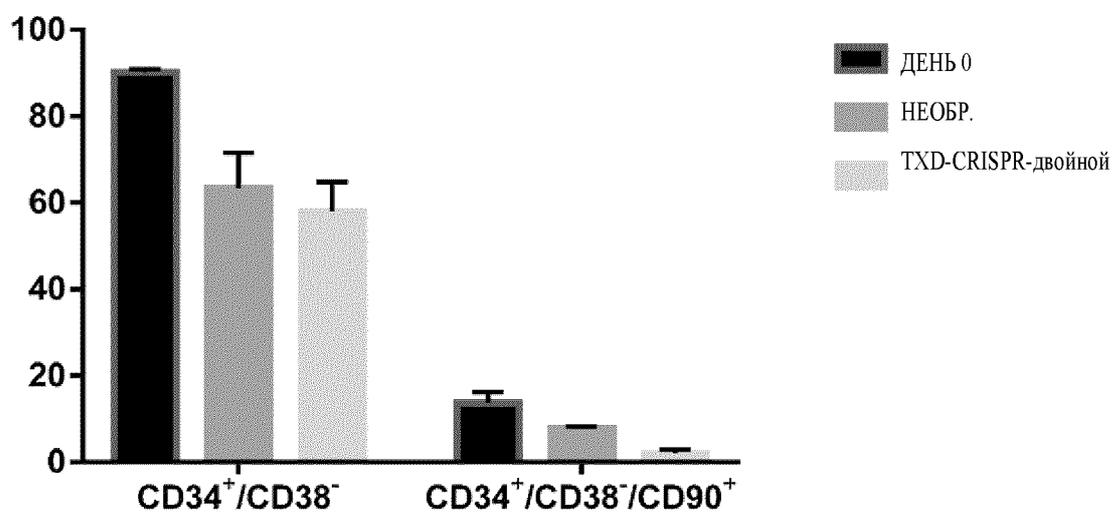


Фиг. 99I

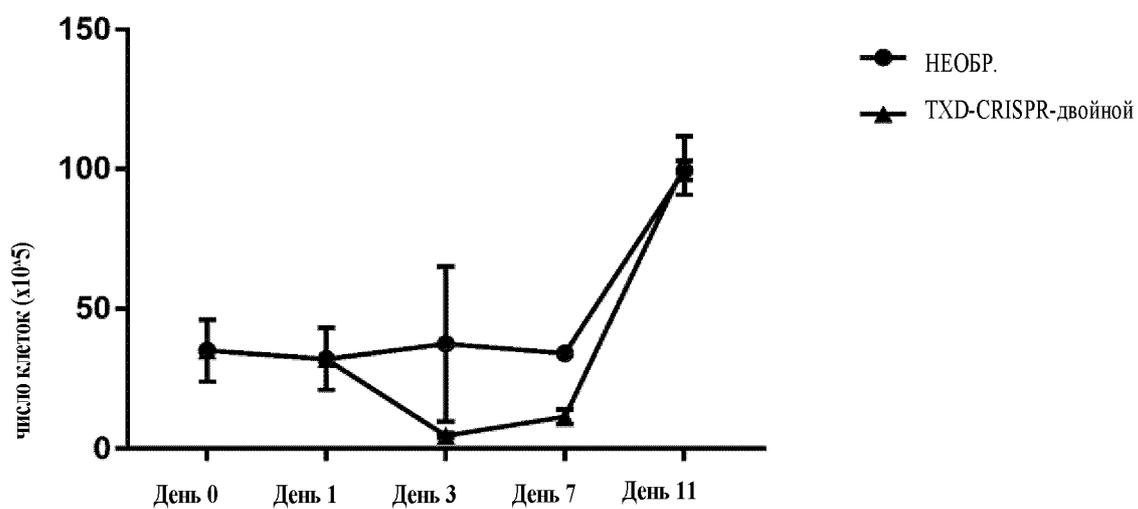


233/350

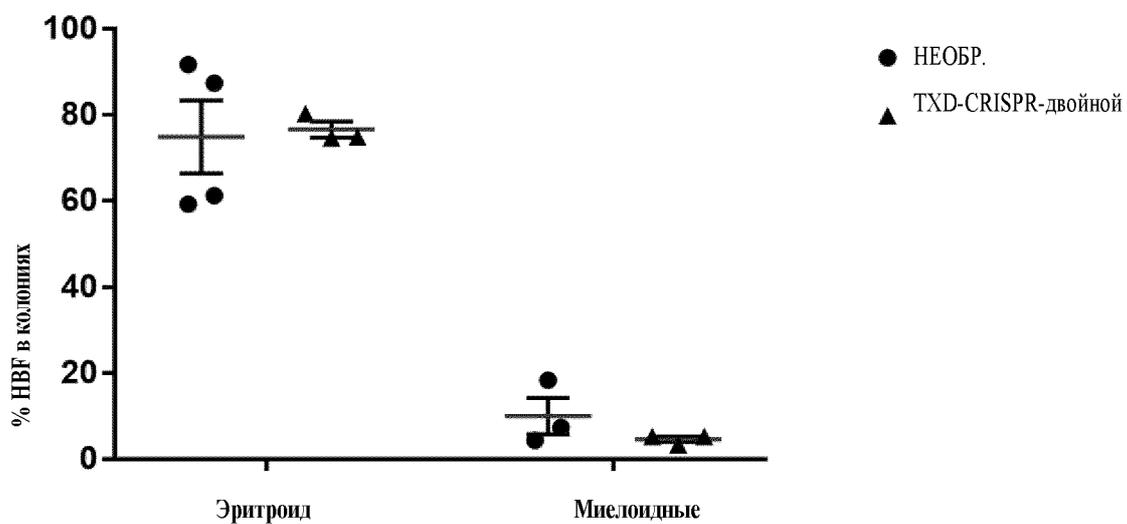
Фиг. 99J



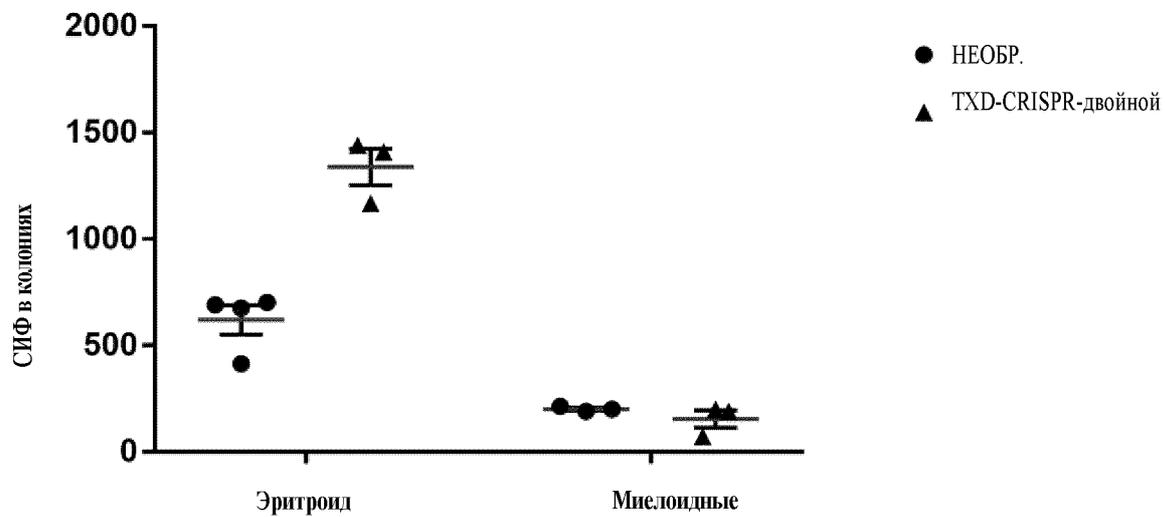
Фиг. 99 К



Фиг. 99L

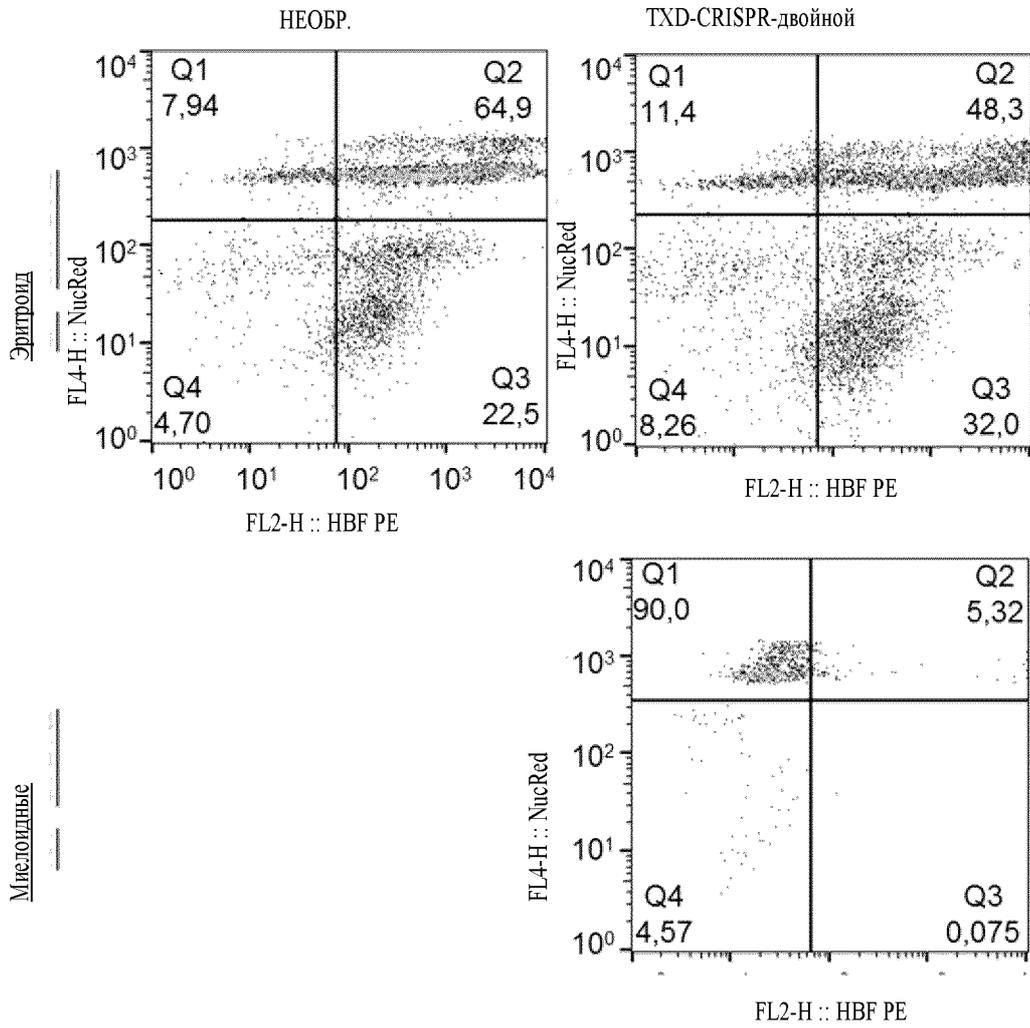


Фиг. 99М

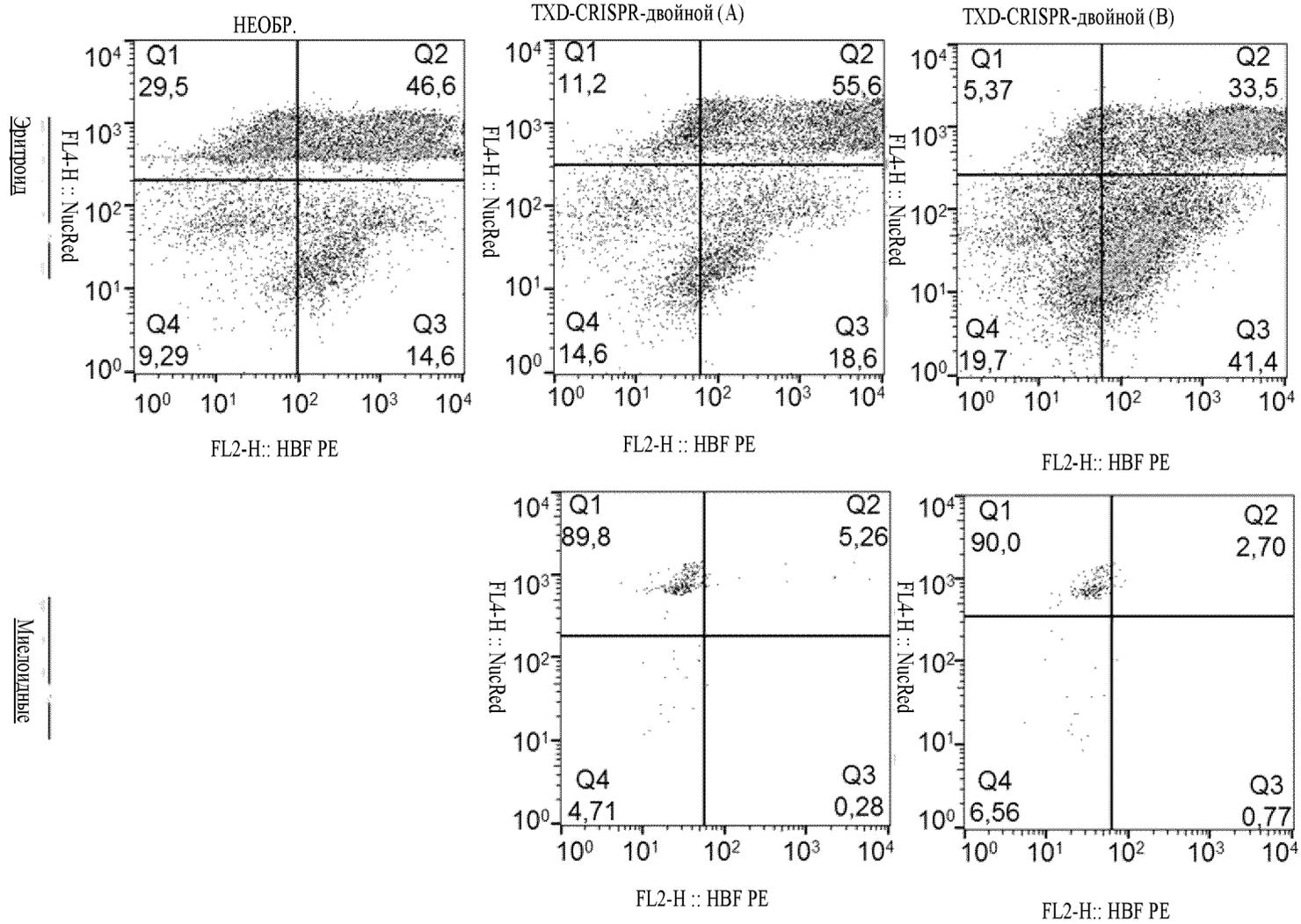


235/350

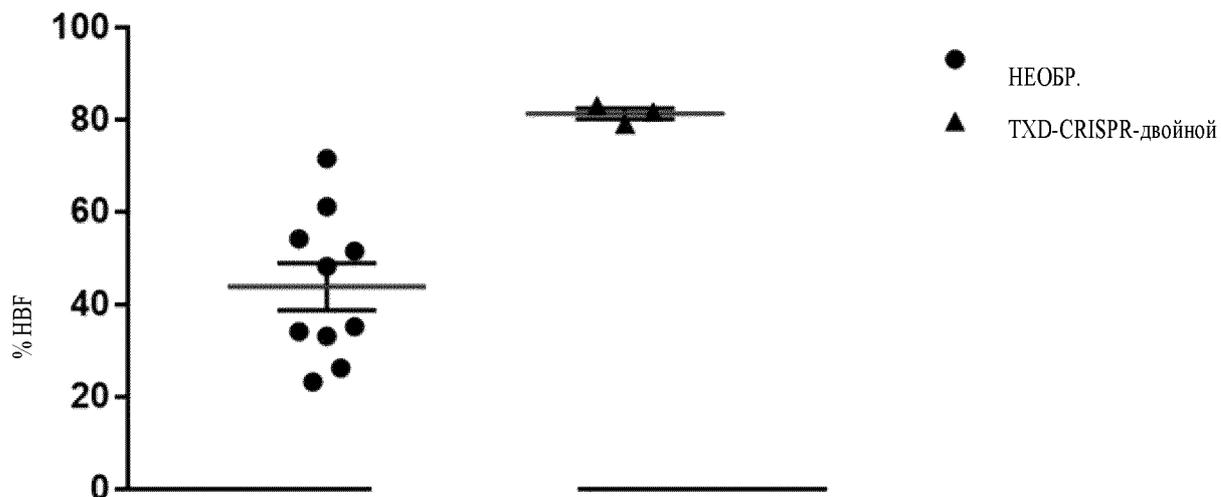
Фиг. 99N



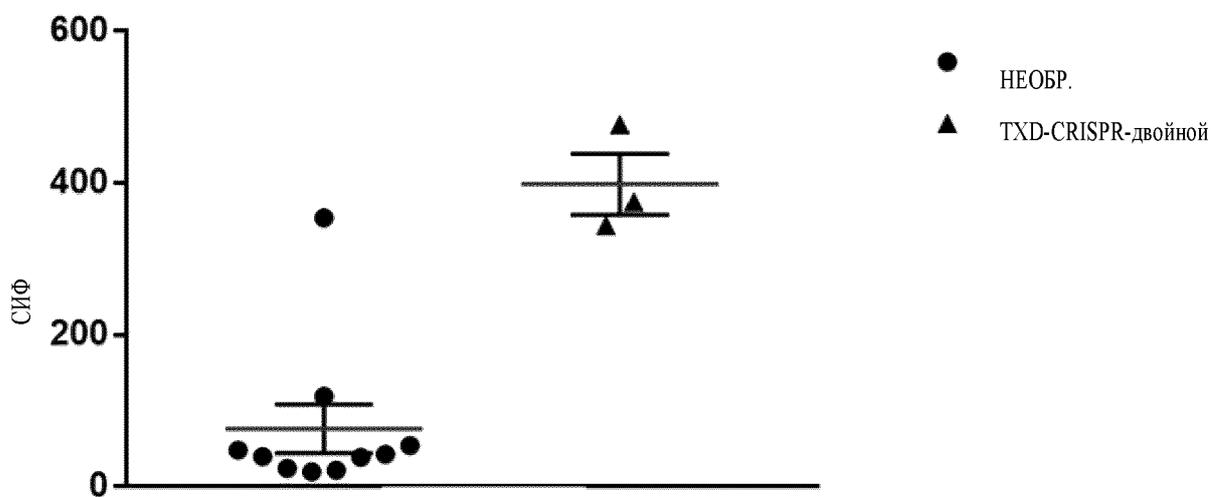
Фиг. 990

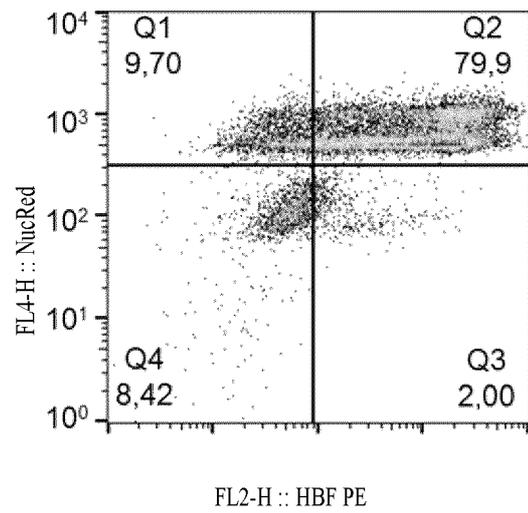
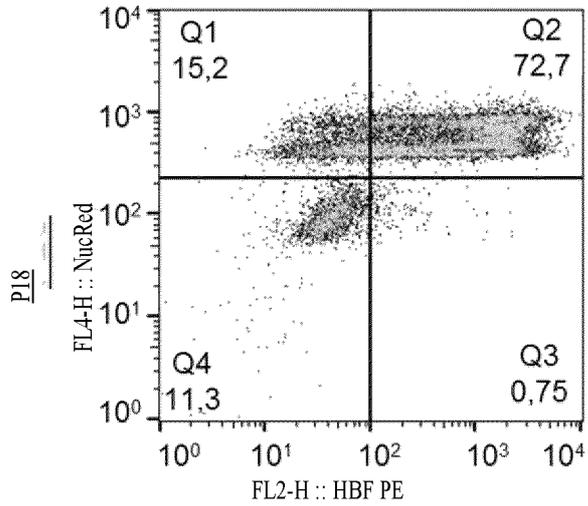
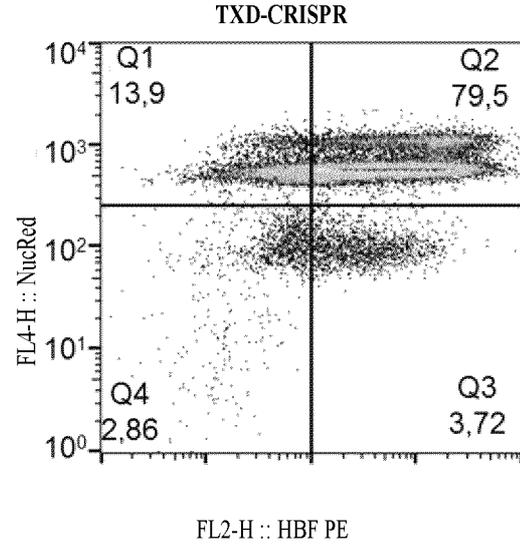
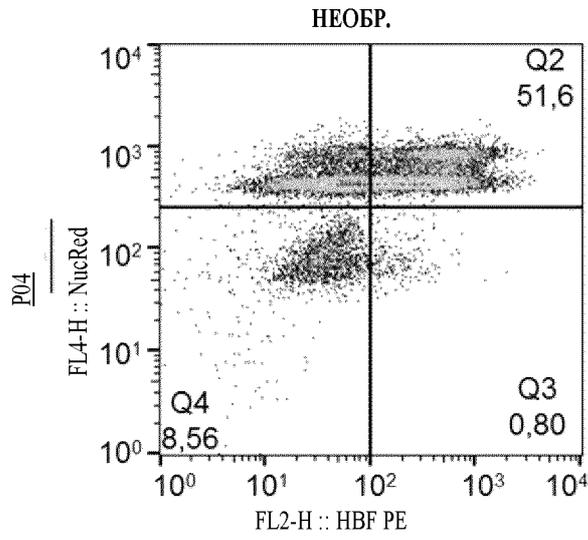


Фиг. 99P



Фиг. 99Q

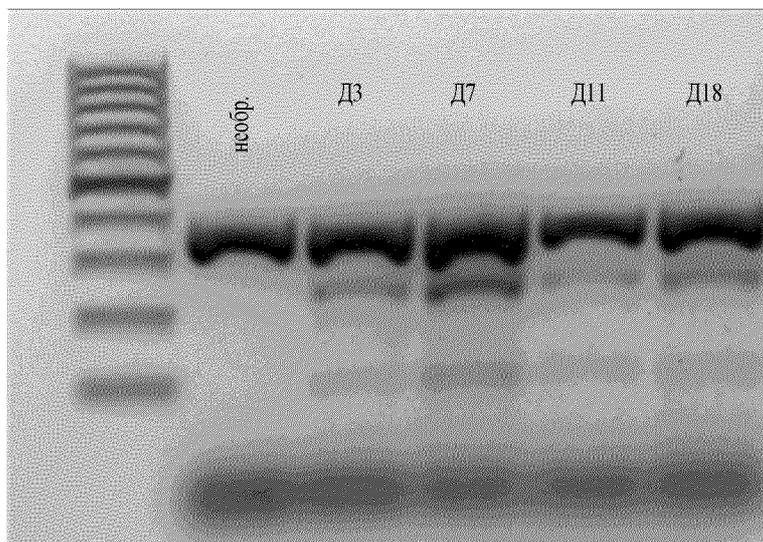




239/350

Фиг. 99S

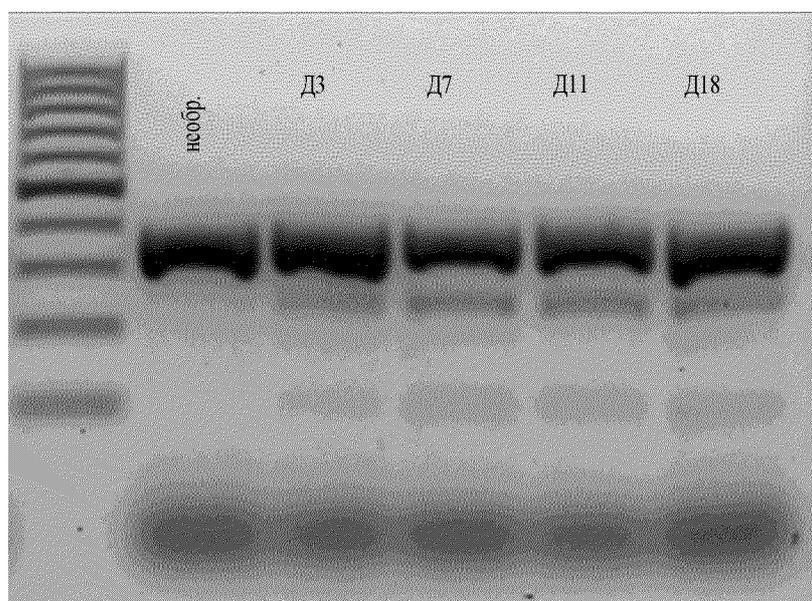
p04



12,2% 19,5% 13,6% 15,5%

Фиг. 99Т

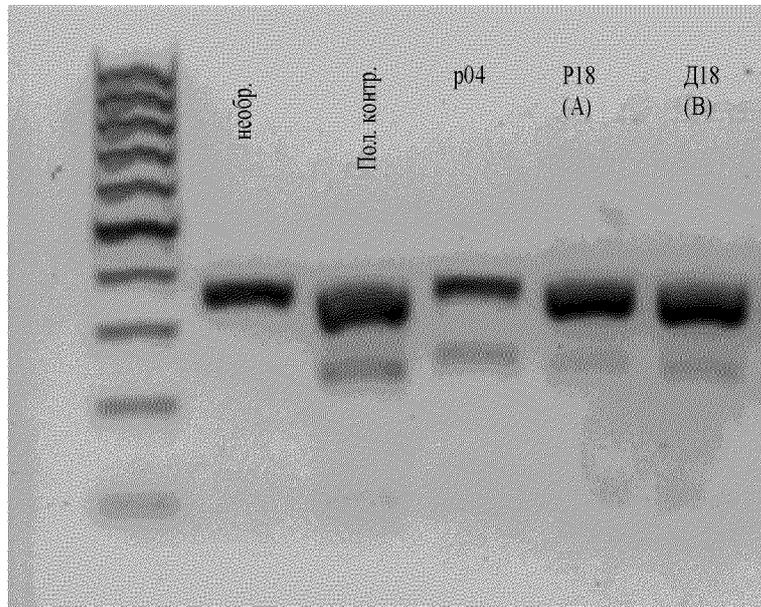
p18



11,4% 15,9% 14,3% 15,7%

240/350

Фиг. 99U



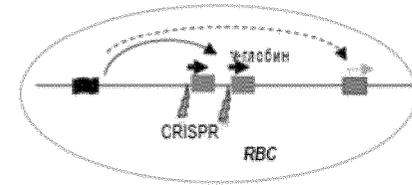
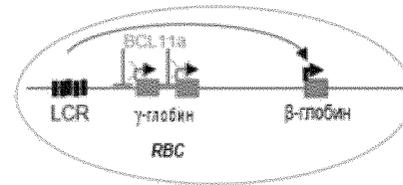
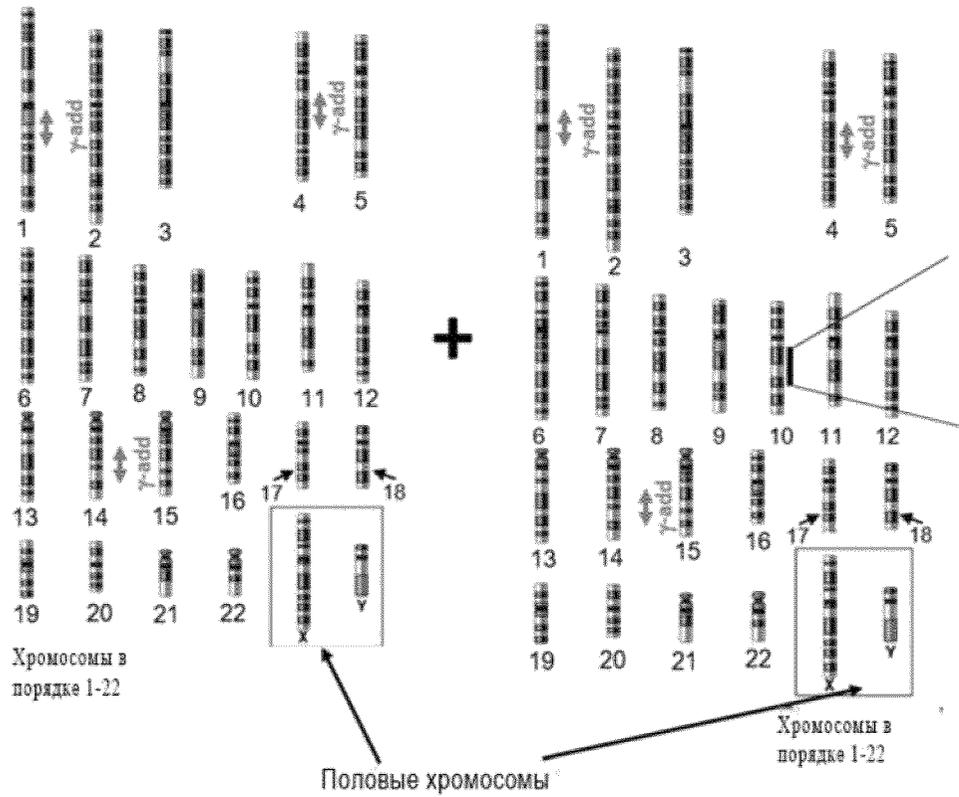
17,4% 12,1% 14,7% 15,9%

Фиг. 100

Комбинация добавления гена γ -глобина и повторной активации эндогенного γ -глобина

SB100x-опосредованная интеграция гена γ -глобина

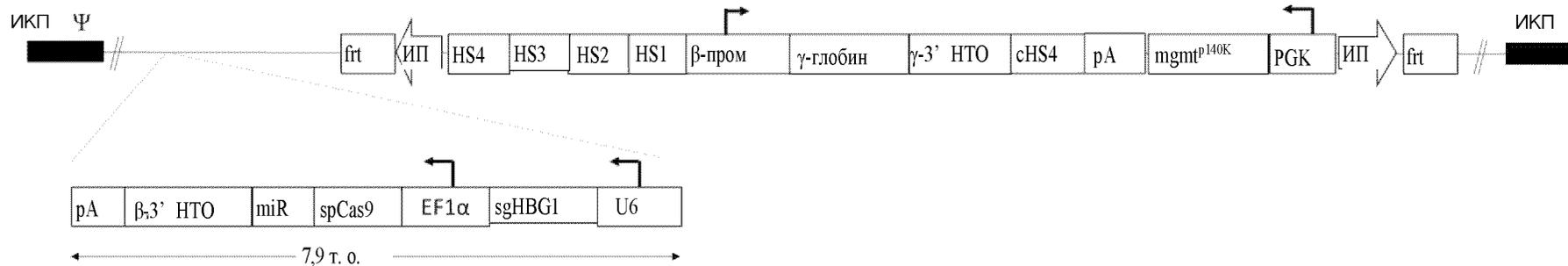
CRISPR-Cas9-опосредованная повторная активация фетального γ -глобина



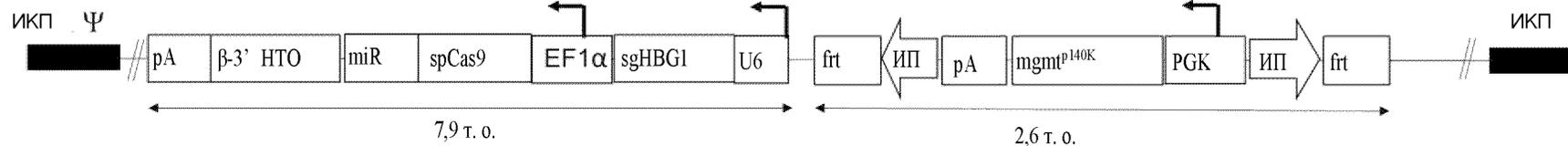
локус β -глобина

Фиг. 101

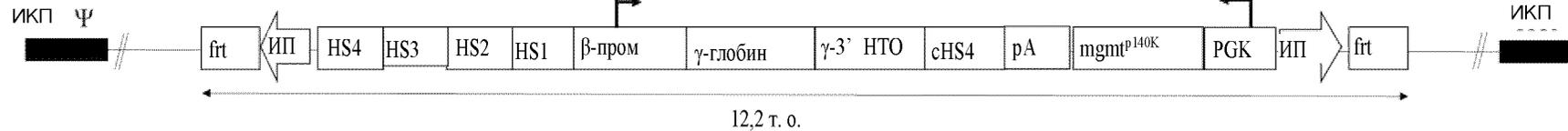
HDAAd-комбо («комбо»)



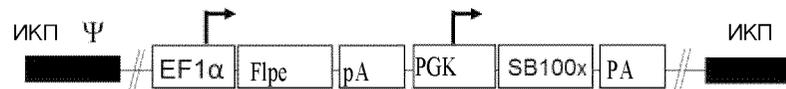
HDAAd-CRISPR («фазрез»)



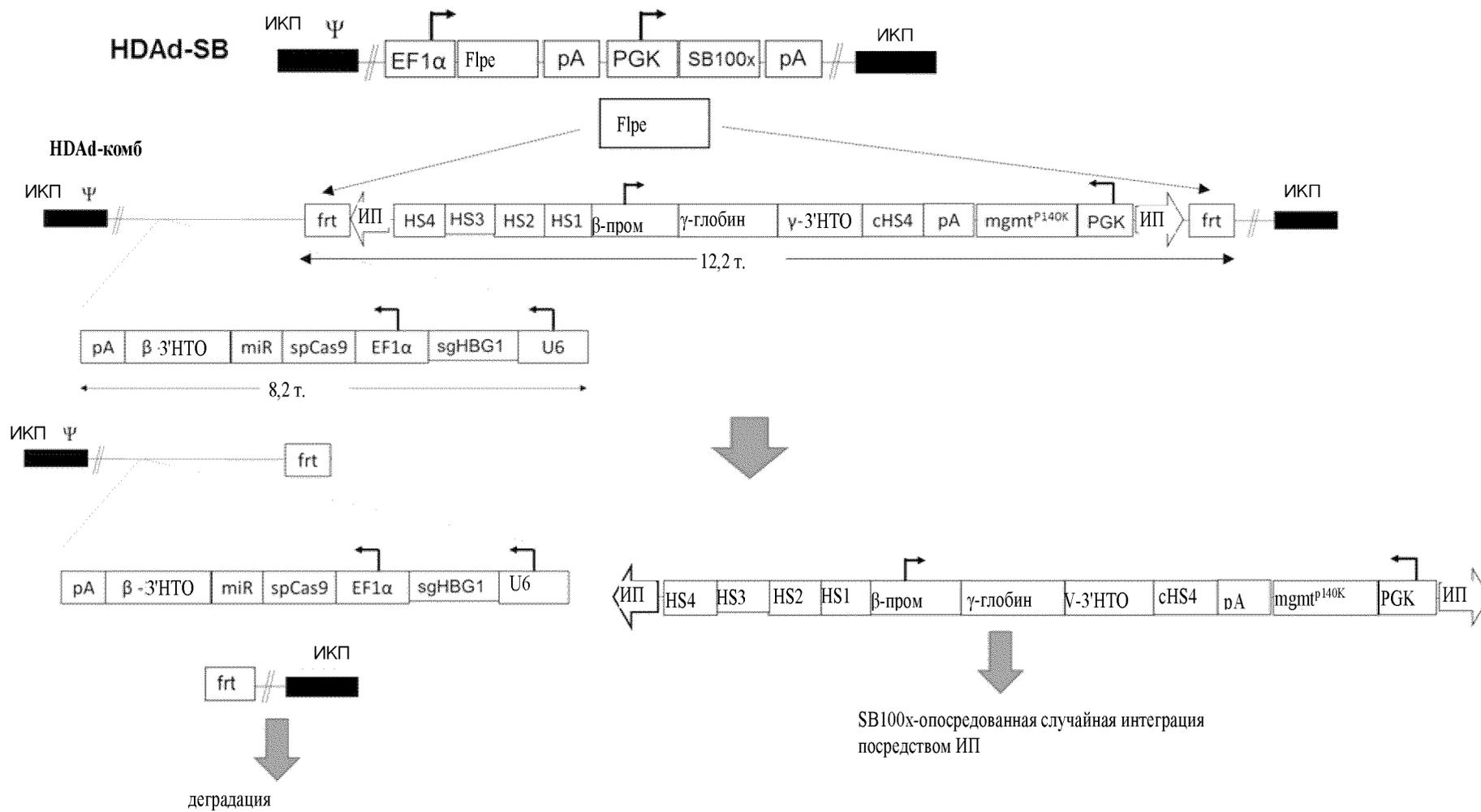
HDAAd-SB-добавление («добавление»)



HDAAd-SB

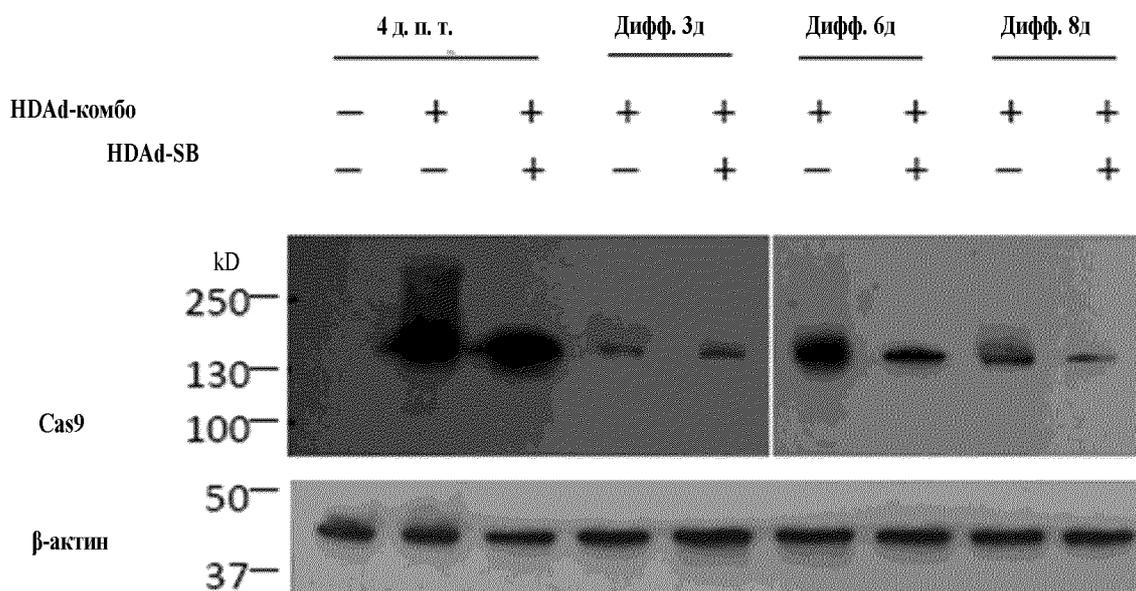


Фиг. 102

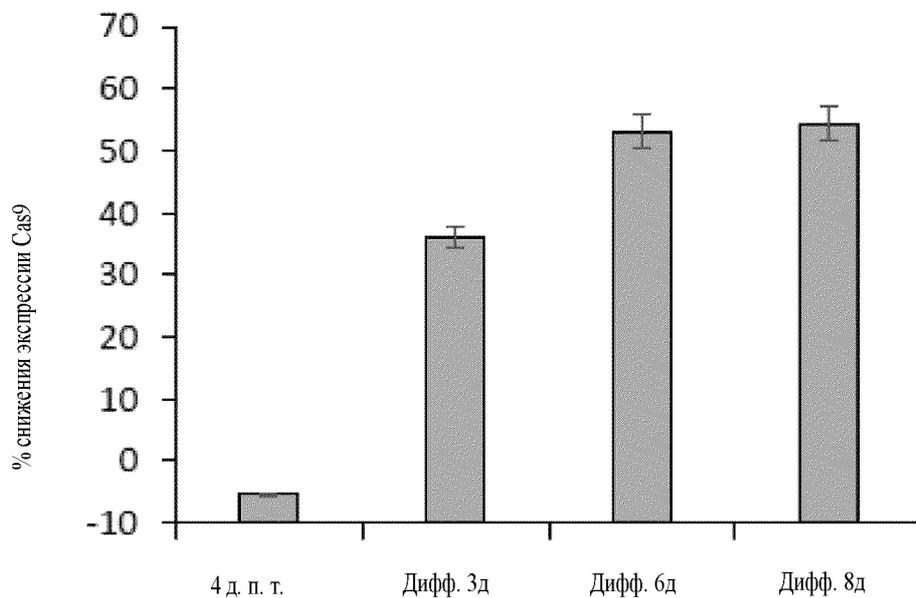


244/350

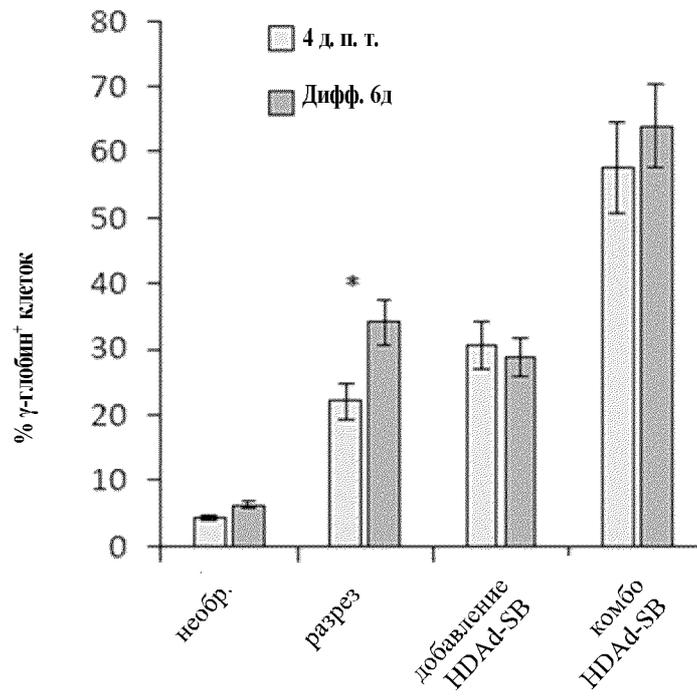
Фиг. 103А



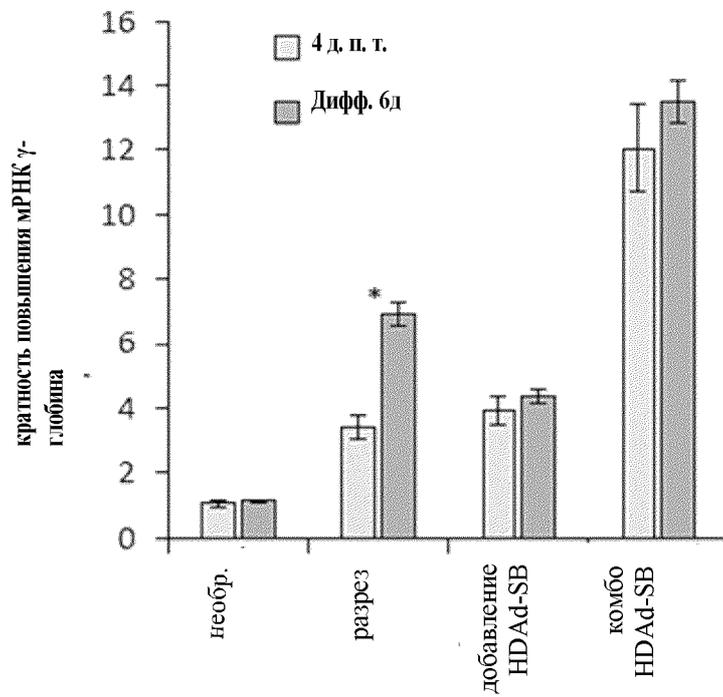
Фиг. 103В



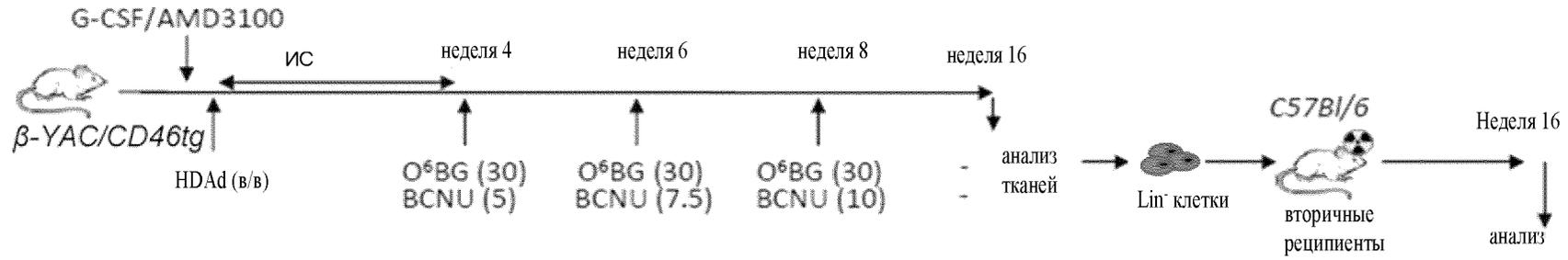
Фиг. 103С



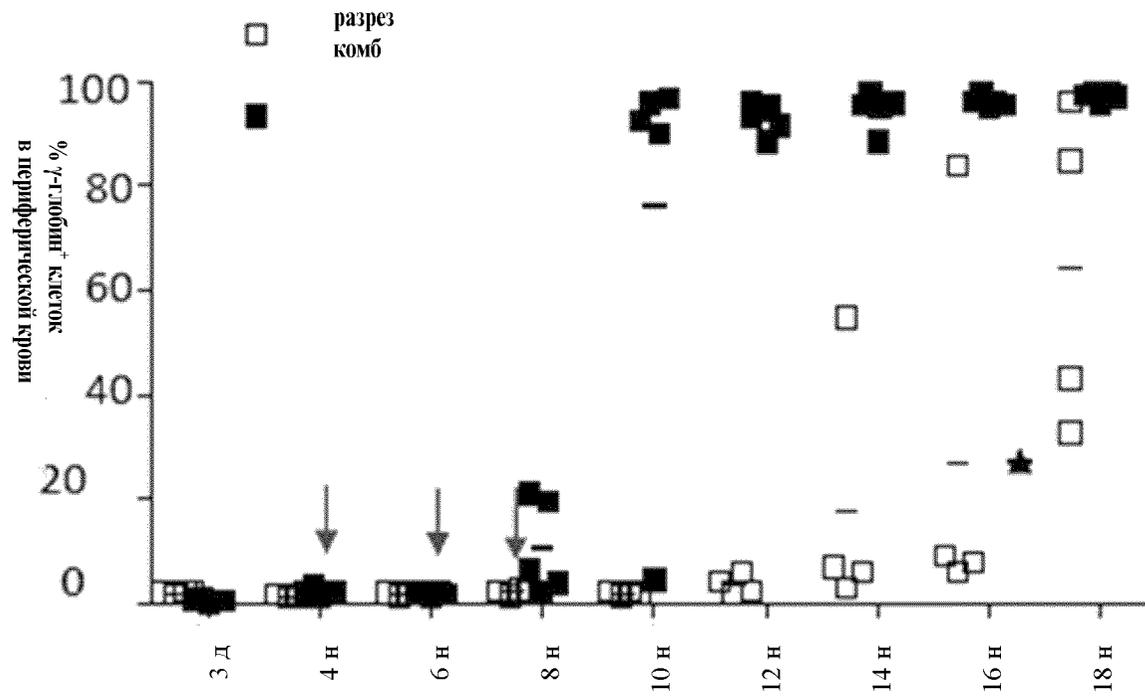
Фиг. 103D



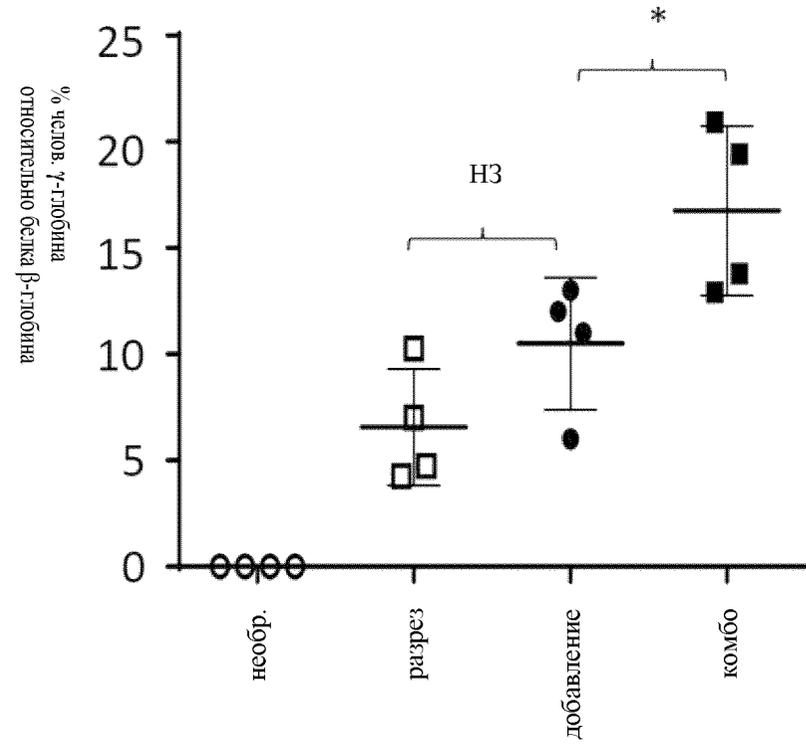
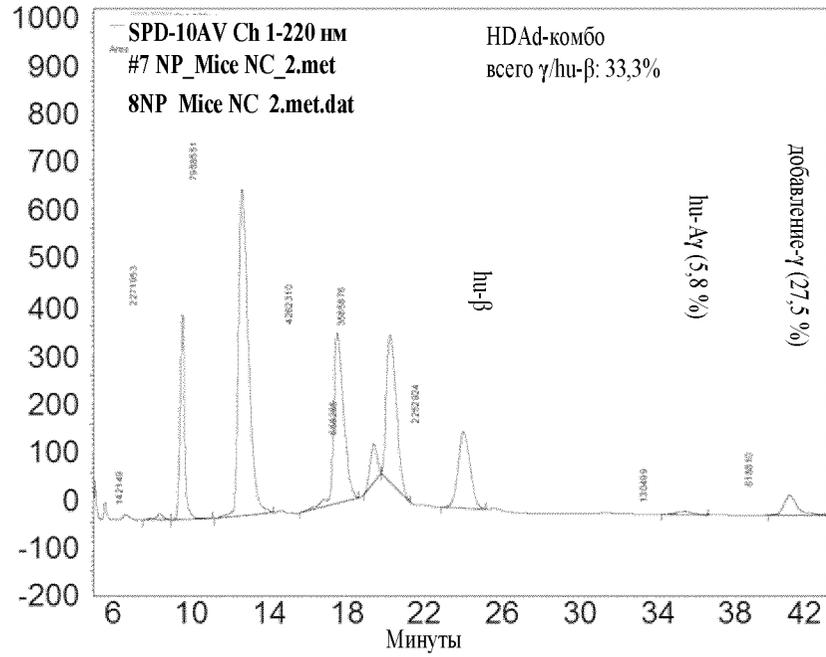
Фиг. 104А



Фиг. 104В

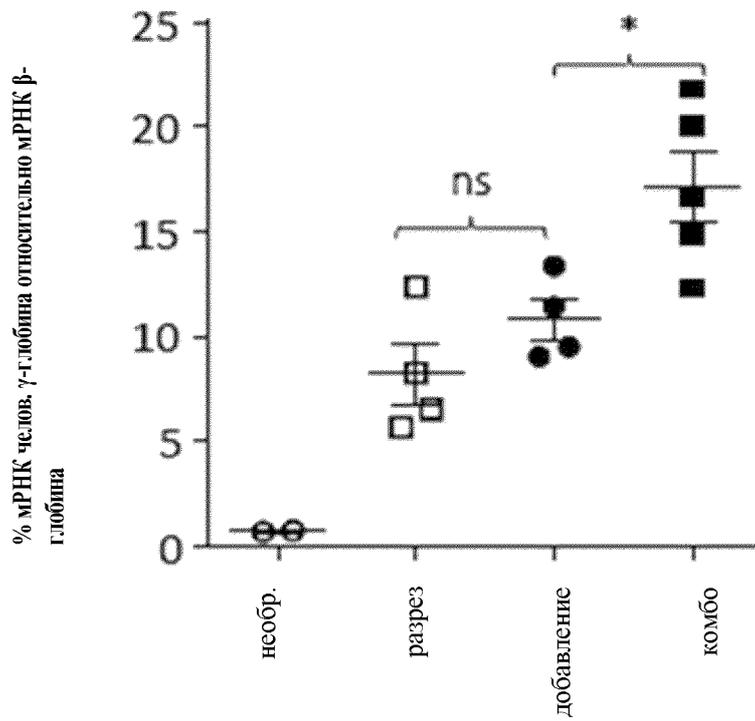


Фиг. 104С

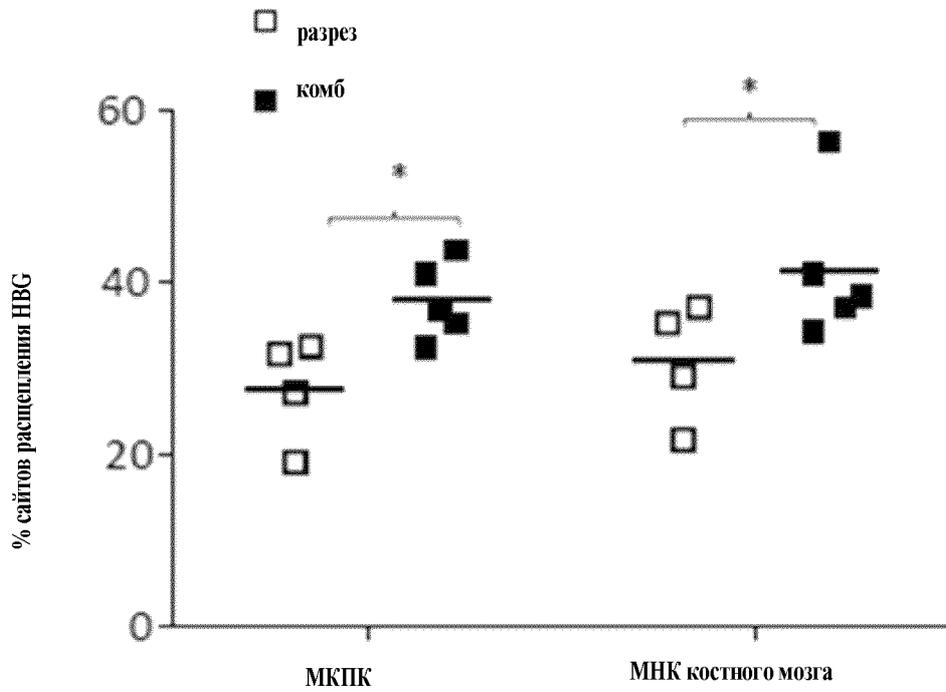


247/350

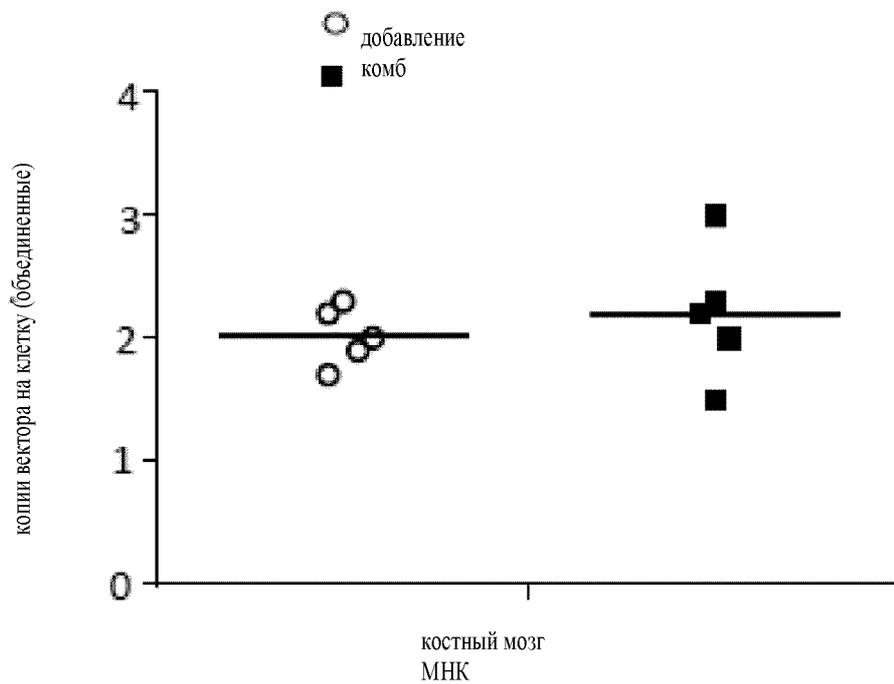
Фиг. 104D



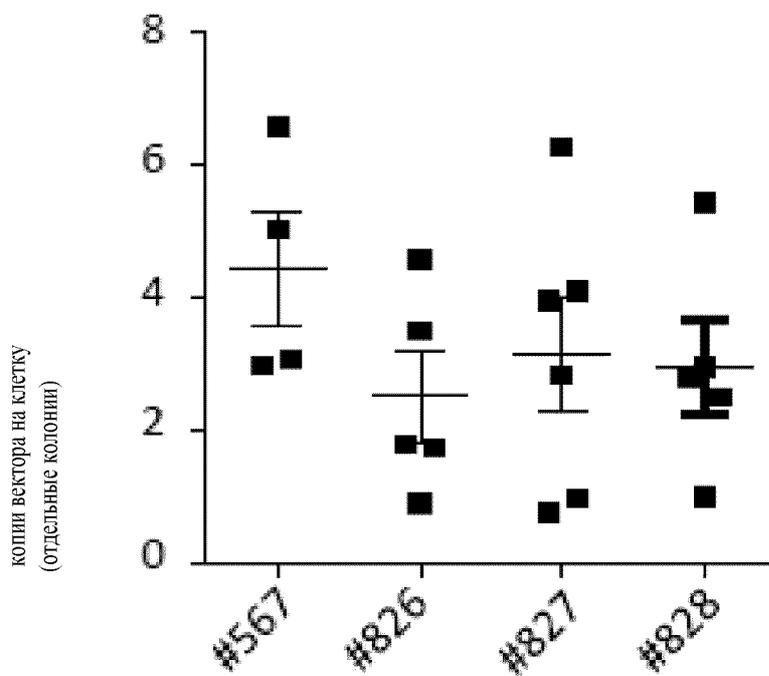
Фиг. 104E



Фиг. 104F

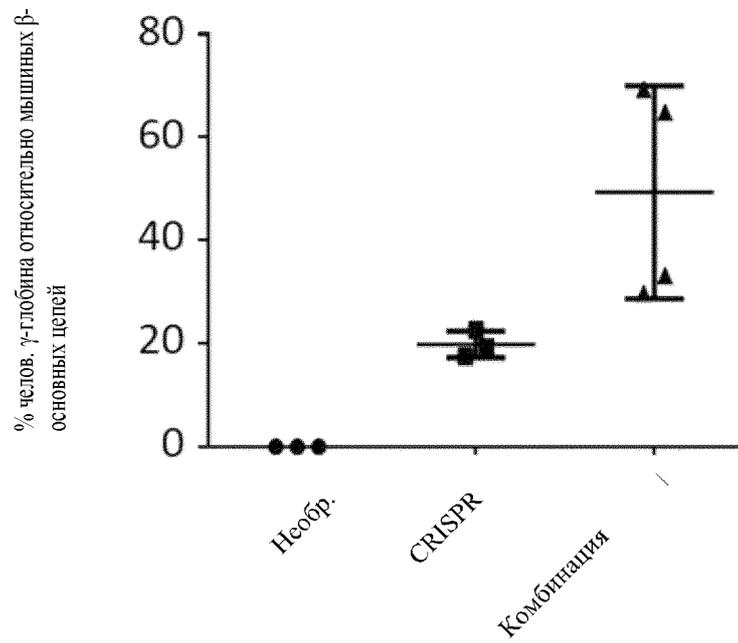


Фиг. 104G

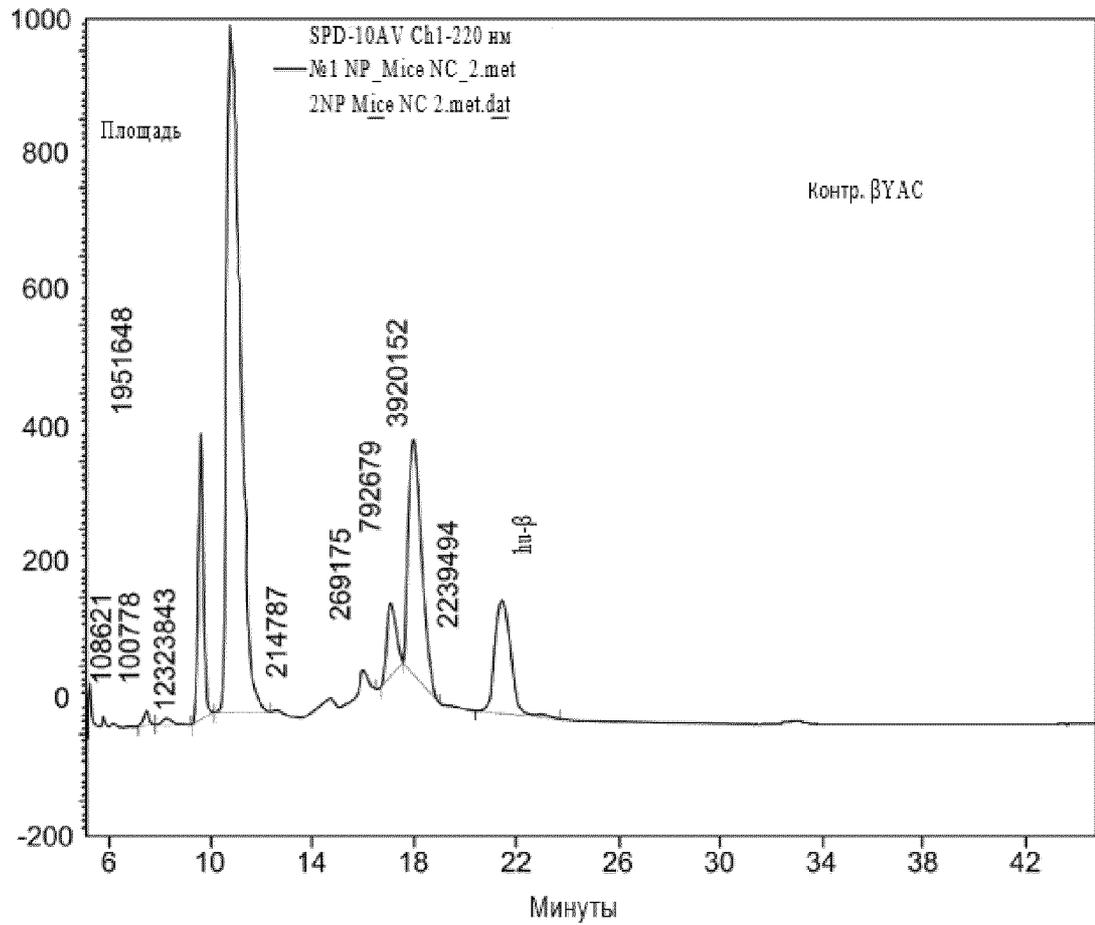


250/350

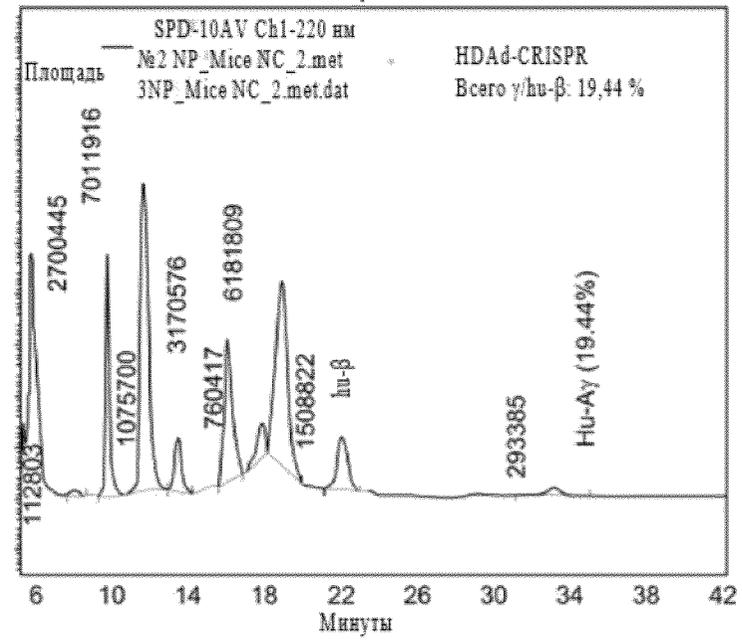
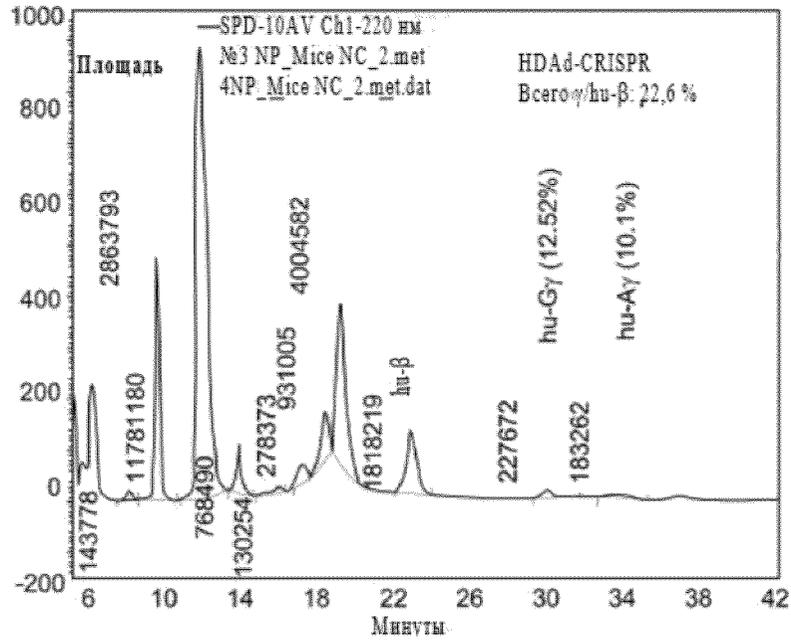
Фиг. 104Н



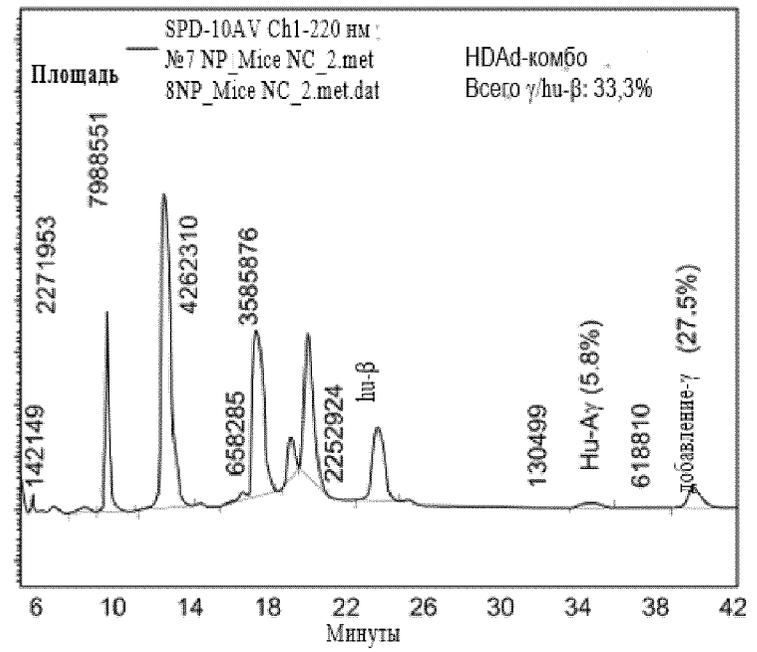
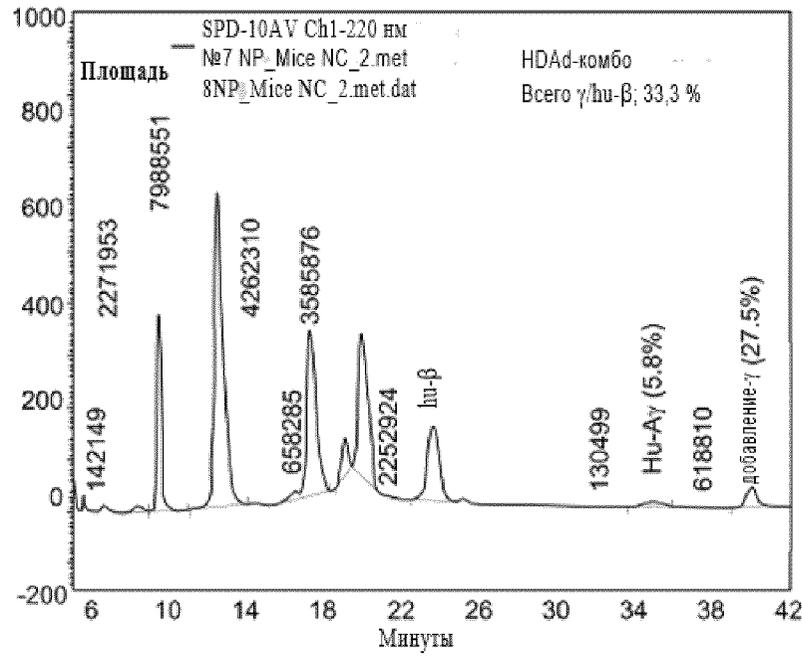
Фиг. 105



Фиг. 105, продолж.



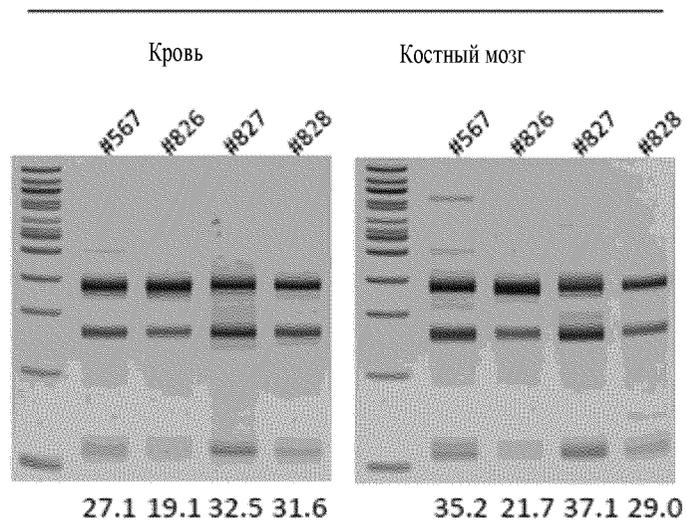
Фиг. 105, продолж.



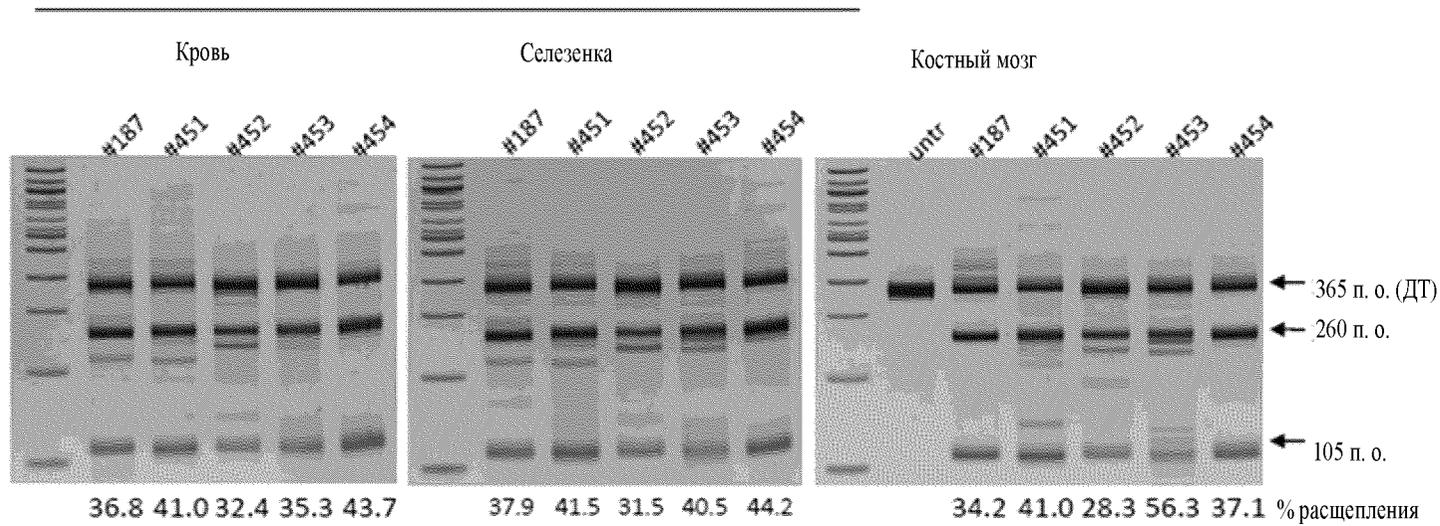
252/350

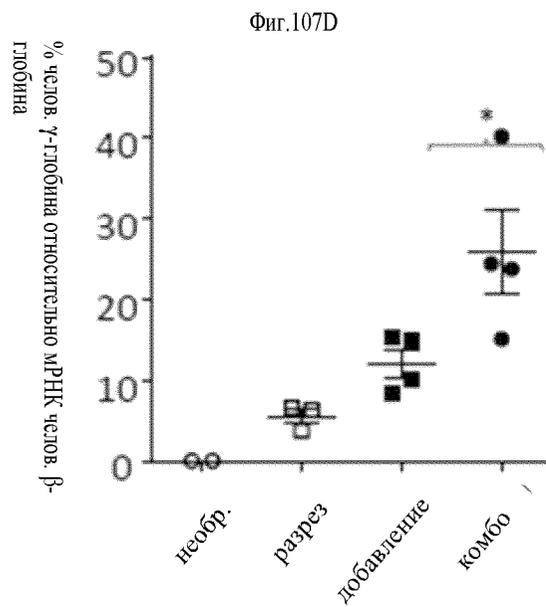
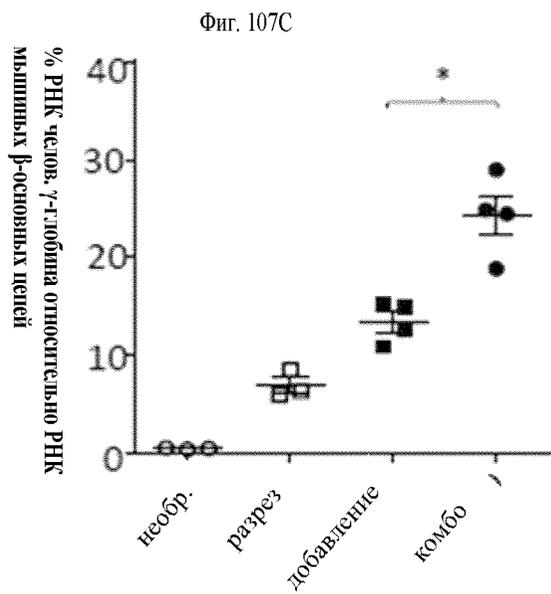
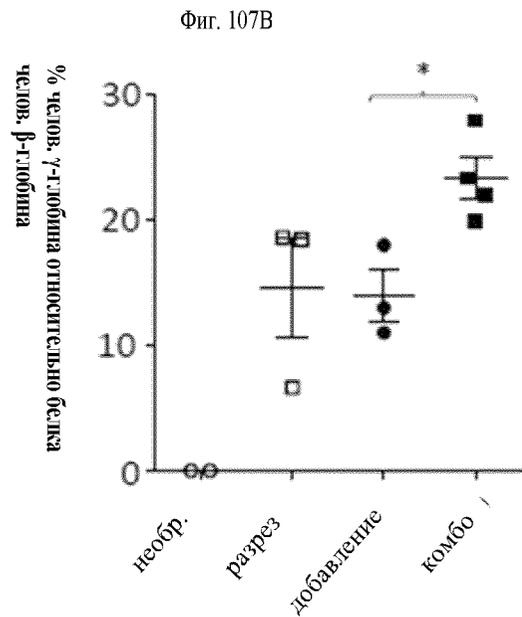
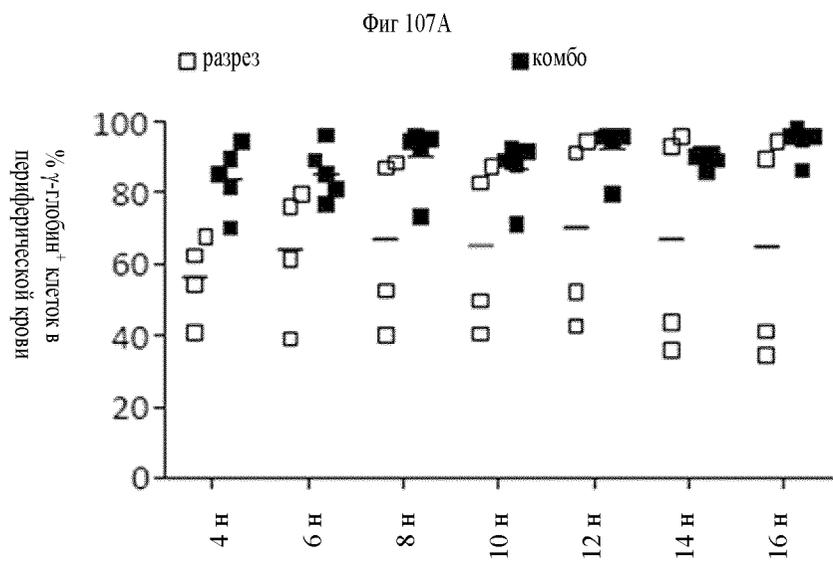
Фиг. 106

«разрез» HDAd-CRISPR

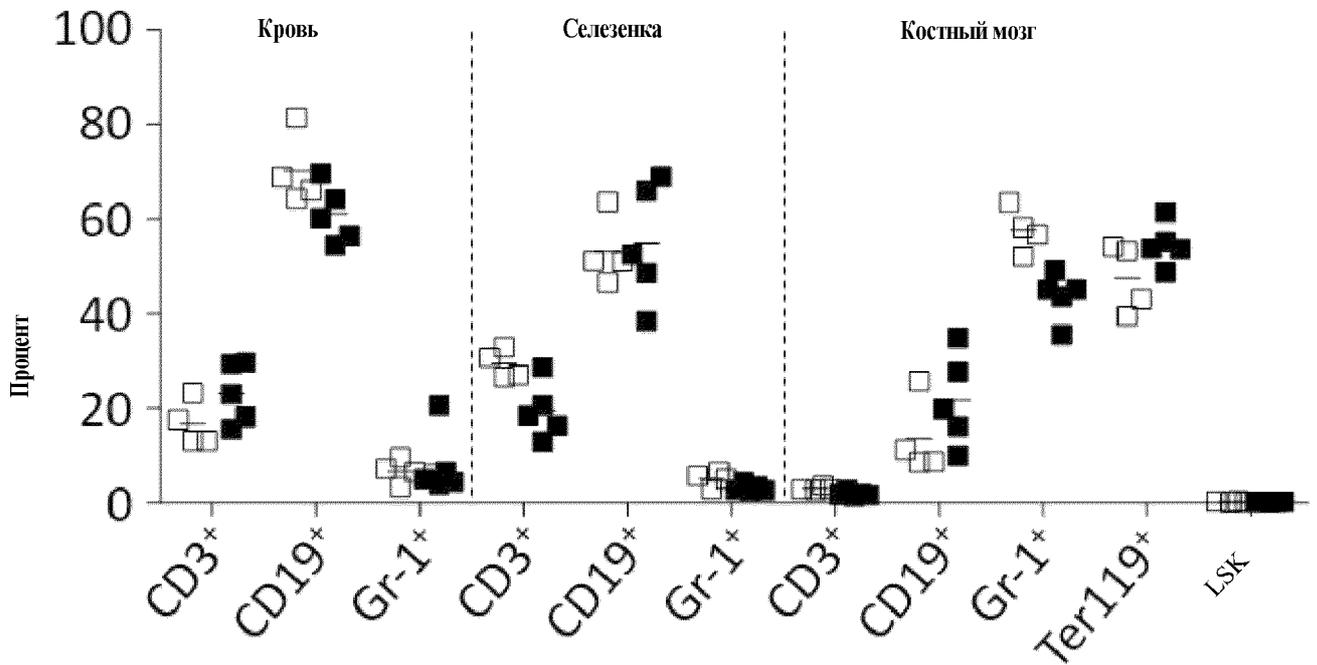


«комбо» HDAd-комбо

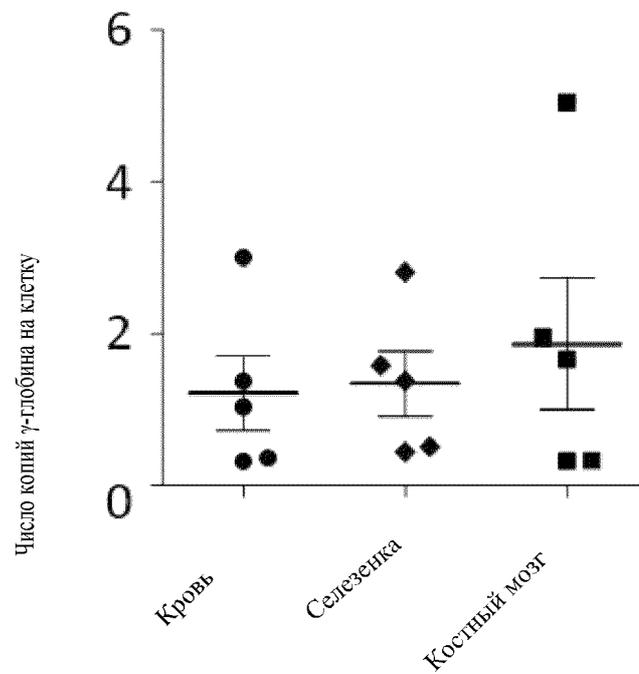




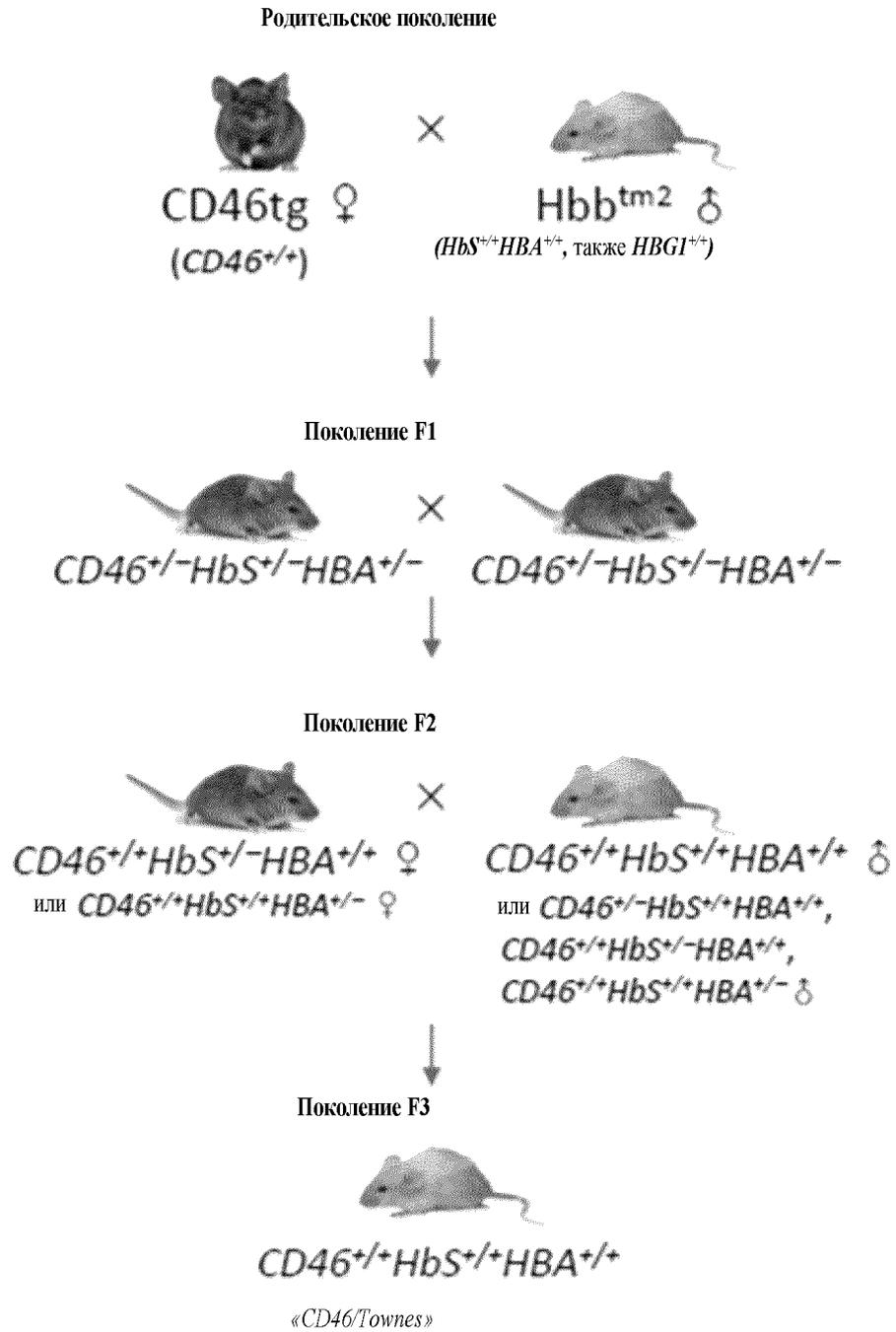
Фиг. 107E



Фиг. 107F

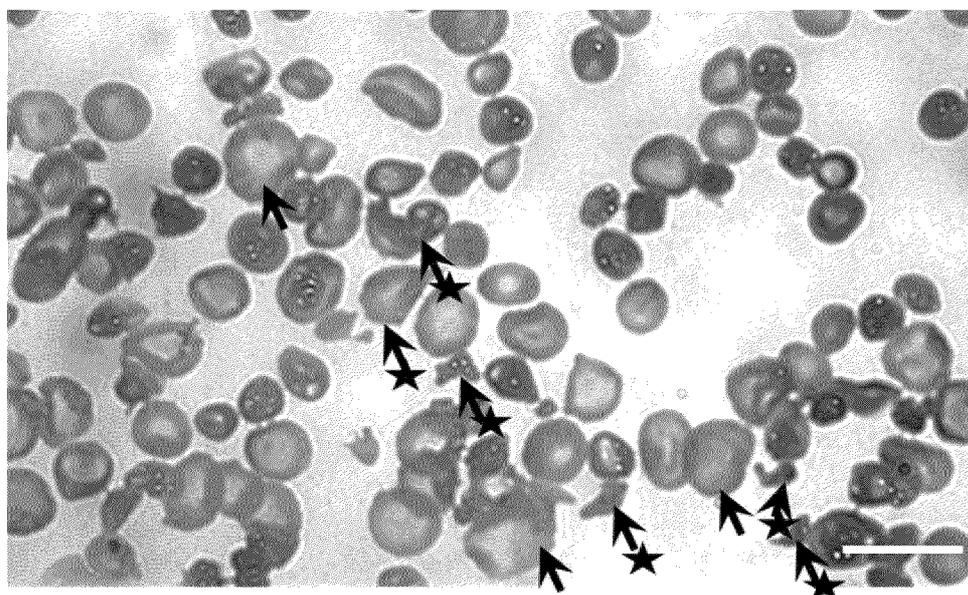


Фиг. 108А

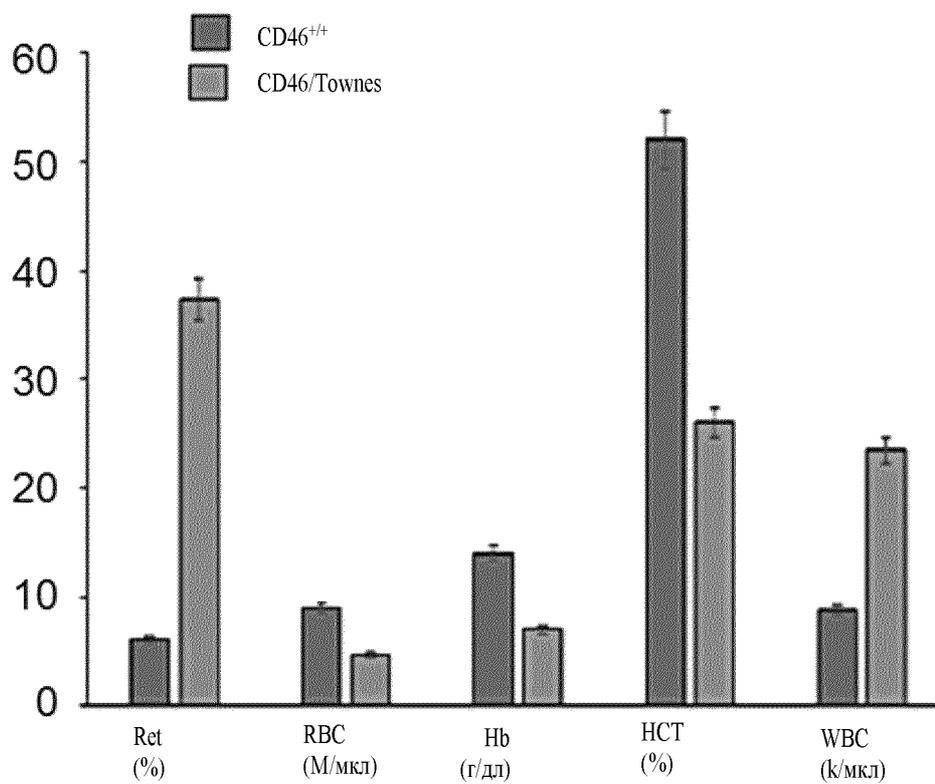


257/350

Фиг. 108В

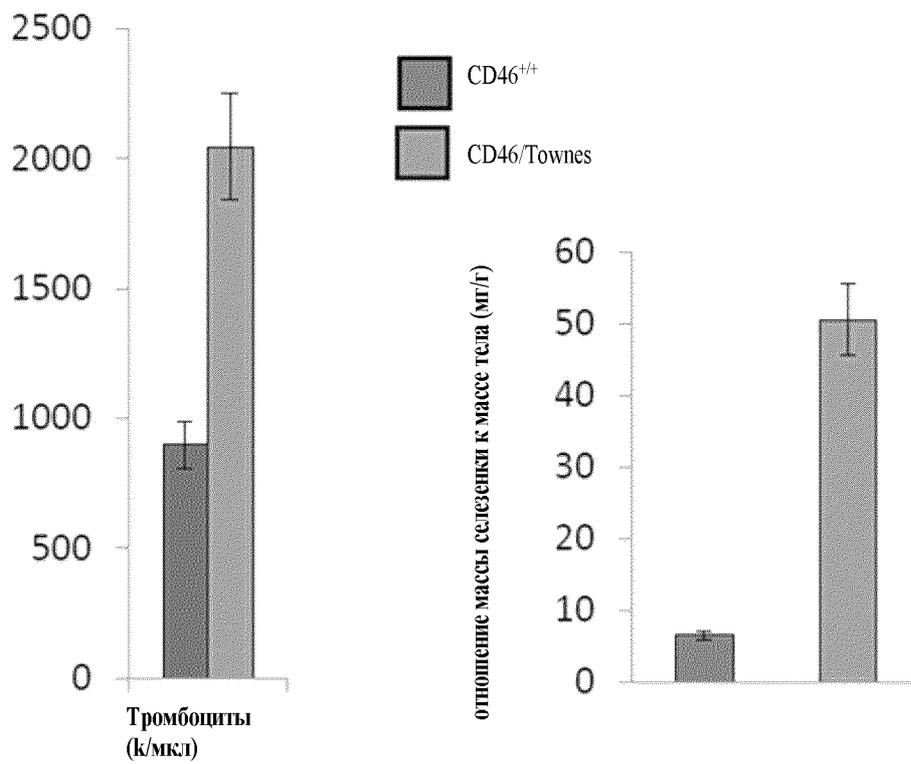


Фиг. 108С

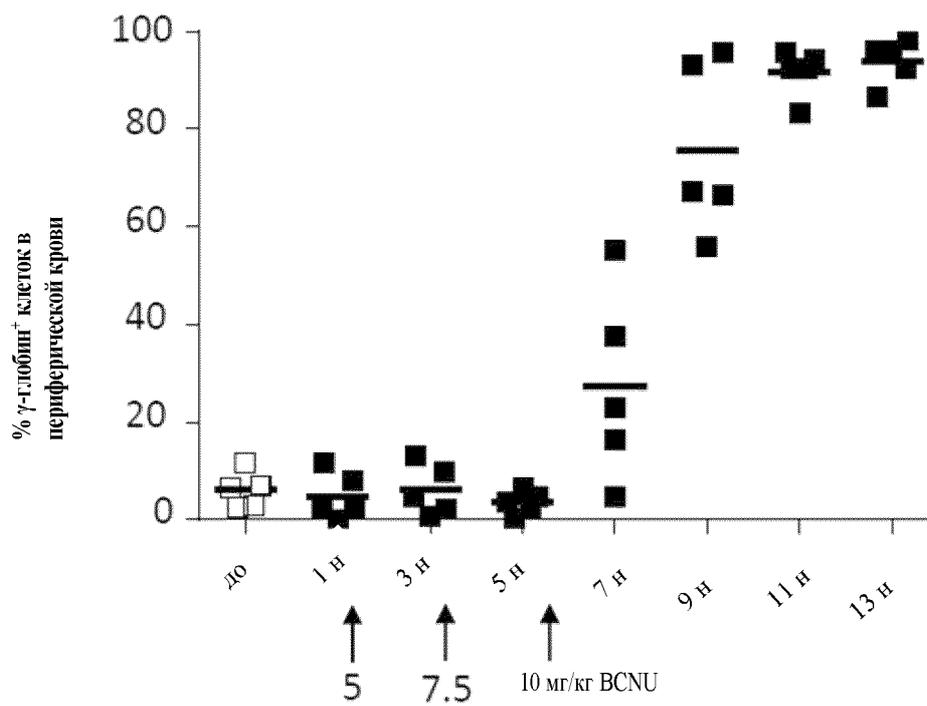


258/350

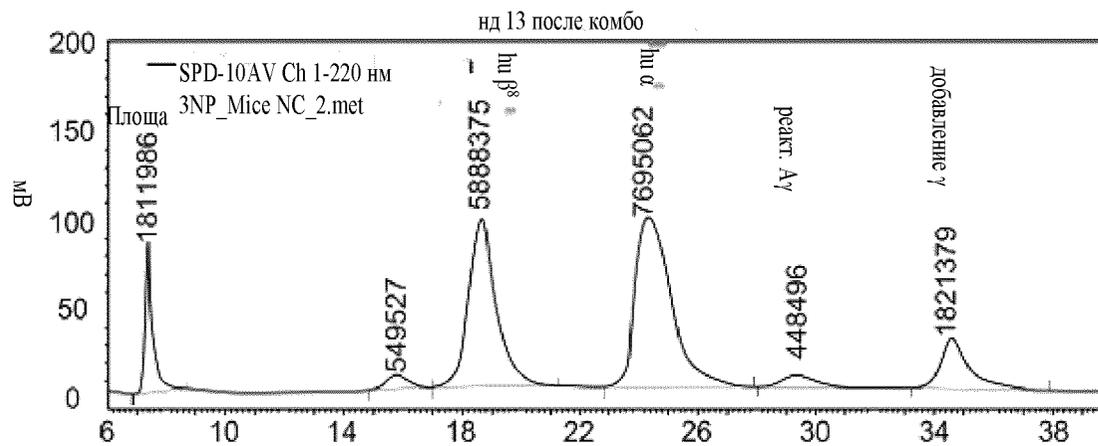
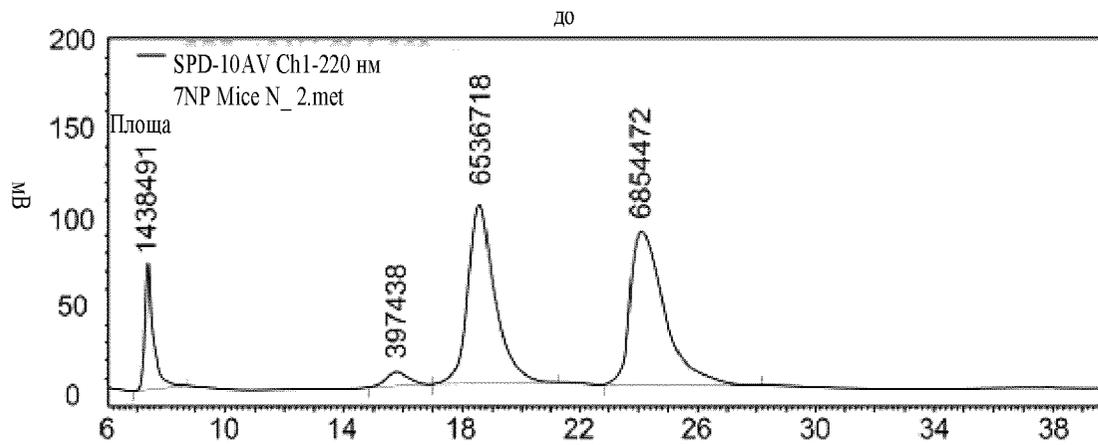
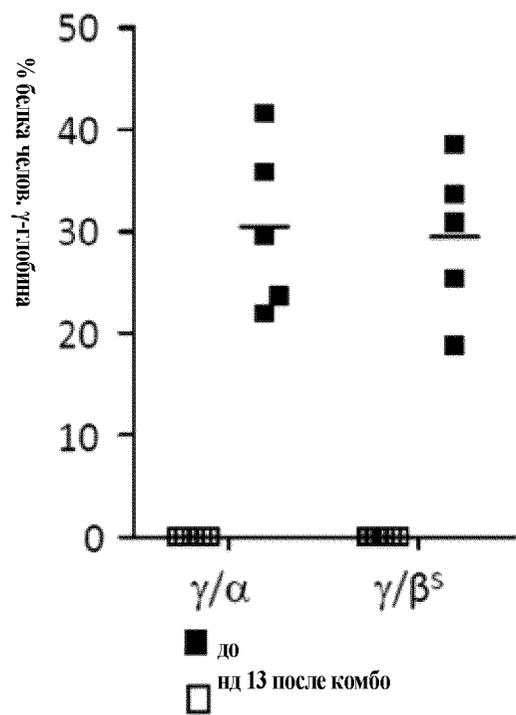
Фиг. 108D



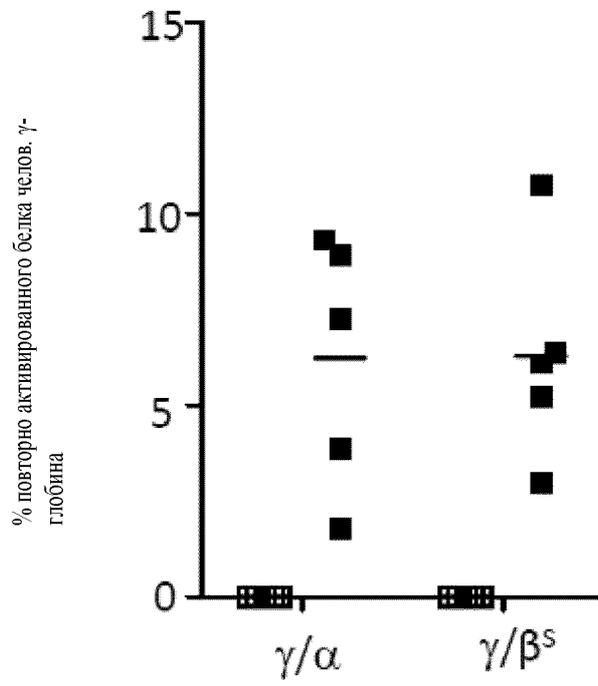
Фиг. 109А



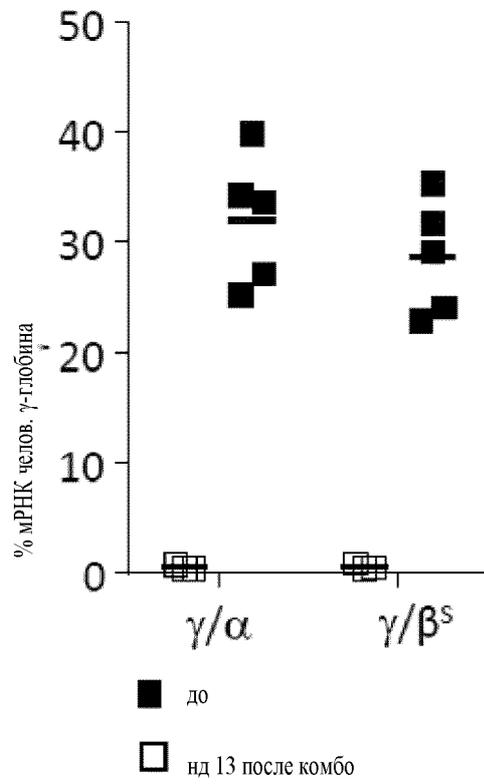
Фиг. 109В



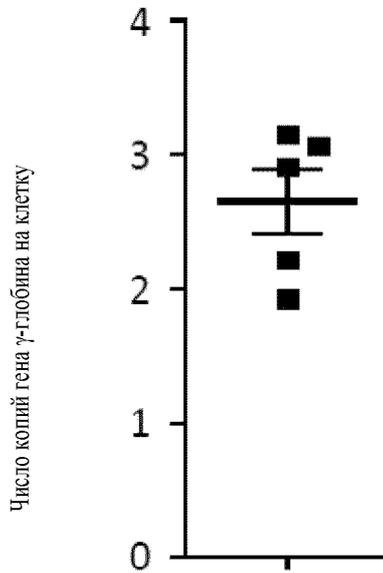
Фиг. 109С



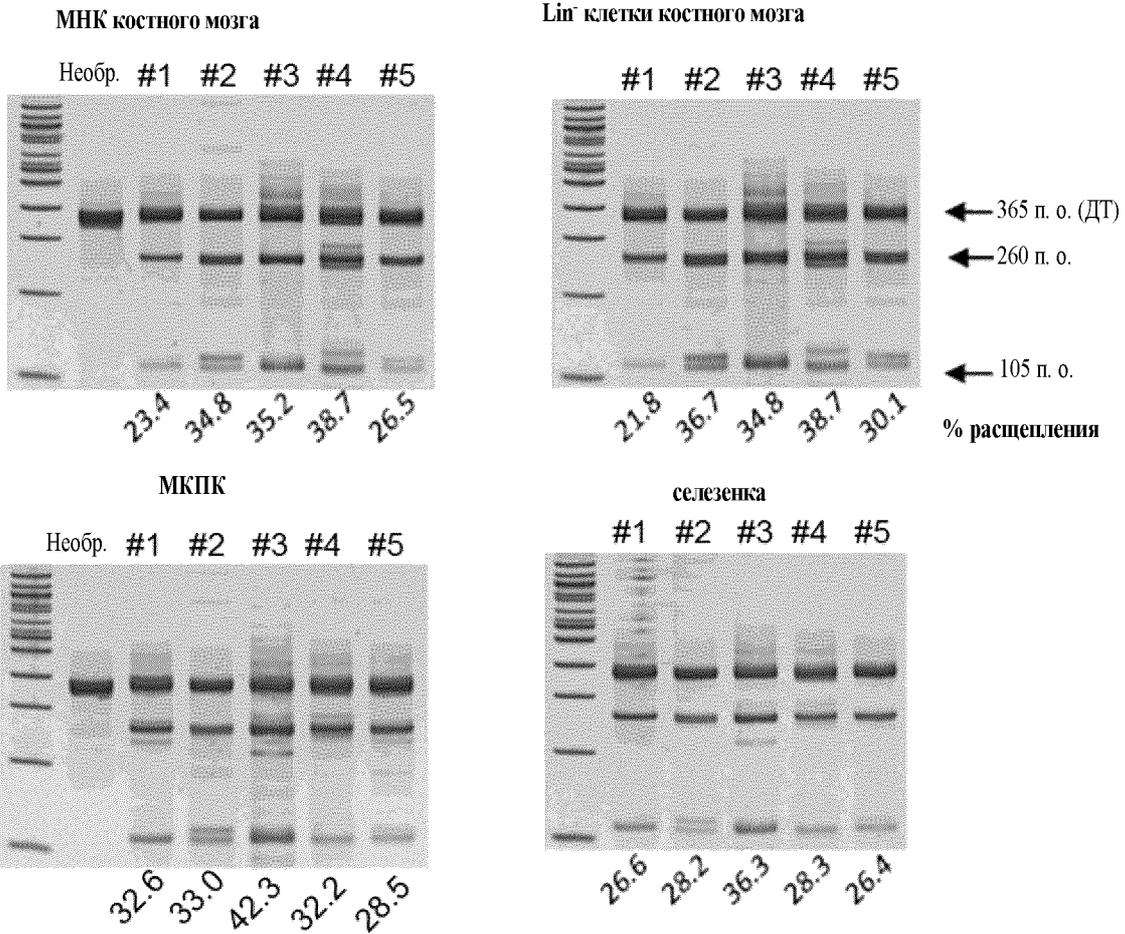
Фиг. 109D



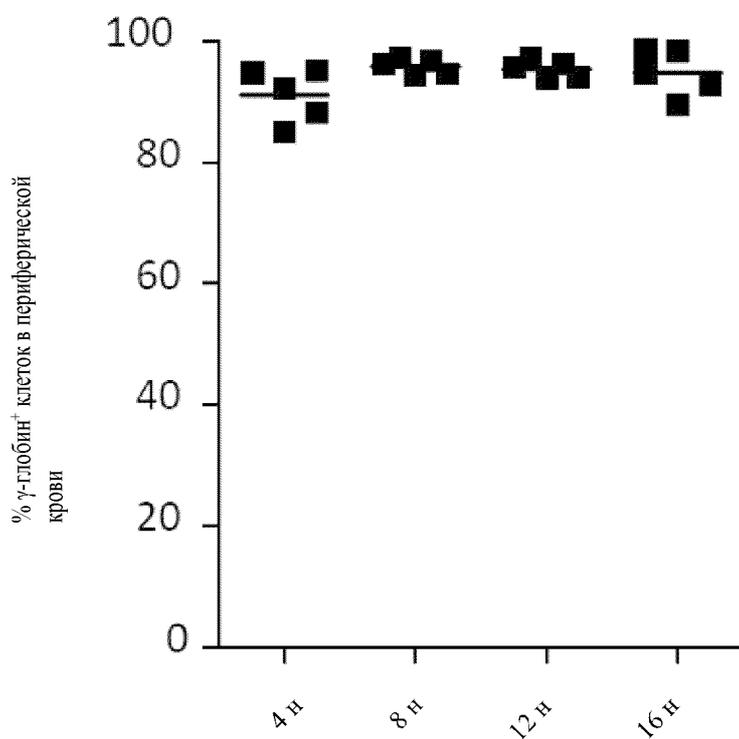
Фиг. 109Е



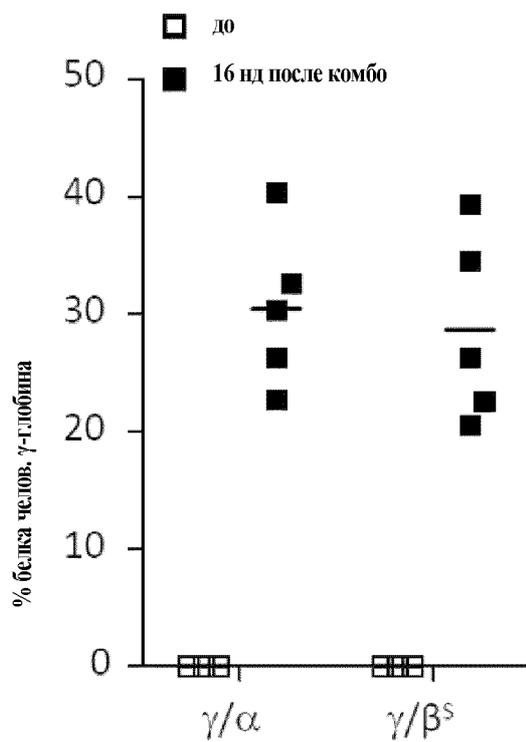
Фиг. 109F



Фиг. 110А



Фиг. 110В



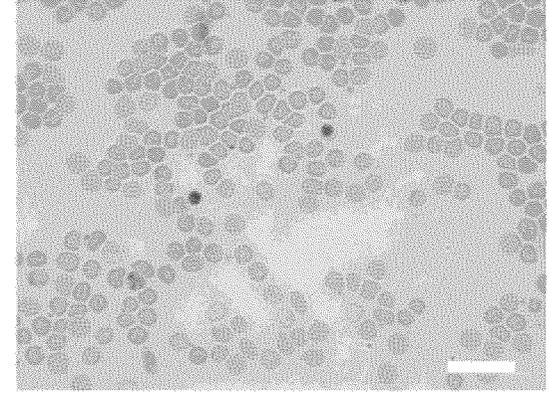
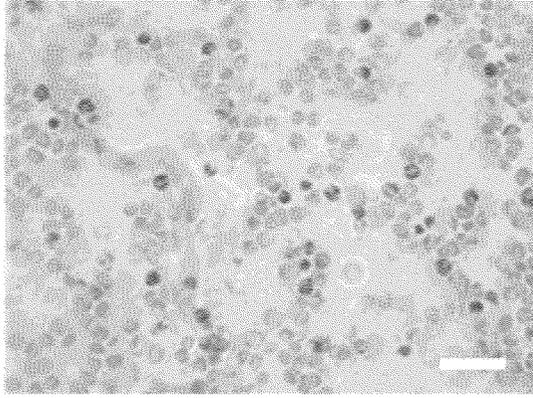
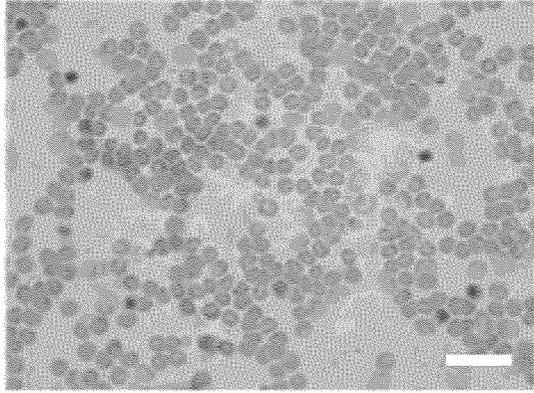
ретикулоциты

Фиг. 111А

CD46

CD46/Townes
до

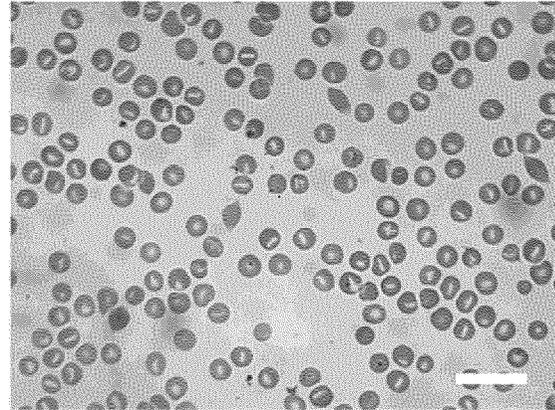
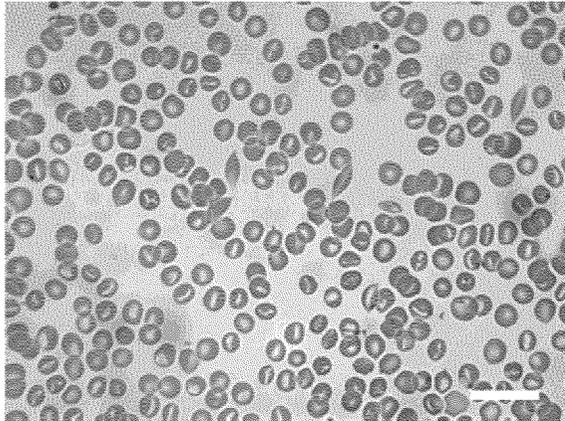
CD46/Townes
нд 13 после комбо



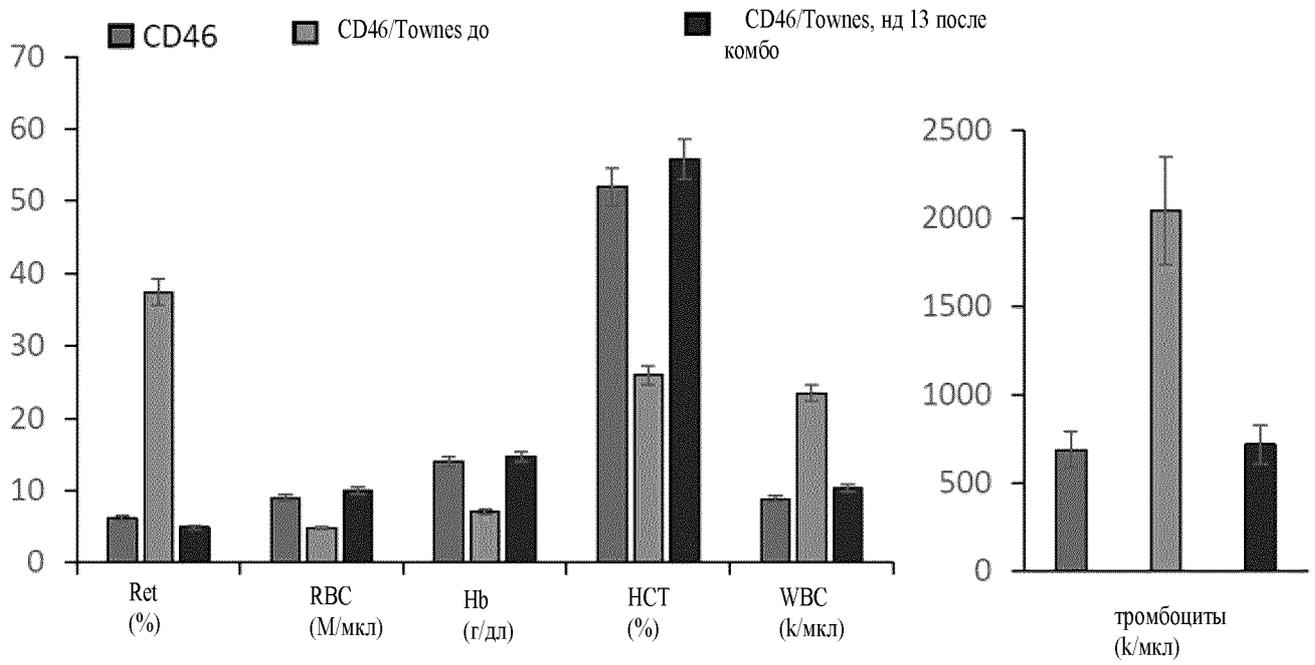
Фиг. 111В

CD46

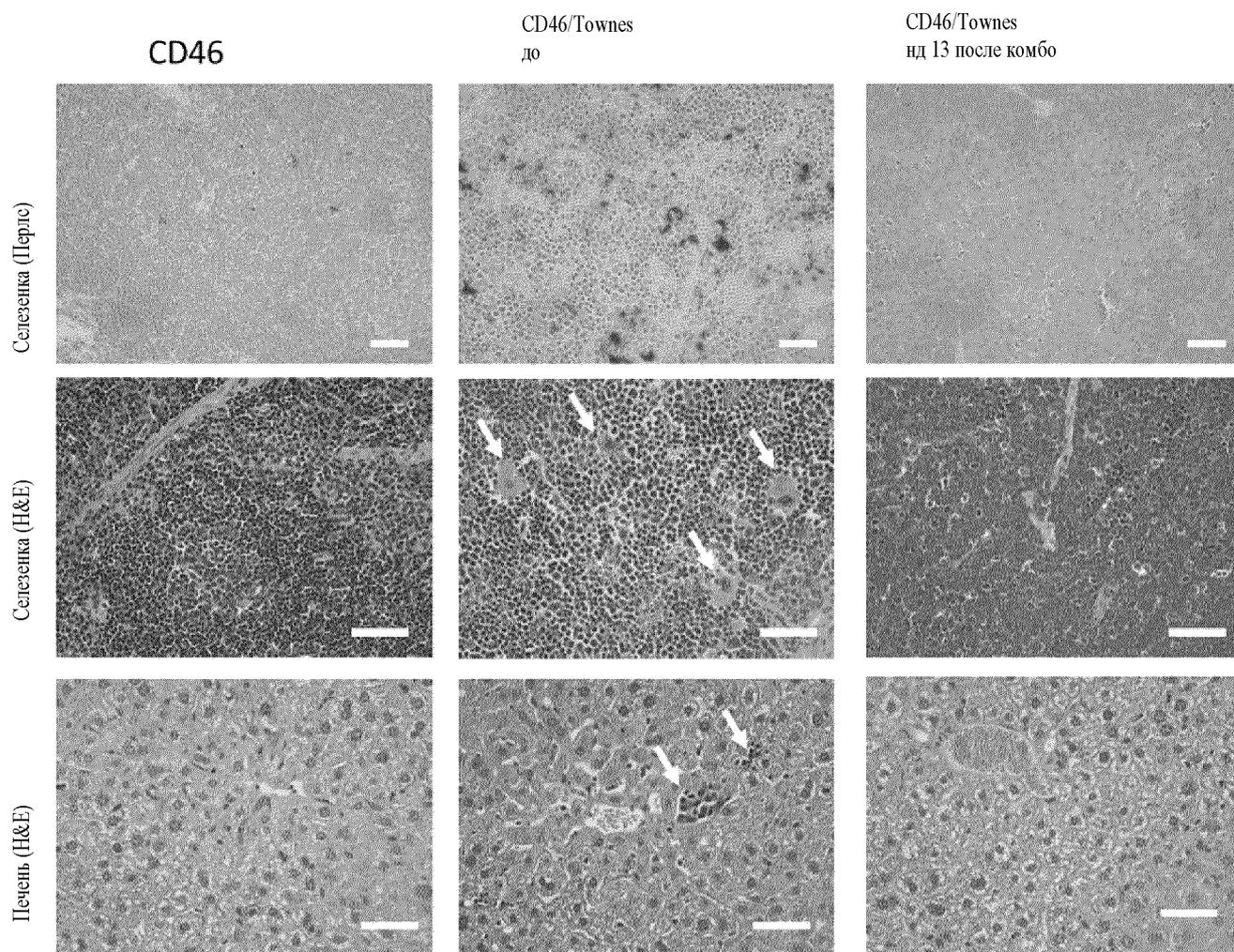
CD46/Townes
нд 13 после комбо



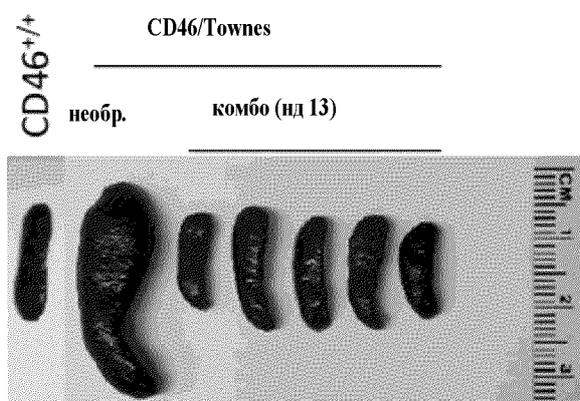
Фиг. 111С



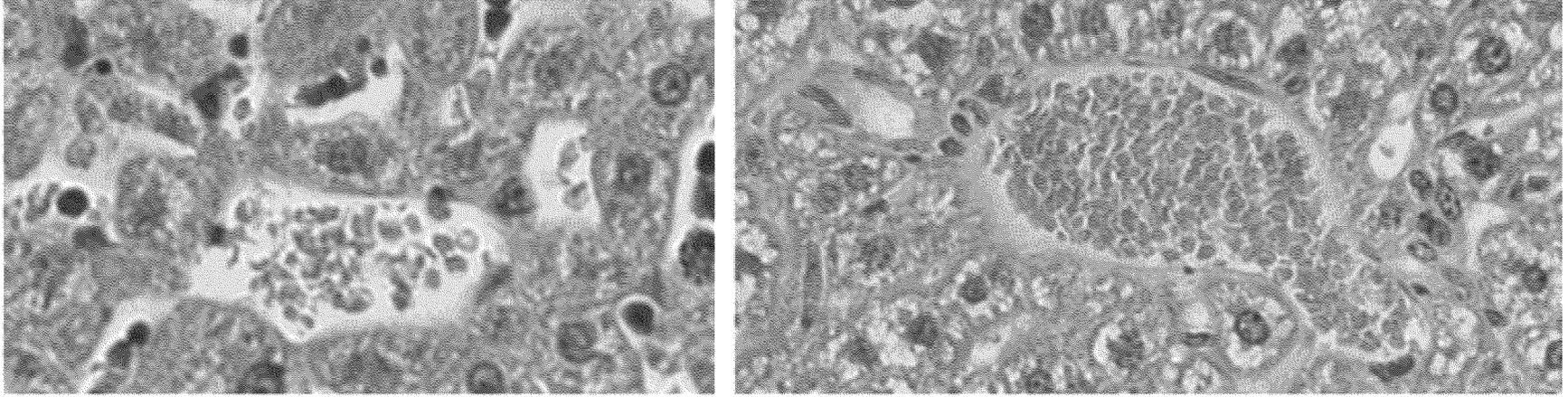
Фиг. 112А



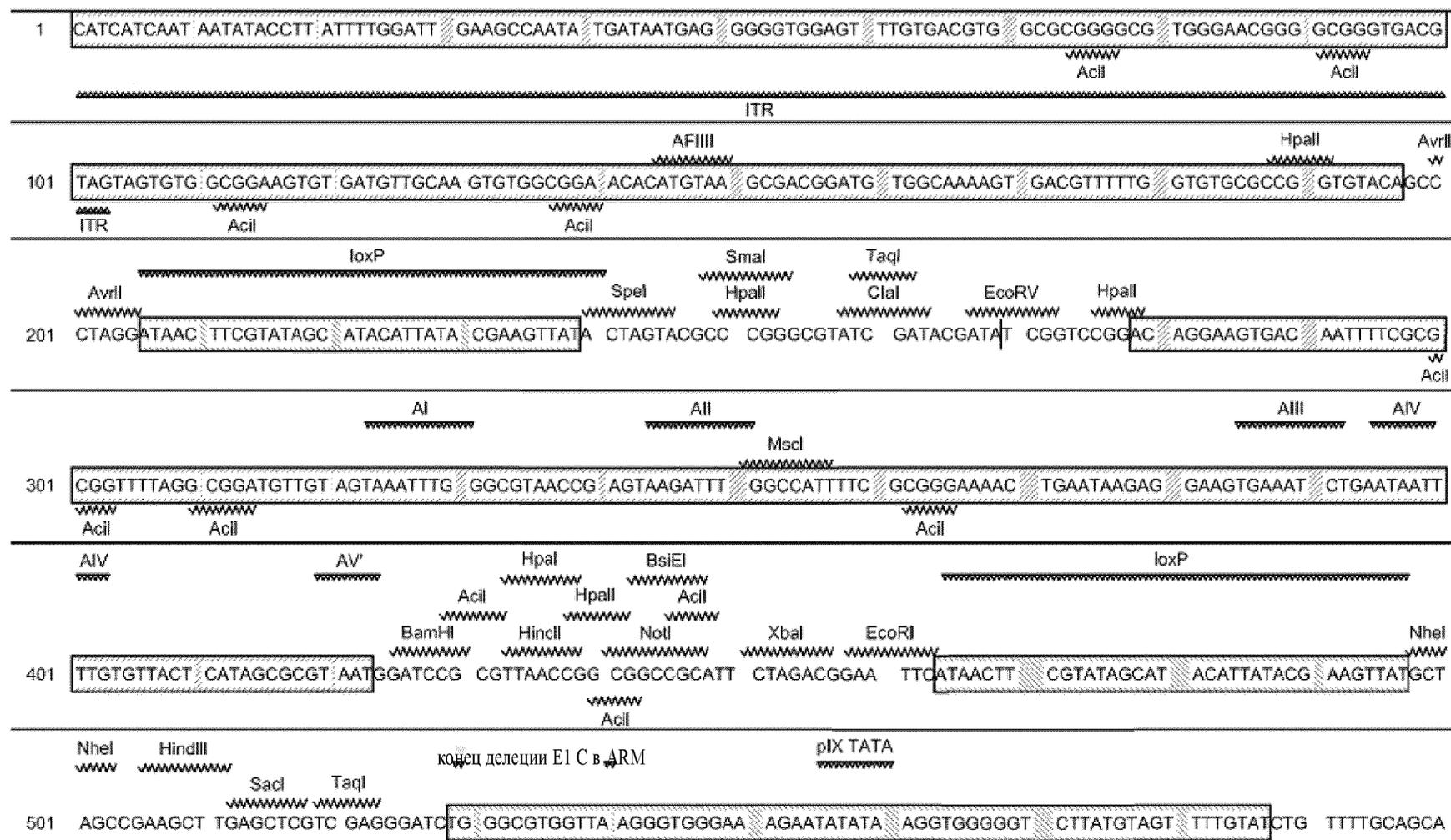
Фиг. 112В



Фиг. 112С



Фиг. 113



267/350

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 Ad5 CATCATCAATAATATACCTTATT-TTGGATTGAAGCCAAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGCGCGGGCGTGGGACGGGGCGGGTGACG-----TAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATG
 Ad35 CATCATCAATAATATACCTTATAGATGGAAATGGTGCCAAATATGTAATGAGGTGATTTTAAAAAGTGTGGGCCGTGTGGTGATTGGCTGTGG-GGTTAACGGTTAAAGGGGGCGCGCGGCCGTGGGAAA

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 AI 260
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 Ad5 TTG-CAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGC---AAAAGTGACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTACACAGGAAGTGCATTTTTTCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAATTTGGG
 Ad35 ATGACGTTTTATGGGGTGGAGTTTTTTGCAAGTTGTCGCGGGAATGTTACGCATAAAAAG-GCTTCTTTTCTCACGGAACTACTTAGTTTTCCACGGTATTTAACAGGAATGAGGTAGTTTTGAC

261 270 AII 280 290 300 310 AIII 320 AIV 330 340 350 AV 360 370 AVI 380 AVII 390
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 Ad5 CGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGGAARACTGAATAAGAGGAGTGAAT-CTGAATAATTTGTGTTACTCATAGCGCTAATATTTGTCTAGGGCCGCGGGGACTTTGACCGTTTACGTG
 Ad35 CGGATGCAGTGAARATGCTGATTTTCGCGGGAARACTGAAT--GAGGAGTGTTTTCTGAATAATGTGGTATTTATGGCAGGGTGGAGTATTTGTTTCAGGGCCAGGTAGACTTTGACCCATTACGTG

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 Ad5 GAGACT-CGCCCAG-GTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCGGGTCAAGTTGGC-GTTTTATTATTATAGTCAGCTGACGTGTAGTGTATTTATACC-CGGTGAGTTCTCAAGAGGCCACTCTTG
 Ad35 GAGGTTTCGATTACCGTGTTTTTACCTGAATTT-CCGCGTACCGTGTCAAGTCTTCTGTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCTAGGGTATTTATACCTCAGGGTTTGTGTCAGAGGCCACTCTTG

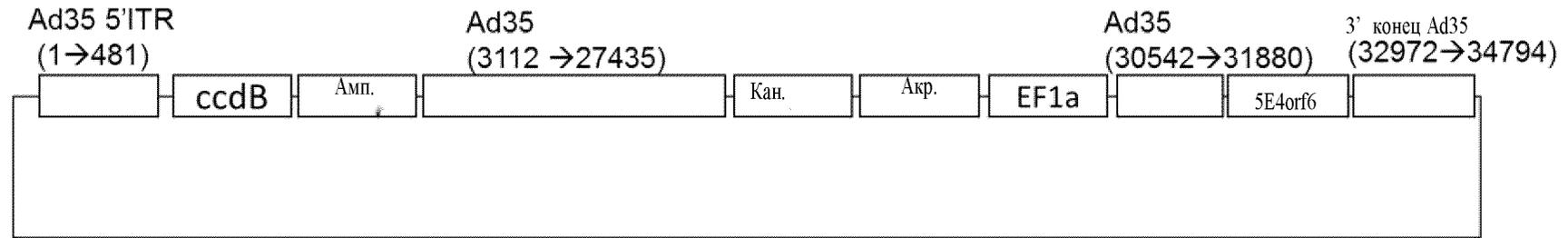
521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 619
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 Ad5 AGTGCCAGCGAGTAGAGTTTTCTCCTCCGAGCCGCTCCGACACCAGGACTGAAATGAGACATAT----TATCTGCCACGGAGGTGTATTACCGAAGA
 Ad35 AGTGCCAGCGAGAGAGTTTTCTCCTCTGCGCCG-GCAGTTTAAATAAAAAAATGAGAGATTTGCGATTTCTGCCTC--AGGAAT

(SEQ ID NO: 49)

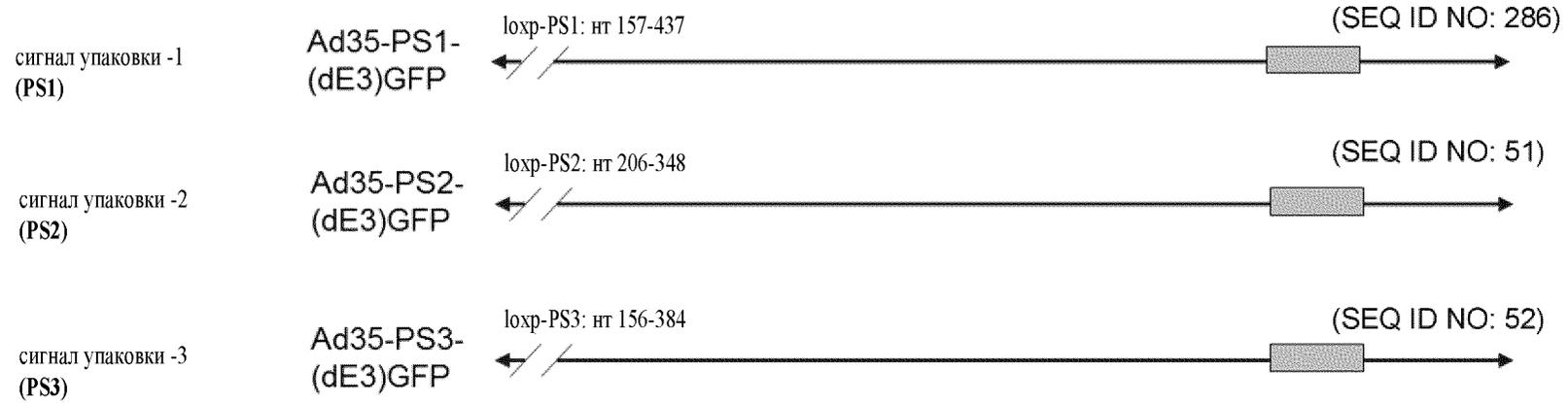
(SEQ ID NO: 50)

268/350

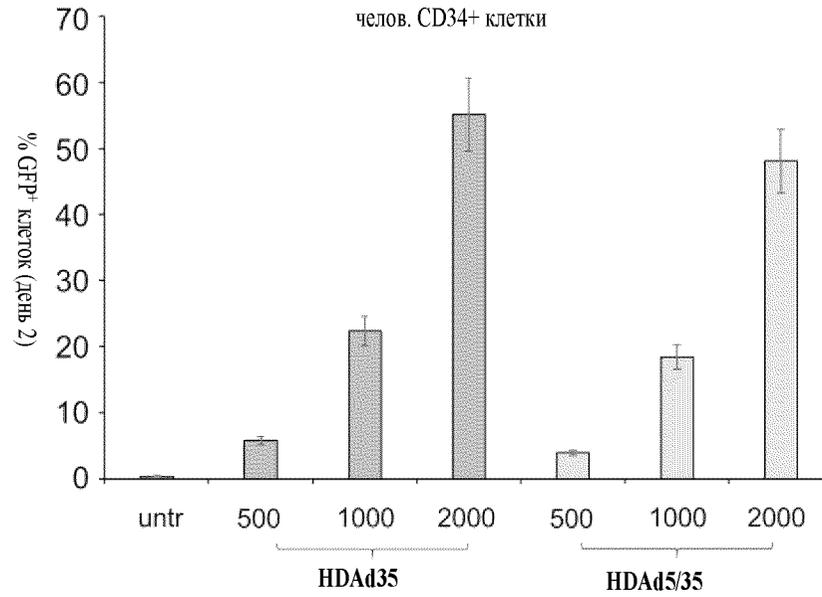
Фиг. 115



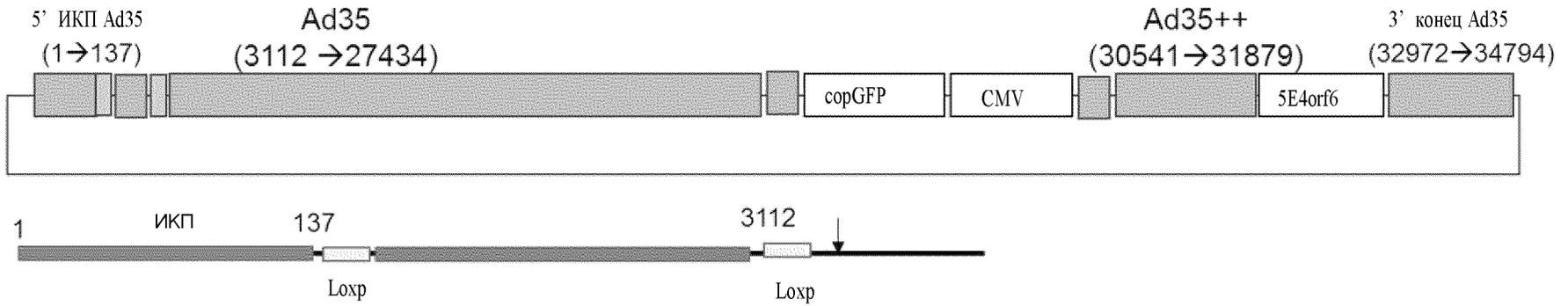
Фиг. 116



Фиг. 117



Фиг. 118



CATCATCAATAATATACCTTATAGATGGAATGGTGCCAATATGTAAATGAGGTGATTTTAAAAAGTGTGGGCCGTGTGGTGATTGG
CTGTGGGGTTAACGGTTAAAAGGGGCGGCGCGGCCGTGGGAAAATGACGTT**ATTTAAAT**TATAACTTCGTATAGCATACATTATA
CGAAGTTATGAGGTAGTTTTGTTTCAGGGGCAAGTGAAAATTGACCCATTACGCGCGAAAAGTGAATGAGGAAGTGTTTTTCTGAA
TAATGTGGTATTTATGGCAGGGTGGAGTATTTGACCGGATCCAGGTAGACTTTGCTGATTTTCGTGGAGGTTTATAACTTCGTATA
GCATACATTATACGAAGTTATATTTAAAT (SEQ ID NO: 264)

ИКП 1 Ad35 → 137 н. о.: (позиции 1-137 в SEQ ID NO: 264)

CATCATCAATAATATACCTTATAGATGGAATGGTGCCAATATGTAAATGAGGTGATTTTAAAAAGTGTGGGCCGTGT
GGTGATTGGCTGTGGGGTTAACGGTTAAAAGGGGCGGCGCGGCCGTGGGAAAATGACGTT

Сайт SwaI: (позиции 146-145 и 363-370 в SEQ ID NO: 264)

ATTTAAAT

Сайт LoxP: (позиции 138-179 и 329-362 в SEQ ID NO: 264)

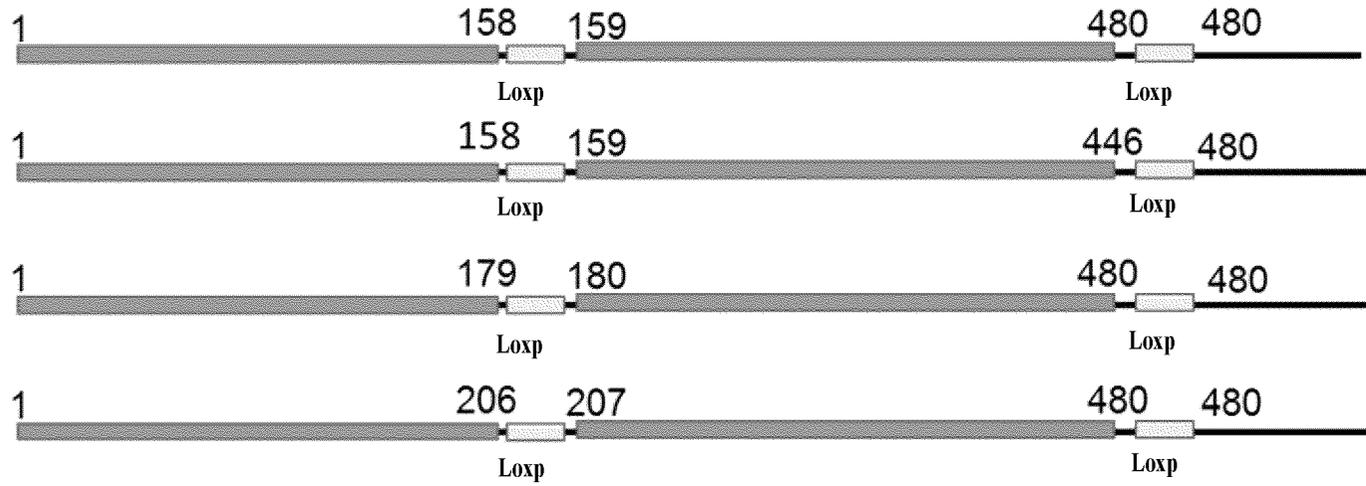
ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT

Мутированный сигнал упаковки: (позиции 138-145 в SEQ ID NO: 264)

GAGGTAGTTTTGTTTCAGGGGCAAGTGAAAATTGACCCATTACGCGCGAAAAGTGAATGAGGAAGTGTTTTTCTGAAT
AATGTGGTATTTATGGCAGGGTGGAGTATTTGACCGGATCCAGGTAGACTTTGCTGATTTTCGTGGAGGTTT

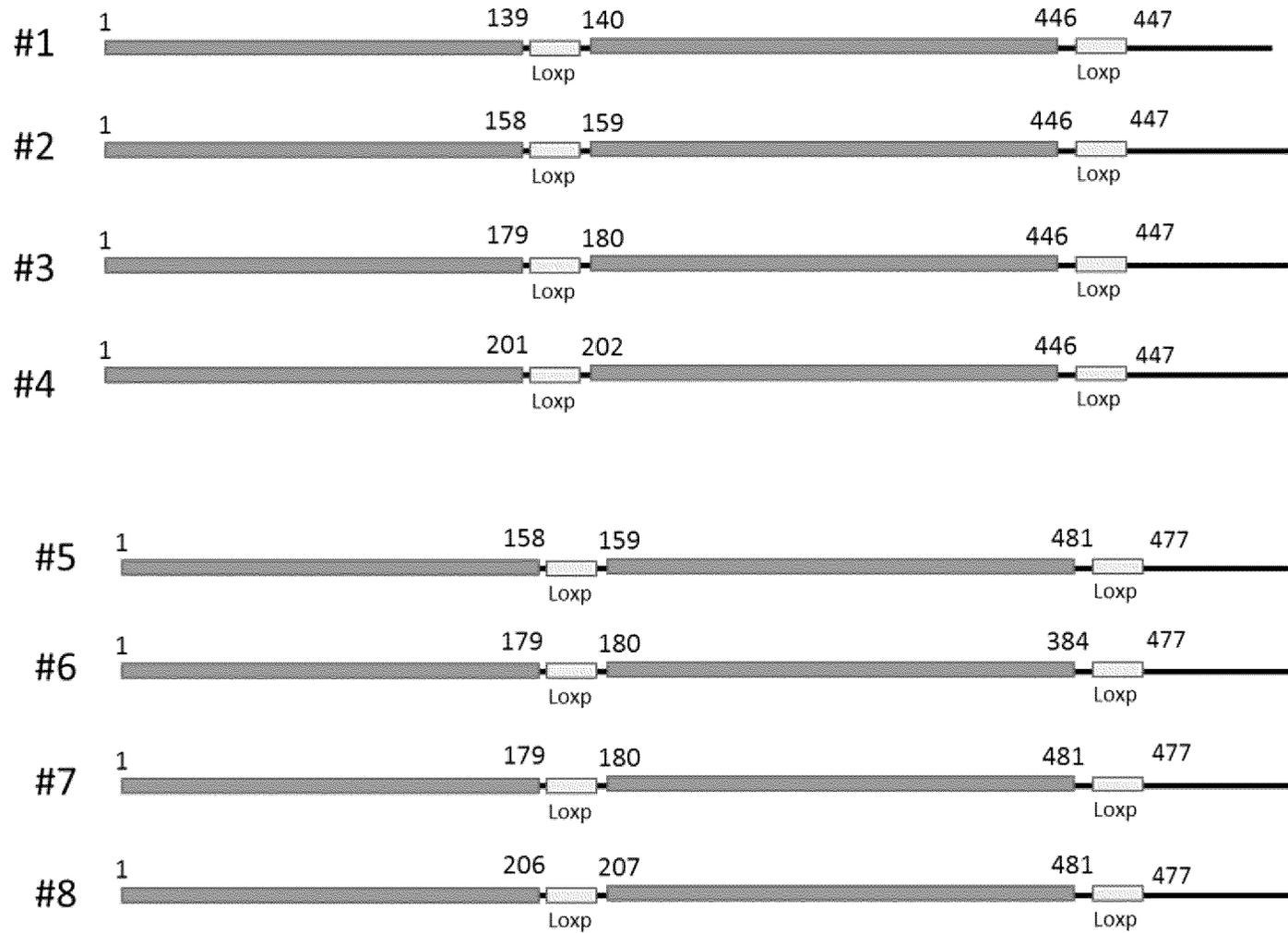
Фиг. 120А

Полученные варианты сигналов упаковки

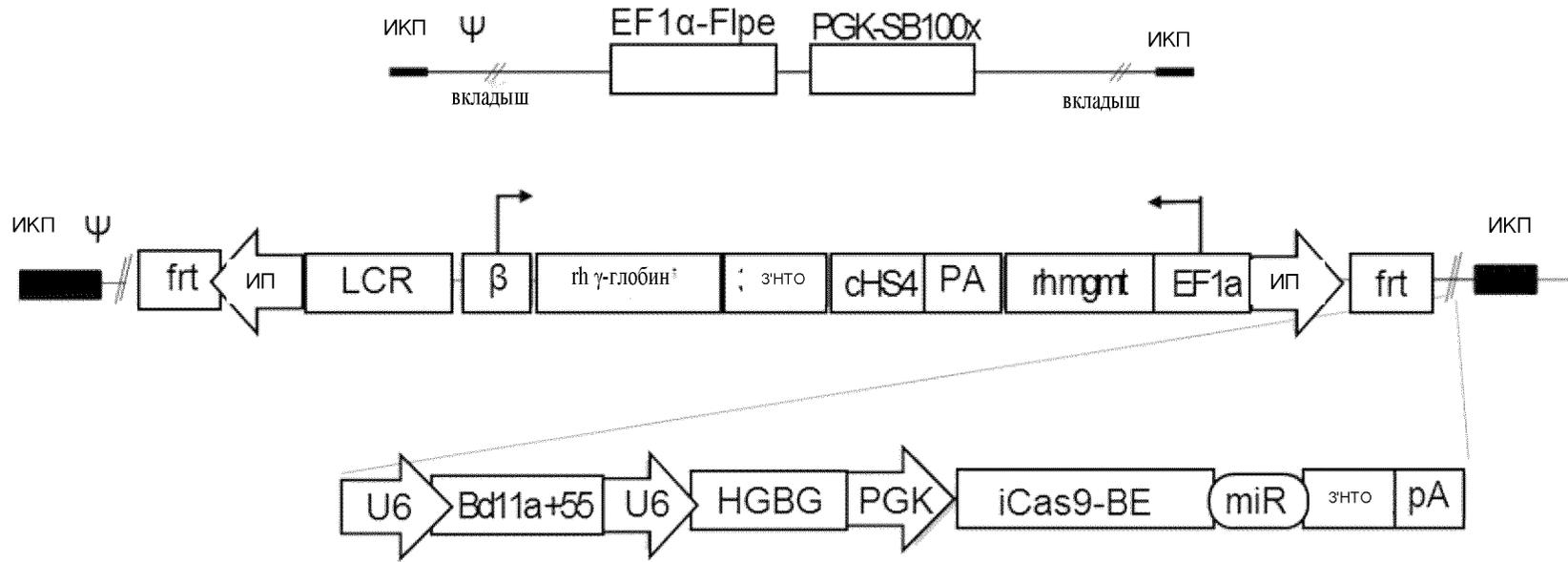


Фиг. 120В

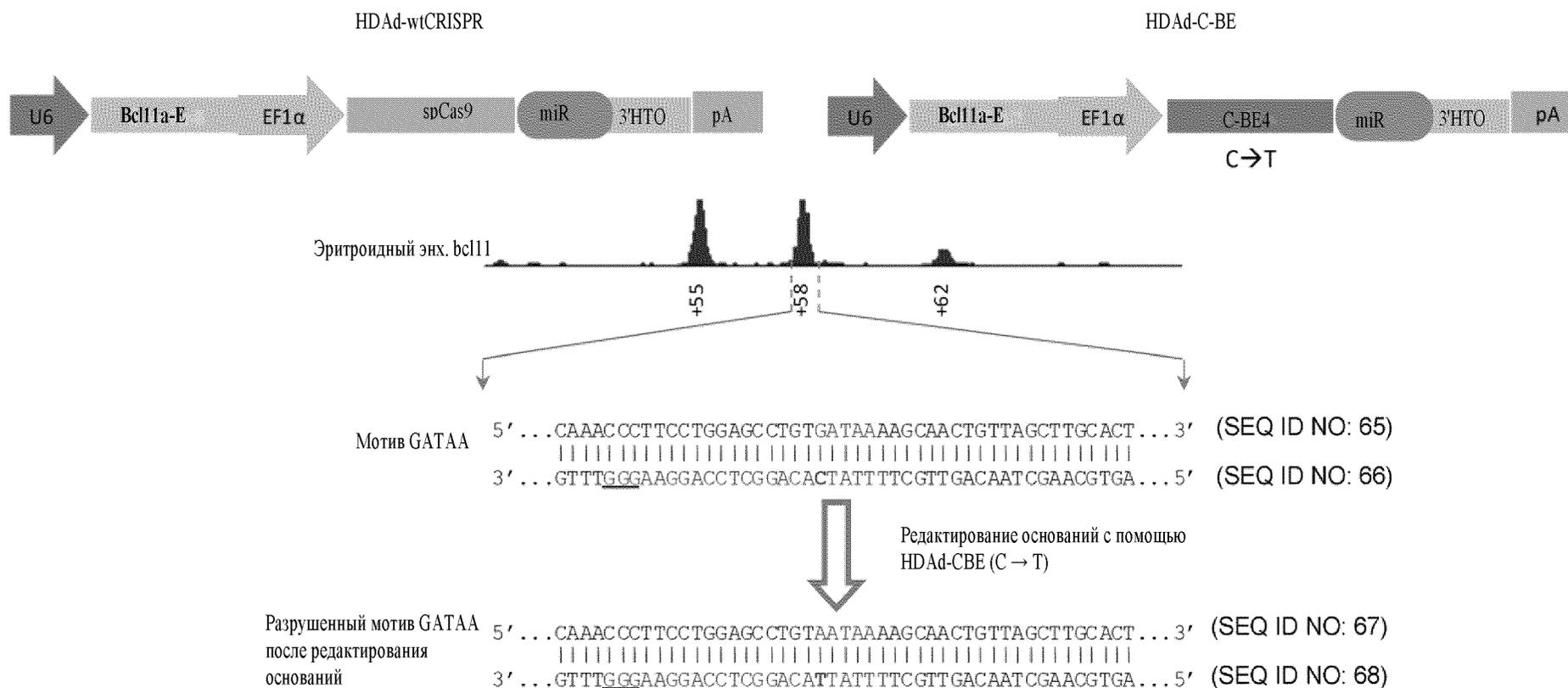
Варианты сигналов упаковки



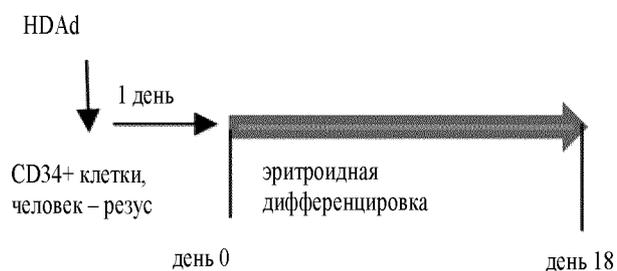
Фиг. 121



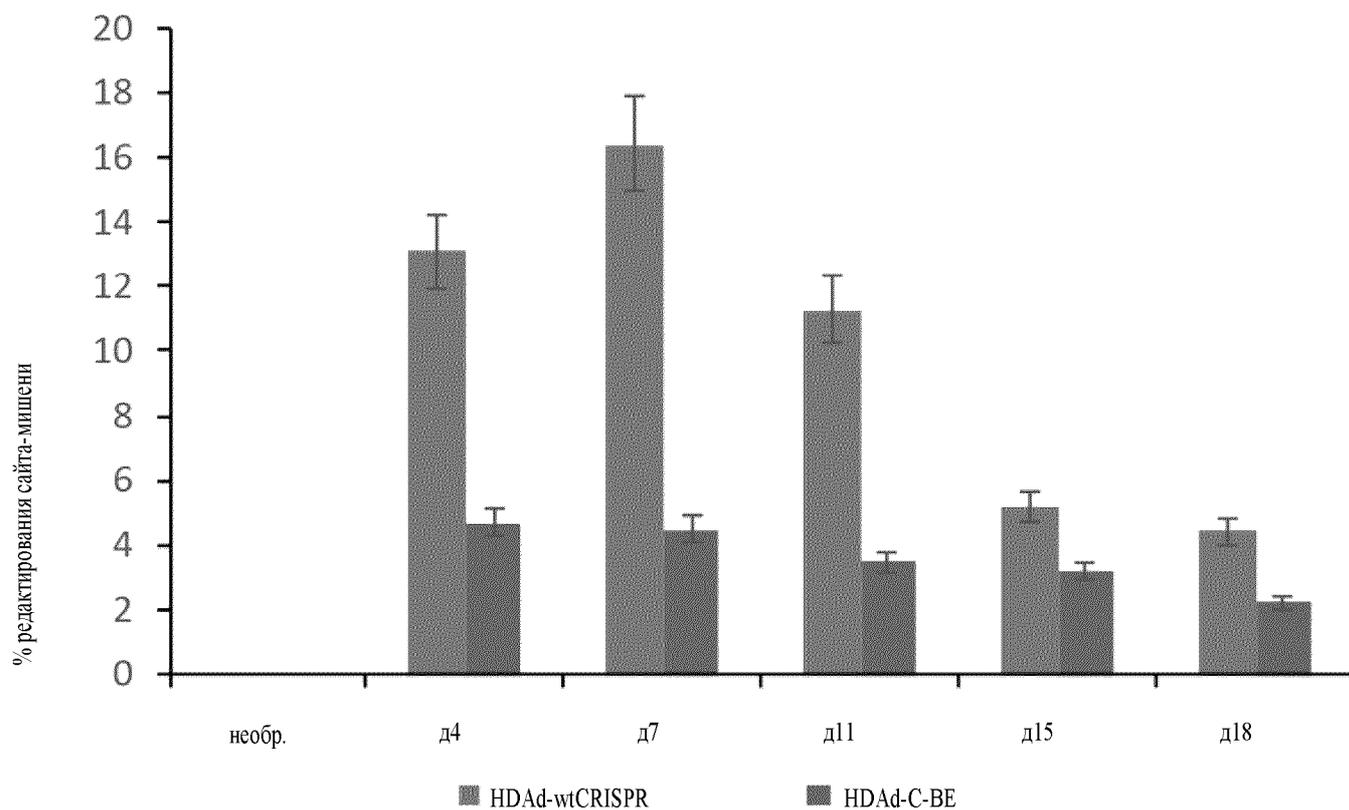
Фиг. 123



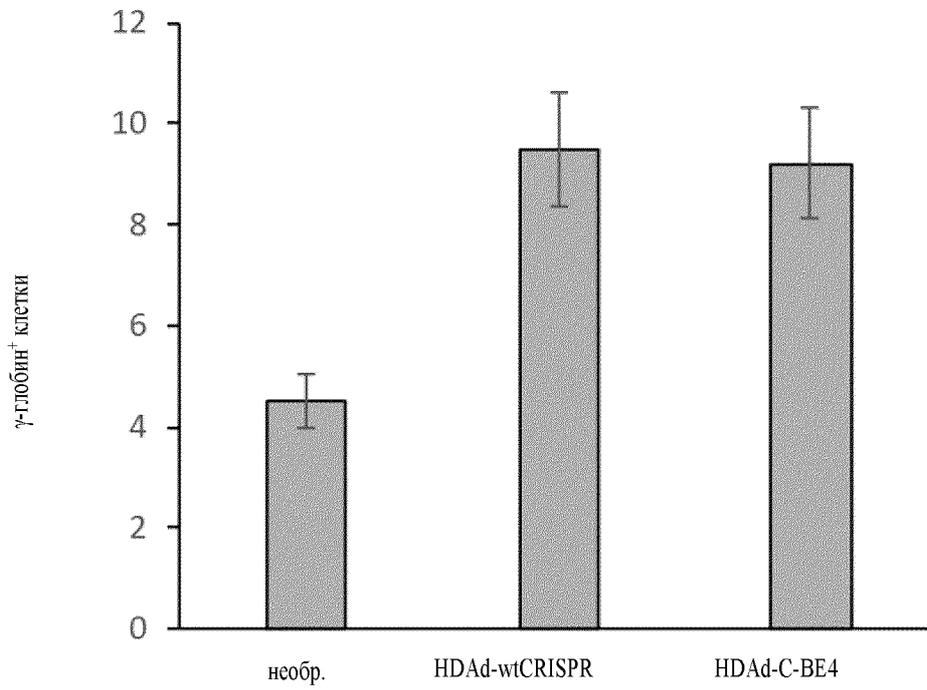
Фиг. 124А



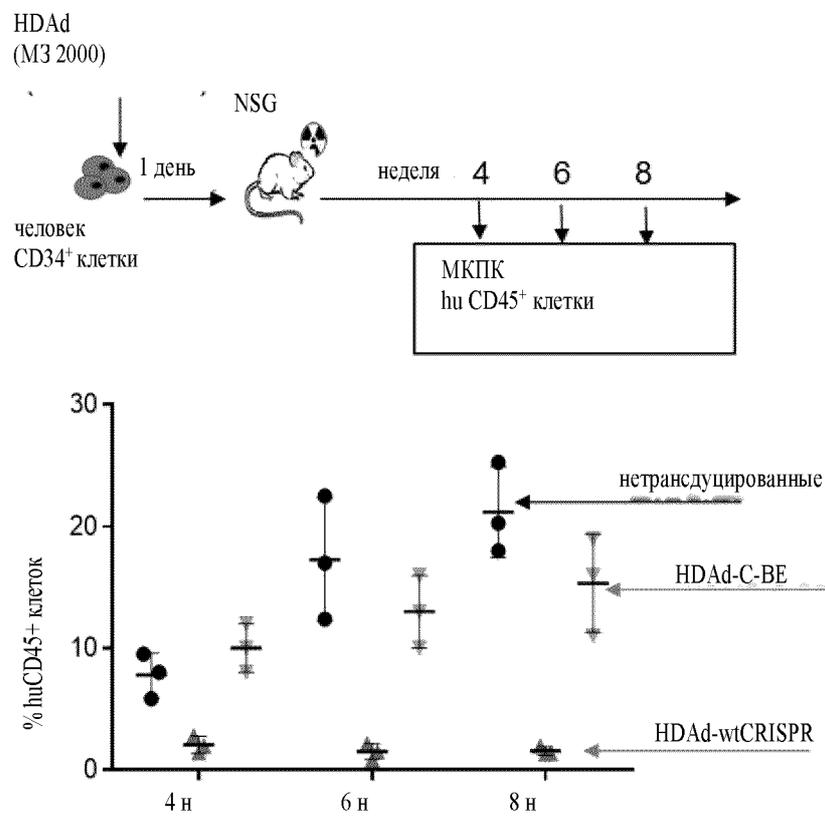
Фиг. 124В



Фиг.124С



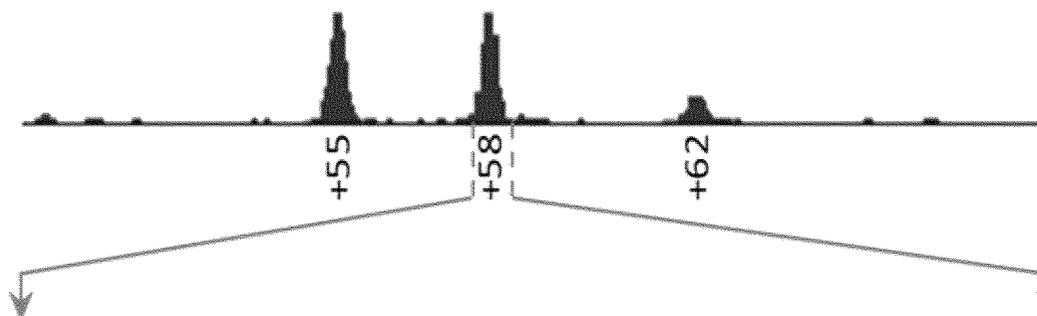
Фиг. 125



Фиг. 126

HDAI-BE bclE+58

Эритроидный энх. bcl11a



Мотив GATAA

```
5' ...CAAACCCTTCCTGGAGCCTGTGATAAAAGCAACTGTTAGCTTGCACT.
   |||
3' ...GTTTGGGAAGGACCTCGGACACTATTTCGTTGACAATCGAACGTGA.
   |||
..5'
```

(SEQ ID NO: 65)

Редактирование оснований с помощью HDAI-CBE
(C → T)

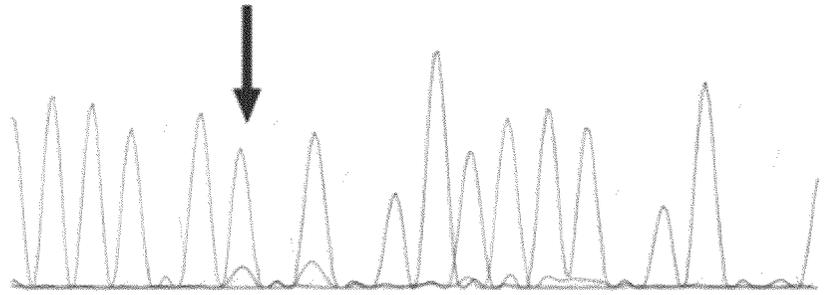
Разрушенный мотив GATAA
после редактирования оснований

```
5' ...CAAACCCTTCCTGGAGCCTGTAATAAAAGCAACTGTTAGCTTGCACT.
   |||
3' ...GTTTGGGAAGGACCTCGGACATTATTTCGTTGACAATCGAACGTGA.
   |||
..5'
```

(SEQ ID NO: 67)

Фиг. 126, продолж.

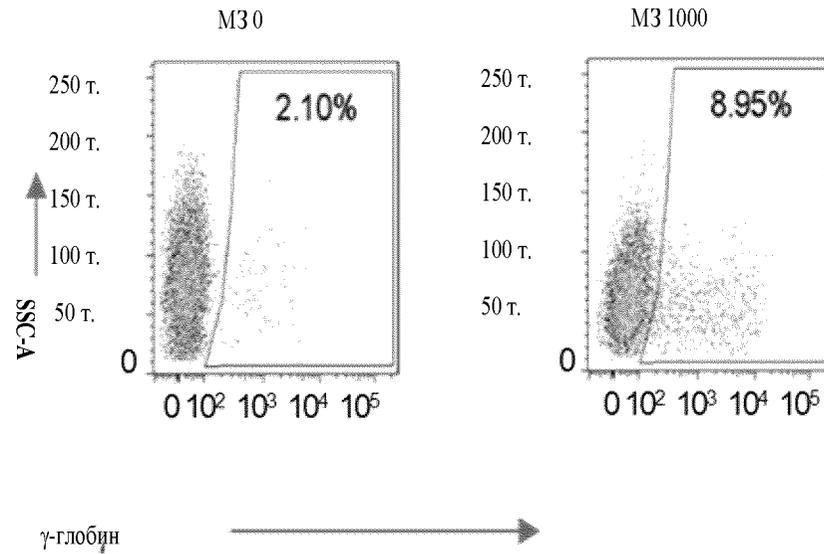
82 % преобразования С→Т



(SEQ ID NO: 244)

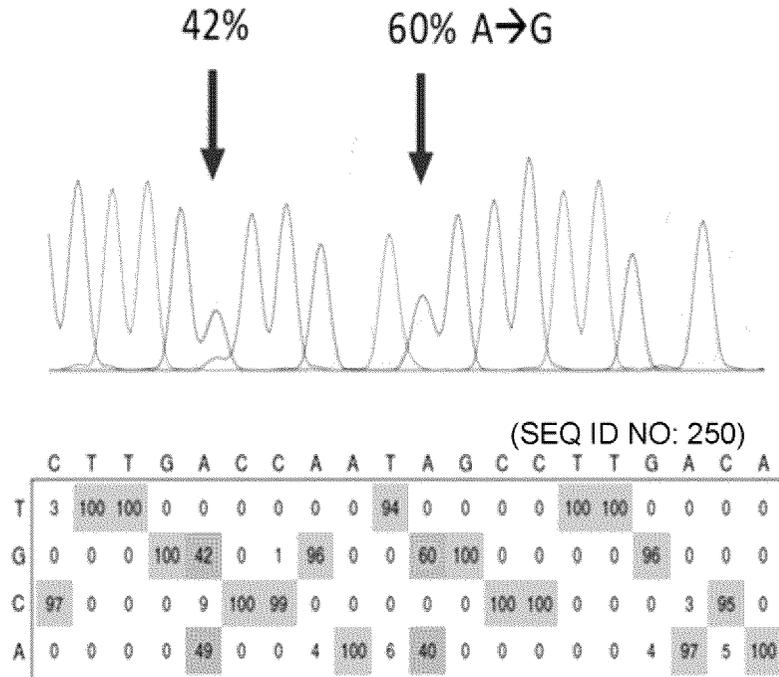
	T	T	T	A	T	C	A	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A
T	97	97	95	6	94	82	3	14	0	1	2	7	90	6	5	2	0	1	1	2
G	0	0	0	0	1	0	0	1	4	91	95	5	1	0	0	4	93	93	4	5
C	1	1	1	1	1	12	3	81	5	3	3	86	7	92	91	7	2	1	0	0
A	2	2	5	93	4	6	93	4	91	5	1	2	2	2	3	88	6	5	95	93

HUDEP-2 после эритроидной дифф. (д5)

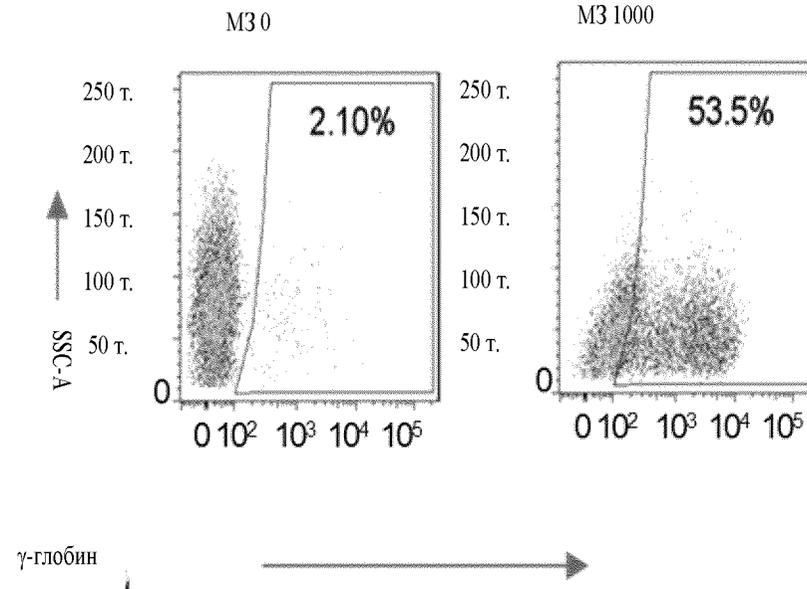


280/350

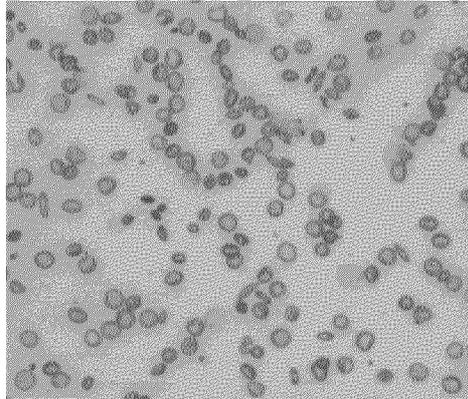
Фиг.126 продолж.



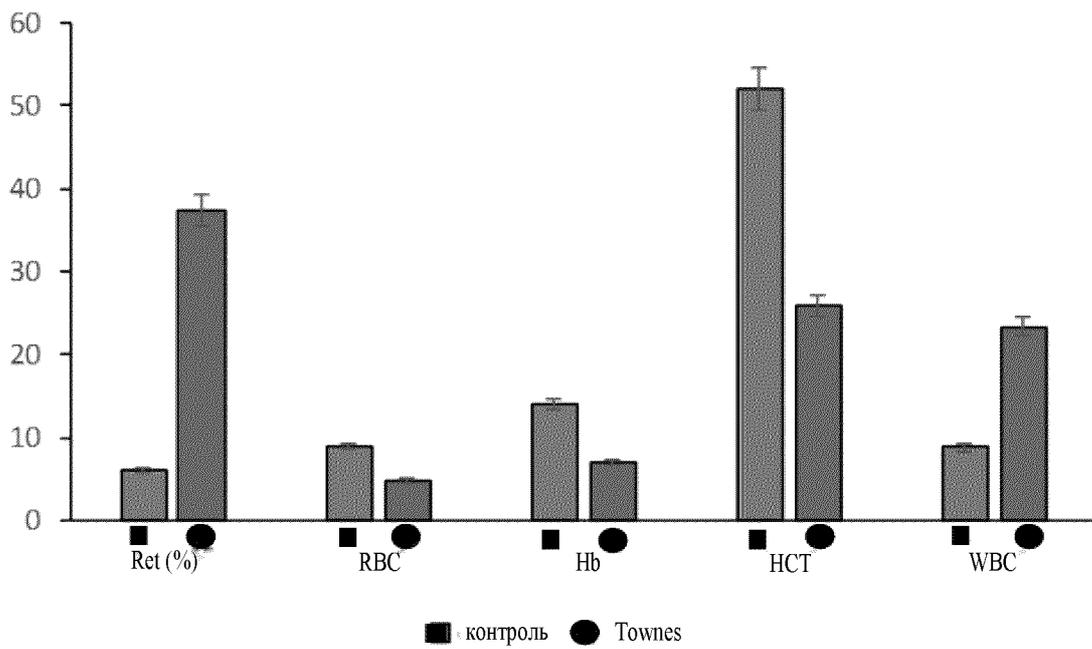
HUDEP-2 после эритроидной дифф. (д5)



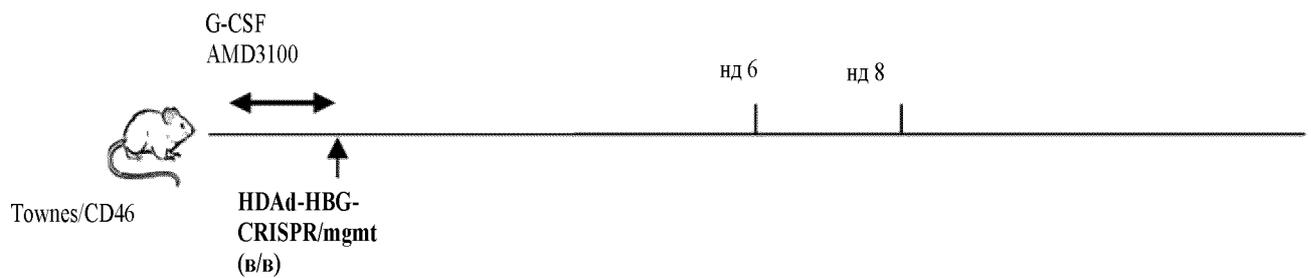
Фиг.127



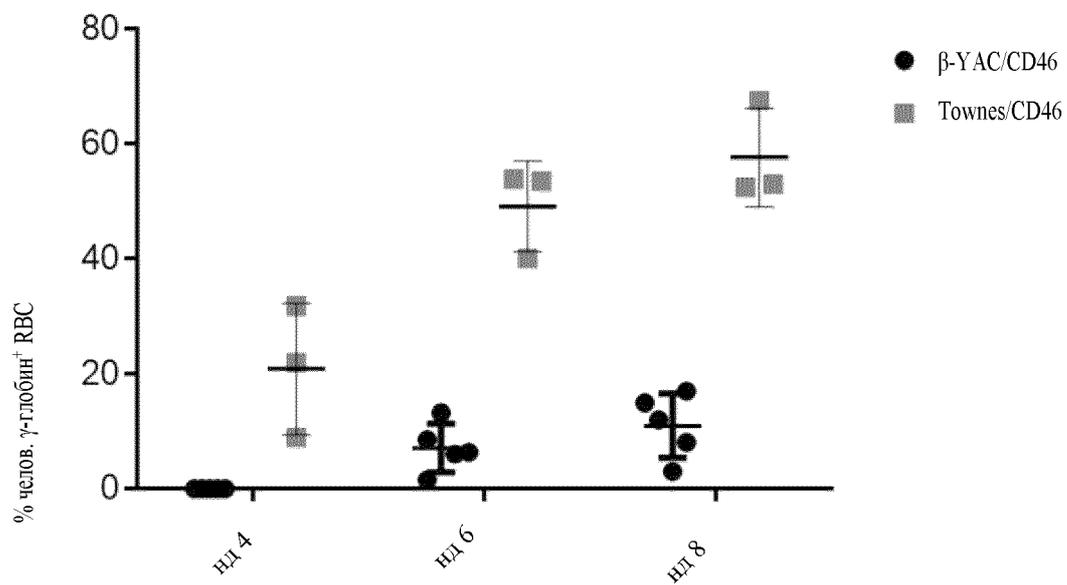
Фиг.127В



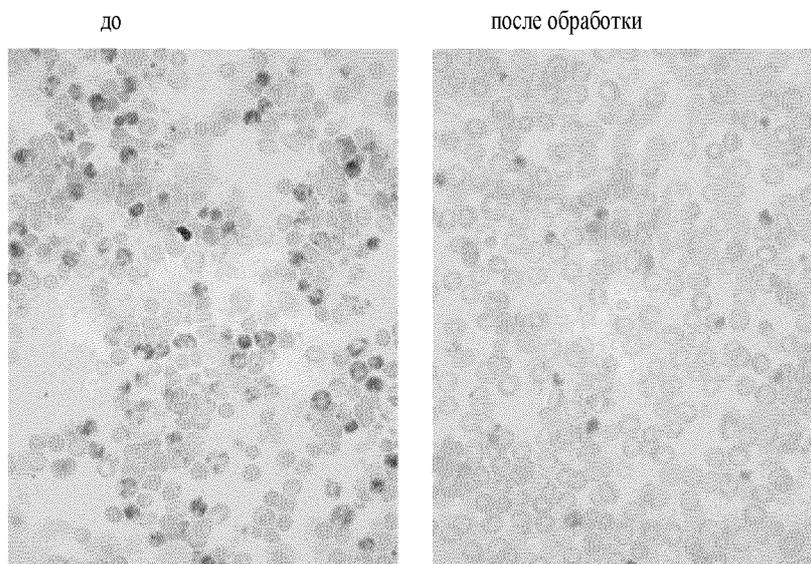
Фиг. 128А



Фиг. 128В

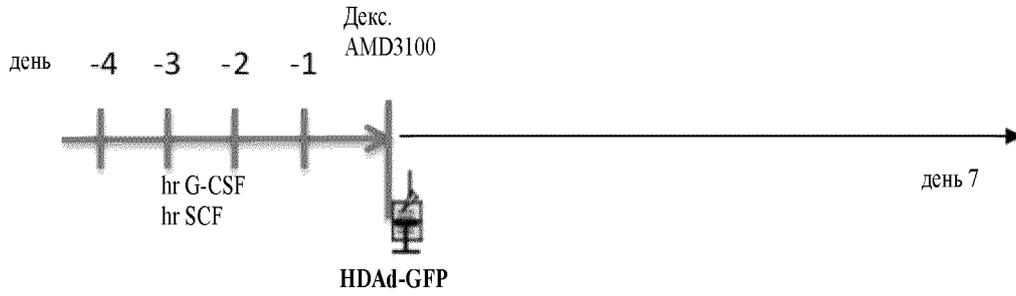


Фиг. 128С

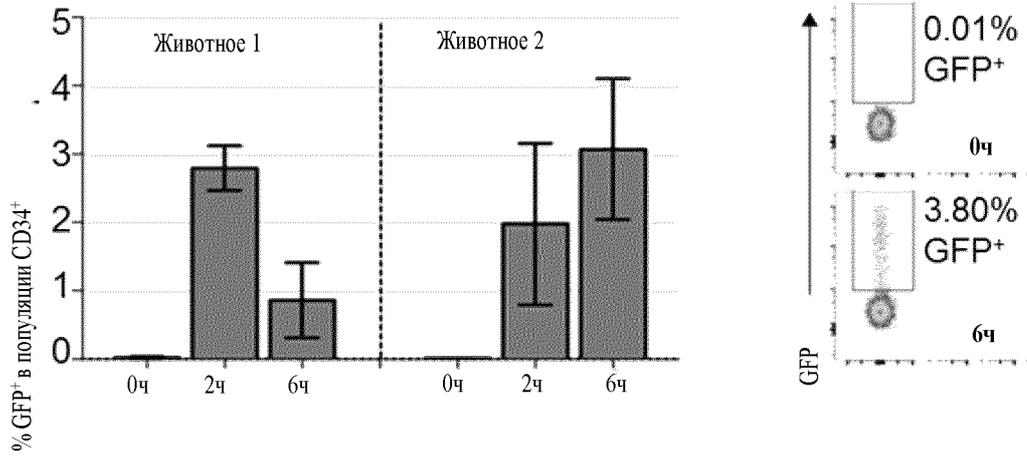


ретикулоциты в периферической крови

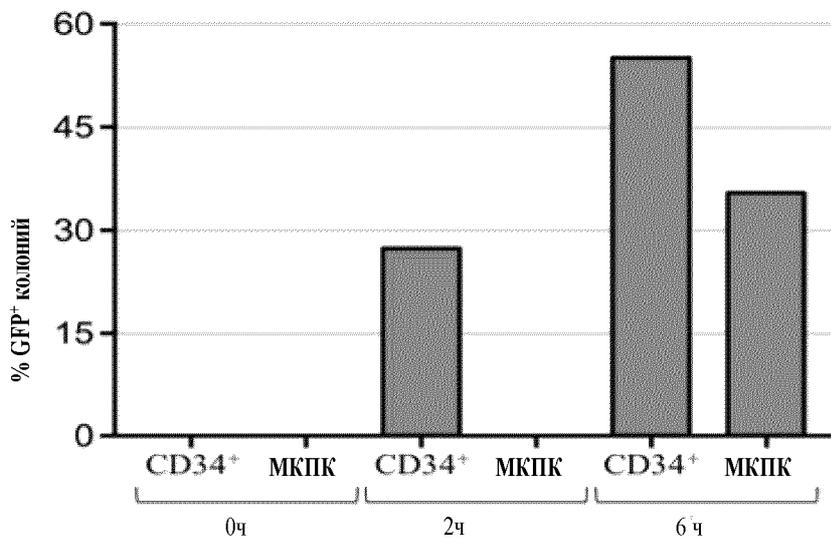
Фиг. 129А



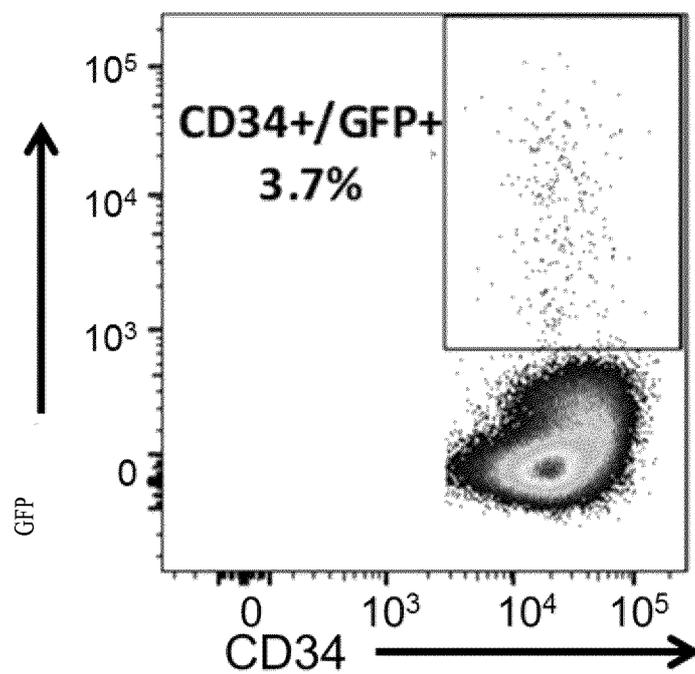
Фиг. 129В



Фиг. 129С



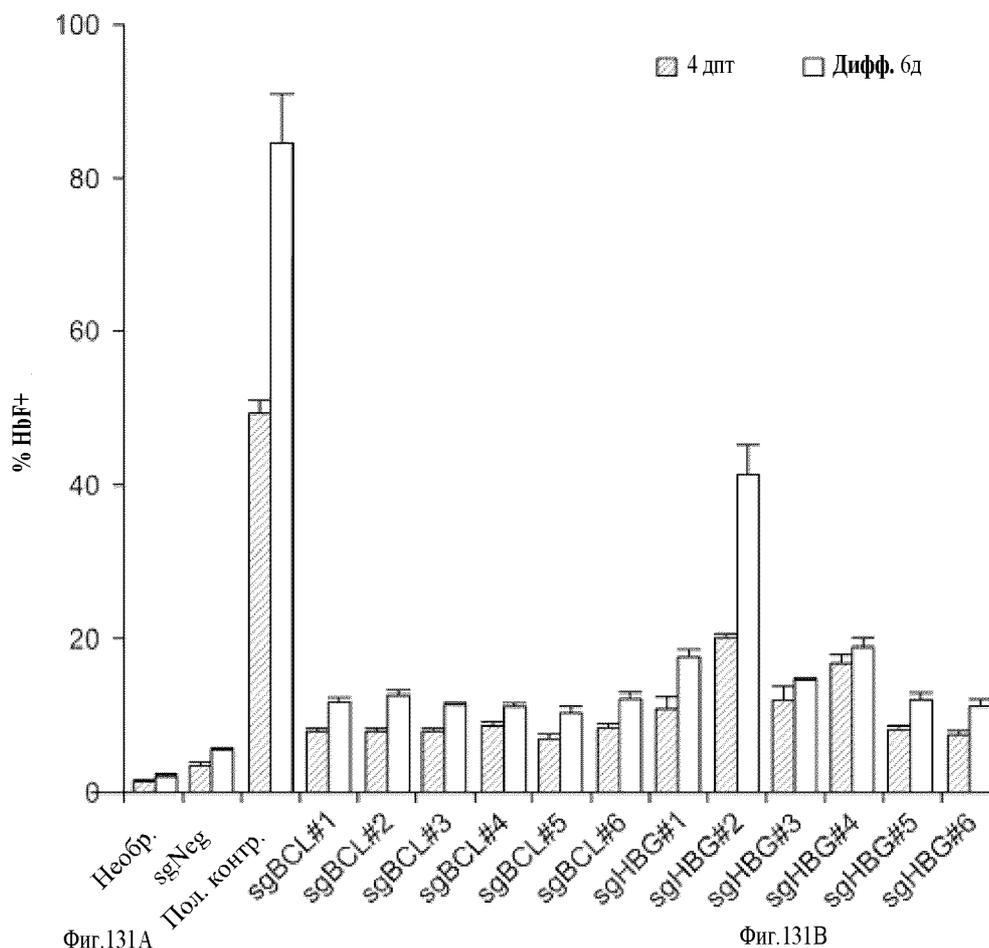
Фиг. 129D



Костный мозг (день 3)

Фиг. 130

повторная активация γ -глобина после временной трансфекции HUDEP-2

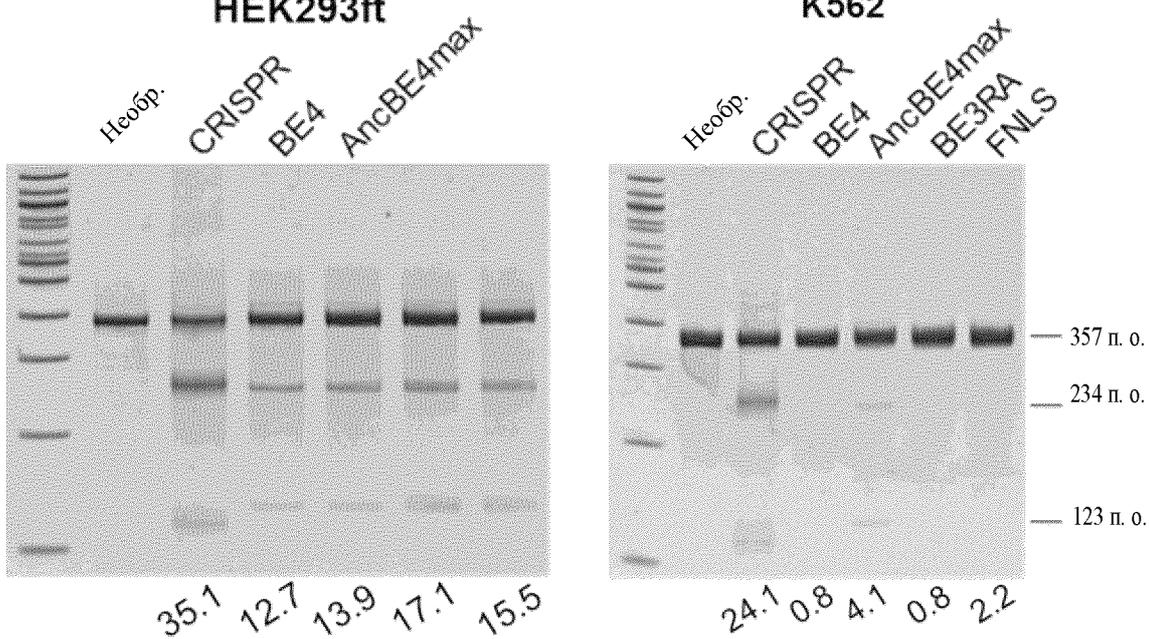


Фиг.131A

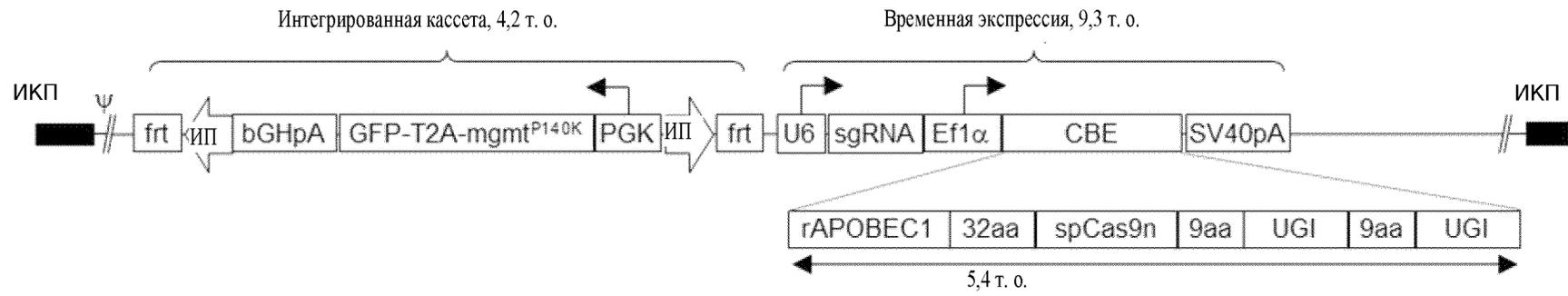
Фиг.131B

HEK293ft

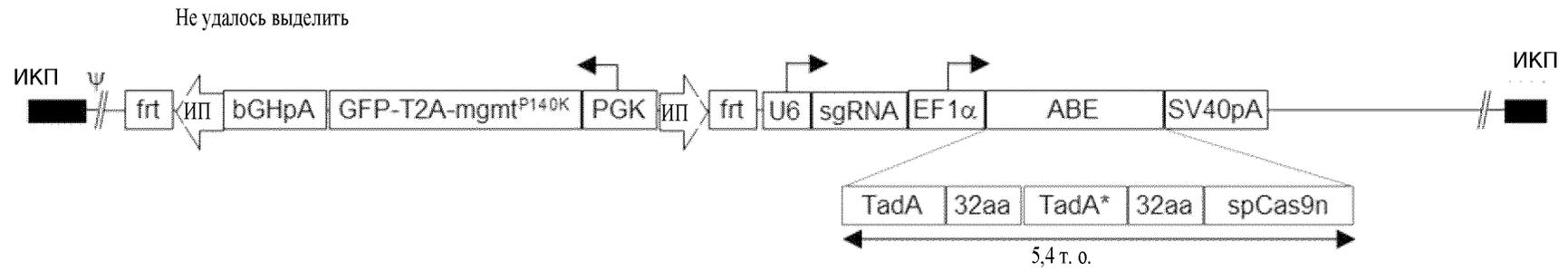
K562



Фиг. 132А



Фиг. 132В



TadA^N+32aa 1 TCTGAAGTCGAGTTCAGCCACGAGTATTGGATGAGGCACGCACTGACCCTGGCAAACGAGCCTGGGACG
 TadA^{N*}+32aa 1G..G.....TTC.....C.....A..T..C.....C..GA.G..AC.C..T.

 TadA^N+32aa 71 AAAGAGAAGTCCCCGTCGGCGCCGTGCTGGTGCACAACAATCGCGTGATCGGAGAAGGATGGAACAGGCC
 TadA^{N*}+32aa 71 .G..G..G..G..T..G..A.....TG.....A.A.....C..G..C.....AG.

 TadA^N+32aa 141 AATCGGACGCCACGACCCTACCGCACACGCAGAGATCATGGCACTGAGGCAGGGAGGACTGGTCATGCAG
 TadA^{N*}+32aa 141 C.....C.TG.....A..A..C..T..C..A..T.....C.....A.....C..C.....

 TadA^N+32aa 211 AATTATCGCCTGATCGATGCCACCCTGTATGTGACACTGGAGCCATGCGTGATGTGCGCAGGAGCAATGA
 TadA^{N*}+32aa 211 ..C..CA.A.....T..C.....C.....T.C.....T.....C..C..C....

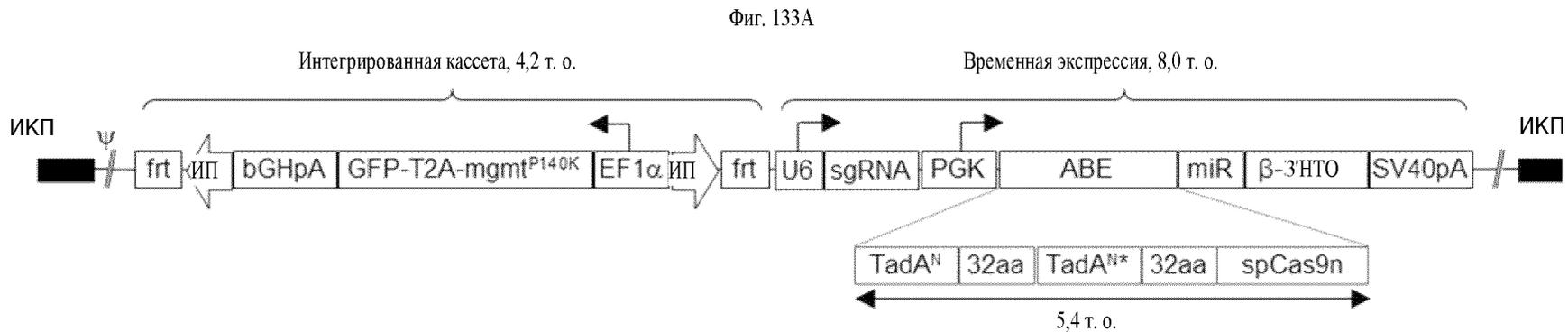
 TadA^N+32aa 281 TCCACAGCCGGATCGGAAGAGTGGTGTTCGGAGCACGAGACGCCAAGACCCGGAGCAGCAGGCAGCCTGAT
 TadA^{N*}+32aa 281TCTA.....CC.C.....T..C.TGA.GA.T..A..A..T..C..C.....TCT.....

 TadA^N+32aa 351 GGATGTGCTGCACCACCCAGGCATGAACCACCGGGTGGAGATCACAGAGGGCATCCTGGCAGACGAGTGC
 TadA^{N*}+32aa 351 ...C.....T....C.....T...A.A..C..A..T..C.....A.....T..A..T

 TadA^N+32aa 421 GCCGCCCTGCTGAGCGATTTCTTTAGAATGAGGAGACAGGAGATCAAGGCCAGAGAAGGCACAGAGCT
 TadA^{N*}+32aa 421T..T.....C.G...CCT.....T.T.T..T..T.....C.....

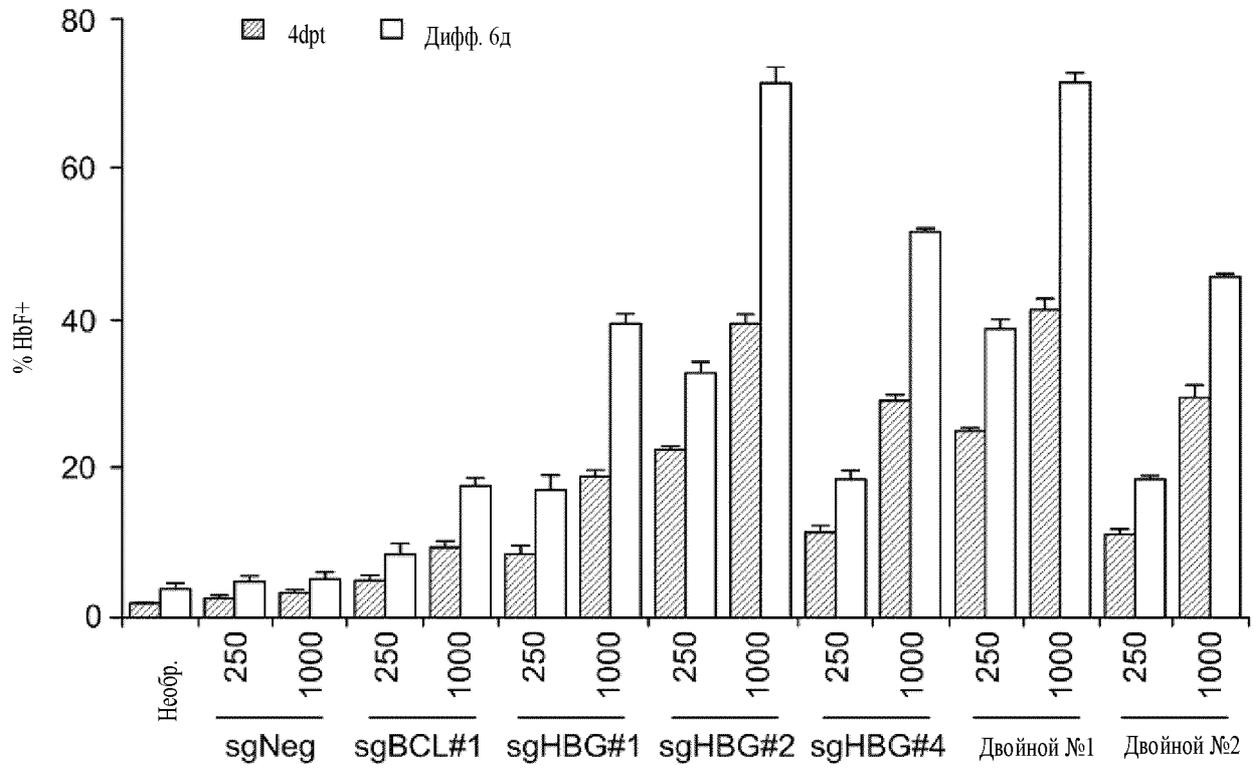
 TadA^N+32aa 491 CCACCGACTCTGGAGGCTCTAGCGGAGGATCCTCTGGAAGCGAGACACCAGGCACATCCGAGTCCGCCAC
 TadA^{N*}+32aa 491TAG...C..A.....G..C.....CTCT.....C..T.....AG...AG...A..

 TadA^N+32aa 561 ACCAGAGTCTTCCGGCGGCTCCTCCGGAGGATCC (SEQ ID NO: 260)
 TadA^{N*}+32aa 561 ...T..AAGCAG...G...AG.AG...G..GAG. (SEQ ID NO: 261)



Полное название	Редактор	Гидовая РНК	Выход (x 10 ¹² вч)
HDAd5/35++_BE4max-sgBCL№1-FI-mgmt/GFP	CBE	sgBCL#1	1.2
HDAd5/35++_BE4max-sgHBG№1-FI-mgmt/GFP	CBE	sgHBG#1	0.8
HDAd5/35++_ABEopti-sgHBG№2-FI-mgmt/GFP	ABE	sgHBG#2	3.8
HDAd5/35++_ABEopti-sgHBG№4-FI-mgmt/GFP	ABE	sgHBG#4	2.8
HDAd5/35++_BE4max-двойной№1-FI-mgmt/GFP	CBE	sgBCL#1 + sgHBG#1	0.5
HDAd5/35++_BE4max-sgNeg-FI-mgmt/GFP	CBE	sgNeg	1.5

Фиг. 133С

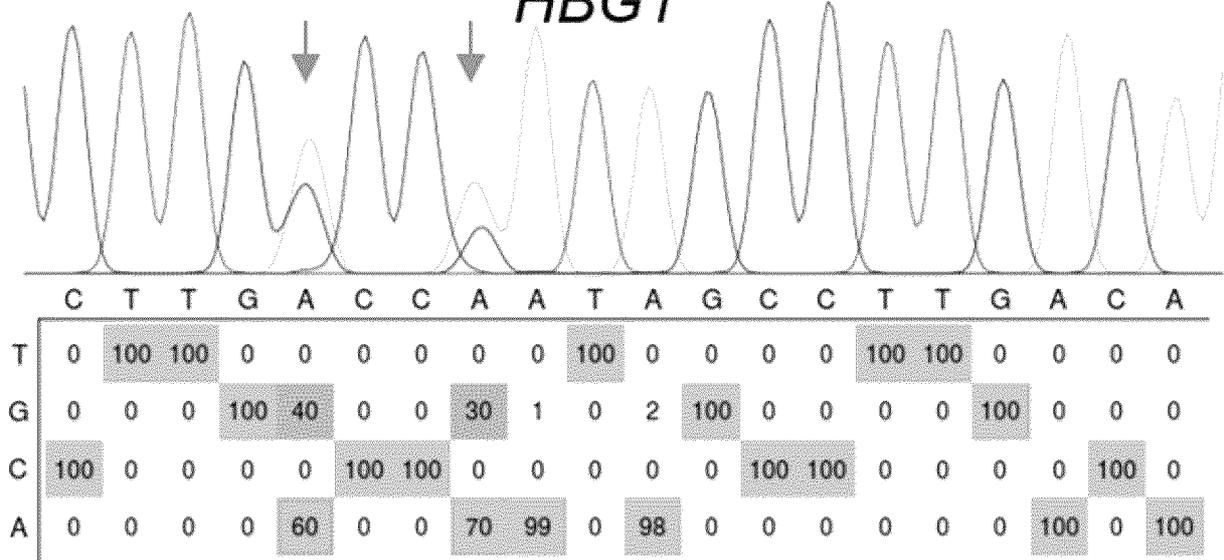


292/350

Φnr. 133D

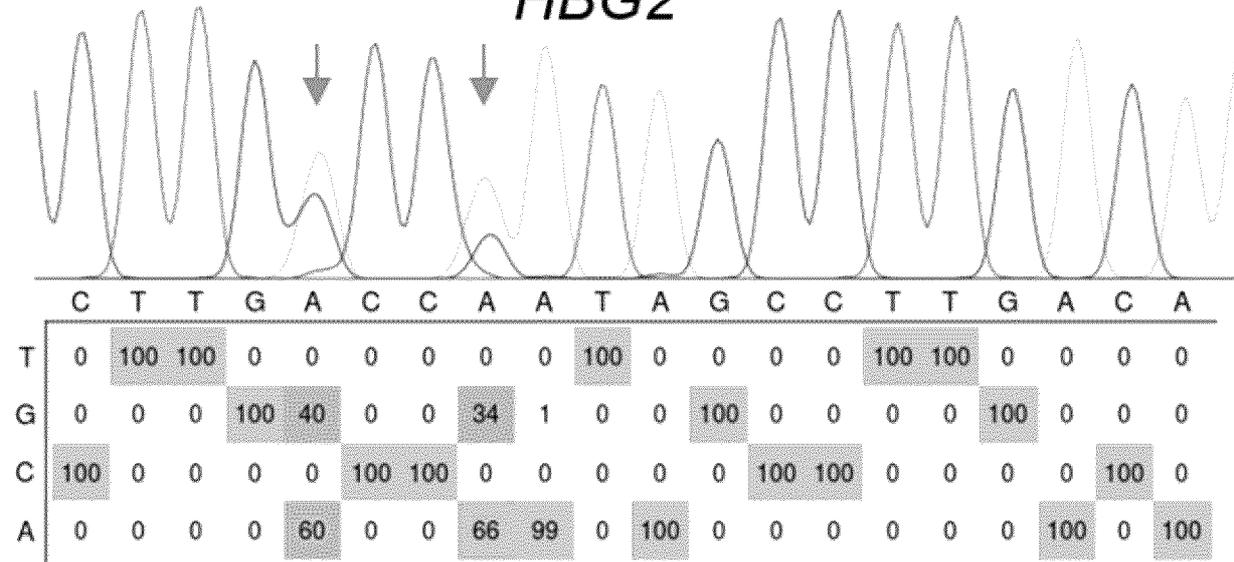
sgHBG#2

HBG1



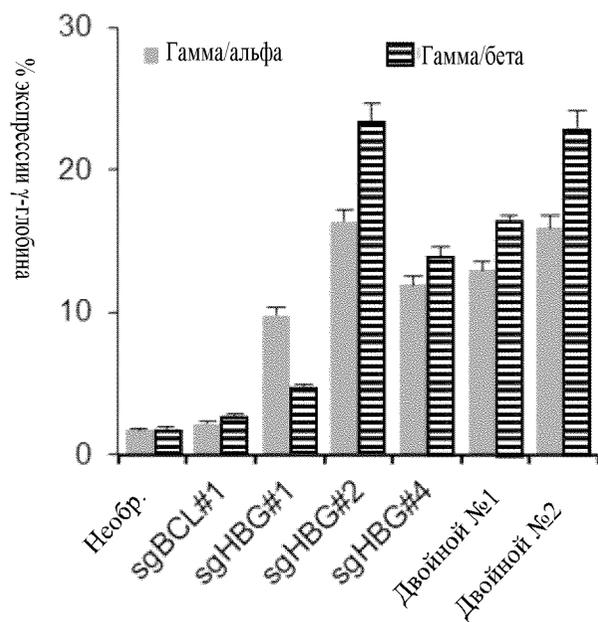
(SEQ ID NO: 250)

HBG2

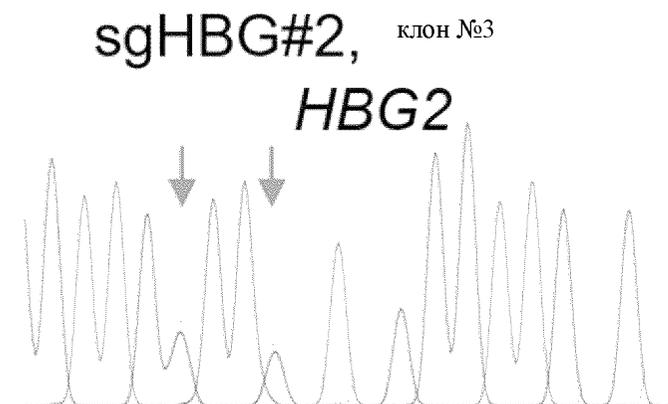


(SEQ ID NO: 250)

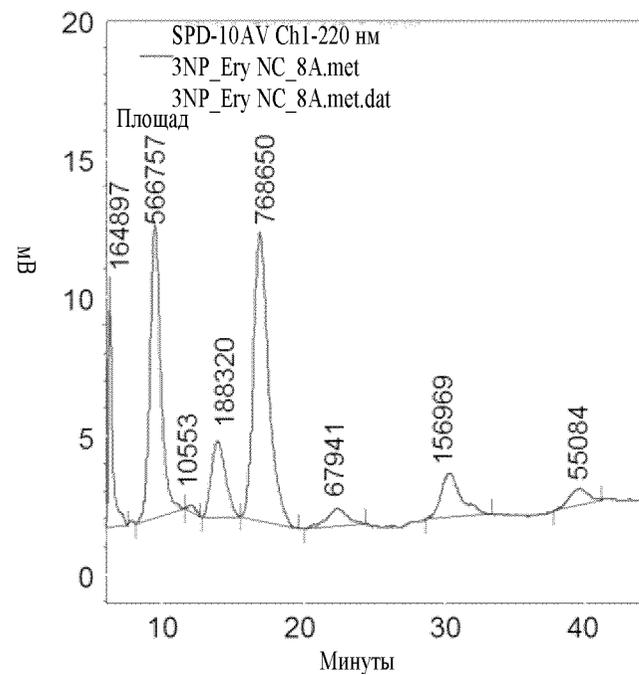
Фиг. 133E



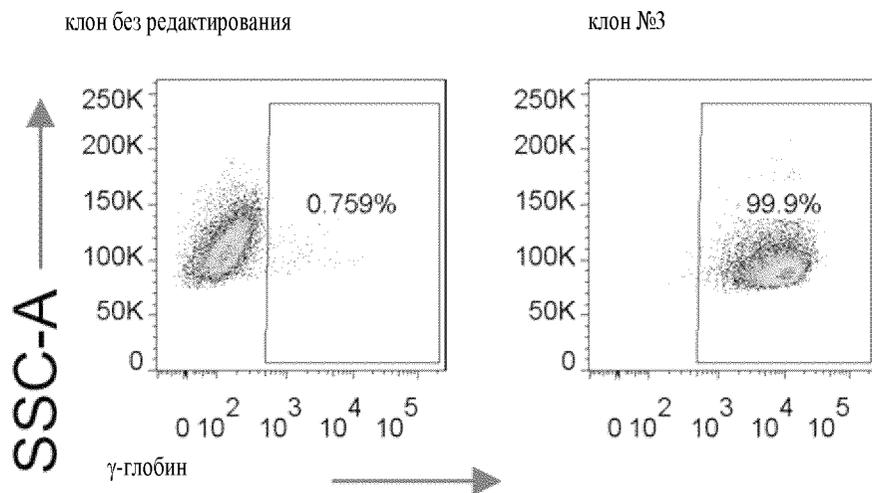
Фиг. 133F



Фиг. 133H

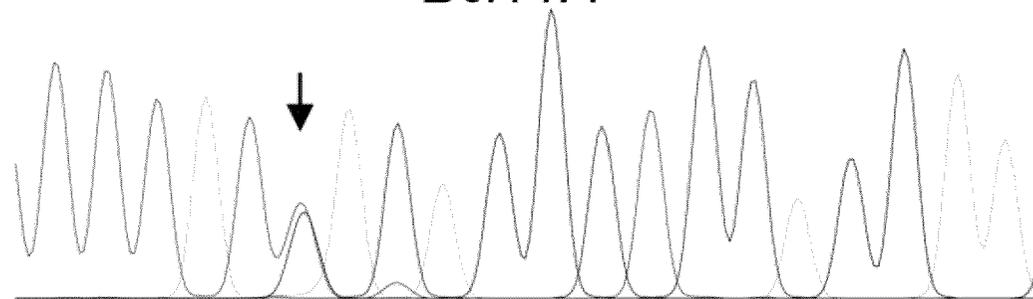


Фиг. 133G



Фиг.134А

sgBCL#1
Bcl11A



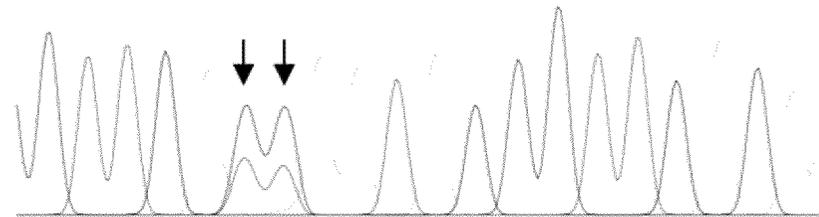
(SEQ ID NO: 244)

	T	T	T	A	T	C	A	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A
T	99	99	100	0	100	51	0	8	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	1	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0
C	0	0	0	0	0	46	0	92	0	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0
A	1	0	0	100	0	2	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100

Фиг. 134А, продолж.

sgHBG#1

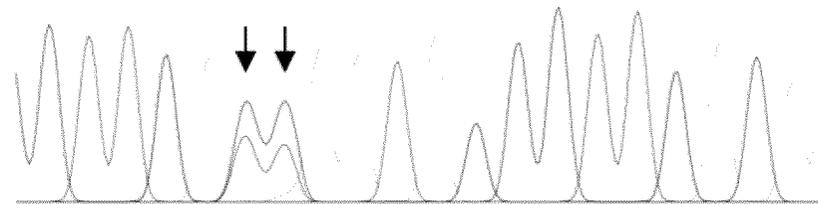
HBG1



	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	0	100	100	0	0	34	31	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
G	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0
C	100	0	0	0	0	66	69	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	0
A	0	0	0	0	100	0	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100

(SEQ ID NO: 250)

HBG2

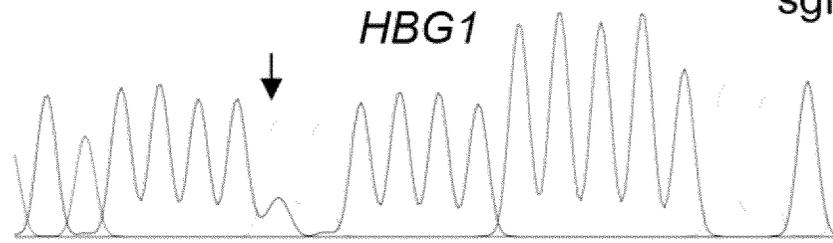


	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	0	100	100	0	0	39	36	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
G	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0
C	100	0	0	0	0	61	64	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	0
A	0	0	0	0	100	0	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0

(SEQ ID NO: 250)

HBG1

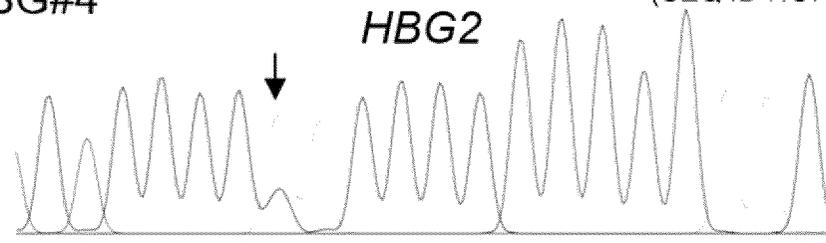
sgHBG#4



	G	T	G	G	G	G	A	A	G	G	G	G	C	C	C	C	C	A	A	G
T	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	100	0	100	100	100	100	25	4	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	100
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0	75	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0

(SEQ ID NO: 253)

HBG2

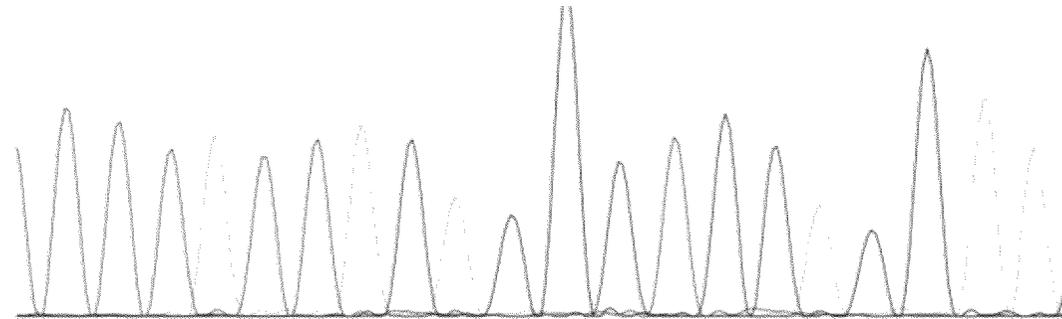


	G	T	G	G	G	G	A	A	G	G	G	G	C	C	C	C	C	A	A	G
T	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	100	4	100	100	100	100	27	3	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	99
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0	73	97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	1

(SEQ ID NO: 253)

Фиг. 134В

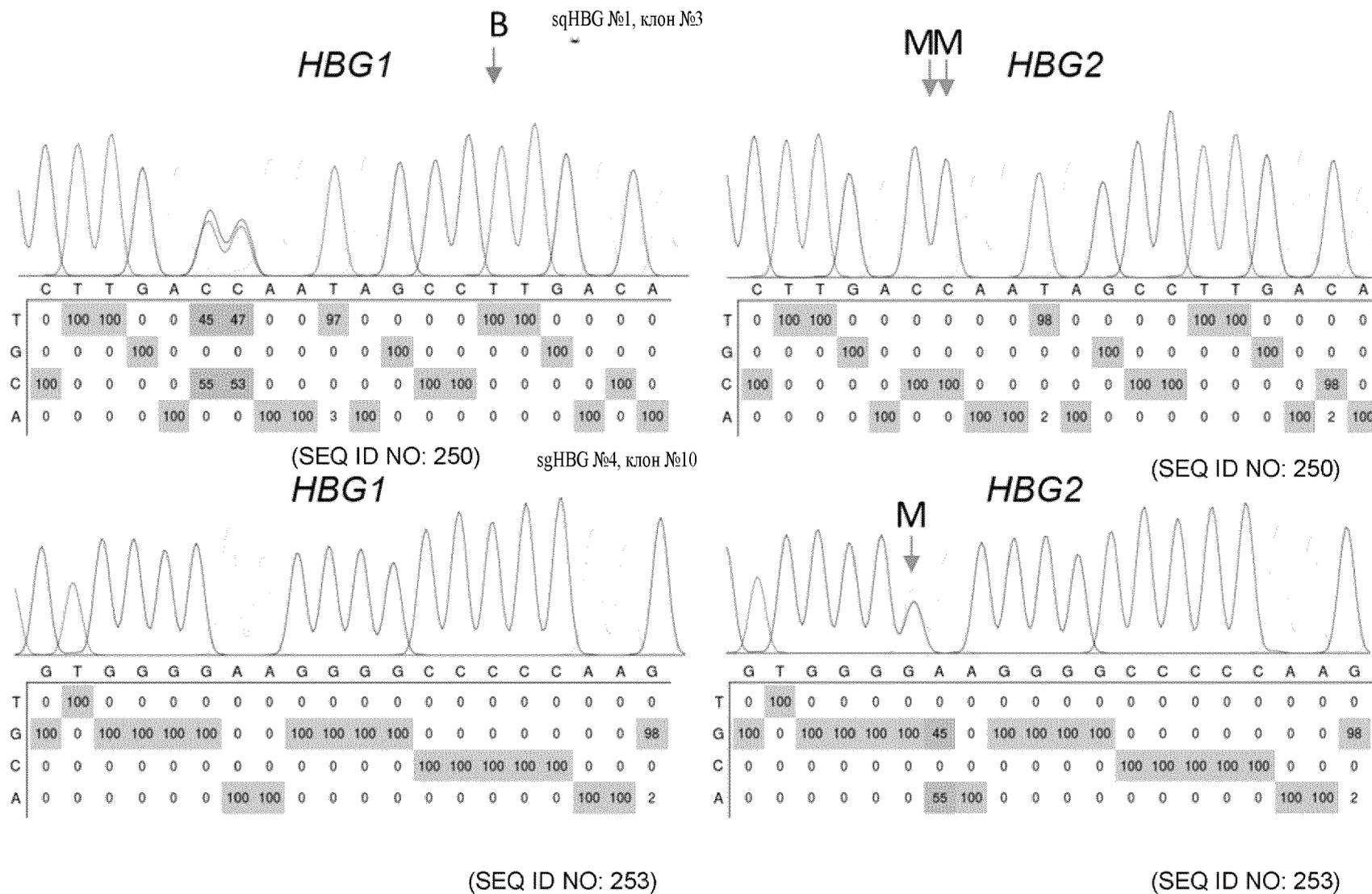
sgBCL №1, клон №5
Bella



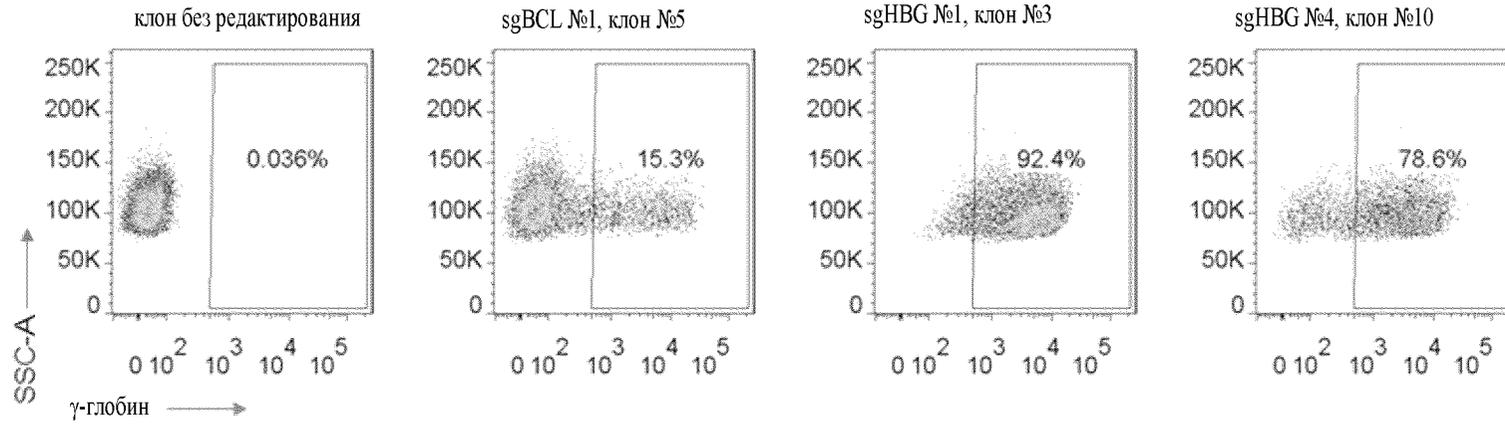
(SEQ ID NO: 244)

	T	T	T	A	T	C	A	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A
T	98	98	96	3	96	96	2	3	0	1	1	3	97	2	4	0	2	1	1	0
G	0	0	0	1	0	0	1	0	2	92	98	5	0	0	0	2	93	96	3	2
C	0	1	1	1	0	1	2	94	4	1	1	92	2	97	94	4	1	0	0	0
A	1	1	3	95	4	3	95	3	94	5	0	0	1	1	2	94	4	3	96	98

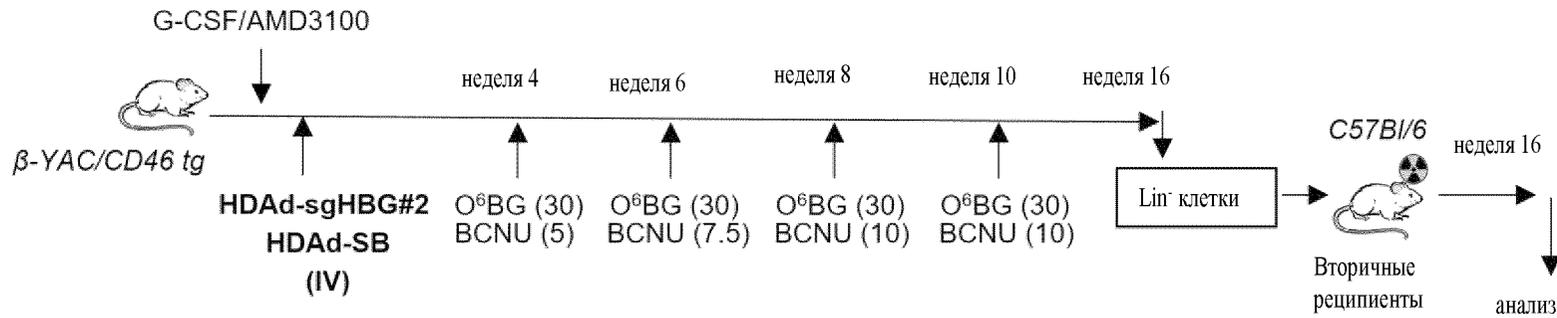
Фиг. 134В, продолж.



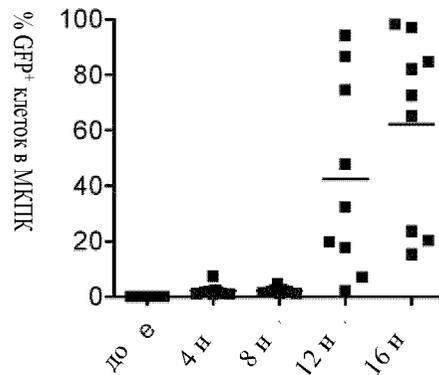
Фиг. 134С



Фиг.135А

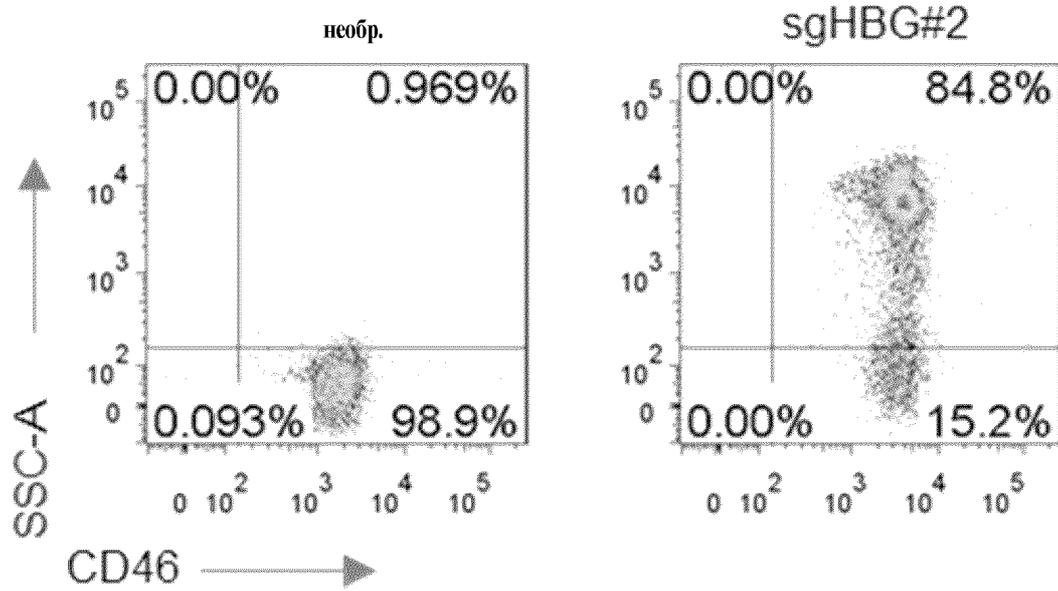


Фиг. 135В

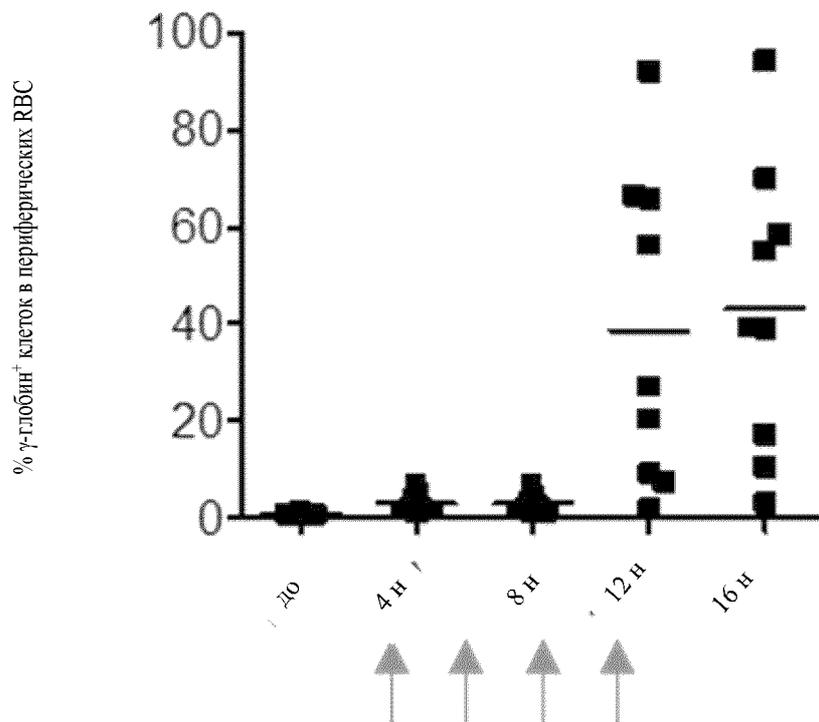


299/350

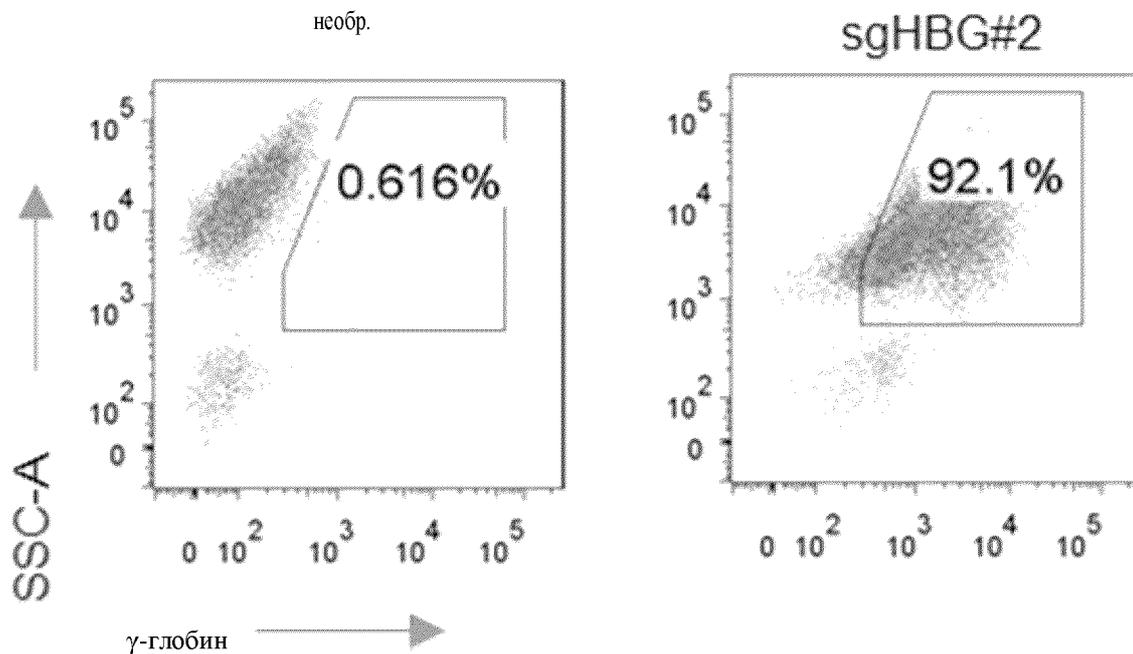
Фиг. 135C



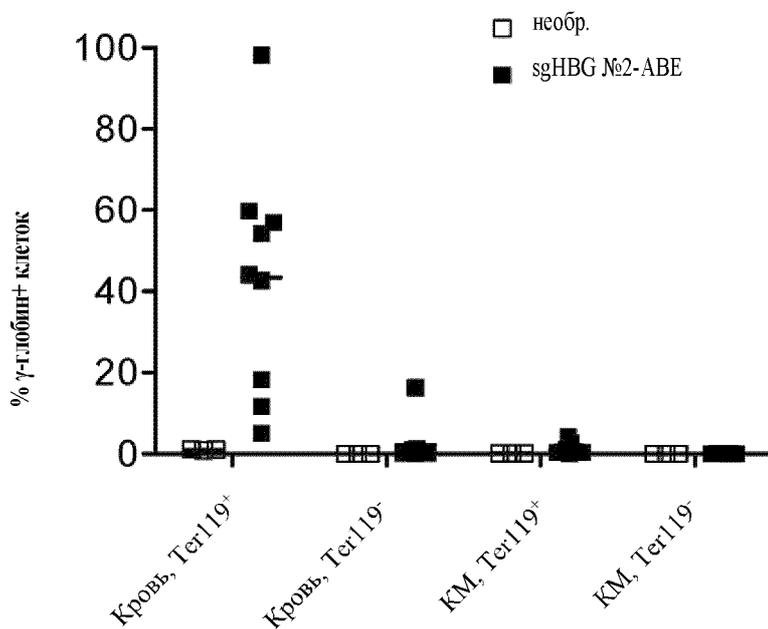
Фиг. 135D



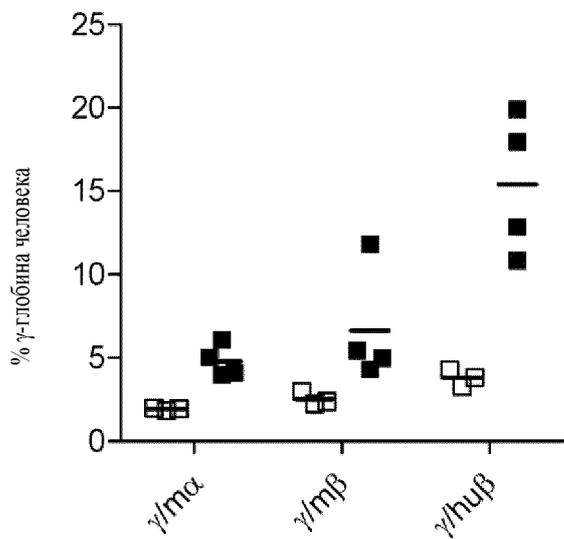
Фиг. 135Е



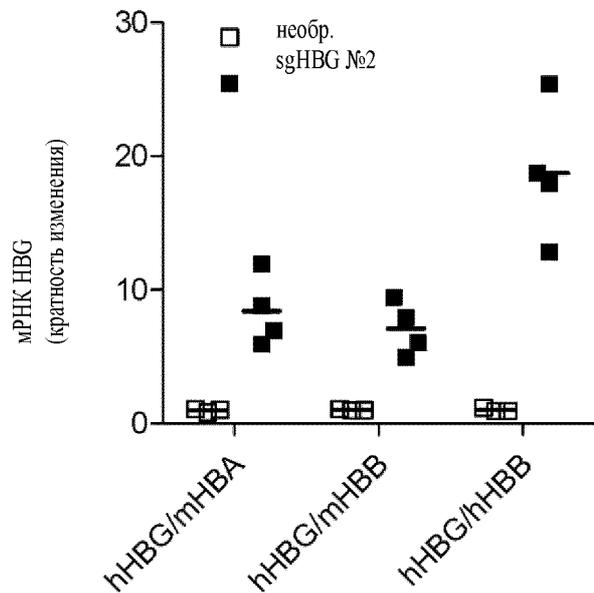
Фиг. 135F



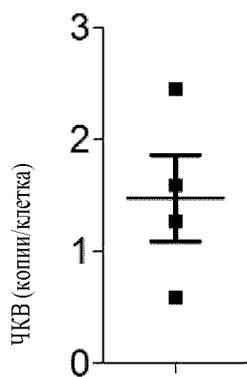
Фиг. 135G



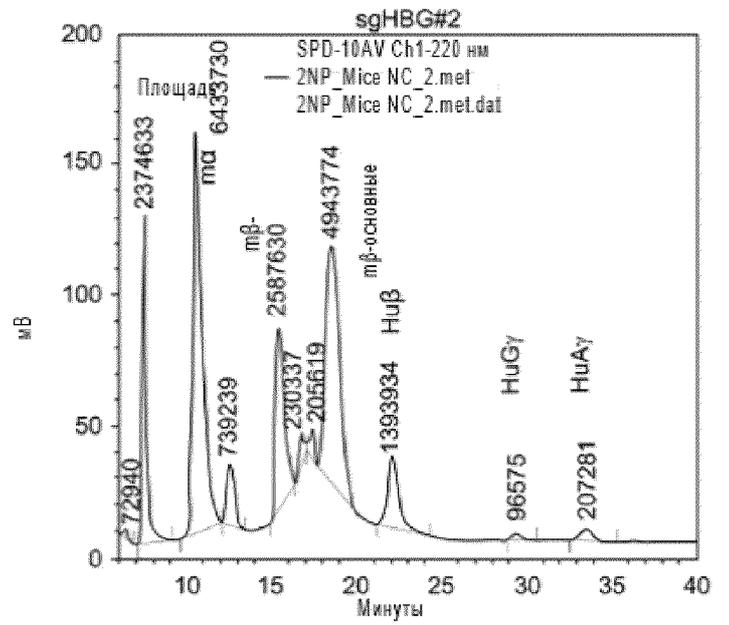
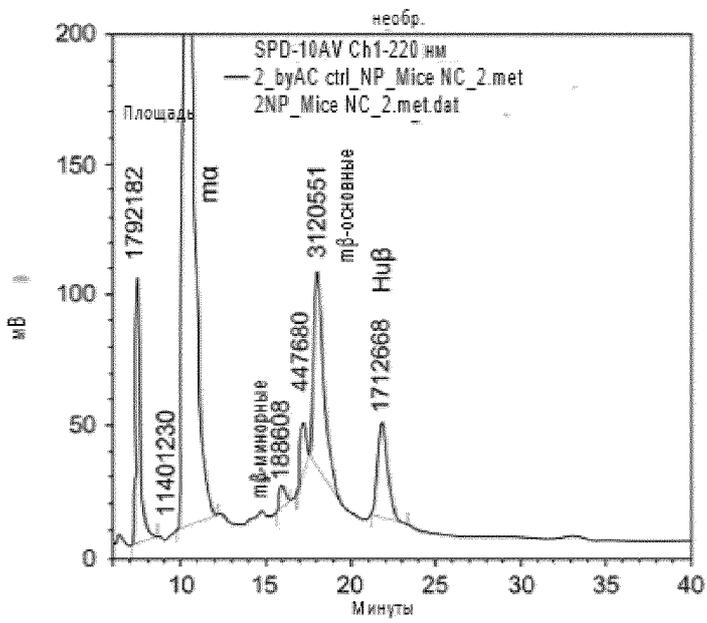
Фиг. 135H



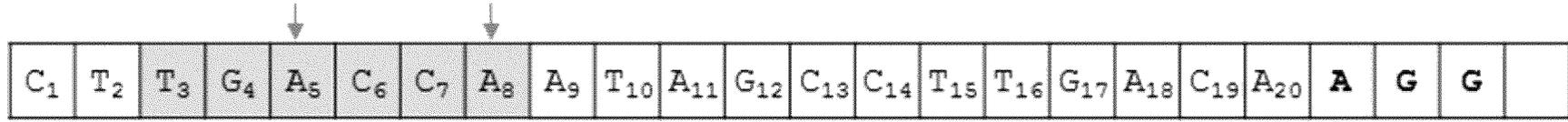
Фиг. 135I



Фиг. 136

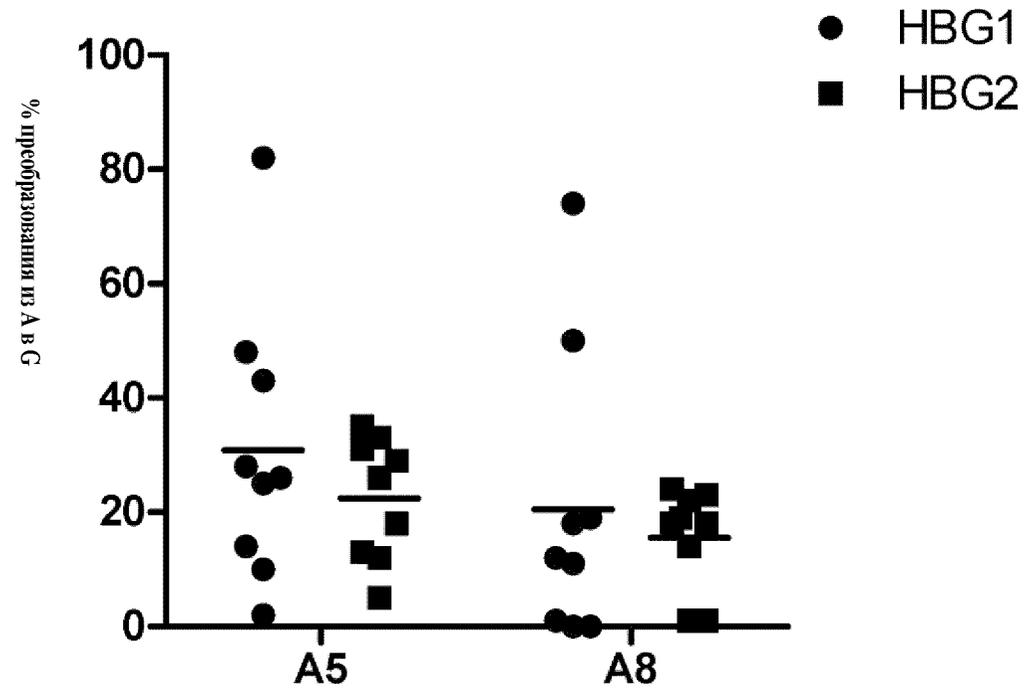


Фиг. 137А



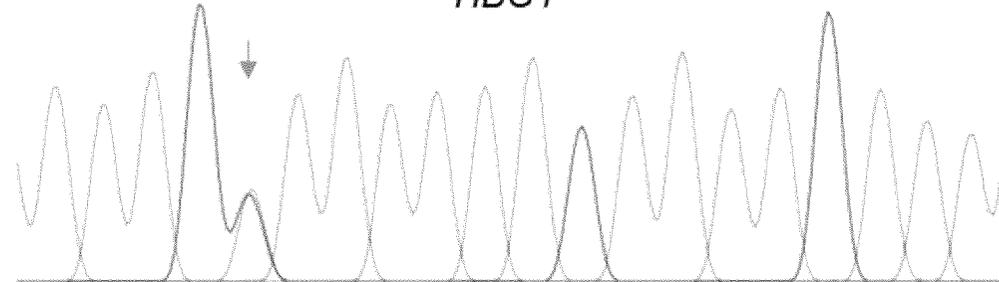
(SEQ ID NO: 276)

Фиг. 137В



Фиг. 137С

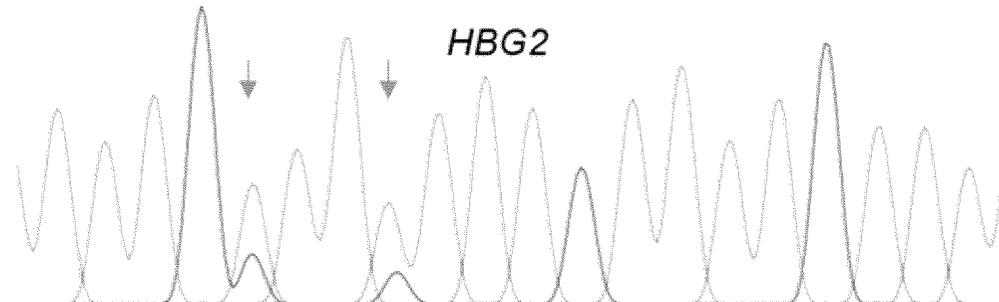
HBG1



(SEQ ID NO: 250)

	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
G	0	0	0	100	48	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0
C	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100
A	0	0	0	0	52	0	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100

HBG2

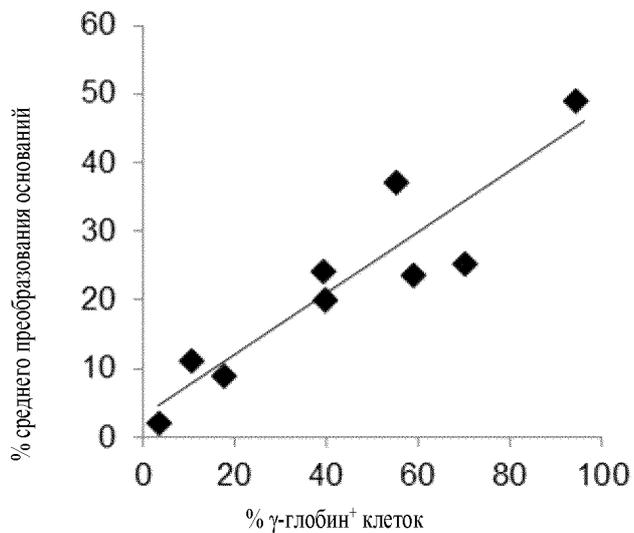


(SEQ ID NO: 250)

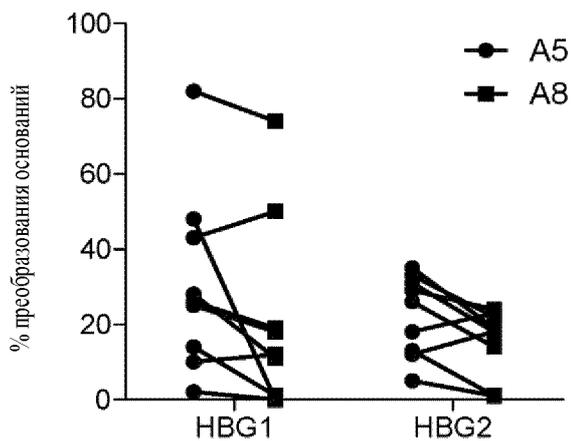
	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
G	0	0	0	100	29	0	0	24	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0
C	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100
A	0	0	0	0	71	0	0	76	100	0	100	0	0	0	0	0	0	99	0	100

305/350

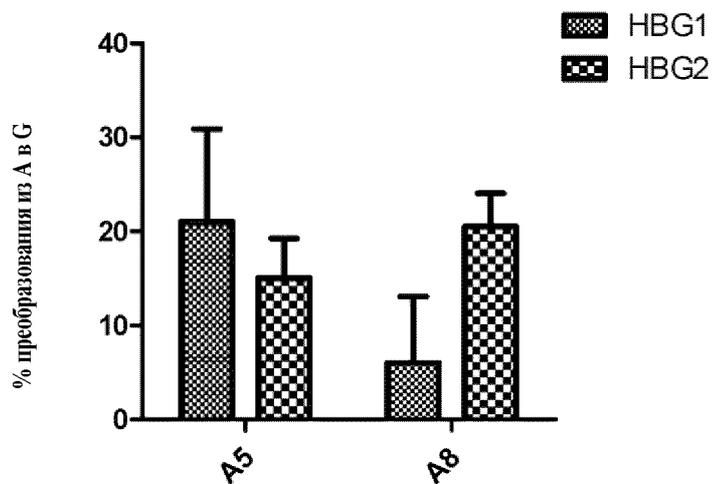
Фиг. 137D



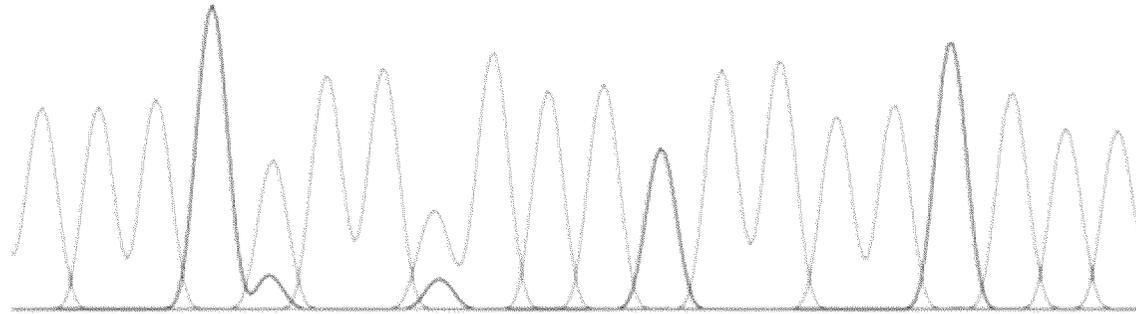
Фиг. 137E



Фиг. 137F



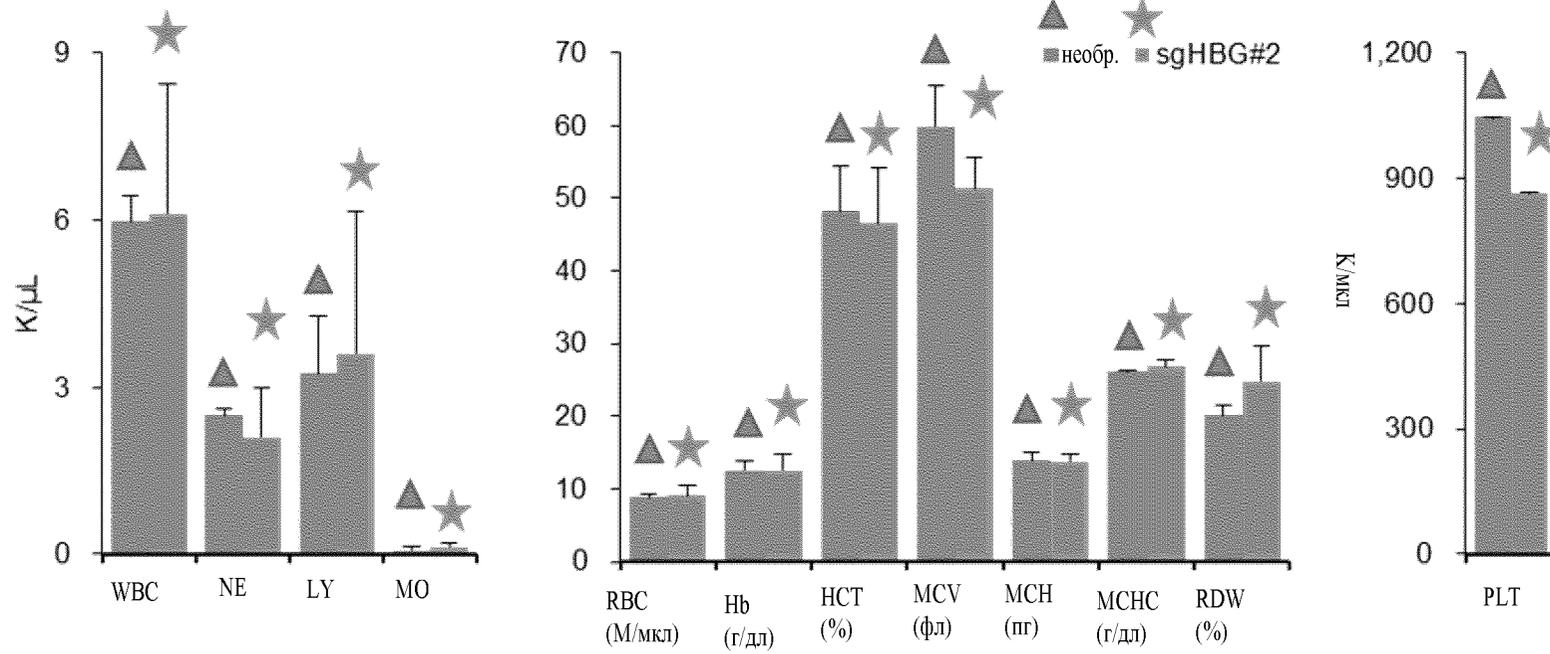
Фиг.137G



(SEQ ID NO: 250)

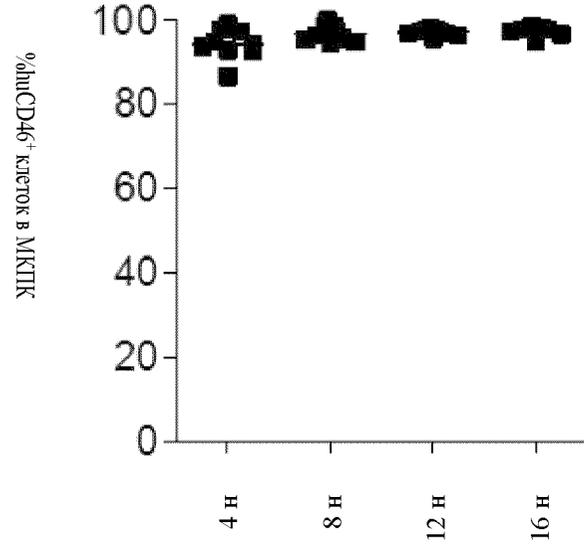
	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
G	0	0	0	100	18	0	0	23	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0
C	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	0
A	0	0	0	0	82	0	0	77	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100

Фиг. 138А

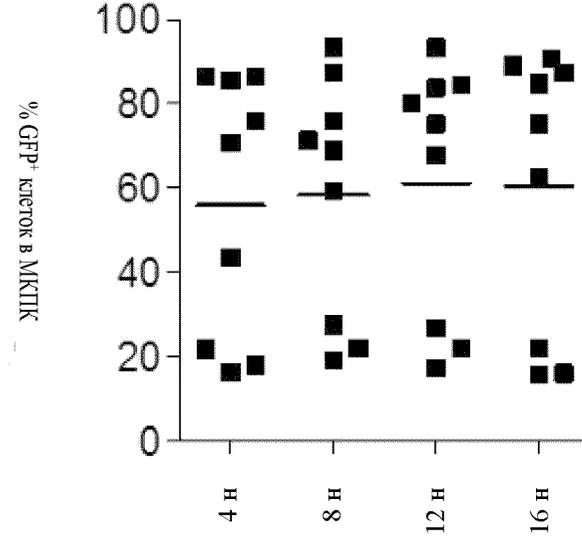


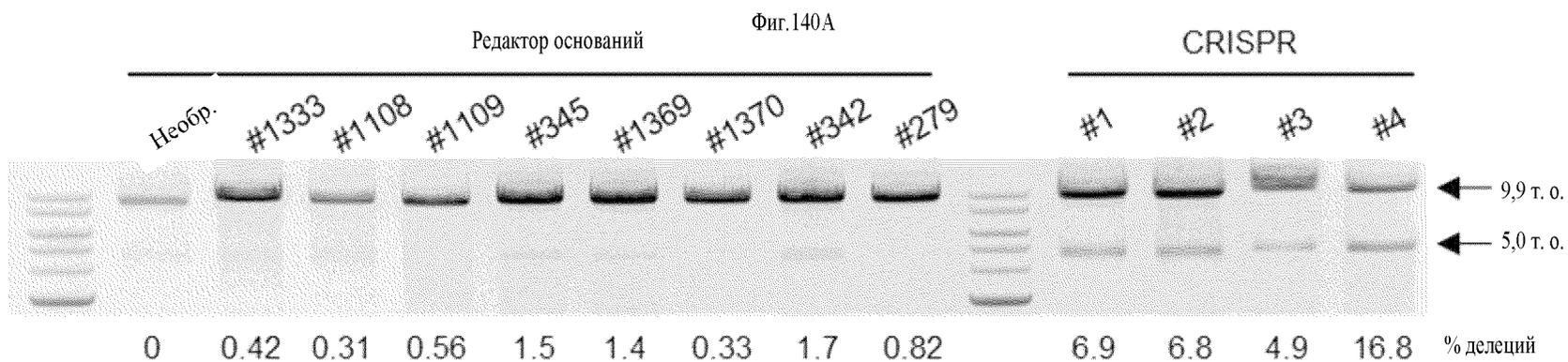
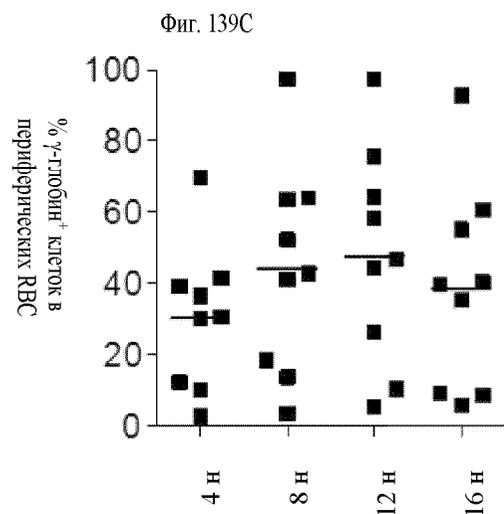
307/350

Фиг. 139А

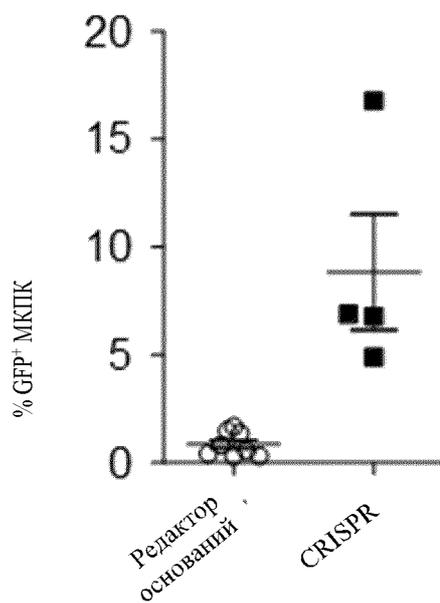


Фиг. 139В

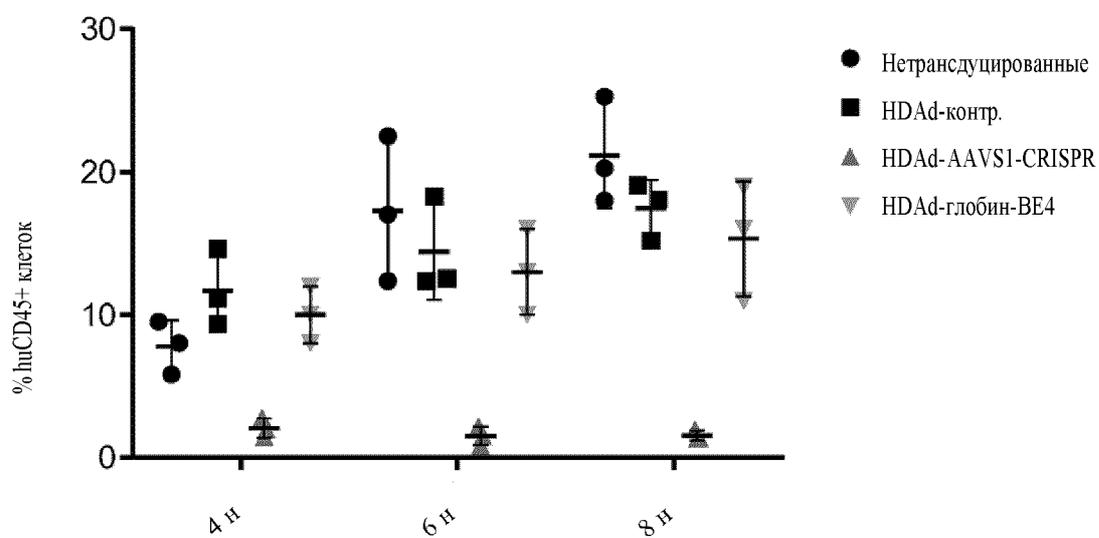




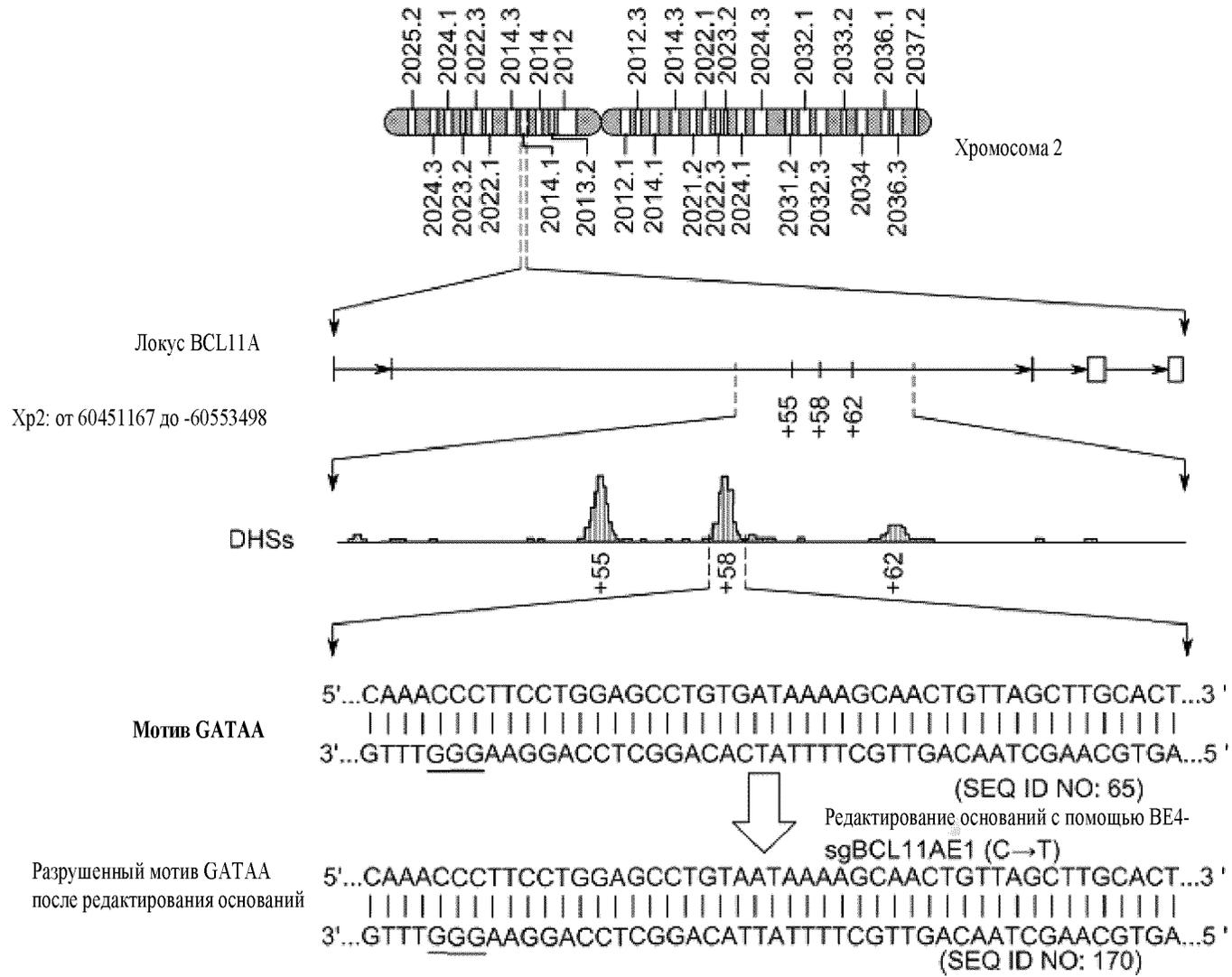
Фиг. 140В



Фиг. 141

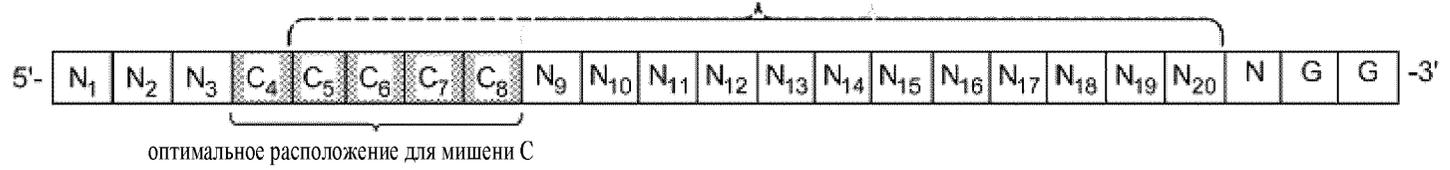


Фиг. 142

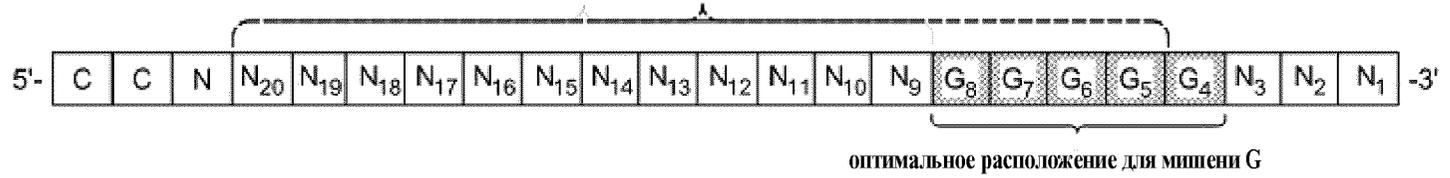


Фиг. 143

12-16 оснований между мишенью С и 5' концом NGG PAM

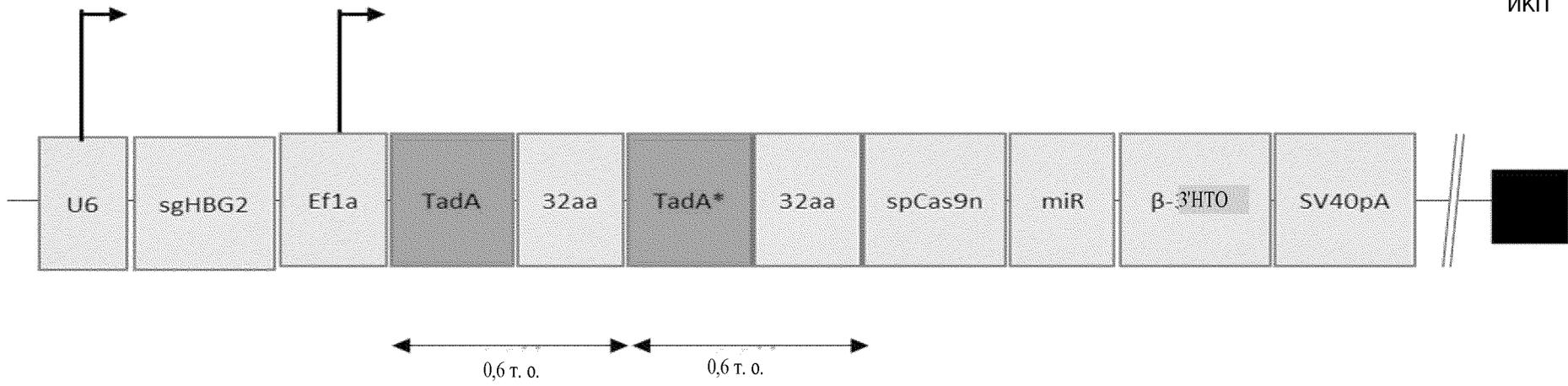
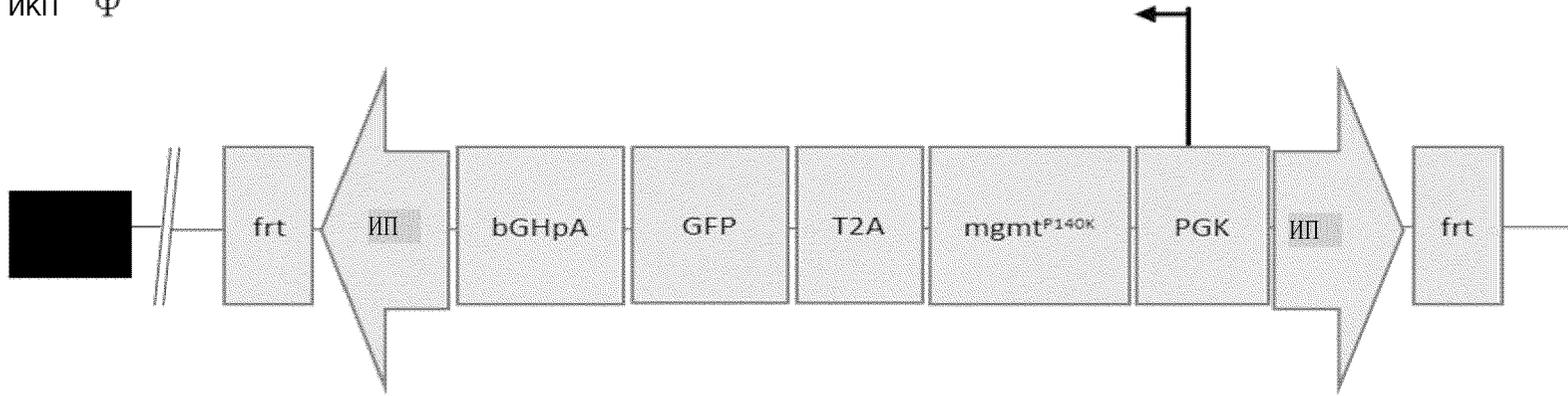


12-16 оснований между мишенью G и 3' концом CCN PAM



Фиг. 145

ИКП Ψ



315/350

TadA (дикий тип), для поддержания стабильности
TadA* (вовлеченный): отвечает за редактирование

Фиг. 146

1 SEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVINNRVIGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTGAAGSLMDVL
TadA*1[R].....[L].....[A][L].....[F].....[V][N].....

361 HHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRROEIKAKKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS (SEQ ID NO: 265)

361 [Y].....[CY]...[P].[VFN]..... (SEQ ID NO: 266)

последовательность ДНК двух 'TadA + 32ак'

TadA 1 tctgaagtcgagtttagccacgagtattggatgaggcagcactgacctggcaaagcgagcatgggatgaaagagaagccccgtggcgccgtgctggcacaacaatagagtgatc
TadA*1[g].[g].....[tc].....[c].....[a].[t].[c].....[c]...[a][g]..[c][c]....[g].[g].[g].[g].[t]....[a].....[tg].....

121 ggagagggatggaacaggccaatcggccgccagacctaccgcacagcgagagatcatggcactgaggcagggaggcctggatgcagaatfaccgctgatcgatgccaccctgtat
121 ..[c]....[c].....[ag][c].....[tg].....[a].[a].[c].[t].[c].[a].[t]....[c]....[a]....[c].....[c]..[a][a]...[t].[c].....[c]

241 gtgacactggagccatgcgtgatgtgcgcaggagcaatgatccacagcaggatcggagagtggtgttcggagcacgggacgccaagaccggcgcagcaggctccctgatggatgtgctg
241[t][c]....[t].....[c].[c].[c].....[tct].....[cc][c].....[t].[c][tga].[a]..[a].[a].....[c].....[c].....

361 caccacccggcatgaaccaccgggtggagatcacagagggaaatcctggcagacgagtgcgccgacctgctgagcgatttctttagaatgaggagacaggagatcaaggcccagaagaag
361 ..[t].....[t]....[c].[c].[a].[t].[c].....[t].[a].[t].....[t].[t].....[c][g]...[ct].....[t].[t]...[t].[t].....

481 gcacagagctccaccgactctggaggatctagcggaggatcctctggaagcgagacaccaggcacaagcgagtcggccacaccagagagctccggcggtcctccggaggatcc
481 ..[c].....[c].....[c].....[ctct].....[t].....[ag].[a]....[t].[a]..[ag]..[g]..[ag].[ag]..[g].[g].[a]

(SEQ ID NO: 267)

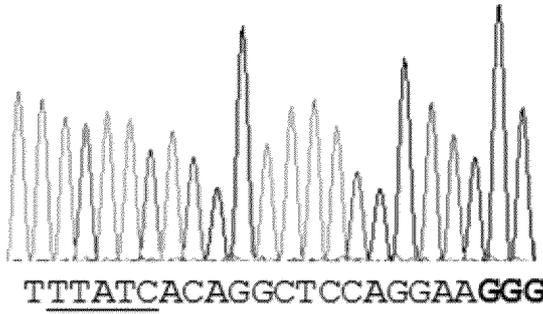
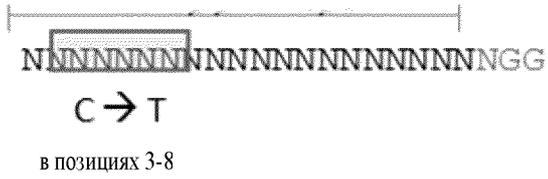
(SEQ ID NO: 268)

317/350

Фиг. 147

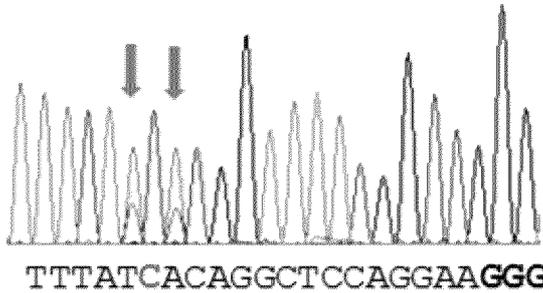
20 п. о. протоспейсер

Редактор цитидиновых оснований



Последовательность дикого типа
Подчеркнуто: Мотив GATAA
Выделено жирным: Мотив PAM

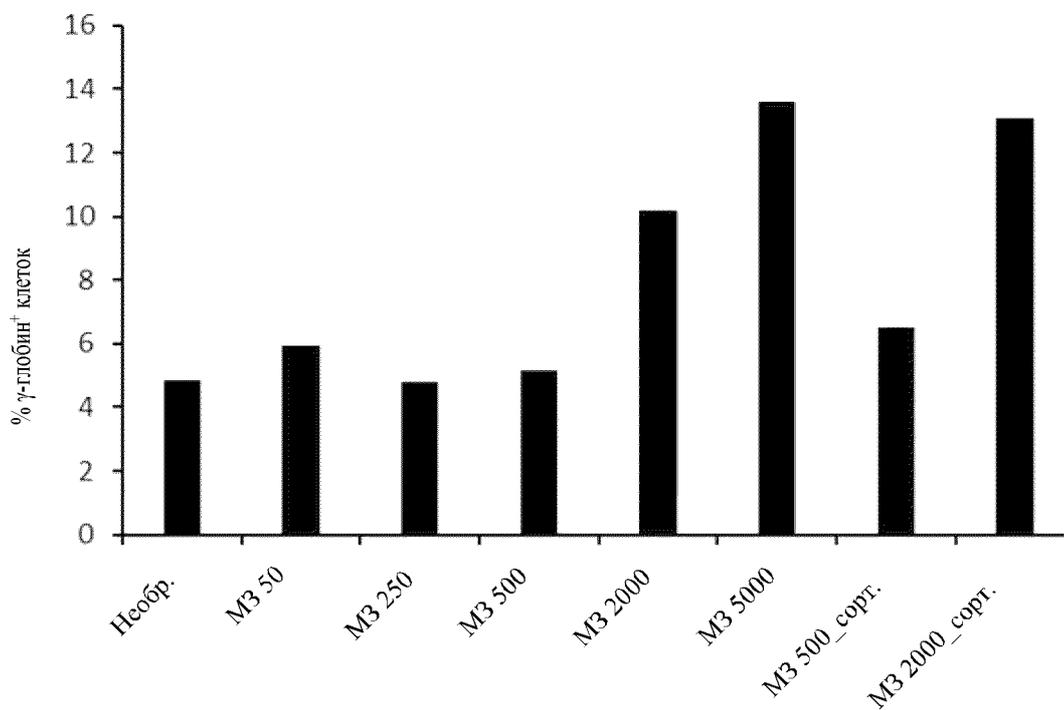
(SEQ ID NO: 269)



Последовательность после редактирования оснований
Стрелки: отредактированные основания
Пурпурный цвет: разрушенное основание мотива GATAA

(SEQ ID NO: 269)

Фиг. 149



Фиг. 150

Повторная активация НbF за счет редактирования оснований

Редактор цитидиновых оснований: C → T
 Редактор адениновых оснований: A → G

Сконструированные векторы:

pBS-AncBE4max-sgBCL11AE1

pBS-AncBE4max-sgBCL11AE2

pBS-ABEmax-sgBCL11AE3

pBS-ABEmax-sgBCL11AE4

+58 мотив GATA, G → A

+58 мотив GATA, G → A

+58 мотив GATA, T → C

+58 мотив GATA, T → C

pBS-AncBE4max-sgHBG1

pBS-ABEmax-sgHBG2

pBS-ABEmax-sgHBG3

pBS-ABEmax-sgHBG4

13 п. о. делеция, ССААТ-бокс, CC → TT

13 п. о. делеция, ССААТ-бокс, A → G

13 п. о. делеция, ССААТ-бокс, T → C

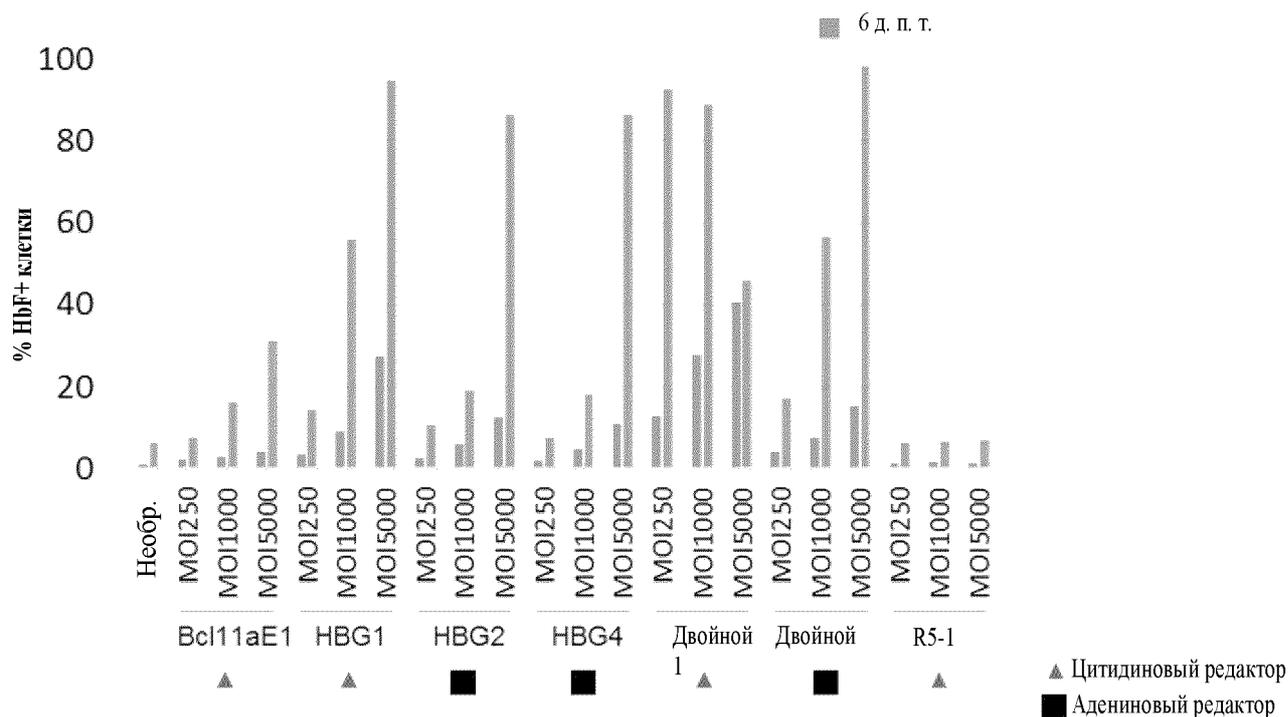
-198T→C

pBS-AncBE4max-sgR5-1

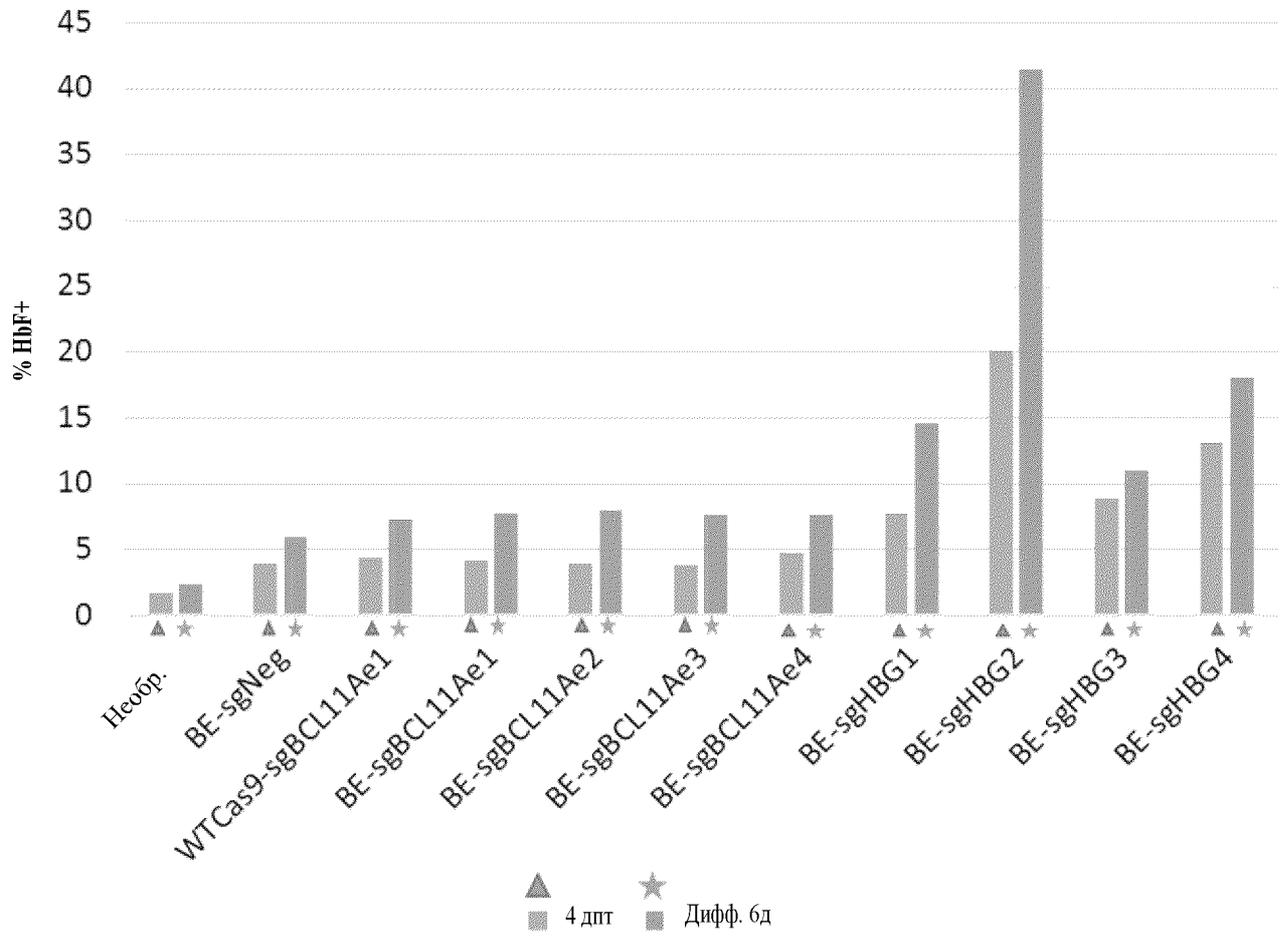
контроль

Фиг. 151

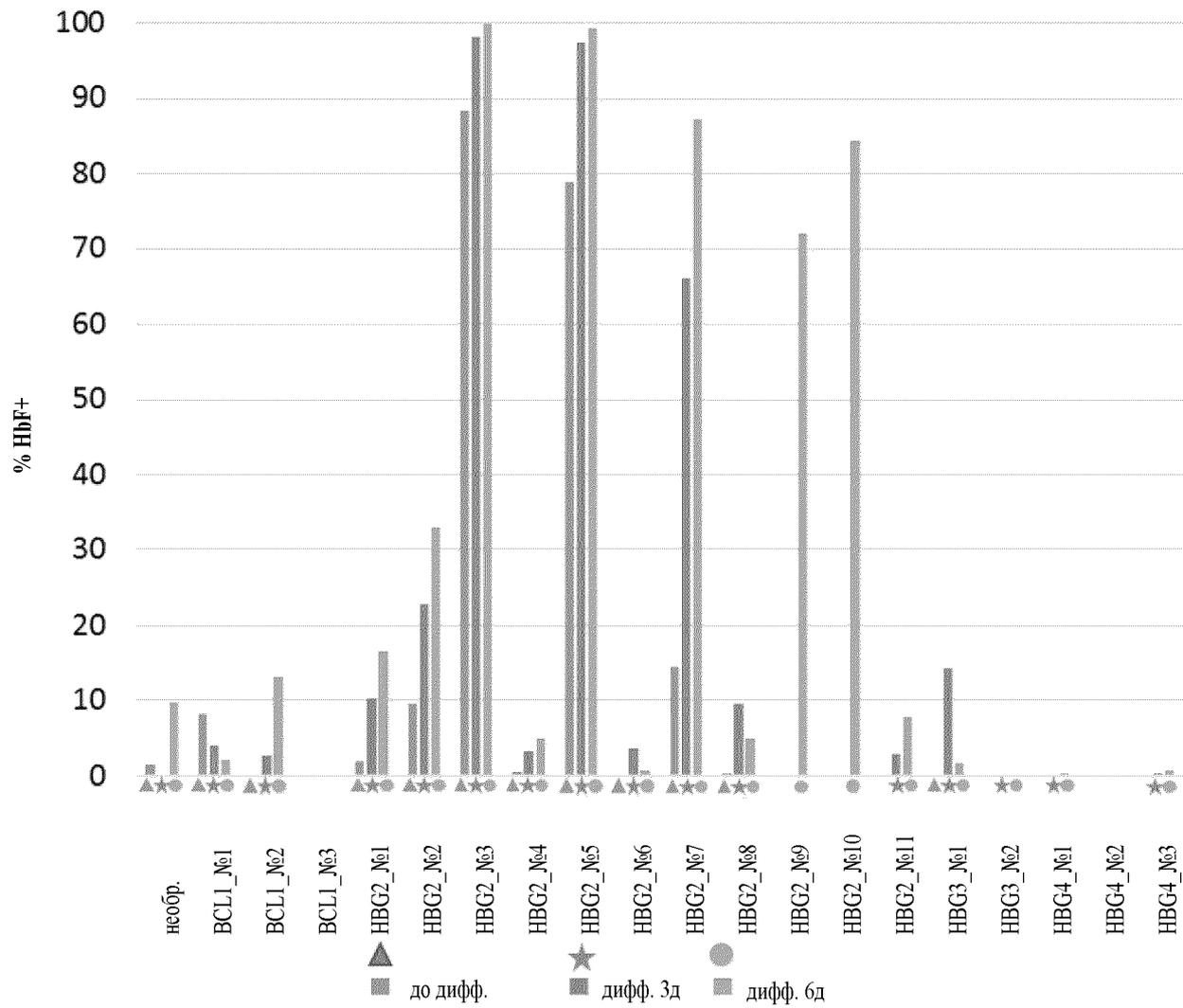
Дата	Полное название	Титр	Примечание
101918-3	HDAd5/35+_BE4max-sgBCL11Ae1-FI-mgmtGFP	0.5×10^{e12}	
→ 041619-2	HDAd5/35+_BE4max-sgHBG1-FI-mgmtGFP	очень низкий (использовать как $0,05 \times 10^{e12}$)	
→ 032819-1	HDAd5/35+_ABEopti-sgHBG2-FI-mgmtGFP	2.8×10^{e12}	
→ 041819-1	HDAd5/35+_ABEopti-sgHBG4-FI-mgmtGFP	1.52×10^{e12}	
→ 041619-3	HDAd5/35+_BE4max-Двойной-FI-mgmtGFP	очень низкий (использовать как $0,05 \times 10^{e12}$)	sgBcl1 + sgHBG1
041619-1	HDAd5/35+_ABEopti-Двойной-пропуск-FI-mgmtGFP	2.5×10^{e12}	sgHBG2 + sgHBV-Стоп
041819-2	HDAd5/35+_BE4max-sgR5-l-FI-mgmtGFP	0.9×10^{e12}	Не-нацеленный Контр



Фиг. 152



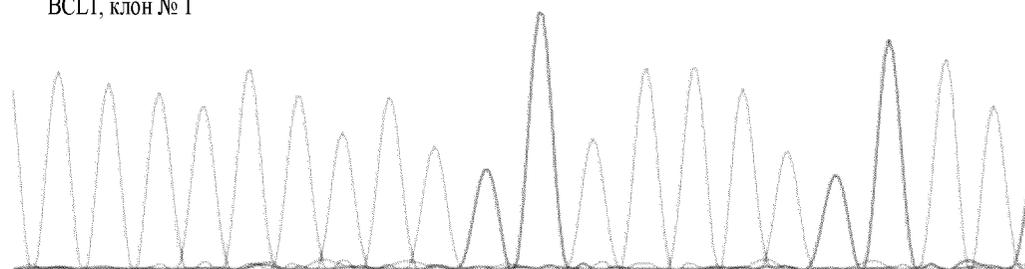
Фиг.153



Фиг. 154А

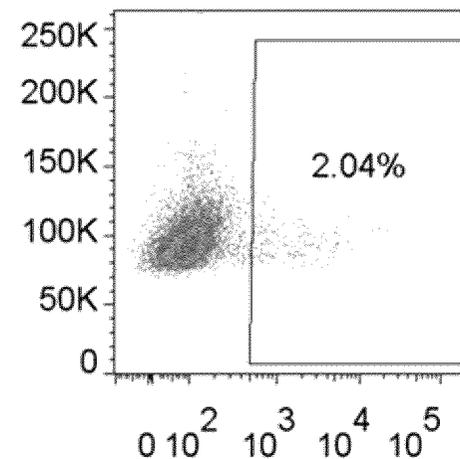
Клоны из одиночных клеток

BCL1, клон № 1



	T	T	T	A	T	C	A	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A
T	98	97	96	5	92	3	6	4	0	3	1	5	97	3	0	7	0	1	2	2
G	1	0	0	1	2	0	2	0	3	92	97	4	0	0	1	2	96	96	3	0
C	0	2	1	1	3	95	6	93	4	1	2	90	3	97	97	3	1	0	0	0
A	1	1	3	94	3	2	86	3	94	5	0	1	0	0	2	87	3	4	96	98

(SEQ ID NO: 271)

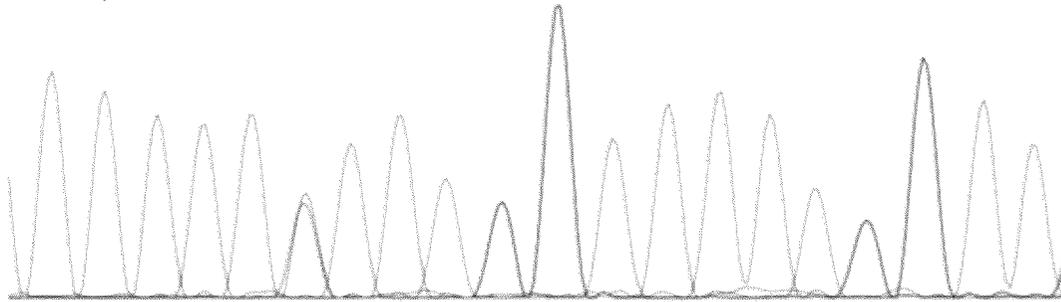


323/350

Фиг.154В

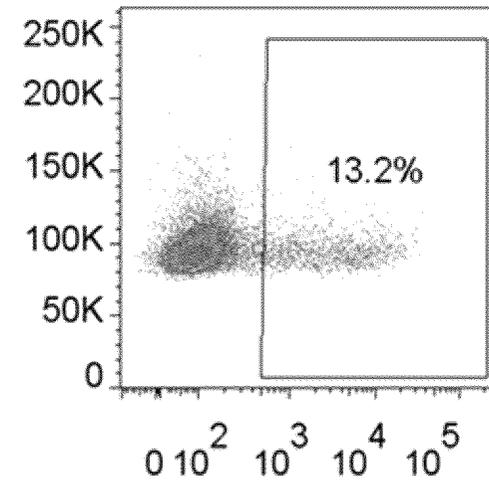
Клоны из одиночных клеток

ВСL1, клон №2



	T	T	T	A	T	C	A	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A
T	98	98	97	4	96	52	1	2	5	0	1	4	97	3	6	0	0	1	1	2
G	0	0	0	1	0	0	0	1	1	93	97	3	0	0	1	1	96	95	3	2
C	1	2	2	0	1	47	3	95	4	2	1	92	3	94	92	7	1	1	0	0
A	1	0	2	95	3	1	96	3	90	4	1	1	0	2	1	92	3	4	96	96

(SEQ ID NO: 271)

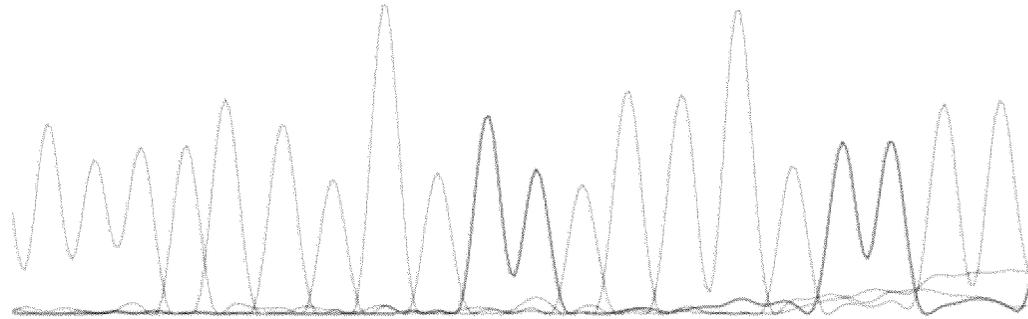


324/350

Фиг. 154С

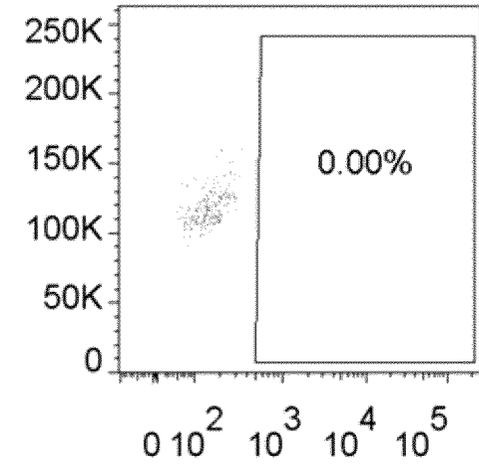
Клоны из одиночных клеток

ВСL1, клон № 3



	T	T	T	A	T	C	A	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A
T	97	97	91	1	94	4	0	3	1	2	10	1	95	2	0	0	7	9	14	16
G	0	2	2	1	0	0	0	0	2	94	85	1	2	0	5	7	79	74	0	6
C	3	0	1	1	1	93	3	95	3	3	4	91	1	95	95	9	9	11	9	0
A	0	2	6	98	5	3	97	3	95	0	1	6	2	3	0	84	5	6	77	78

(SEQ ID NO: 271)

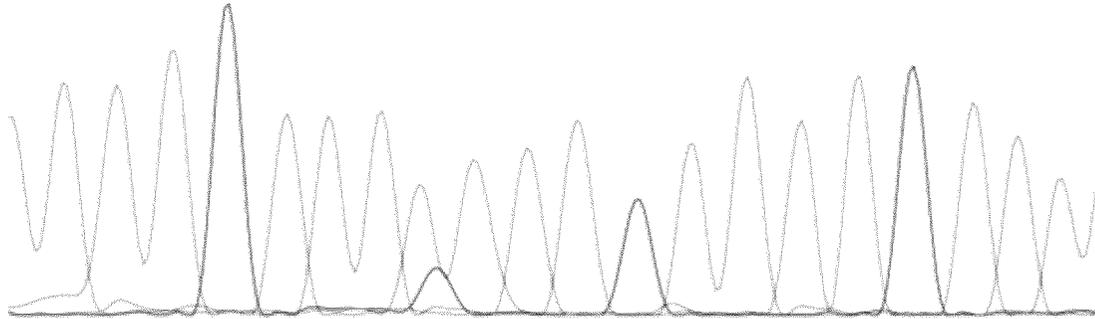


325/350

Фиг.154D

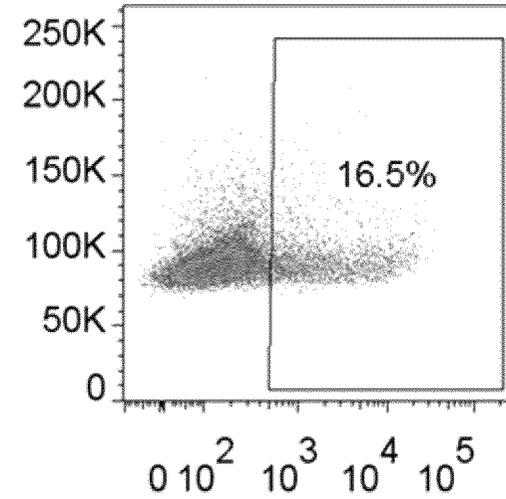
Клоны из одиночных клеток

HBG2, клон №1



	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	8	91	95	1	2	2	3	3	1	97	0	1	2	2	95	96	1	1	1	2
G	1	1	1	96	2	4	0	25	1	1	0	97	1	1	0	1	97	1	2	0
C	92	6	0	1	1	93	96	4	0	2	1	2	91	97	5	1	1	1	96	4
A	0	2	3	1	95	1	1	68	97	0	98	1	6	1	0	2	1	97	1	94

(SEQ ID NO: 250)

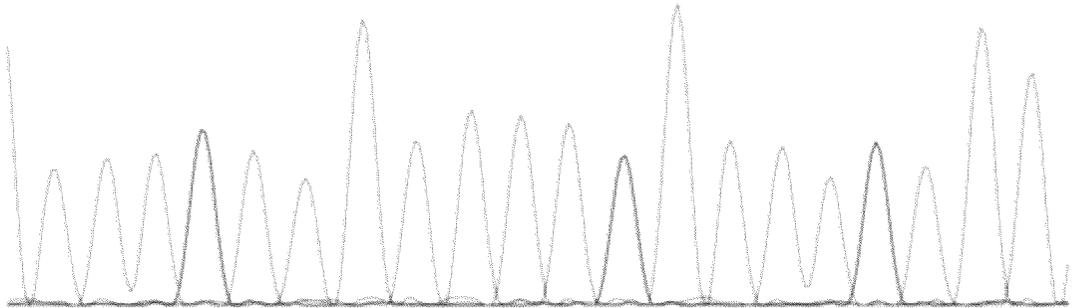


326/350

Фиг. 154Е

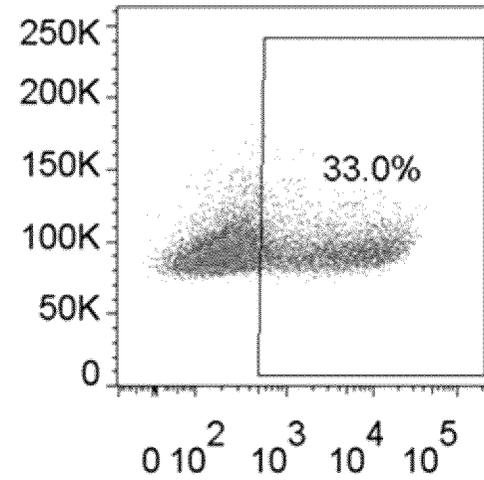
Клоны из одиночных клеток

HBG2, клон № 2



	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	3	94	93	2	2	3	3	1	4	93	3	2	2	2	95	92	3	2	2	0
G	2	1	2	94	3	1	1	0	0	1	1	91	1	1	1	2	95	2	1	0
C	95	4	3	2	2	91	95	5	2	2	2	3	96	96	3	4	0	4	96	3
A	0	1	2	2	94	4	1	94	94	3	93	4	1	0	1	2	2	92	1	97

(SEQ ID NO: 250)

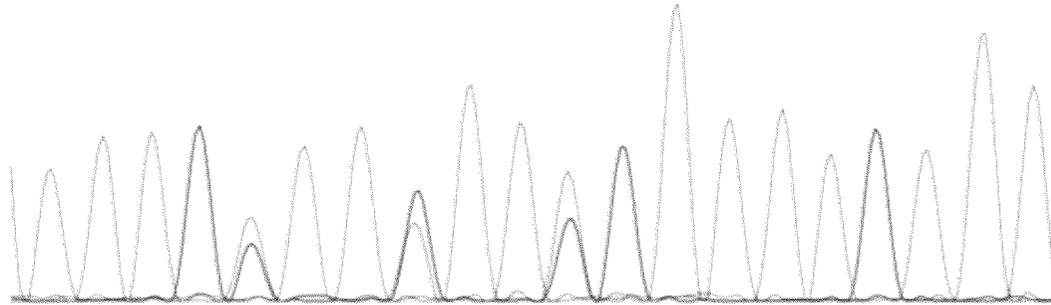


327/350

Фиг.154F

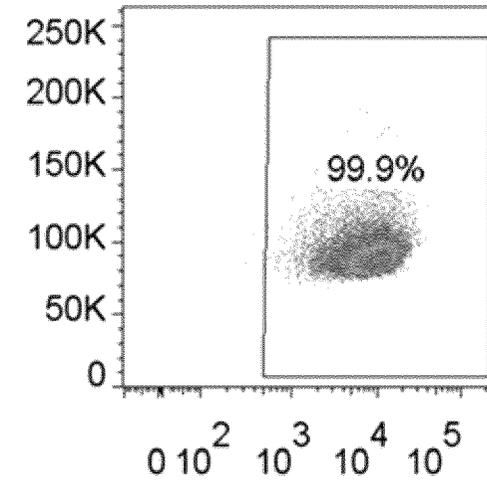
Клоны из одиночных клеток

HBG2, клон № 3



	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	4	95	94	4	3	4	3	2	3	93	3	2	0	4	95	94	3	1	1	1
G	0	1	3	92	38	1	1	55	2	1	37	89	1	0	1	3	94	3	0	2
C	93	4	2	0	3	92	93	3	1	1	2	4	97	96	3	2	0	4	97	4
A	3	0	2	3	56	3	2	39	95	5	58	5	1	0	1	1	3	92	2	94

(SEQ ID NO: 250)

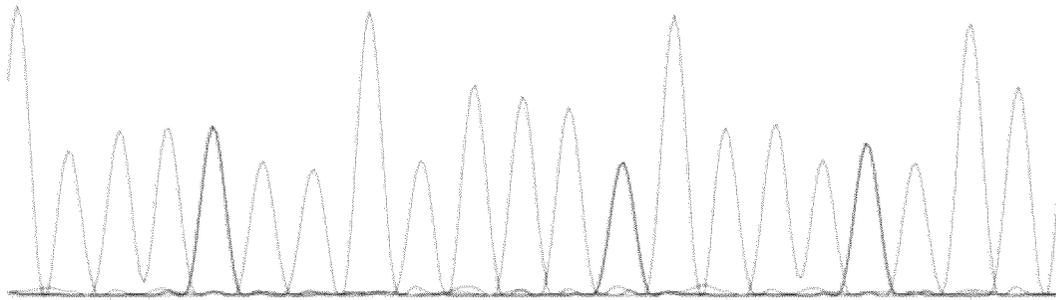


328/350

Фиг. 154G

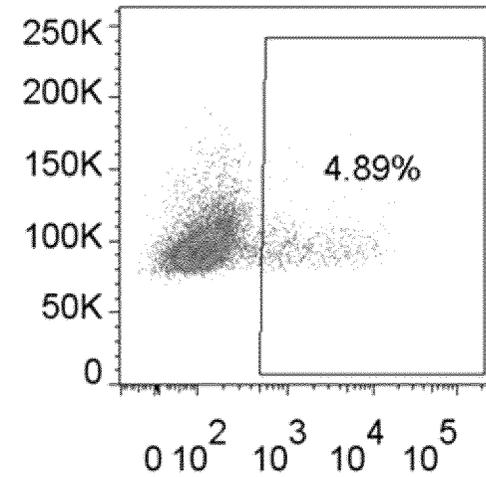
Клоны из одиночных клеток

HBG2, клон № 4



	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	5	96	92	2	2	3	2	1	4	94	3	1	0	6	96	91	2	2	2	0
G	1	1	2	94	3	0	1	1	0	0	1	90	1	0	1	2	94	3	0	1
C	94	3	4	2	3	94	96	6	2	2	1	3	98	94	3	5	2	4	96	4
A	0	0	1	2	92	3	1	92	94	3	94	6	1	0	0	2	2	91	1	95

(SEQ ID NO: 250)



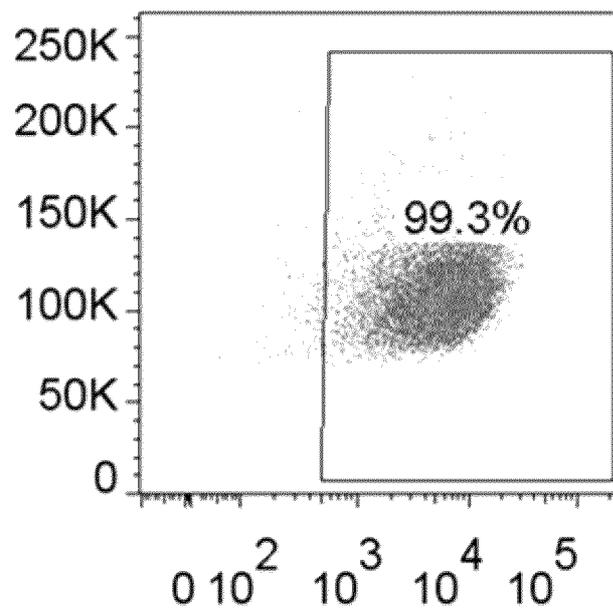
329/350

330/350

Фиг.154Н

Клоны из одиночных клеток

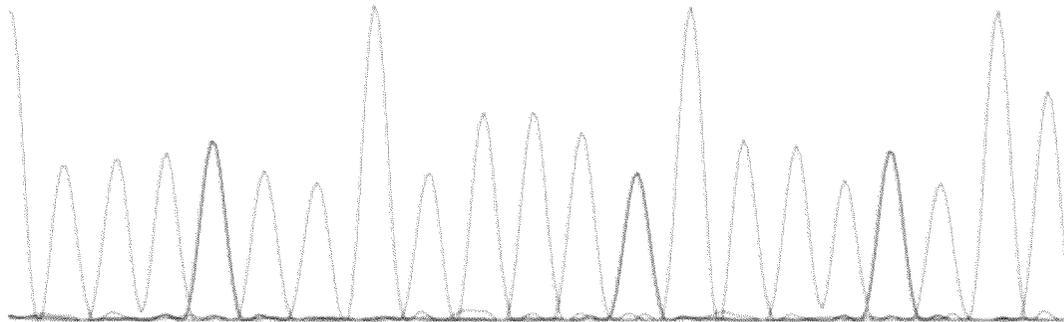
HBG2, клон № 5



Фиг.154I

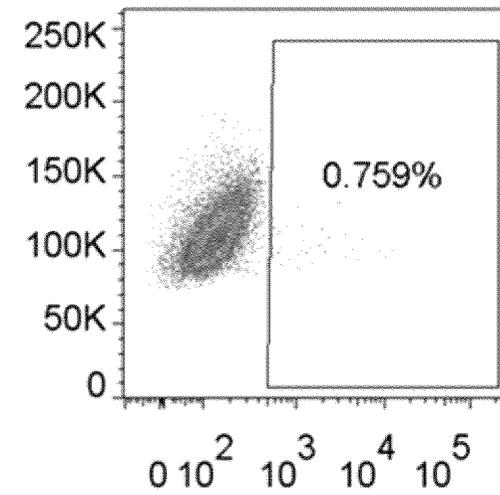
Клоны из одиночных клеток

HBG2, клон № 6



	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	4	95	92	3	2	2	1	2	5	95	3	1	0	4	96	92	2	1	1	0
G	0	1	3	95	3	0	1	1	0	1	2	91	1	0	0	3	94	3	0	1
C	96	5	2	0	1	94	97	6	1	1	0	4	98	96	3	2	1	4	98	4
A	0	0	3	2	93	3	1	92	95	3	94	4	0	0	0	3	2	91	1	95

(SEQ ID NO: 250)

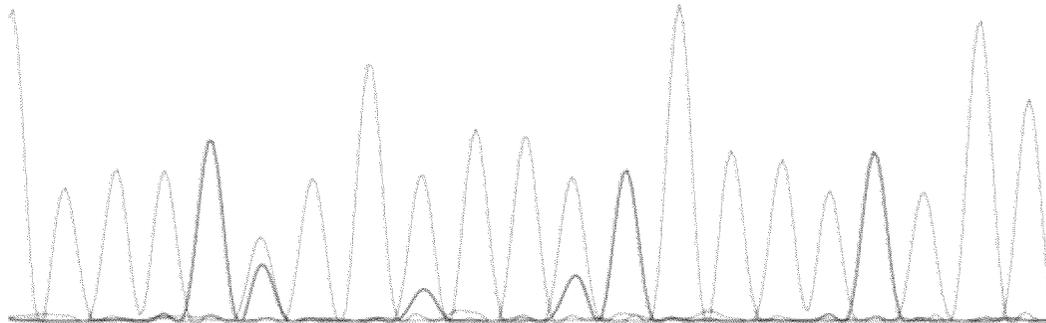


331/350

Фиг.154J

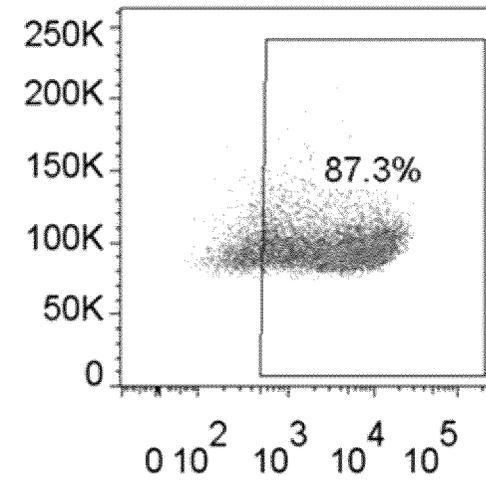
Клоны из одиночных клеток

HBG2, клон № 7



	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	5	95	90	3	2	2	1	0	5	94	3	1	1	6	95	93	2	1	1	1
G	0	1	4	93	39	1	0	17	0	0	24	91	1	1	1	5	95	3	0	1
C	95	3	3	1	2	94	97	4	1	2	0	4	97	93	3	2	0	5	97	4
A	0	0	3	3	57	2	1	78	93	3	73	5	1	0	0	0	3	92	1	94

(SEQ ID NO: 250)

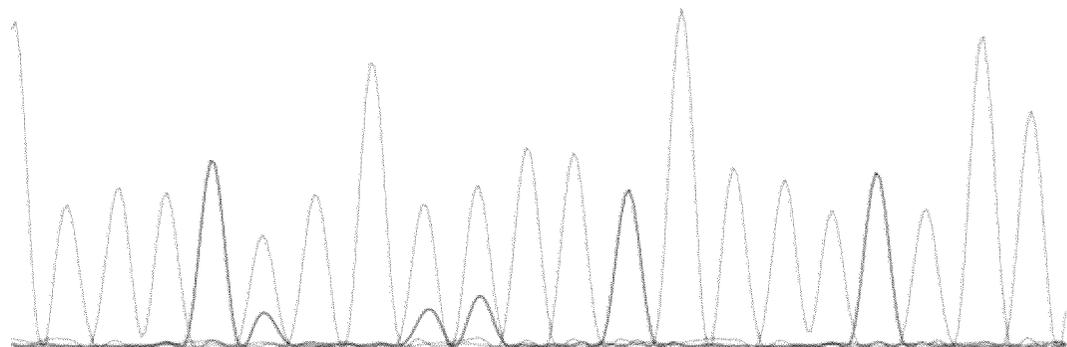


332/350

Фиг. 154К

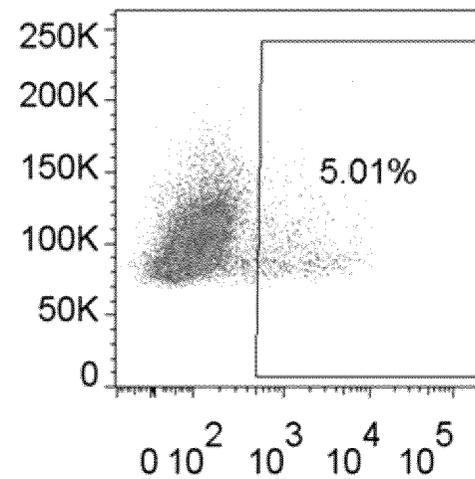
Клоны из одиночных клеток

HBG2, клон № 8



	C	T	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	C	C	T	T	G	A	C	A
T	5	96	94	3	3	3	1	0	4	96	4	1	0	4	96	93	2	2	1	2
G	2	1	3	93	22	1	0	20	23	0	2	90	1	1	1	3	94	3	0	0
C	93	3	2	1	2	94	97	4	1	1	1	4	99	95	3	2	1	4	97	3
A	0	0	1	3	73	2	1	76	72	3	94	4	0	0	0	2	2	91	1	94

(SEQ ID NO: 250)



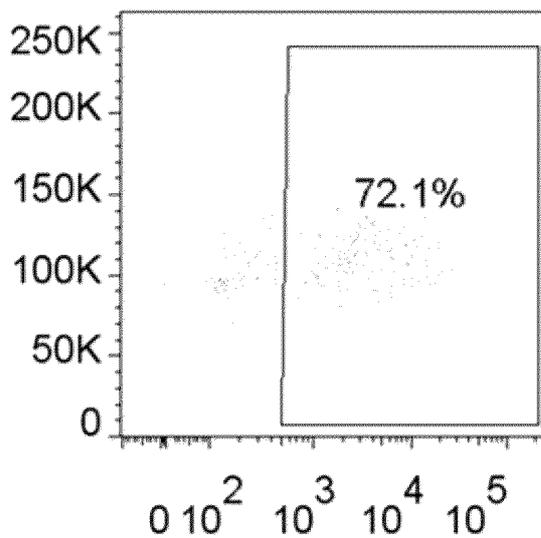
333/350

334/350

Фиг. 154L

Клоны из одиночных клеток

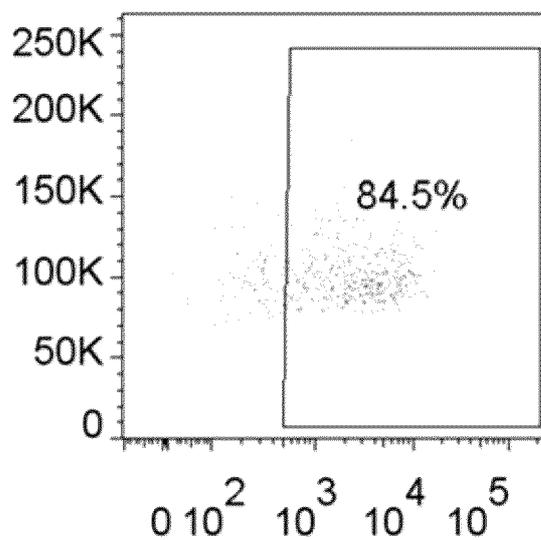
HBG2, клон № 9



Фиг. 154M

Клоны из одиночных клеток

HBG2, клон № 10

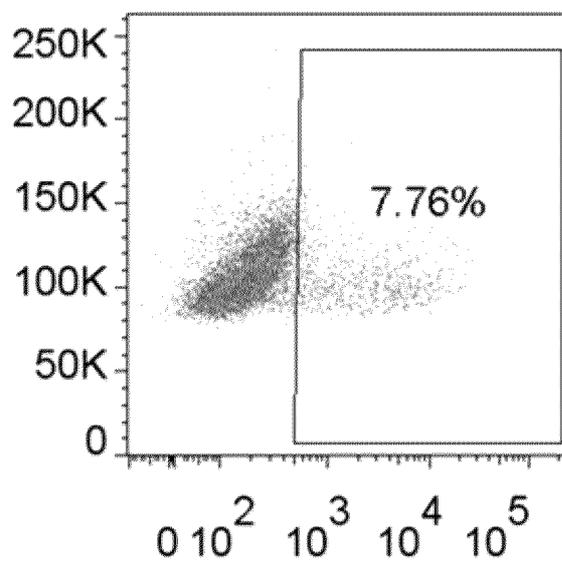


335/350

Фиг. 154N

Клоны из одиночных клеток

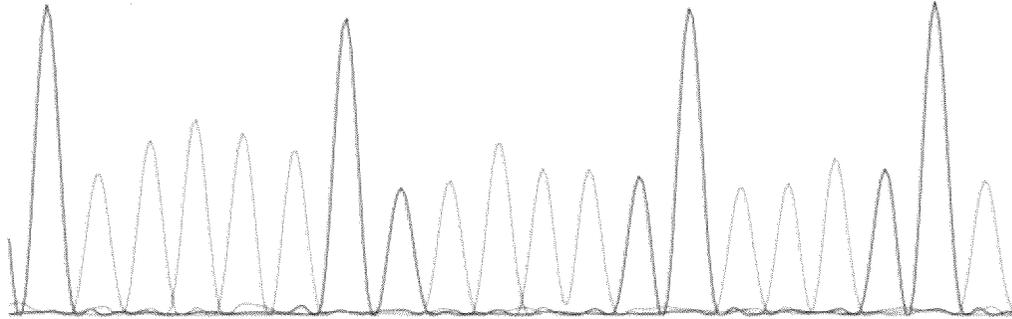
HBG2, клон № 11



Фиг. 1540

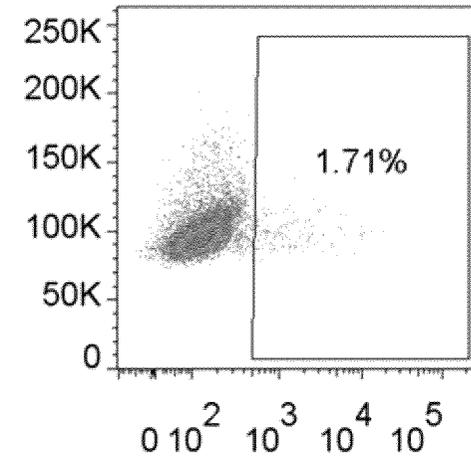
Клоны из одиночных клеток

HBG3, клон №1



	G	C	T	A	T	T	G	G	T	C	A	A	G	G	C	A	A	G	G	C
T	1	5	93	3	93	94	2	4	91	3	4	0	1	1	4	0	1	1	2	5
G	98	3	1	2	1	5	96	92	2	1	2	4	95	95	5	3	3	92	97	4
C	1	89	2	0	0	0	1	1	3	94	5	1	0	1	88	5	2	2	2	90
A	0	2	4	95	6	0	1	3	4	3	89	95	4	2	3	91	93	5	0	0

(SEQ ID NO: 252)

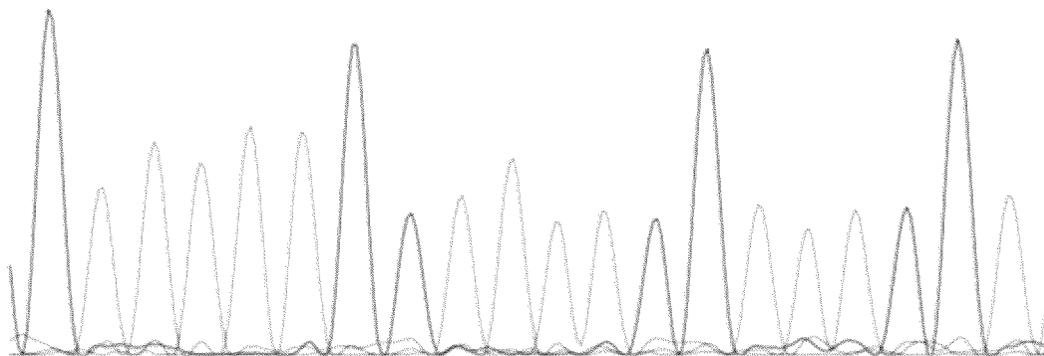


336/350

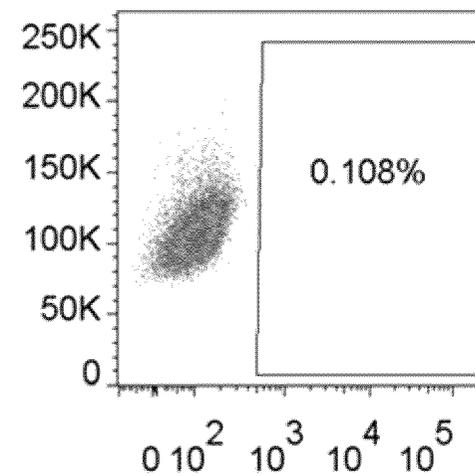
Фиг.154Р

Клоны из одиночных клеток

HBG3, клон № 2



	G	C	T	A	T	T	G	G	T	C	A	A	G	G	C	A	A	G	G	C
T	1	7	88	6	95	90	3	10	85	3	4	2	2	1	0	0	3	0	0	8
G	97	5	4	0	1	5	95	85	5	3	1	8	84	91	5	10	8	85	95	7
C	2	85	2	0	0	1	0	1	6	91	8	5	4	3	91	12	5	8	5	83
A	0	3	6	93	4	4	3	4	5	2	88	85	10	4	3	78	84	8	0	2

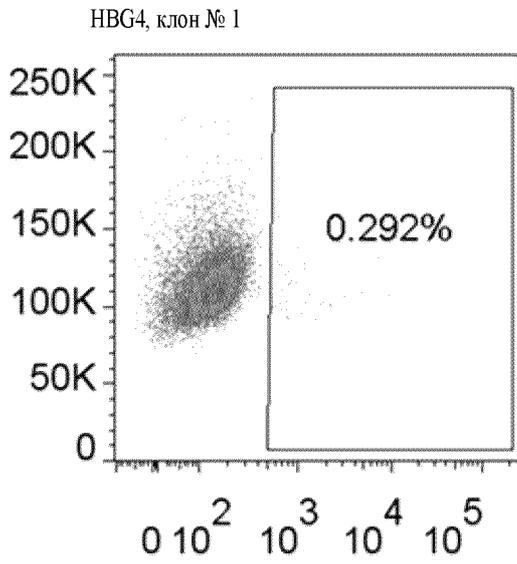


337/350

(SEQ ID NO: 252)

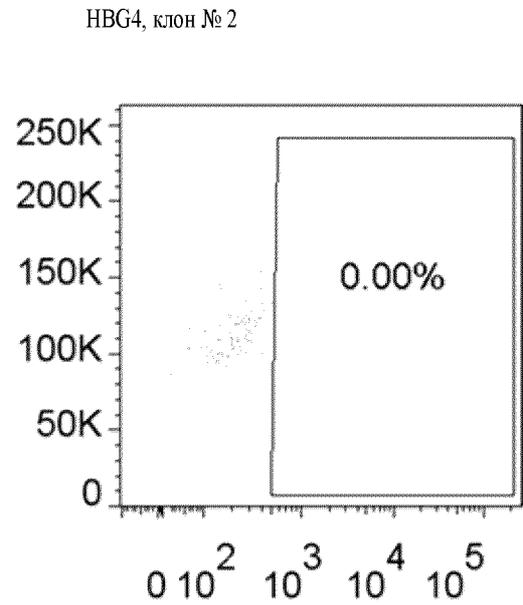
Фиг. 154Q

Клоны из одиночных клеток



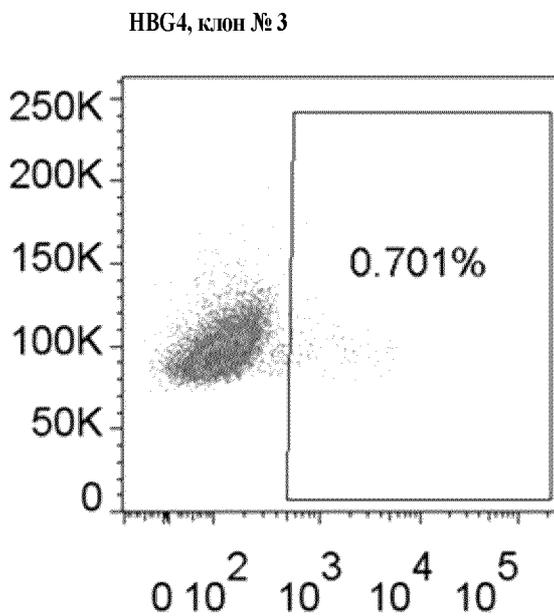
Фиг. 154R

Клоны из одиночных клеток

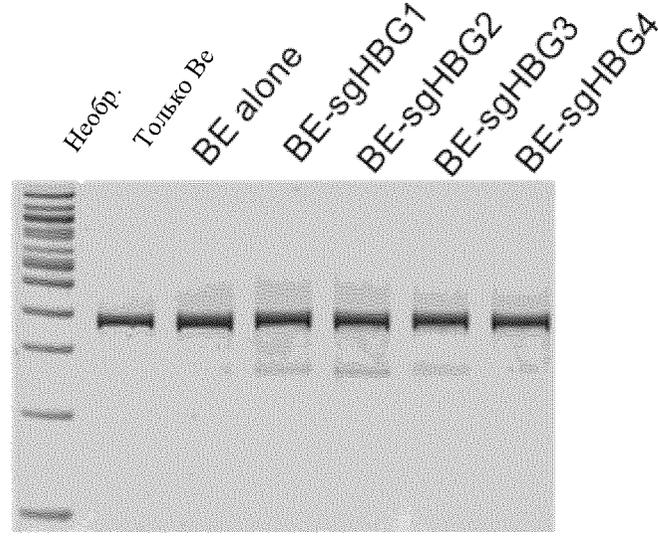
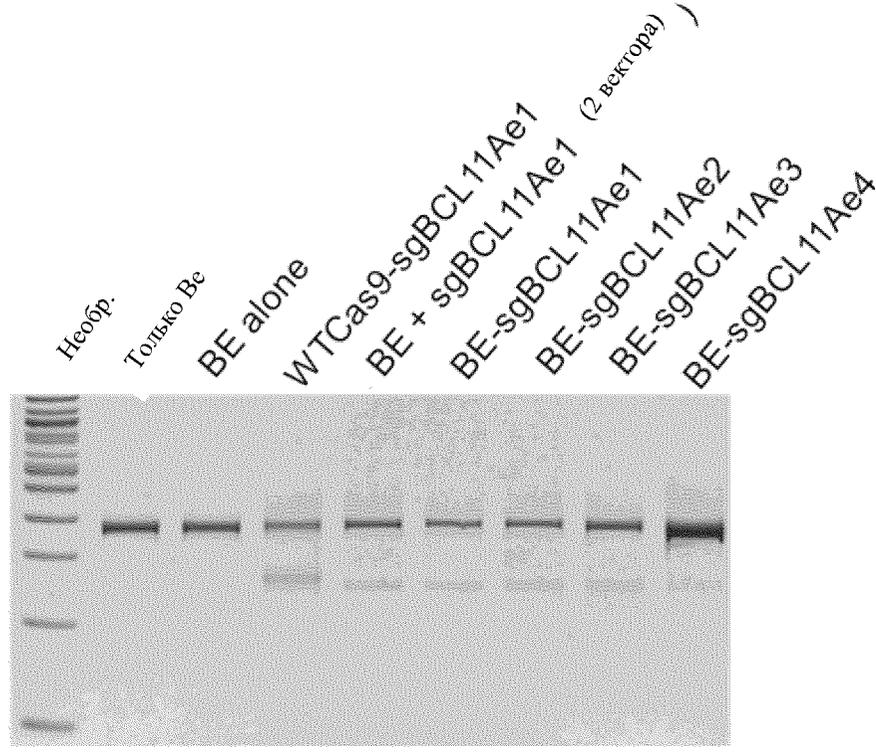


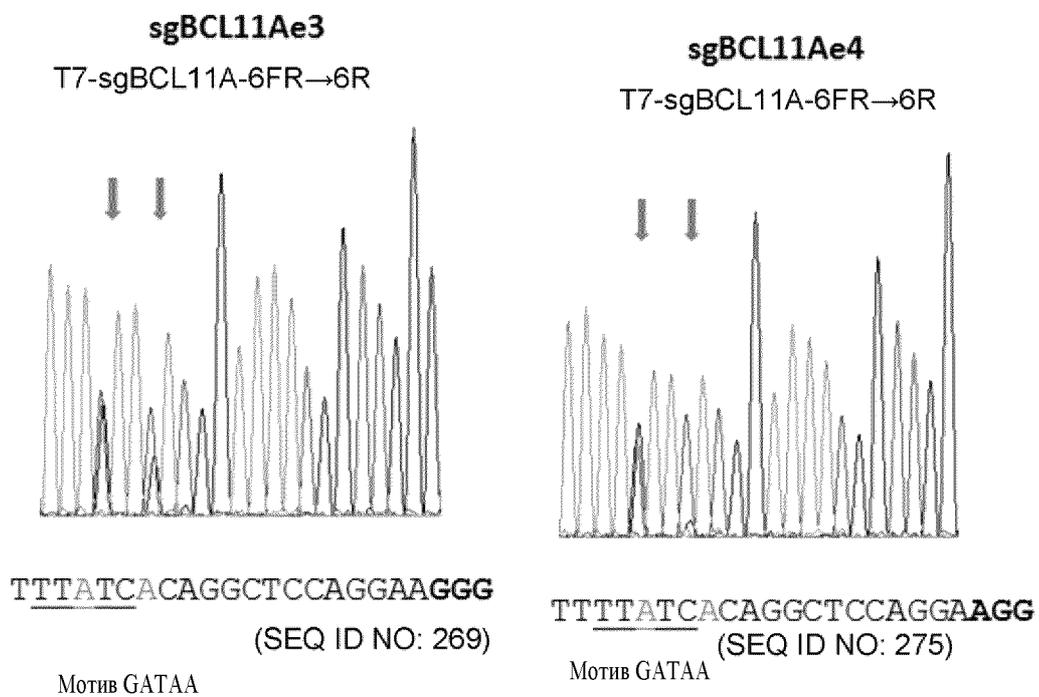
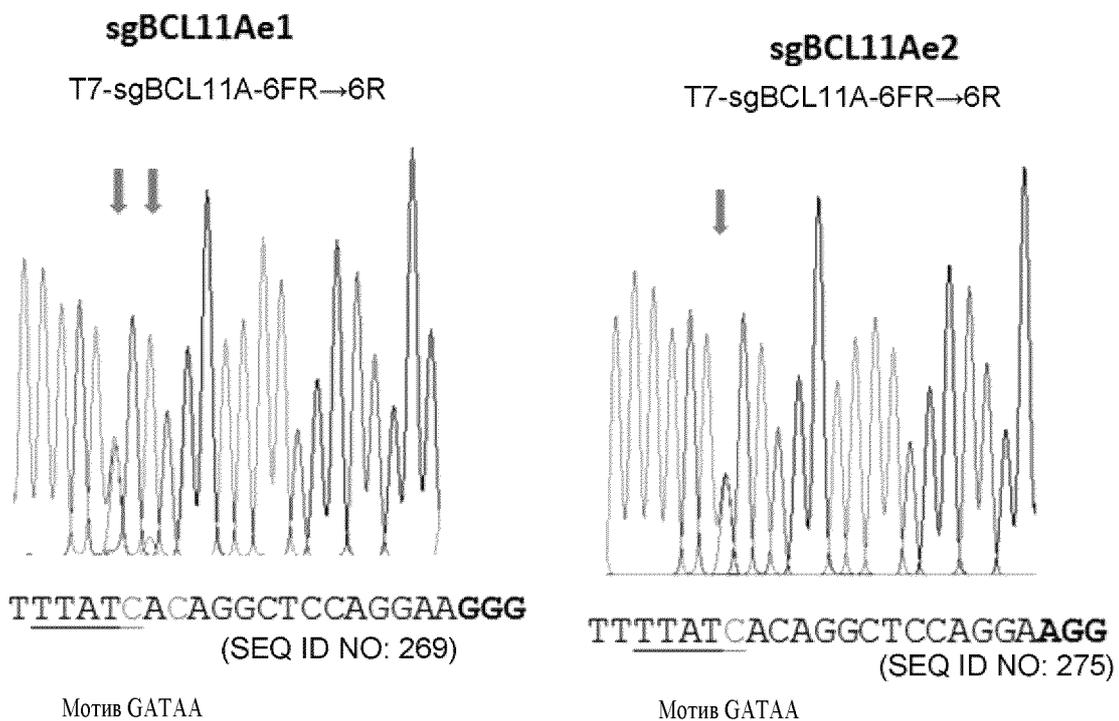
Фиг. 154S

Клоны из одиночных клеток



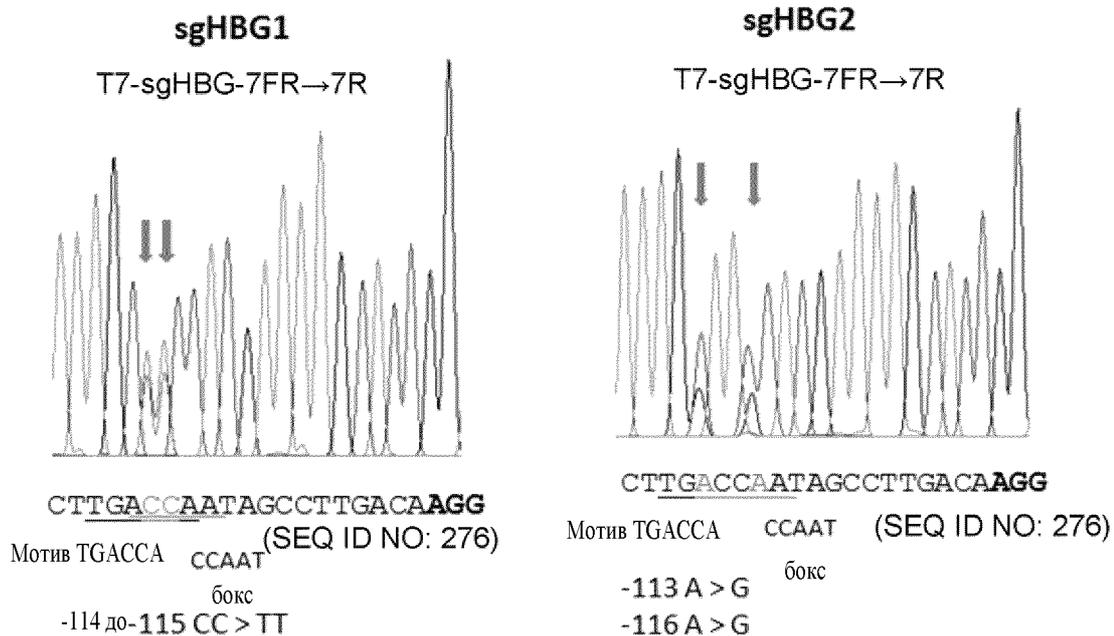
Фиг. 155



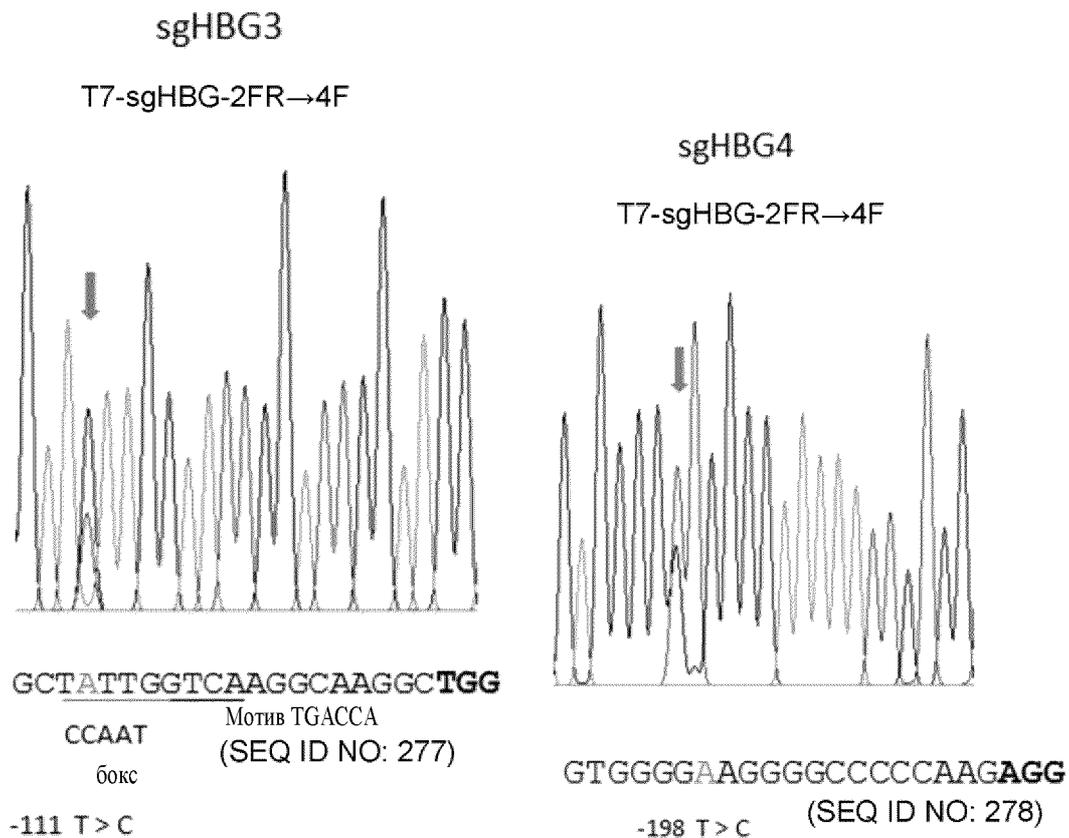


341/350

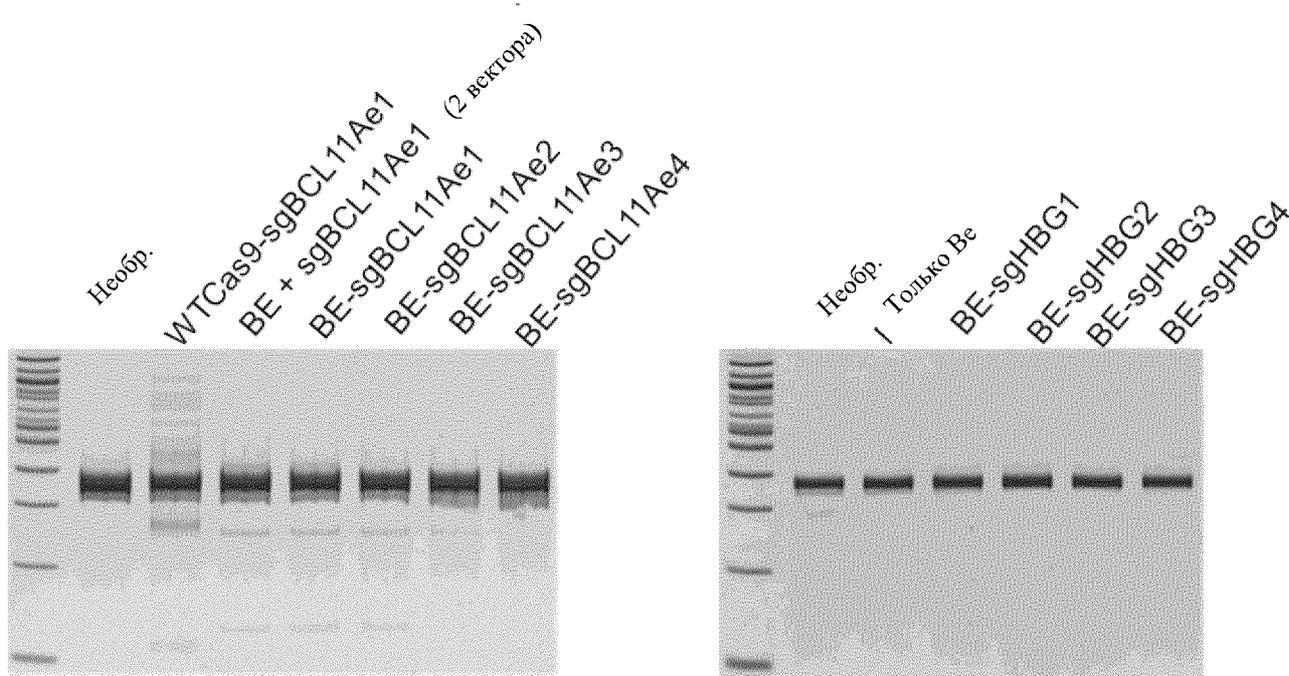
Фиг.156С



Фиг. 156D

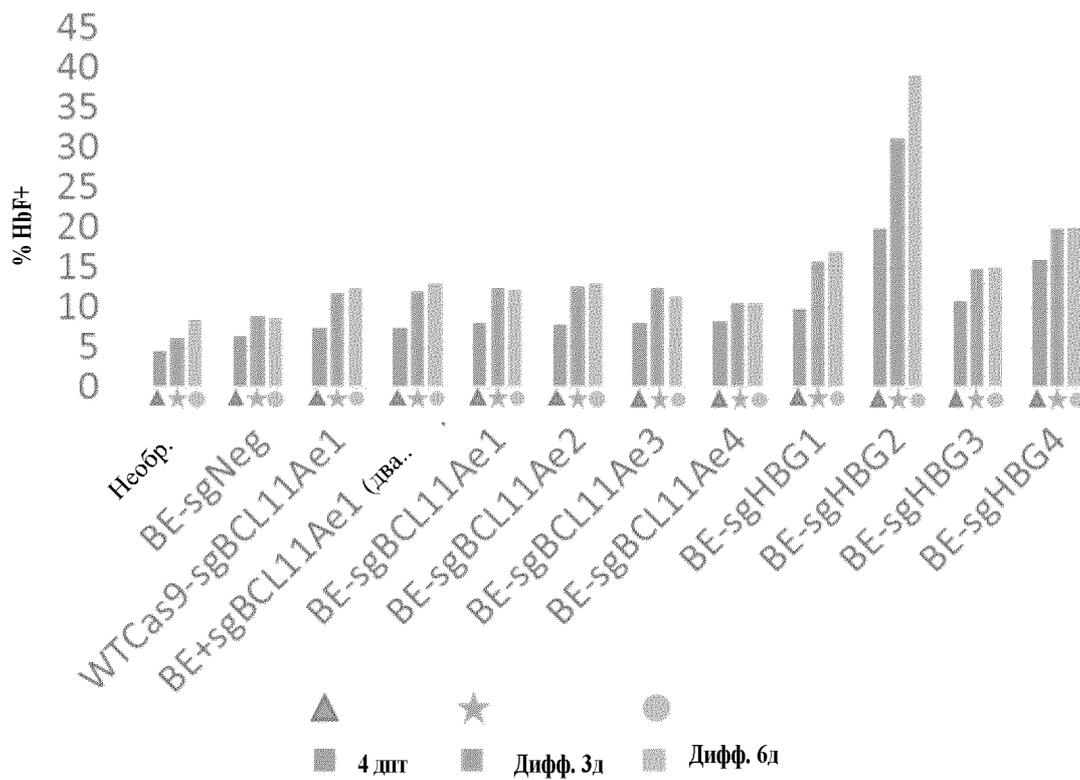


Фиг. 157

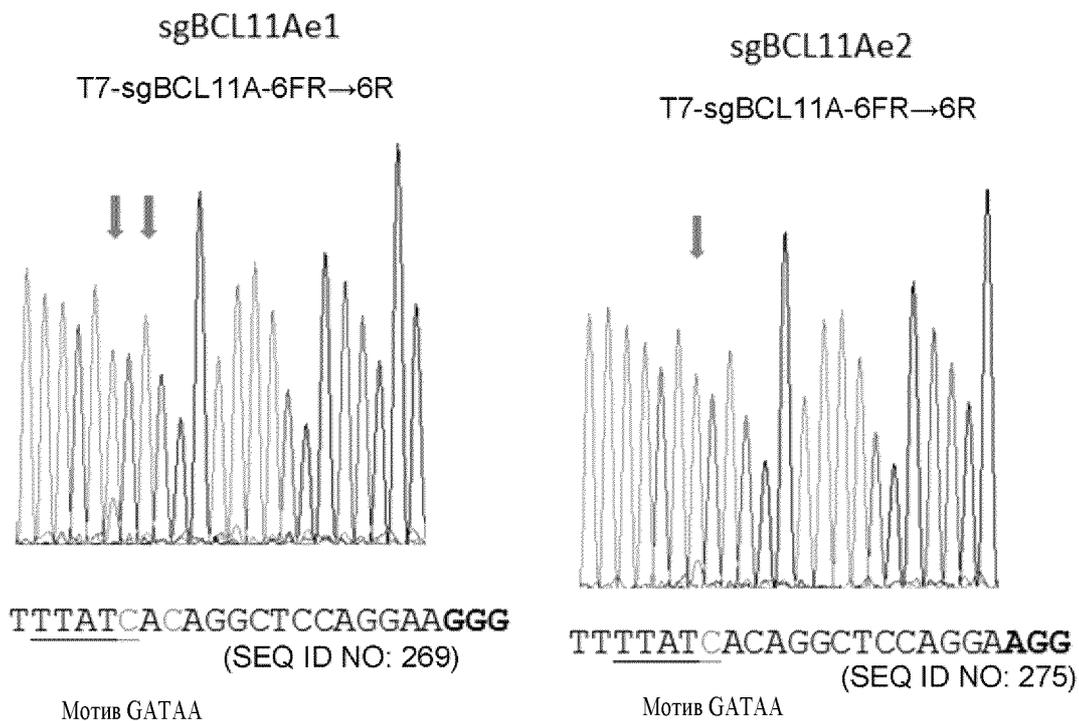


Фиг. 158

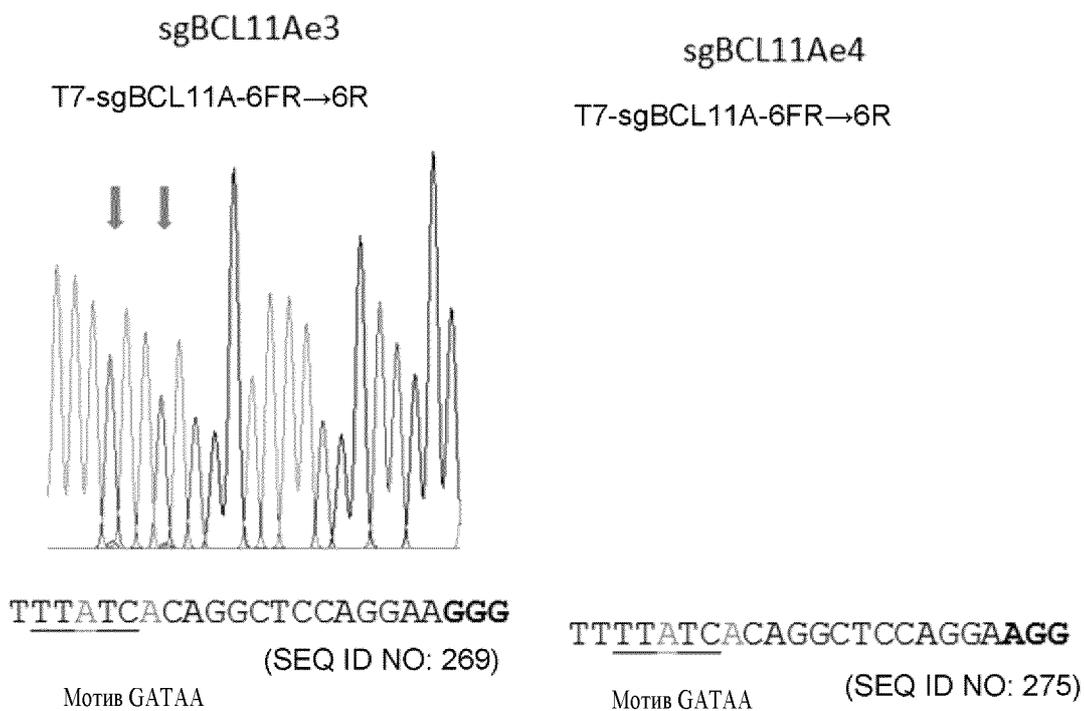
экспрессия γ -глобина (HUDEP-2)



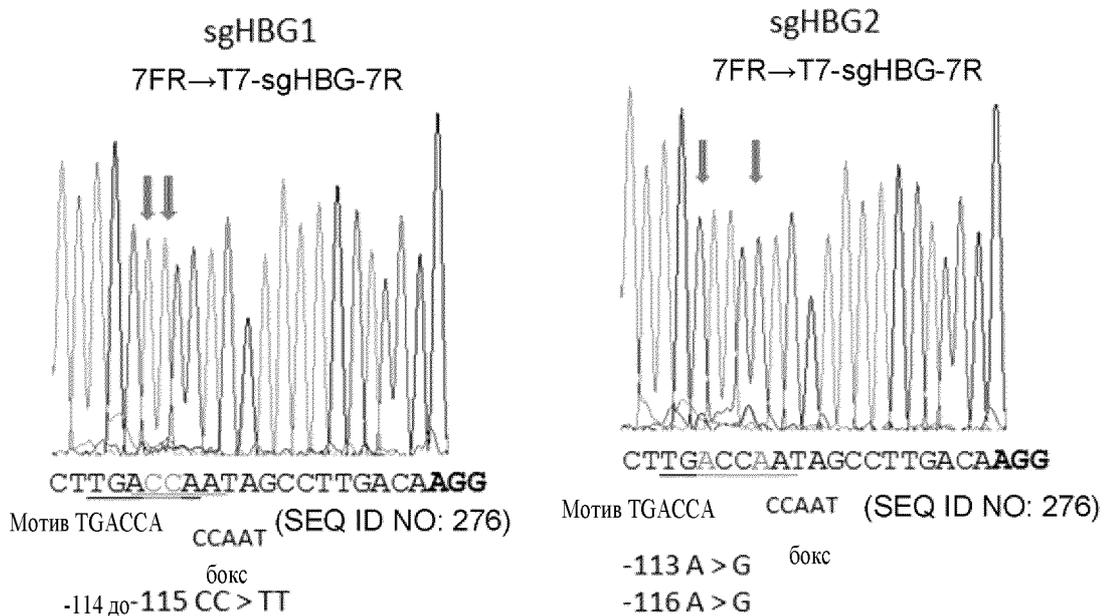
Фиг. 159А



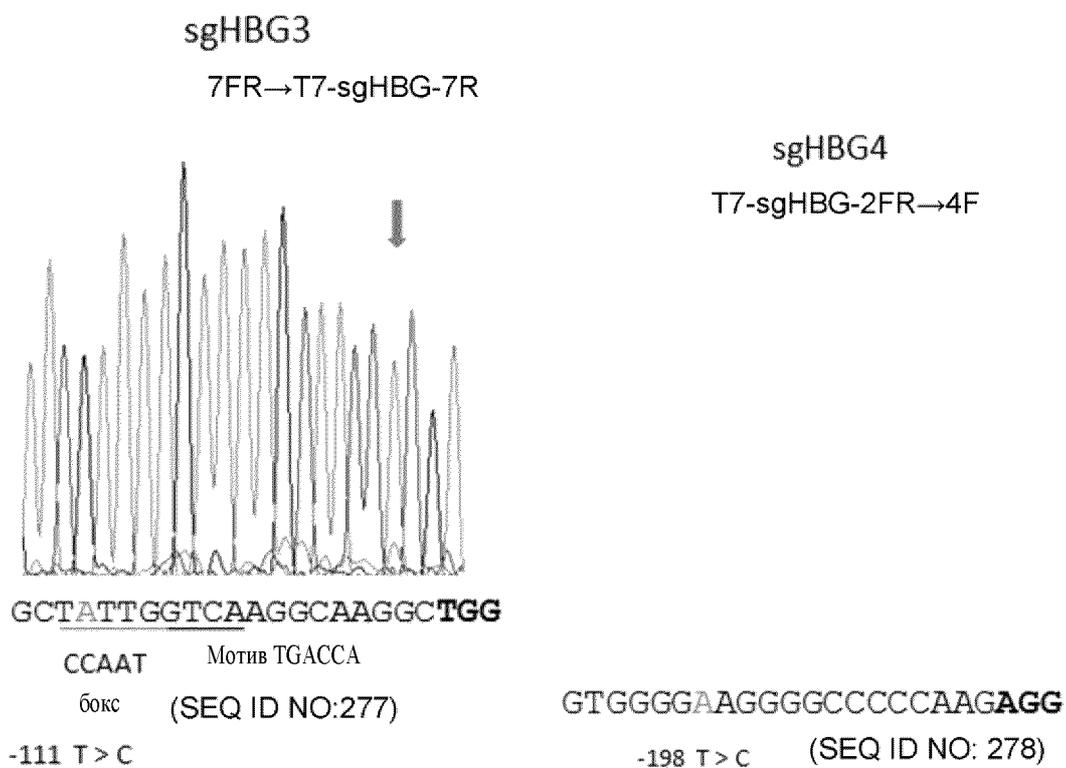
Фиг. 159В



Фиг.159С



Фиг. 159D



Фиг. 160

Выбранные конструкции для выработки вируса HDAd (в условиях макси-получения)

Сконструированные векторы:

рBS-AncBE4max-sgBCL11AE1
 рBS-AncBE4max-sgBCL11AE2
 рBS-ABEmax-sgBCL11AE3
 рBS-ABEmax-sgBCL11AE4

рBS-AncBE4max-sgHBG1-1
 рBS-ABEmax-sgHBG1-2
 рBS-ABEmax-sgHBG1-3
 рBS-ABEmax-sgHBG1-4

рBS-AncBE4max-sgR5-1

+58 мотив GATA, G → A
 +58 мотив GATA, G → A
 +58 мотив GATA, T → C
 +58 мотив GATA, T → C

13 п. о. делеция, ССААТ-бокс, СС → ТТ
 13 п. о. делеция, ССААТ-бокс, А → G
 13 п. о. делеция, ССААТ-бокс, Т → С
 -198 Т → С

контроль

Соответствующие конструкции Ad:

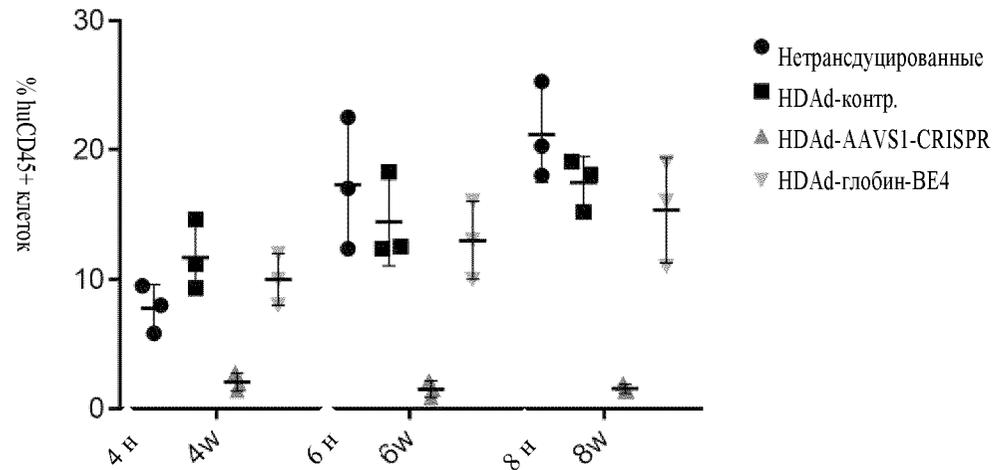
рHSA-BE4max-sgBCL11Ac1-FI-mgmt/GFP

рHSA-ABEmax-sgHBG2-FI-mgmt/GFP

рHSA-ABEmax-sgHBG4-FI-mgmt/GFP

рHSA-BE4max-sgR5-1-FI-mgmt/GFP(контр)

Фиг.161

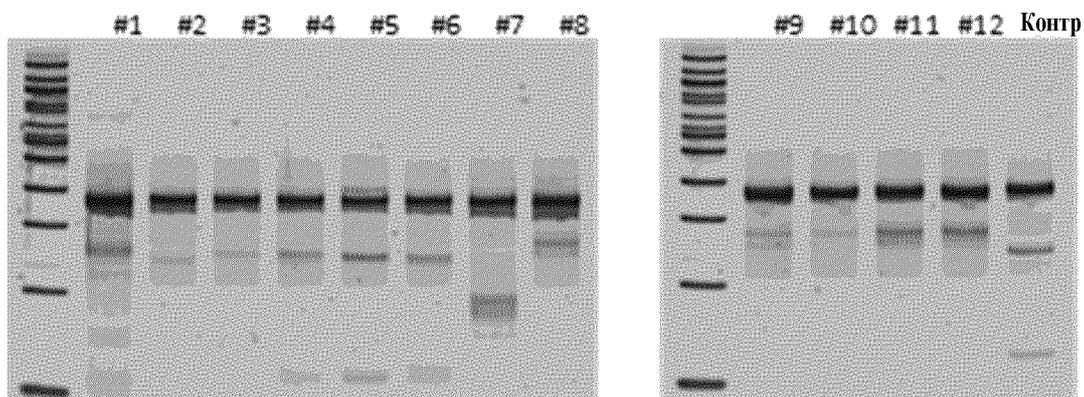


346/350

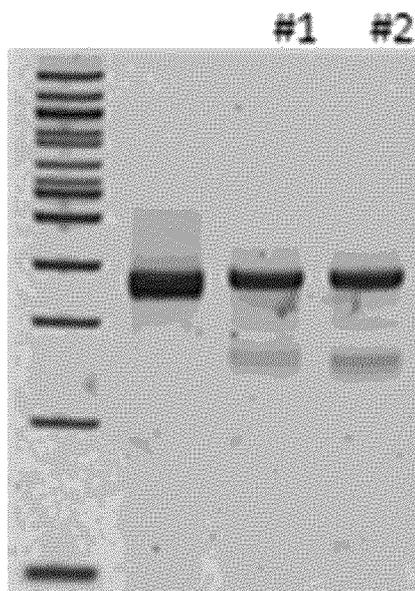
Фиг.162

Временная трансфекция клеток HUDEP-2: (расщепление T7E1)

Энхансер Vcl1a



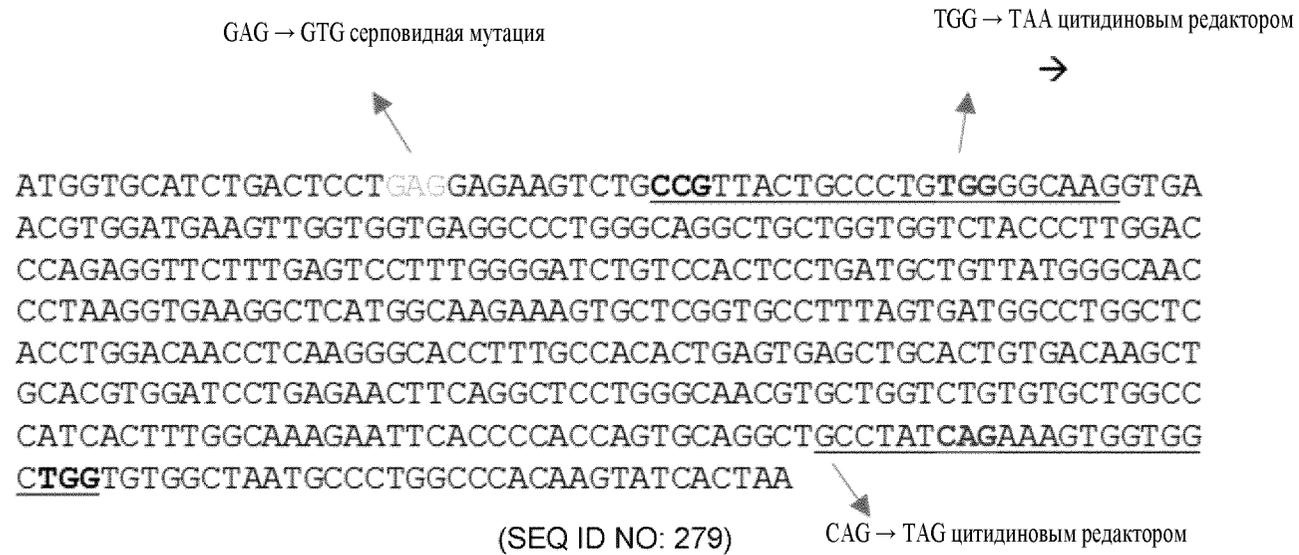
Промотор HBG



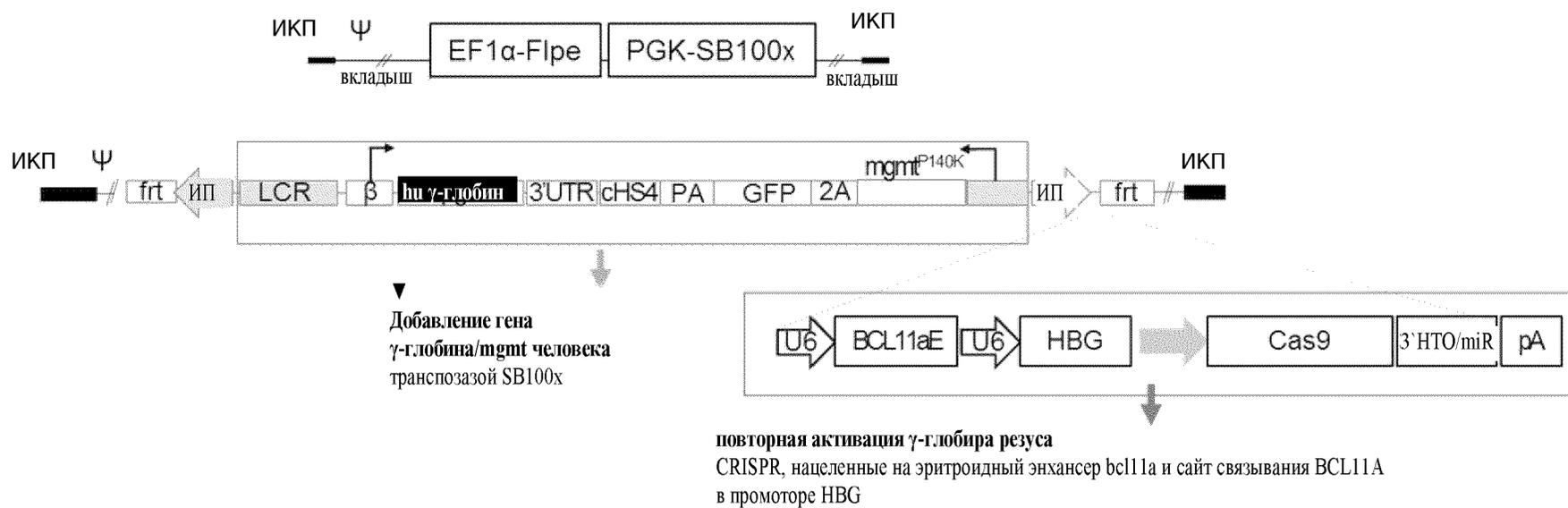
Фиг.163

Применение двойного вектора редактирования оснований

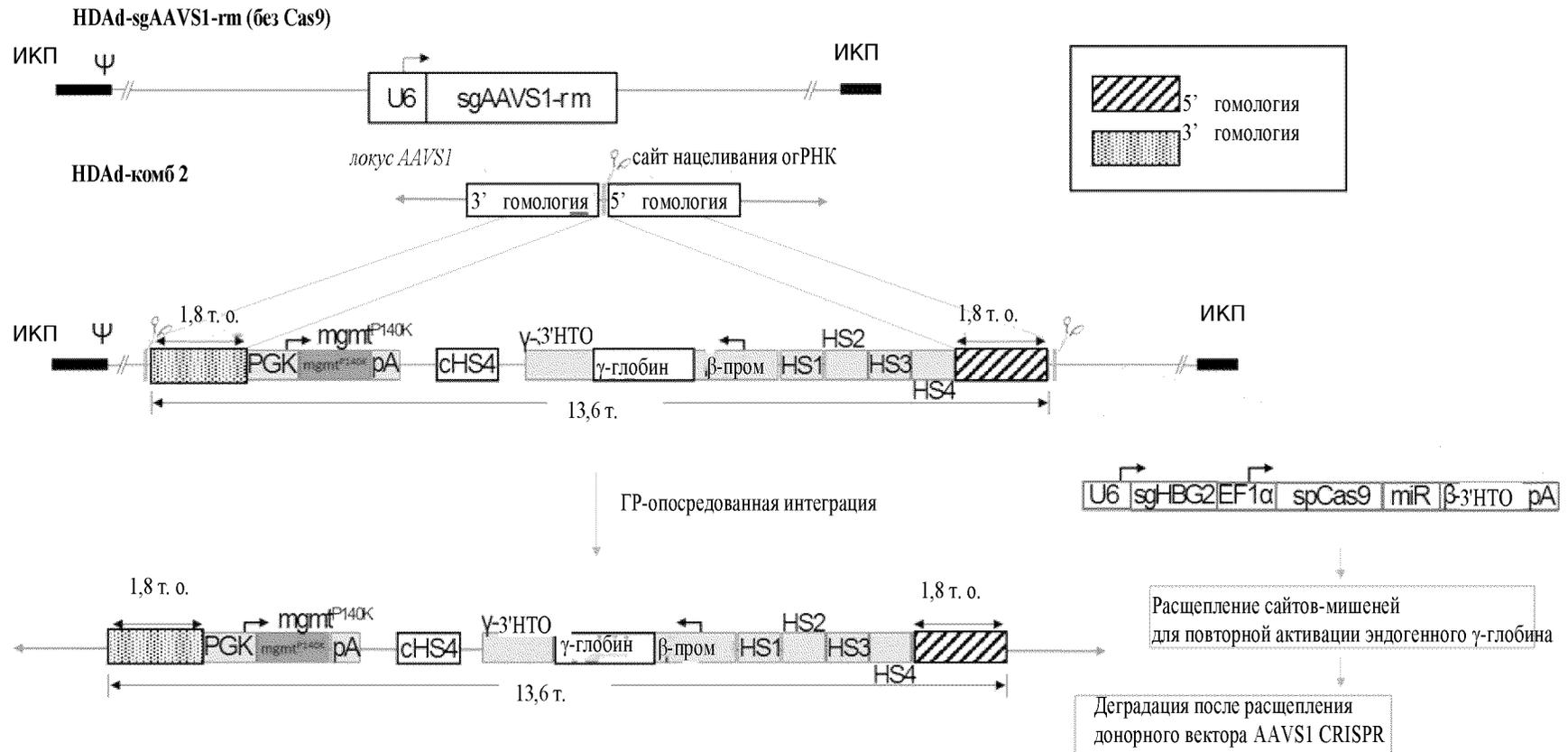
Повторная активация γ -глобина за счет разрушения сайтов связывания BCL11A + терминация мутантного HBB с помощью CRISPR-СТОП



Фиг. 164



Фиг. 165



Фиг. 166

