

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290230** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.07

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
C07K 14/015 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.07.15

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КАПСИДНЫЕ БЕЛКИ AAV ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ СУСТАВОВ

(31) **2023505**

(32) **2019.07.15**

(33) **NL**

(86) **PCT/IB2020/056635**

(87) **WO 2021/009684 2021.01.21**

(71) Заявитель:

**МИРАДЖИТИЭКС ЮКЕЙ П
ЛИМИТЕД (GB); ЮНИВЕРСИТИ
ОФ ХАЙДЕЛЬБЕРГ (DE)**

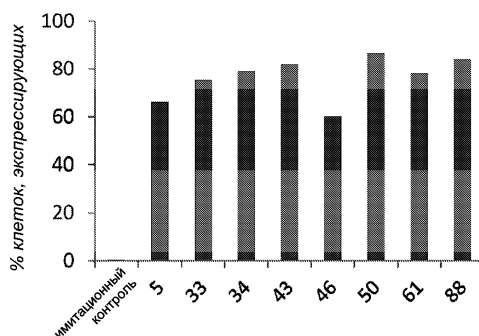
(72) Изобретатель:

**Ван Дер Санден Сабине Мария
Гертруде, Сноек Сюзанн Анна,
Броекстра Нильс (NL), Финн
Джонатан Дуглас (US), Гримм Дирк,
Бернер Кэтлин (DE)**

(74) Представитель:

**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.
(RU)**

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



A1

202290230

202290230

A1

Модифицированные капсидные белки AAV для лечения заболевания суставов

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к области генной терапии на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), в частности к применению мутантного капсида rAAV для лечения или профилактики заболевания суставов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Векторы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) продемонстрировали отличные показатели безопасности и эффективности для доставки генов человеку *in vivo*. Таким образом, векторы rAAV широко используются для генной терапии *in vivo*, и в доклинических моделях, а также в клинических исследованиях было показано, что они безопасны и эффективны. Векторы rAAV успешно прошли ряд клинических исследований генной терапии для ряда заболеваний, включая гемофилию В, гемофилию А, муковисцидоз, дефицит альфа-1-антитрипсина, спинальную мышечную атрофию (SMA), болезнь Паркинсона, мышечную дистрофию Дюшенна и врожденный амавроз Лебера (Selot *et al.*, Current Pharmaceutical Biotechnology, 2013, 14, 1072-1082). Алипоген типарвовек (Glybera®, uniQure) получил регистрационное удостоверение в Европе в качестве геннотерапевтического препарата для лечения недостаточности липопротеинлипазы (LPLD). Впоследствии было получено разрешение на геннотерапевтический препарат Талимоген лагерпарепвек на основе вируса герпеса для лечения рака кожи (T-Vec, Imlygic®, Amgen) и на геннотерапевтический препарат *ex vivo* на основе содержащих ретровирус стволовых клеток Strimvelis для лечения ADA-SCID (GSK).

Геннотерапевтический препарат на основе вектора rAAV также применяли при ревматоидном артрите (RA), который представляет собой хроническое воспалительное заболевание, поражающее около 1% населения. Патологические изменения при RA распространяются на весь синовиальный сустав. Локальный характер сустава делает генную терапию *in vivo* очень привлекательной. Применялась терапия противовоспалительными белками, направленная на сдвиг баланса при RA в сторону противовоспалительного состояния.

Большая работа была сосредоточена на разработке капсидных белков AAV с желаемыми свойствами. Такие свойства могут включать в себя более высокую эффективность трансдукции, тропизм к тканям/органам, отключение нежелательных тканей/органов или избегание ранее существовавших нейтрализующих антител.

Однако в данной области техники все еще существует потребность в дальнейшем улучшении векторов для генной терапии на основе rAAV. В частности, необходимо улучшить использование векторов для генной терапии на основе rAAV при заболевании суставов и, точнее, повысить эффективность доставки генетического материала в ткань-мишень, такую как синовиальный сустав или определенные типы клеток внутри синовиального сустава, предпочтительно в фибробластоподобные синовиоциты (FLS).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах изобретение относится к следующим пронумерованным вариантам осуществления:

5 Вариант осуществления 1. Вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV),
содержащий модифицированный капсидный белок и промотор, функционально связанный с
нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес генный продукт,
причем вирион rAAV предназначен для применения при лечении или профилактике заболевания
суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с
10 заболеванием суставов, при этом модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой
части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на
поверхности капсидного белка, предпочтительно при этом представляющий интерес продукт
представляет собой иммунодепрессант.

15 Вариант осуществления 2. Вирсон rAAV для применения в согласно варианту осуществления 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность Z:

а. содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I:



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

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

Вариант осуществления 3. Вирион rAAV для применения согласно варианту осуществления 1 или 2, отличающийся тем, что представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор IL-6.

Вариант осуществления 4. Вирион gAAV для применения согласно варианту осуществления 1 или 2, отличающийся тем, что представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор TNF α .

35 Вариант осуществления 5. Вирион rAAV для применения согласно варианту осуществления 1
или 2, отличающийся тем, что представляющий интерес генный продукт представляет собой
ингибитор IL-1.

Вариант осуществления 6. Вирион rAAV для применения согласно варианту осуществления 3, отличающийся тем, что ингибитор IL-6 выбран из группы, состоящей из антагониста рецептора IL-6, гуманизированного моноклонального антитела к IL-6, химерного моноклонального антитела к IL-6.

гуманизированного кроличьего моноклонального антитела к IL-6 и растворимого рецептора IL-6, предпочтительно при этом по меньшей мере один из следующего:

i) антагонист рецептора IL-6 представляет собой по меньшей мере один из тоцилизумаба и сарилумаба;

5 ii) гуманизированное моноклональное антитело к IL-6 представляет собой по меньшей мере одно из олокизумаба и сирукумаба;

iii) химерное моноклональное антитело к IL-6 представляет собой силтуцимаб; и

iv) гуманизированное кроличье моноклональное антитело к IL-6 представляет собой клазакизумаб.

10
Вариант осуществления 7. Вирион gAAV для применения согласно варианту осуществления 4, отличающийся тем, что ингибитор TNF α выбран из группы, состоящей из этанерцепта, инфликсимаба, адалимумаба, цертилизумаб пэгола и голимумаба, предпочтительно при этом ингибитор TNF α представляет собой этанерцепт.

15
Вариант осуществления 8. Вирион gAAV для применения согласно варианту осуществления 5, отличающийся тем, что ингибитор IL-1 выбран из группы, состоящей из следующего:

i) антагонист рецептора IL-1, предпочтительно антагонист рецептора IL-1 человека, предпочтительно антагонист рецептора IL-1 человека анакинра;

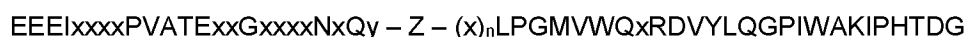
20 ii) моноклональное антитело к IL-1, предпочтительно человеческое моноклональное антитело к IL-1, предпочтительно человеческое моноклональное антитело к IL-1, канакинумаб или гевокизумаб

iii) человеческий димерный слитый белок к IL-1, предпочтительно человеческий димерный слитый белок к IL-1 рилонацепт; и

25 iv) человеческий иммуноглобулин к IL-1 с двойным вариабельным доменом, предпочтительно человеческий иммуноглобулин к IL-1 с двойным вариабельным доменом лутикизумаб.

30
Вариант осуществления 9. Вирион gAAV для применения по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что промотор представляет собой конститутивный промотор или индуцибельный промотор, предпочтительно промотор представляет собой NF κ B-чувствительный промотор, предпочтительно NF κ B-чувствительный промотор CMV, предпочтительно NF κ B-чувствительный минимальный промотор CMV.

35
Вариант осуществления 10. Вирион gAAV для применения по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что последовательность Z содержится в модифицированном капсидном белке в месте, представленном формулой II:



40

а. где Z, x и y имеют значения, определенные в варианте осуществления 2; и

b. где n равен 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15.

Вариант осуществления 11. Вирион gAAV для применения по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из следующего:

i) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 1, и где аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11,

ii) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 2, и где аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10,

iii) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 3, и где аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9,

iv) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 4, и где аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8,

v) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 5, и где аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9,

vi) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 6, и где аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и

vii) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 7, и где аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12,

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

Вариант осуществления 12. Вирион гAAV для применения по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–7, предпочтительно при этом капсидный белок содержит или состоит из SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 13. Композиция гAAV для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов, причем композиция гAAV содержит вирион гAAV, как определено в любом из вариантов осуществления 1-12, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 14. Композиция гAAV и иммунодепрессант для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов, причем композиция гAAV является такой, как определена в варианте осуществления 13, и при этом лечение или профилактика включает введение композиции гAAV и введение иммунодепрессанта индивидууму.

Вариант осуществления 15. Вирион гAAV для применения по любому из вариантов осуществления 1–12, композиция гAAV для применения по варианту осуществления 13 или композиция гAAV и иммунодепрессант для применения по варианту осуществления 14, где заболевание суставов выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита (RA), ювенильного ревматоидного артрита, остеоартрита (OA), подагры, псевдоподагры, спондилоартрита (SpA), псориатического артрита, анкилозирующего спондилита, септического артрита, артрита, ювенильного идиопатического артрита, тупой травмы, замены сустава и болезни Стилла.

Вариант осуществления 16. Вирион гAAV для применения по любому из вариантов осуществления 1-12 или композиция гAAV для применения по варианту осуществления 13, где вирион гAAV и/или композицию гAAV вводят системно и/или местно.

Вариант осуществления 17. Композиция гAAV и иммунодепрессант для применения по варианту осуществления 14, где по меньшей мере одно из композиции гAAV и иммунодепрессанта вводят местно.

Вариант осуществления 18. Вирион гAAV или композиция гAAV для применения по варианту осуществления 16 и/или композиция гAAV и иммунодепрессант для применения по варианту осуществления 17, где местное введение представляет собой внутрисуставное введение.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения обнаружили, что вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащий модифицированный капсидный белок, неожиданно эффективен в трансдукции клеток и, в частности, эффективен в трансдукции клеток синовиального сустава.

Первичные клетки-мишени в суставе при лечении заболеваний суставов, таких как, например, ревматоидный артрит, включают, но не ограничиваются ими, фибробластоподобные синовиоциты (FLS), хрящевые клетки, хондроциты и хондробласты. Целью настоящего изобретения является создание капсидных белков, у которых улучшено одно или более из следующих свойств: i) более высокие уровни экспрессии в ткани сустава, в частности, в FLS; ii) улучшенный тропизм к суставной ткани, в частности улучшенный тропизм к FLS; и/или iii) улучшенное ненацеливание на нежелательные ткани/органы при введении гAAV по сравнению с капсидными белками, известными в данной области техники. В частности, эти свойства вириона гAAV, содержащего модифицированный капсидный белок по изобретению, улучшены по сравнению с немодифицированными капсидными белками, предпочтительно капсидным белком дикого типа того же серотипа, что и модифицированный капсидный белок, и/или капсидными белками AAV5. Ранее было установлено, что капсид AAV5 вызывает самые высокие уровни экспрессии FLS по сравнению с другими серотипами AAV (Adriaansen et al. (2005) *Ann Rheum Dis* 64:1677-1684; Apparailly et al. (2005) *Hum. Gene Ther.* 16:426-434). Поскольку именно капсид придает свойства тропизма к ткани/клетке, модифицированные капсиды, описанные в данном изобретении, обладают свойством повышенного потенциала в отношении трансдукции FLS предпочтительно по сравнению с немодифицированным AAV5. В частности, предпочтительно, чтобы капсидные белки по настоящему изобретению обеспечивали более высокие уровни экспрессии в синовиальной ткани, в частности, в FLS, предпочтительно при внутрисуставном введении, по сравнению с немодифицированными капсидными белками (то есть тем же капсидным белком без модификации, который подлежит тестированию, предпочтительно того же серотипа, что и модифицированные капсидные белки), предпочтительно немодифицированными капсидными белками дикого типа (предпочтительно того же серотипа, что и модифицированные капсидные белки), более предпочтительно немодифицированными капсидными белками AAV5 или wtAAV5.

Следовательно, в первом аспекте изобретение относится к вириону гAAV, содержащему модифицированный капсидный белок. Вирион гAAV, как определено в данном документе, особенно полезен для применения в генной терапии.

Используемый в данном документе термин «генная терапия» представляет собой вставку последовательностей нуклеиновых кислот (таких как, например, трансген (также называемый нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес генный продукт), как определено в данном документе ниже) в клетки и/или ткани индивидуума для лечения или профилактики заболевания или расстройства, или для лечения или профилактики симптомов заболевания или расстройства.

AAV может инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки, и заражение происходит путем взаимодействия капсидных белков с мембранным рецептором с последующим эндоцитозом вириона AAV. AAV принадлежит к роду *Dependovirus*, который, в свою очередь, принадлежит к подсемейству *Parvovirinae*, также называемому парвовирусами, способными инфицировать позвоночных. *Parvovirinae* принадлежат к семейству мелких ДНК-содержащих вирусов животных, то есть к семейству *Parvoviridae*. Как можно заключить из названия их рода, представители *Dependovirus* уникальны тем, что им обычно требуется коинфекция хелперным вирусом, таким как аденовирус или вирус герпеса, для продуктивной инфекции в культуре клеток. Род *Dependovirus*

включает AAV, который, как правило, поражает людей, и родственные вирусы, которые заражают других теплокровных животных (например, аденоассоциированные вирусы крупного рогатого скота, собак, лошадей и овец). Дополнительная информация о парвовирусах и других представителях Parvoviridae описана в Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996). Для удобства настоящее изобретение далее проиллюстрировано и описано со ссылкой на AAV. Однако следует понимать, что изобретение не ограничивается AAV, но может в равной степени применяться и к другим парвовирусам.

Геномная организация всех известных серотипов AAV очень похожа. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК длиной менее примерно 5000 нуклеотидов (нт).

Инвертированные терминальные повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности для неструктурных белков репликации (Rep) и структурных белков (VP). Белки VP (VP1, -2 и -3) образуют капсид или белковую оболочку с помощью активирующего сборку белка (AAP) (для некоторых серотипов), который кодируется в альтернативной открытой рамке считывания, перекрывающейся с рамкой считывания VP2/VP3.

Концевые нуклеотиды являются самокомплементарными и организованы таким образом, что может образовываться энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильку. Размер концевых нуклеотидов зависит от серотипа. Например, в случае AAV2 из концевых 145 нуклеотидов 125 нуклеотидов являются самокомплементарными, а остальные 20 нуклеотидов остаются одноцепочечными. Эти шпильки функционируют как точка начала репликации вирусной

ДНК, выступая в качестве праймеров для комплекса клеточной ДНК-полимеразы. После инфицирования AAV дикого типа (wtAAV) в клетках млекопитающих белки Rep (т.е. Rep78 и Rep52) экспрессируются из мРНК, при этом транскрибируются промотором p5 и промотором p19, соответственно. Оба белка Rep участвуют в репликации вирусного генома. Событие сплайсинга в ORF Rep приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (т.е. Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40).

Однако было показано, что белков Rep78 и Rep52, кодируемых несплайсированными мРНК, в клетках млекопитающих достаточно для продукции вектора AAV. Более того, продукция wtAAV или гAAV в клетках млекопитающих зависит от комбинации поочередного использования двух сайтов акцептора сплайсинга и субоптимального использования иницирующего кодона ACG для VP2, что обеспечивает надлежащую экспрессию всех трех капсидных белков примерно в соотношении 1:1:10 (VP1:VP2:VP3).

«Вирин гAAV» (также называемый в данном документе «вектором гAAV» или «трансгенным вектором гAAV») в данном контексте означает капсид AAV, содержащий ненативную последовательность нуклеиновой кислоты. Такая последовательность в гAAV обычно фланкирована последовательностями ITR, предпочтительно из wtAAV, и предпочтительно кодирует представляющий интерес генный продукт, такой как, например, трансгенное или гомологичное плечо. Иными словами, вирин гAAV означает геном гAAV, содержащий (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес генный продукт, и (ii) по меньшей мере одну последовательность ITR AAV, инкапсулированную капсидными белками. В геноме гAAV может быть удален один или предпочтительно все гены wtAAV, но он все еще может содержать функциональные нуклеиновые последовательности ITR. Предпочтительно вирин гAAV не содержит каких-либо нуклеотидных последовательностей, кодирующих вирусные белки, такие как

гены *rep* (репликация) или *cap* (капсид) AAV. Таким образом, вирион гAAV отличается от вириона wtAAV, поскольку весь вирусный геном или его часть заменены нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес генный продукт, который является ненативной нуклеиновой кислотой по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты AAV, как дополнительно определено в данном документе.

В предпочтительном варианте вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок по изобретению, предназначен для лечения или профилактики заболеваний суставов или для лечения или профилактики симптомов, связанных с заболеванием суставов. Медицинское применение (например, генная терапия для лечения или профилактики (симптомов, связанных с) заболеванием суставов), описанное в данном документе, составлено в виде вириона гAAV согласно изобретению для применения в качестве лекарственного препарата для профилактики или лечения заболевания(-й) и/или нарушения(-й), определенных в данном документе, но в равной степени может быть сформулировано как (i) способ профилактики или лечения заболевания(-й) и/или нарушения(-й), определенных в данном документе, или их симптомов, включающий введение достаточного или эффективного количества вириона гAAV по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, как (ii) вирион гAAV по настоящему изобретению для применения в приготовлении лекарственного препарата для профилактики или лечения заболевания(-й) и/или нарушения(-й), определенных в данном документе или как (iii) применение вириона гAAV по изобретению для профилактики или лечения заболевания(-й) и/или нарушения(-й), определенных в данном документе. Все такие медицинские применения предусмотрены настоящим изобретением. Предпочтительно модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка.

Используемые в данном документе термины «лечить», «лечение» или «лечащий» относятся к применению или введению вириона гAAV по изобретению субъекту, имеющему заболевание суставов, причем целью является излечение, частичное или полное реверсирование, облегчение, ослабление, ингибирование, задержка, подавление, замедление или остановка прогрессирования или степени тяжести заболевания суставов или симптомов, связанных с заболеванием суставов. Термин «лечение» включает уменьшение или облегчение по меньшей мере одного нежелательного явления или симптома заболевания суставов. Лечение, как правило, «эффективно», если один или более симптомов или клинических маркеров уменьшаются. Альтернативно, лечение является «эффективным», если прогрессирование заболевания суставов снижено или остановлено. То есть «лечение» включает не только улучшение симптомов или маркеров, но также прекращение или, по меньшей мере, замедление прогрессирования или ухудшения симптомов, которые можно было бы ожидать при отсутствии лечения. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, помимо прочего, облегчение одного или более симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное смягчение болезненного состояния, и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или необнаруживаемую. Термин «лечение» заболевание суставов также включает облегчение симптомов или побочных эффектов заболевания суставов (включая паллиативное лечение). Используемый в данном термин «предотвращение»,

«профилактика» или «профилактический» (также называемый профилактическим) относится к применению или введению вируса гAAV согласно изобретению субъекту, который имеет предрасположенность к заболеванию суставов, с целью отсрочить или предотвратить манифестацию, смягчить, облегчить, ослабить, ингибировать прогрессирование, уменьшить степень тяжести и/или уменьшить частоту возникновения одного или более симптомов или признаков будущего заболевания суставов. Таким образом, вирус гAAV по изобретению можно вводить субъекту, у которого нет признаков заболевания суставов, и/или субъекту, у которого проявляются только ранние признаки заболевания суставов, предпочтительно с целью снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием суставов.

Используемый в данном документе термин «излечение» или «излечить» означает полное облегчение одного или более, предпочтительно всех симптомов или признаков заболевания суставов. Используемый в данном документе термин «задержка» или «отсрочка» означает задержку манифестации и/или ингибирование прогрессирования и/или уменьшение тяжести одного или более симптомов или признаков заболевания суставов.

В предпочтительном варианте модифицированный капсидный белок по изобретению обеспечивает по меньшей мере двукратное увеличение экспрессии по сравнению с немодифицированным капсидным белком при тестировании в тех же условиях. Предпочтительно немодифицированный капсидный белок представляет собой капсидный белок того же серотипа, что и модифицированный капсидный белок, но без модификации, которая подлежит тестированию.

Более предпочтительно, немодифицированный капсидный белок представляет собой капсидный белок дикого типа (wt) того же серотипа, что и модифицированный капсидный белок, причем капсидный белок дикого типа предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13–19. В качестве альтернативы предпочтительно, чтобы немодифицированный капсидный белок имел аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13–19. Наиболее предпочтительно немодифицированный капсидный белок имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19. Предпочтительные немодифицированные капсидные белки могут зависеть от ткани, на которую нацелен вирус гAAV. Например, гAAV с капсидными белками AAV5, по-видимому, является предпочтительным вирусом для клеток FLS (Apparailly et al. (2005) Human Gene Therapy 16(4):426-434; Adriaansen et al. (2005) Ann. Rheum. Dis. 64(12):1677-1684), и поэтому – независимо от исходного серотипа мутантных вирусов гAAV – контрольный вирус гAAV предпочтительно содержит капсидные белки AAV5, более предпочтительно капсидный белок AAV5 дикого типа (wtAAV5), более предпочтительно капсидный белок AAV5 имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19, еще более предпочтительно контрольный вирус гAAV представляет собой вирус гAAV5. Контрольный вирус гAAV представляет собой вирус гAAV, содержащий немодифицированные капсидные белки, как определено в данном документе, вместо модифицированных капсидных белков. В предпочтительном варианте осуществления вирус гAAV (содержащий модифицированные капсидные белки) обеспечивает более высокую экспрессию при трансдукции *in vitro* в фибробластоподобных синовиоцитах пациентов с ревматоидным артритом (RA-FLS) и/или клетках HEK 293, предпочтительно HEK293T, по сравнению с тем же вирусом гAAV с немодифицированными капсидными белками, как

определено в данном документе, вместо модифицированных капсидных белков с использованием способа, описанного в Примерах. Другими словами, за исключением капсидных белков, вирион гAAV и контрольный вирион гAAV предпочтительно идентичны. Эффективность трансдукции предпочтительно определяют в анализе трансдукции *in vitro*: путем измерения уровней экспрессии репортерного гена, кодируемого трансгеном, такого как GFP, YFP и/или люциферазы. В предпочтительном варианте осуществления тест для определения экспрессии представляет собой анализ трансдукции *in vitro*, как описано в Примере 2/3. Вкратце, RA-FLS (выделенные, как описано у van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427) высевают по 2500 клеток на лунку, или клетки HEK293T (клетки эмбриональной почки человека) высевают по 40000 клеток на лунку в 96-луночной планшете (DMEM-GlutaMAX-I (Gibco, арт. 31966-021), 10% FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка Gold, Gibco арт. A15-151), 100 мкг/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, арт. P0781; 37°C / 5% CO₂). Через 24 часа супернатант удаляют и заменяют средой (DMEM-glutaMAX-I (Gibco, кат. № 31966-021), 0,001% плюроники F68 (Sigma, кат. p5559)), содержащей мутантные вирионы гAAV или контрольные вирионы гAAV, все экспрессируют желтый флуоресцентный белок (yFP) и/или люциферазу под контролем промотора цитомегаловируса (CMV), при множественности заражения (MOI) 10000, 20000 и 100000. Можно использовать неочищенные лизаты (т. е. неочищенные супернатанты клеток, трансфицированных всеми плазмидами, необходимыми для продукции гAAV, и содержащие вирионы, экспрессирующие репортер) или очищенные AAV (предпочтительно на основе очистки йодиксанолом или очистки в градиенте плотности хлорида цезия (CsCl)). Через четыре часа после трансдукции добавляли среду (DMEM-GlutaMAX-I, 10% FBS 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина), содержащую доксорубин (Sigma, арт. D1515; конечная концентрация 0,4 мкМ), FBS (конечная концентрация 1%). Через 48 часов (HEK293T) или 4-6 дней (RA-FLS) клетки анализируют на процент клеток, экспрессирующих YFP или люциферазу, с помощью флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии. Предпочтительно анализ трансдукции *in vitro* проводят несколько раз с FLS, выделенными от разных пациентов, например, с FLS, выделенными от 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более пациентов.

«Серотип» традиционно определяется на основе отсутствия перекрестной реактивности между антителами к одному вирусу по сравнению с другим вирусом. Такие различия в перекрестной реактивности обычно связаны с различиями в последовательностях капсидных белков/антигенных детерминант (например, из-за различий в последовательностях VP1, VP2 и/или VP3 серотипов AAV). Согласно традиционному определению, серотип означает, что представляющий интерес вирус был протестирован против сыворотки, специфичной для всех существующих и охарактеризованных серотипов, на нейтрализующую активность, и не было обнаружено антител, нейтрализующих представляющих интерес вирус. По мере того, как обнаруживается больше встречающихся в природе вирусных изолятов и создаются капсидные мутанты, могут быть или не быть серологические различия с любым из существующих в настоящее время серотипов. Таким образом, в случаях, когда новый AAV не имеет серологических отличий, этот новый AAV будет подгруппой или вариантом соответствующего серотипа. Во многих случаях серологическое тестирование нейтрализующей активности еще предстоит провести на мутантных вирусах с модификациями капсидной последовательности, чтобы определить, относятся ли они к другому

серотипу в соответствии с традиционным определением серотипа. Соответственно, для удобства и во избежание повторения термин «серотип» в широком смысле относится как к серологически различным вирусам (например, AAV), так и к вирусам (например, AAV), серологически неотличимым, которые могут принадлежать к подгруппе или варианту данного серотипа.

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

Реципиентная клетка-хозяин, в которую трансдуцируют трансген, предпочтительно представляет собой клетку, пораженную заболеванием, которое подлежит лечению, такую как, например, синовиальные клетки, более конкретно FLS, макрофаги, моноциты, нейтрофилы, остеобласты, остеокласты, хондроциты, Т-лимфоциты, дендритные клетки, плазматические клетки, тучные клетки, В-лимфоциты при заболевании суставов. «Синовиальная оболочка», или «синовиальная ткань», или «синовиальные клетки», как используется в данном документе, относится к клеточной оболочке, покрывающей нехрящевые поверхности синовиальных суставов, как дополнительно описано в Tak (2000, Examination of the synovium and synovial fluid. In: Firestein GS, Panyani GS, Wollheim FA editors. Ревматоидный артрит. New York: Oxford Univ. Press, Inc. 55-68), которая включена в данный документ посредством ссылки. Синовиальная оболочка состоит из слоя интимального листка (или синовиального листка) и синовиального подпокровного слоя (субсиновия), которая сливается с капсулой сустава. Слой интимального листка состоит из интимальных макрофагов (или макрофагоподобных синовиоцитов, или синовиоцитов типа А) и FLS (или синовиоцитов типа В). Следовательно, «синовиальная оболочка» может быть заменена или является синонимом «синовиальной ткани». Синовиальная клетка может включать любую клетку, присутствующую в синовиальной оболочке, включая FLS и макрофагоподобные синовиоциты. Синовиоциты могут также представлять собой нейтрофилы, Т-, В-клетки и/или клетки соединительной ткани, которые все могут присутствовать в синовиуме.

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

клетки которых играют решающую роль в патогенезе хронических воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит (RA). Термин «синовиальная оболочка, пораженная ревматизмом» или «синовиальная клетка, пораженная ревматизмом» относится к воспаленной синовиальной оболочке суставов индивидуума, имеющего RA. Синовиальная оболочка, пораженная ревматизмом, характеризуется гиперплазией интимального листка и накоплением FLS, Т-клеток, плазматических клеток, макрофагов, В-клеток, натуральных клеток-киллеров и дендритных клеток в синовиальном подпокровном слое. Эти накопленные клетки включены в определение пораженных ревматизмом синовиальных клеток. При прогрессировании RA синовиальная ткань становится местом постоянных воспалительных процессов, которые со временем могут привести к повреждению хрящей, деструкции и деформации суставов. Сообщалось, что FLS, присутствующие в синовиальной оболочке во время RA, демонстрируют измененный фенотип по сравнению с FLS, присутствующими в нормальных тканях. Например, FLS в пораженной ревматизмом синовиальной оболочке теряют «контактное ингибирование», т. е. теряют свойство останавливать свой рост при контакте большого количества клеток друг с другом. Кроме того, они теряют зависимость от роста на адгезивных поверхностях. В результате количество FLS в пораженной синовиальной оболочке увеличивается. Воспаление дополнительно усиливается продукцией нескольких провоспалительных сигнальных молекул, особенно интерлейкинов IL-6 и IL-8, простаноидов и матриксных металлопротеиназ (MMP).

Альтернативно или в сочетании с другим вариантом осуществления, в еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок по настоящему изобретению, обеспечивает по меньшей мере двукратное увеличение экспрессии представляющего интерес генного продукта в человеческих FLS по сравнению с вирионом гAAV, содержащим немодифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, предпочтительно с немодифицированным капсидным белком с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13–19, при тестировании в тех же условиях, где предпочтительно немодифицированный капсидный белок имеет тот же серотип, что и модифицированный капсидный белок, или аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19.

Более предпочтительно, вирион гAAV изобретения приводит к увеличению уровня экспрессии представляющего интерес генного продукта при трансдукции *in vitro*, как описано выше, по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 15-, 20-, 25-, 30-, 35-, 40-, 50-кратное увеличению уровня экспрессии в клетках FLS человека по сравнению с контрольным вирионом гAAV.

Также предпочтительно и/или в дополнение к вышеизложенному вирион гAAV обеспечивает повышенную экспрессию при введении *in vivo* в модель воздушной синовиальной сумки (APS) у мышей (адаптировано из Edwards et al (1981) J Pathol 134: 147-156 как описанный в Примере 4), по сравнению с контрольным вирионом гAAV, предпочтительно по сравнению с вирионом гAAV, содержащим капсидные белки wtAAV5, при условии, что во всем остальном гAAV идентичен (за исключением его капсидного(-ых) белка(-ов)). Предпочтительно экспрессия представляющего интерес генного продукта в по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35 раз увеличивается при использовании гAAV, содержащего мутантные капсидные белки способа по изобретению. Иллюстративный способ представлен в Примерах.

Также предпочтительно или в дополнение к вышесказанному, вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, обеспечивает аналогичные или более низкие титры нейтрализующих антител (нАт) по сравнению с таким же вирионом гAAV, включающим немодифицированный, предпочтительно дикого типа, капсидный белок AAV того же серотипа.

5 Известно, что капсиды WtAAV5 обладают привлекательным профилем нАт, и, следовательно, предпочтительны аналогичные или более низкие титры нАт к гAAV, содержащего модифицированный капсидный белок по настоящему изобретению, по сравнению с wtAAV5.

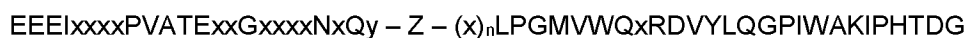
В качестве альтернативы, анализ трансдукции *in vitro* можно проводить аналогично описанному выше, но в типе/линии клеток, отличном от FLS, в зависимости от типа клеток, на
10 который нужно нацелиться, например, в клетках, выбранных из группы, состоящей из первичных гепатоцитов, клеточных линий печени, например, HuH, HepG2, HepA1-6, клетки сердца, клетки скелетных мышц, клетки легкого, такие как линия клеток A549, клетки ЦНС, клетки глаза, клетки желудочно-кишечного тракта, клетки костного мозга и клетки крови, такие как линия клеток THP-1. Это также может потребовать другого серотипа AAV в качестве предпочтительного контроля, в
15 зависимости от тропизма капсидных белков дикого типа. Как правило, контрольный вектор предпочтительно содержит капсидные белки дикого типа, которые естественным образом нацелены на выбранную ткань. Как понятно специалисту в данной области техники, это также может зависеть от способа введения: местного или системного. Например, AAV2, который был наиболее изученным AAV, проявляет тропизм по отношению к клеткам скелетных мышц, нейронам, клеткам гладкой
20 мускулатуры сосудов и гепатоцитам; AAV6 проявляет тропизм к эпителиальным клеткам дыхательных путей; AAV7 проявляет тропизм к клеткам скелетных мышц; AAV8 проявляет тропизм к гепатоцитам; AAV1 и AAV5 обладают тропизмом к эндотелиальным клеткам сосудов. При системном введении AAV 1-3 и 5-9 обладают тропизмом к печени, при этом высокие уровни белка наблюдаются у AAV9, 8, 7, 6, 1 и в меньшей степени 5 и 2; в сердце трансдуцируется AAV4, 6, 7, 8 и
25 9; торакальная экспрессия наблюдается для AAV4 и 6 (Zincarelli et al. (2008) Molecular Therapy 16(6): 1073-1080).

Не желая быть связанными какой-либо теорией, мы полагаем, что повышенная экспрессия, достигаемая вирионами гAAV, содержащими модифицированный капсидный белок по изобретению, по сравнению с контрольными вирионами гAAV, вызвана улучшенной трансдукцией гAAV в клетку,
30 возможно, путем изменения тропизма, что приводит к (i) увеличению числа трансдуцируемых клеток в клеточной популяции и/или (ii) повышению уровня экспрессии на клетку, например, благодаря лучшему поглощению вириона и/или внутриклеточному процессингу.

Другим преимуществом вириона гAAV с модифицированным капсидным белком по изобретению предпочтительно могут быть другие усовершенствования, такие как возможное
35 отсутствие ранее существовавших нейтрализующих антител.

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

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



где x представляет собой один аминокислотный остаток, где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка(-ов) (которые, таким образом, могут отсутствовать), и где n равно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, предпочтительно 8, 9 или 10, или где расположение вставки представлено последовательностью, имеющей по меньшей мере 90, 93, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с формулой II. Предпочтительно последние три аминокислотных остатка, предшествующие N-концу последовательности Z по изобретению, представляют собой NLQ, NHQ или NFQ. Предпочтительно y представляет собой 0 или 2 аминокислотных остатка. В некоторых случаях y представляет собой 2 аминокислотных остатка, таким образом, между мотивом NxQ и вставкой по изобретению могут присутствовать два дополнительных аминокислотных остатка, предпочтительно два остатка серина. Это предпочтительно в случае, когда мотив NxQ представляет собой NFQ, например, если капсид AAV представляет собой последовательность

капсида AAV1, представленную в SEQ ID NO:1. Специалист в данной области техники сможет определить эти мотивы и эту область, в которой расположена вставка, а также если она содержит некоторые вариации, такие как аминокислотные замены или делеции, которые также входят в объем настоящего изобретения.

- 5 В предпочтительном варианте осуществления, исходя из выравниваний, приведенных на Фиг. 4 и 5, вставка (последовательность Z) содержит или состоит из последовательности формулы: $x_1\text{-G-Q-}x_2\text{-G-}x_3\text{-}x_4\text{-}x_5\text{-R-}x_6\text{-}x_7\text{-}x_8\text{-}x_9\text{-}x_{10}\text{-}x_{11}\text{-}x_{12}\text{-}x_{13}\text{-}x_{14}\text{-}x_{15}$, где x_1 представляет собой Q или отсутствует, x_2 представляет собой S или R, x_3 представляет собой N или C, x_4 представляет собой D, Y или E, x_5 представляет собой C, V, S или A, x_6 представляет собой G, S или V, x_7 отсутствует, A, V или R, x_8 представляет собой D, N или E, x_9 представляет собой C или A, x_{10} представляет собой F или Q, x_{11} отсутствует, C или A, x_{12} отсутствует или A, x_{13} отсутствует или Q, x_{14} отсутствует или A и x_{15} отсутствует или представляет собой A. Альтернативно вставка (последовательность Z) содержит или состоит из последовательности формулы: $y_1\text{-G-Q-}y_2\text{-G-}y_3\text{-}y_4\text{-}y_5\text{-R-}y_6\text{-}y_7\text{-}y_8\text{-}y_9\text{-}y_{10}\text{-A-}y_{11}\text{-}y_{12}\text{-}y_{13}$, где y_1 представляет собой Q или отсутствует, y_2 представляет собой S или R, y_3 представляет собой N или C, y_4 представляет собой D, Y или E, y_5 представляет собой C, V, S или A, y_6 представляет собой G, S или V, y_7 отсутствует или представляет собой D, y_8 отсутствует или представляет собой C, y_9 представляет собой A, V, R или F, y_{10} представляет собой N, D, E или C, y_{11} отсутствует или представляет собой Q, y_{12} отсутствует или представляет собой A, y_{13} отсутствует или представляет собой A. В еще одном альтернативном варианте, в наиболее предпочтительном варианте осуществления, основанном на выравниваниях, приведенных на Фиг. 6 и 7, вставка (последовательность Z) содержит или состоит из последовательности общей формулы I:

$$y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$$

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

$$z_0 - G - Q - z_1 - G - z_2 - z_3 - z_4 - R - z_5 - z_6 - z_7 - z_8 - z_9 - A - Q - A - A$$

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

- 40 Более предпочтительно, последовательность Z/вставка содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94,

95, 96, 97, 98 или 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8–12. Предпочтительно, чтобы последовательность Z/вставка содержала или состояла из аминокислотной последовательности, представленной любой из приведенных выше формул и

5 имеющей по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-12.

В клетках млекопитающих экспрессия трех капсидных белков AAV (VP1, VP2 и VP3) в правильной стехиометрии зависит от комбинации поочередного использования двух акцепторных

10 сайтов сплайсинга и субоптимального использования иницирующего кодона ACG для VP2, который не воспроизводится точно клетками насекомых. Правильная стехиометрия важна для инфективности частиц AAV. Для продукции трех капсидных белков AAV в клетках насекомых с правильной стехиометрией в данной области техники обычно используют конструкцию, которая транскрибируется в единую полицистронную мРНК, способную экспрессировать все три белка VP

15 без необходимости сплайсинга. Чтобы достичь этого, белок VP1 может находиться под контролем субоптимального кодона инициации трансляции вместо ATG. Примерами такого субоптимального кодона инициации трансляции являются ACG, TTG, CTG и GTG (Urabe et al. (2002) Human Gene Therapy 13: 1935-1943; US 20030148506; US 20040197895; WO 2007/046703). Альтернативно, при получении гAAV в клетках насекомых можно использовать кассету нуклеиновой кислоты для

20 экспрессии белков VP1, VP2 и VP3, где эти белки кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORF), как описано в Европейском патенте № 2061891 B1, в котором описана кассета экспрессии VP, которая содержит интрон, содержащий промотор перед кодоном инициации трансляции ACG VP2. Модифицированный капсидный белок по изобретению определяют относительно белковой

25 последовательности капсидного белка VP1. Однако, поскольку последовательность Z/вставка расположена в С-концевой части белка VP1, в изобретение включено, что также белки VP2 и VP3 содержат последовательность Z/вставку и, таким образом, модифицируются (независимо от способа получения гAAV, например, в клетках насекомых или в клетках млекопитающих).

Альтернативно или в комбинации с другим вариантом осуществления, в еще одном

30 предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения модифицированный капсидный белок по данному изобретению содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из следующего: i) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с аминокислотной

35 последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 1, и где аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, ii) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с аминокислотной

40 последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 2, и где аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее

предпочтительно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, iii) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 3, и где аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, iv) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 4, и где аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, v) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 5, и где аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, vi) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 6, и где аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и vii) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 7, и где аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, наиболее предпочтительно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно каркасный капсидный белок AAV, в который входит вставка, имеет аминокислотную последовательность капсида AAV дикого типа, такую как, например, AAV5, AAV1, AAV2, AAV7, AAV9, AAVrh10 или AAVDJ, или аминокислотную последовательность, имеющую консервативные аминокислотные замены. Более предпочтительно, каркасный капсидный белок AAV, в который входит вставка, имеет аминокислотную последовательность капсида wtAAV5 или аминокислотную последовательность, имеющую консервативные аминокислотные замены.

«Идентичность последовательностей» в данном документе определяется как взаимосвязь между двумя или более аминокислотными (полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот (полинуклеотидными), как определено путем сравнения последовательностей. В предпочтительном варианте осуществления идентичность последовательности рассчитывают на основе полной длины двух заданных SEQ ID NO или их частей. Выражение «ее часть» предпочтительно означает по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или 100% обеих последовательностей SEQ ID NO. В данной области техники «идентичность» также означает степень родства последовательностей между последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот, в зависимости от случая,

определяемую по совпадению между участками таких последовательностей. Если в данном документе не указано иное, идентичность или сходство с данной SEQ ID NO означает идентичность или сходство на основе полной длины указанной последовательности (т.е. по всей ее длине или в целом).

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

Разработаны предпочтительные методы определения идентичности с целью выявления максимального сходства между исследуемыми последовательностями. Эти методы определения идентичности и подобию запрограммированы в общественно доступных компьютерных программах. Предпочтительные компьютерные программные методы для определения идентичности и сходства между двумя последовательностями включают, например, пакет программ GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN, и FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Программа BLAST X общедоступна в NCBI и других источниках (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Также для определения идентичности можно использовать известный алгоритм Смита-Ватермана.

Предпочтительные параметры для сравнения последовательностей полипептидов включают следующий алгоритм: Needleman and Wunsch, J. Mol. биол. 48:443-453 (1970); матрица сравнения: BLOSSUM62 от Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992); штраф за открытие гэпа: 12; и штраф за продолжение гэпа: 4. Такая программа общедоступна как программа "Ogap" от Genetics Computer Group, расположенной в Мэдисоне, штат Висконсин. Вышеупомянутые параметры являются параметрами по умолчанию для сравнения аминокислот (наряду с отсутствием штрафа за внесение концевых гэпов).

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

Необязательно, при определении степени сходства аминокислот специалист в данной области техники может также принимать во внимание так называемые «консервативные» аминокислотные замены, как будет понятно специалисту в данной области техники. Консервативные аминокислотные замены относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих

сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, представляет собой глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксильные боковые цепи, представляет собой серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амидосодержащие боковые цепи, представляет собой аспарагин и глутамин; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, представляет собой фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, представляет собой лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, представляет собой цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Варианты с заменой аминокислотной последовательности, описанные в данном документе, представляют собой те, в которых по меньшей мере один остаток в описанных последовательностях был удален, а на его место вставлен другой остаток. Предпочтительно аминокислотная замена является консервативной. Предпочтительными консервативными заменами для каждой из встречающихся в природе аминокислот являются следующие: Ala на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln или His; Asp на Glu; Cys на Ser или Ala; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Pro; His на Asn или Gln; Ile на Leu или Val; Leu на Ile или Val; Lys на Arg; Gln или Glu; Met на Leu или Ile; Phe на Met, Leu или Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp или Phe; и, Val на Ile или Leu.

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

Вирсион гAAV по изобретению может содержать один тип модифицированного капсидного белка, предпочтительно один тип модифицированного капсидного белка, как определено в данном документе. Следовательно, в одном варианте осуществления вирион гAAV по изобретению содержит модифицированные капсидные белки, где каждый модифицированный капсидный белок имеет одинаковую или практически одинаковую аминокислотную последовательность. Альтернативно, вирион гAAV по изобретению может содержать различные типы модифицированных капсидных белков. В качестве неограничивающего примера вирион AAV по изобретению может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более типов модифицированных капсидных белков. Вирсион гAAV по изобретению может дополнительно содержать капсидные белки одного или дикого типа в комбинации с модифицированными капсидными белками одного или разных типов.

В предпочтительных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе,

В предпочтительных вариантах осуществления капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z

а. содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I:



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

б. присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV по изобретению содержит модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или при лечении или предупреждении симптомов, связанных с заболеванием суставов.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV по изобретению содержит модифицированный капсидный белок P4 AAV1 для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион гAAV по изобретению содержит модифицированный капсидный белок P2 AAV2 для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV по данному изобретению содержит модифицированный капсидный белок A6 AAV7 для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID

NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV по данному изобретению содержит модифицированный капсидный белок A2 AAV9 для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV по данному изобретению содержит модифицированный капсидный белок A6 AAVrh10 для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV по данному изобретению содержит модифицированный капсидный белок A2 AAVrh10 для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион гAAV по изобретению содержит модифицированный капсидный белок AAV-DJ-QR-P2 для применения при лечении или профилактике заболевания суставов, или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов.

Функциональные последовательности ITR необходимы для репликации, спасения и упаковки вирионов гAAV. Последовательности ITR могут быть последовательностями дикого типа или могут иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностями дикого типа или могут быть изменены, например, путем вставки, мутации, делеции или замены нуклеотидов, пока они остаются функциональными. В этом контексте термин «функциональность» относится к способности непосредственно упаковывать геном в капсидную оболочку, а затем обеспечивать экспрессию в трансдуцируемой клетке-хозяине или клетке-мишени. Как правило, ITR генома AAV дикого типа сохраняются в векторе гAAV. ITR могут быть клонированы из вирусного генома AAV или вырезаны из вектора, содержащего ITR AAV. Нуклеотидные

последовательности ITR могут быть либо лигированы на любом конце трансгена, как определено в данном документе, с использованием стандартных методов молекулярной биологии, либо последовательность AAV дикого типа между ITR может быть заменена желаемой нуклеотидной последовательностью. Вектор гAAV предпочтительно содержит по меньшей мере нуклеотидные последовательности областей ITR одного из серотипов AAV или нуклеотидные последовательности, по существу идентичные им, и по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический белок (под контролем подходящего регуляторного элемента), вставленную между двумя ITR. В большинстве используемых в настоящее время векторов гAAV используются последовательности ITR из AAV серотипа 2. Наиболее предпочтительные ITR, присутствующие в векторе гAAV, относятся к серотипу AAV2. Другие предпочтительные ITR относятся к серотипу AAV1, AAV3, AAV5 или AAV6 (Grimm et al. (2006) J Virol 80(1):426-439). Геном гAAV может содержать одноцепочечную или двухцепочечную (самокомплементарную) ДНК. Одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой либо смысловую, либо антисмысловую цепь, поскольку обе полярности в равной степени способны упаковываться в капсиды AAV. В одноцепочечных векторах гAAV могут использоваться последовательности ITR AAV серотипа 2 (AAV2) дикого типа, а в двухцепочечных (самокомплементарных) векторах гAAV может использоваться модифицированная версия ITR. Альтернативно, в варианте осуществления двухцепочечный вектор содержит одну ITR, причем эта ITR получена из AAV4. Вектор гAAV может дополнительно содержать маркерный или репортерный ген, такой как ген, например, кодирующий ген устойчивости к антибиотикам, флуоресцентный белок (например, *gfp*) или ген, кодирующий химически, ферментативно или иным образом обнаруживаемый и/или селективируемый продукт (например, *lacZ*, щелочную фосфатазу (AP), SEAP, Luc, Neo, Bla и т.д.), известные в данной области техники.

Вектор гAAV, включая любую возможную комбинацию капсида серотипа AAV и ITR генома AAV, получают с использованием способов, известных в данной области техники, например, с использованием системы продукции гAAV млекопитающих или системы продукции гAAV клеток насекомых. Способы, известные в данной области техники, описаны, например, в Pan et al. (J. of Virology (1999) 73: 3410-3417), Clark et al. (Human Gene Therapy (1999) 10: 1031-1039), Wang et al. (Methods Mol. Biol. (2011) 807: 361-404), Grimm (Methods (2002) 28(2): 146-157), и система клеток насекомых на основе Urabe et al (Human Gene Therapy (2002) 13:1935-1943), Kohlbrenner et al (Molecular Therapy (2005) 12(6):1217-1225), международной патентной публикации WO 2007/046703, международной патентной публикации WO 2007/148971, международной патентной публикации WO 2009/014445, международной патентной публикации WO 2009/104964, международной патентной публикации WO 2009/154452, международной патентной публикации WO 2011/112089, международной патентной публикации WO 2013/036118, патенте США № 6723551 В, которые включены в данный документ посредством ссылки. Короче говоря, способы, как правило, могут включать (а) введение конструкции генома гAAV в клетку-хозяина, (b) введение хелперной конструкции AAV в клетку-хозяина, при этом хелперная конструкция имеет вирусные функциональные элементы, отсутствующие в геноме гAAV дикого типа и (с) введение конструкции хелперного вируса в клетку-хозяина. Все функциональные элементы для репликации и упаковки вектора гAAV должны присутствовать, чтобы обеспечить репликацию и упаковку генома гAAV в

векторы gAAV. Введение в клетку-хозяина можно проводить с использованием стандартных методов молекулярной биологии и можно одновременно или последовательно. Наконец, клетки-хозяева культивируют для получения векторов gAAV, которые затем очищают с использованием стандартных способов, таких как градиенты CsCl (Xiao et al. 1996, J. Virol. 70: 8098-8108) или очистка йодиксанолом. Затем очищенный вектор gAAV, как правило, готов к применению в способах. Могут быть достигнуты высокие титры более 10^{12} частиц на мл и высокая чистота (отсутствие обнаруживаемых хелперных вирусов и вирусов дикого типа) (см., например, Clark et al. выше и Flotte et al. 1995, Gene Ther. 2: 29-37). Общий размер трансгена, встроенного в вектор gAAV между областями ITR, обычно составляет менее 5 тысяч нуклеотидов (т.н.).

В контексте настоящего изобретения оболочка из капсидных белков может иметь серотип, отличный от генома gAAV, который содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес генный продукт, и (ii) по меньшей мере одну последовательность ITR AAV. Таким образом, геном gAAV по изобретению может быть инкапсулирован оболочкой из капсидных белков по настоящему изобретению, т.е. икосаэдрическим капсидом, который содержит капсидные белки (VP1, VP2 и/или VP3) по настоящему изобретению, например, мутантные капсидные белки AAV по данному изобретению, тогда как последовательности ITR, содержащиеся в этом векторе gAAV, могут быть любого серотипа AAV, описанного выше, включая, например, AAV2 или AAV5. В одном варианте осуществления геном gAAV или ITR, присутствующие в вирионе gAAV, получены из AAV серотипа 2, или AAV серотипа 5, или AAV серотипа 8. Был секвенирован полный геном AAV5 и других серотипов AAV (Chiorini et al. 1999, J. of Virology Vol. 73, No.2, p1309-1319), а нуклеотидная последовательность AAV5 доступна в GenBank (номер доступа AF085716). Таким образом, нуклеотидные последовательности ITR AAV2 и AAV5 легко получить специалисту в данной области техники. Полный геном AAV2 доступен в NCBI (эталонная последовательность в NCBI: NC_001401.2). Их можно либо клонировать, либо получить с помощью химического синтеза, известного в данной области техники, с использованием, например, синтезатора олигонуклеотидов, поставляемого, например, компанией Applied Biosystems Inc. (Фостерс, штат Калифорния, США) или при помощи стандартных методик молекулярной биологии.

Альтернативно или в комбинации с другим вариантом осуществления, в еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вектор gAAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес генный продукт.

Термин «трансген» используется для обозначения полинуклеотида, который может быть введен в клетку или организм. Трансген включает любой полинуклеотид, такой как ген, кодирующий полипептид или белок, полинуклеотид, который транскрибируется в ингибирующий полинуклеотид, или полинуклеотид, который не транскрибируется (например, в котором отсутствует элемент регуляции экспрессии, такой как промотор, который управляет транскрипцией). Трансген по изобретению может содержать по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, каждая из которых отличается или кодирует разные терапевтические молекулы. По меньшей мере две разные нуклеотидные последовательности могут быть связаны элементом IRES (внутренний участок посадки рибосомы), обеспечивая бицистронный транскрипт под контролем одного промотора. Подходящие элементы IRES описаны, например, в Hsieh et al. (1995, Biochem. Biophys. Res.

Commun. 214:910-917). Кроме того, по меньшей мере две разные нуклеотидные последовательности, кодирующие разные (терапевтические) полипептиды или белки, могут быть связаны вирусной последовательностью 2A для обеспечения эффективной экспрессии обоих трансгенов с одного промотора. Примеры последовательностей 2A включают последовательности вируса ящура, вируса ринита лошадей А, вируса *Thosea asigna* и свиного тешовируса-1 (Kim et al., PLoS One (2011) 6(4): e18556). Трансген предпочтительно встроен в геном gAAV или между последовательностями ITR. Трансген также может представлять собой конструкцию экспрессии, содержащую регуляторный элемент экспрессии, такой как промотор или регуляторная последовательность транскрипции, функционально связанные с кодирующей последовательностью и 3'-терминирующей последовательностью. Трансген может представлять собой функциональный мутантный аллель, который заменяет или дополняет дефектный. Генная терапия также включает в себя вставку трансгенов, которые являются ингибирующими по своей природе, т.е. которые ингибируют, снижают или уменьшают экспрессию, активность или функцию эндогенного или экзогенного гена или белка, такого как нежелательный или aberrантный (например, патогенный) ген или белок. Такие трансгены могут быть экзогенными. Под экзогенной молекулой или последовательностью понимается молекула или последовательность, как правило, не встречающаяся в клетке, ткани и/или у индивидуума, который подлежит лечению. Генной терапии поддаются как приобретенные, так и врожденные заболевания.

«Ген» или «кодирующая последовательность» относится к области ДНК или РНК, которая «кодирует» конкретный белок. Кодированная последовательность транскрибируется (ДНК) и транслируется (РНК) в полипептид, когда ее помещают под контроль соответствующей регуляторной области, такой как промотор. Ген может содержать несколько функционально связанных фрагментов, таких как промотор, 5'-лидерная последовательность, интрон, кодирующая последовательность и 3'-нетранслируемая последовательность, содержащая сайт полиаденилирования или сигнальную последовательность. Химерный или рекомбинантный ген представляет собой ген, обычно не встречающийся в природе, такой как ген, в котором, например, промотор не связан в природе с частью или со всей транскрибируемой областью ДНК. «Экспрессия гена» относится к процессу, при котором ген транскрибируется в РНК и/или транслируется в активный белок.

Используемый в данном документе термин «промотор» или «регуляторная последовательность транскрипции» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который функционирует для контроля транскрипции одной или более кодирующих последовательностей и расположен против хода транскрипции относительно сайта инициации транскрипции кодирующей последовательности, и структурно идентифицируется наличием сайта связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, включая, помимо прочего, сайты связывания факторов транскрипции, сайты связывания белков-репрессоров и активаторов, и любые другие последовательности нуклеотидов, известные специалисту в данной области техники, которые прямо или косвенно регулируют количество транскрипции с промотора. «Конститутивный» промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве тканей при большинстве физиологических условий и условий развития. «Индукцибельный» промотор представляет собой промотор, который регулируется физиологически

или в процессе развития, например, путем применения химического индуктора. «Тканеспецифический» промотор предпочтительно активен в определенных типах тканей или клеток. Выбор подходящей последовательности промотора обычно зависит от клетки-хозяина, выбранной для экспрессии сегмента ДНК. Трансген может быть функционально связан с промотором, обеспечивающим эффективную системную экспрессию или обеспечивающим тканеспецифическую экспрессию.

10 Промоторы

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, кодирующего представляющий интерес генный продукт, предпочтительно представляющий интерес генный продукт, как определено в данном документе, функционально связана с промотором. Поэтому предпочтительно вирион gAAV по изобретению содержит промоторную последовательность.

Предпочтительно промотор выбран из группы, состоящей из конститутивного промотора, индуцибельного промотора, тканеспецифического промотора, промоторов, обеспечивающих экспрессию в клетках сустава, промотора CMV, промотора CAG (немедленно-раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина), промотора EF1 α , промотора SV40, промотора CBA (куриного бета-актина), специфического для печени промотора, NF κ B-чувствительного (индуцибельного) промотора, промотора гена модулятора воспаления, промотора IL1 β , промотора IL-6 (HGF), промотора IL8 (CXCL8), промотора CXCL10, промотора MMP3, промотора MMP2, промотора ICAM1, промотора MMP13, промотора ADAMTS4, промотора ADAMDEC1, промотора COL1A1, промотора MMP12, промотора RUNX2, промотора ADAMTS5, промотора COX2 (PTGS2), промотора TNF α (TNF), промотора VEGF (VEGFA), промотора (основного) FGF (FGF2) и промотора TGF- β (TGB1).

Предпочтительно промотор выбран из группы, состоящей из NF κ B-чувствительного (индуцибельного) минимального промотора CMV, промотора гена провоспалительного цитокина, минимизированного промотора гена провоспалительного цитокина, промотора, который обеспечивает экспрессию в клетках пораженного артритом сустава, промотора, который обеспечивает экспрессию в клетках соединительной ткани, промотора, который обеспечивает экспрессию в синовиальных клетках, промотора, который обеспечивает экспрессию в субсиновиальных клетках, промотора, который обеспечивает экспрессию в интимальных макрофагах, промотора, который обеспечивает экспрессию в FLS, промотора, который обеспечивает экспрессию в хрящевых клетках, промотора, который обеспечивает экспрессию в хондроцитах, промотора, который обеспечивает экспрессию в хондробластах, промотора, который обеспечивает экспрессию в адипоцитах, промотора, который обеспечивает экспрессию в остеокластах, промотора, который обеспечивает экспрессию в Т-клетках, промотора альфа-1-антитрипсина человека (hAAT) и промотора TBG (тироксин-связывающего глобулина).

Предпочтительно промотор выбран из группы, состоящей из минимального промотора CMV, NF κ B-чувствительного (индуцибельного), промотора CMV, промотора EF1 α , промотора CAG, промотора MMP13, промотора IL-6 и промотора IL8, предпочтительно NF κ B-чувствительного (индуцибельного) минимального промотора CMV. Предпочтительно NF κ B-чувствительный

(индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется конститутивным промотором.

5 В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется индуцибельным промотором.

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется тканеспецифическим промотором.

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется промотором, который обеспечивает экспрессию в клетках сустава, предпочтительно пораженного артритом сустава. Предпочтительный промотор обеспечивает экспрессию по меньшей мере в одной из клеток соединительной ткани, синовиальных клеток, субсиновиальных клеток, интимальных макрофагов, FLS, хрящевых клеток, хондроцитов, хондробластов, адипоцитов, остеокластов и Т-клеток, предпочтительно промотор
10 обеспечивает экспрессию в клетках FLS.

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется промотором CMV.

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется промотором CAG (немедленно-раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина).
20

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется промотором EF1 α .

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется промотором SV40.

25 В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется промотором CBA (куриного бета-актина).

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется специфическим для печени промотором. Предпочтительным специфическим для печени промотором является по меньшей мере один из промотора альфа-1-антитрипсина человека (hAAT) и промотора TBG (тироксин-связывающего глобулина).
30

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется NF κ B-чувствительным (индуцибельным) промотором. Предпочтительный NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор представляет собой NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор CMV, предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) минимальный промотор CMV. Предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.
35

40 В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется промотором модулятора

В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе, контролируется промотором TGF-β (TGB1).

В предпочтительных вариантах осуществления промотор в вирионе gAAV не представляет собой стероид-индуцибельный промотор. Предпочтительно промотор в вирионе gAAV не представляет собой дексаметазон-индуцибельный промотор.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок представляет собой модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, контролирующей экспрессию трансгена. Предпочтительно промотор представляет собой промотор, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z

а. содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I:



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

б. присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, контролирующей экспрессию трансгена. Предпочтительно промотор представляет собой промотор, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок P4 AAV1, дополнительно содержит промотор, контролирующей экспрессию трансгена. Предпочтительно промотор представляет собой промотор, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион gAAV,

содержащий модифицированный капсидный белок P2 AAV2, дополнительно содержит промотор, контролирующий экспрессию трансгена. Предпочтительно промотор представляет собой промотор, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок A6 AAV7, дополнительно содержит промотор, контролирующий экспрессию трансгена. Предпочтительно промотор представляет собой промотор, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок A2 AAV9, дополнительно содержит промотор, контролирующий экспрессию трансгена. Предпочтительно промотор представляет собой промотор, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок A6 AAVrh10, дополнительно содержит промотор, контролирующий экспрессию трансгена. Предпочтительно промотор представляет собой промотор, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок A2 AAVrh10, дополнительно содержит промотор, контролирующий экспрессию трансгена. Предпочтительно промотор представляет собой промотор, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-

QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок AAV-DJ-QR-P2, дополнительно содержит промотор, контролирующий экспрессию трансгена. Предпочтительно промотор представляет собой промотор, как определено в данном документе выше.

Термины «контролирующий экспрессию» и «функционально связанный» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Используемый в данном документе термин «функционально связанный» относится к соединению полинуклеотидных (или полипептидных) элементов в функциональную взаимосвязь. Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, регуляторная последовательность транскрипции функционально связана с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. «Функционально связанный» означает, что связываемые последовательности ДНК, как правило, являются смежными и, когда необходимо соединить две области, кодирующие белок, они являются смежными и находятся в рамке считывания.

Представляющий интерес генный продукт

Трансген, как определено в данном документе, предпочтительно кодирует представляющий интерес генный продукт, как определено в данном документе. «Представляющий интерес генный продукт» может представлять собой «терапевтический полипептид» или «терапевтический белок», которые следует понимать в данном документе как полипептид или белок, который может оказывать благоприятное воздействие на индивидуума, предпочтительно указанный индивидуум представляет собой человека, более предпочтительно указанный человек страдает от болезни. Такой терапевтический полипептид может быть выбран из группы, состоящей из фермента, кофактора, цитокина, антитела, фактора роста, гормона и противовоспалительного белка, но не ограничивается ими.

Альтернативно или в комбинации с другим вариантом осуществления, в еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес генный продукт, расположена между двумя последовательностями ITR AAV. Альтернативно, нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес генный продукт, фланкирована двумя последовательностями ITR AAV, т.е. одной ITR на каждом конце нуклеотидной последовательности, кодирующей представляющей интерес генный продукт.

Альтернативно или в комбинации с другим вариантом осуществления, в еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представляющий интерес генный продукт лечит, предотвращает или подавляет симптомы, связанные с заболеванием суставов.

В данном документе подразумевается, что представляющий интерес генный продукт может включать биоаналоги указанного представляющего интерес генного продукта.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой иммунодепрессант.

5 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт выбран из группы, состоящей из следующего: ANP32A, Nrf2, ингибитор IL-6, растворимый рецептор IL-6, антагонист рецептора IL-6, гуманизированное моноклональное антитело к IL-6, химерное моноклональное антитело к IL-6, гуманизированное кроличье моноклональное антитело против IL-6, ингибитор интерлейкина-1 (IL-1), ингибитор фактора некроза опухоли альфа (TNF α), антагонист
10 рецептора IL-1, растворимый рецептор IL-1, ингибитор IL-17, ингибитор IL-12/IL-23, ингибитор костимуляции Т-клеток, истощающие и ингибирующие В-клетки агенты, ингибитор IL-15, ингибитор IL-22, ингибитор GM-CSF, инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), фактор роста фибробластов (FGF), ингибитор лиганда рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL), ингибитор 5 α системы комплемента, член семейства костных морфогенетических белков (BMP),
15 трансформирующий ростовой фактор бета (TGF- β), член семейства факторов роста и дифференцировки (GDF), ингибитор интерлейкина-18, ингибитор IL-2, рецептор растворимого TNF α (sTNF α) p55, рецептор sTNF α p75, рецепторы sTNF α , слитые с IgG, ингибиторы рецептора TNF α p55, ингибиторы рецептора sTNF α p75, доминантно-негативная I κ B-киназа (dn-IKK- β), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-13 (IL-13), ингибитор IL-33, ингибитор CCL17, интерферон
20 бета (IFN- β), тканевой ингибитор члена семейства MMP (TIMP), ингибитор активатора плазминогена (PAI), ингибитор сериновой протеазы (серпины), сигнальные молекулы/факторы транскрипции, компоненты внеклеточного матрикса, вазоактивный интестинальный пептид (VIP), кластер дифференцировки 39 (CD39), кластер дифференцировки 73 (CD73) и супероксиддисмутаза (SOD).

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт
25 выбран из группы, состоящей из следующего: тоцилизумаб, сарилумаб, олокизумаб, сирукумаб, силтуцимаб, клазакизумаб, анакинра, канакинумаб, рилонацепт, гевокизумаб и лутикизумаб, этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пэгол, голимумаб, секукинумаб, бродалумаб, иксекизумаб, устекинумаб, рисанкизумаб, гуселькумаб, тилдракизумаб, абатацепт, ритуксимаб, белимумаб, ианалумаб, табалумаб, AMG-714, фезакинумаб, лензилумаб, наmilумаб,
30 rhFGF-18/сприфермин, деносумаб, C5aR-151, Тадекиниг альфа/ IL-18-связывающий белок, базиликсимаб, даклизумаб, F8IL10/Декавил, SMAD, Sox9, I κ B, коллаген, олигомерный матричный белок хряща (COMP), протеогликаны и эластин.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой этанерцепт. Предпочтительно этанерцепт кодируется последовательностью
35 SEQ ID NO: 28. Белок этанерцепт может содержать сигнальный пептид, например, белок может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, а после расщепления сигнального пептида белок может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ANP32A.

40 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой Nrf2.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор IL-6.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой растворимый рецептор IL-6.

5 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой антагонист рецептора IL-6. Предпочтительно антагонист рецептора IL-6 представляет собой по меньшей мере один из тоцилизумаба и сарилумаба.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой гуманизированное моноклональное антитело к IL-6. Предпочтительно
10 гуманизированное моноклональное антитело к IL-6 представляет собой по меньшей мере одно из олокизумаба и сирукумаба.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой химерное моноклональное антитело к IL-6. Предпочтительно химерное моноклональное антитело к IL-6 представляет собой силтуцимаб.

15 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой гуманизированное кроличье моноклональное антитело к IL-6. Предпочтительно гуманизированное кроличье моноклональное антитело к IL-6 представляет собой клазакизумаб.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор интерлейкина-1 (IL-1). Предпочтительно ингибитор интерлейкина-1
20 (IL-1) выбран из группы, состоящей из анакинры, канакинумаба, рилонацепта, гевекизумаба и лутикизумаба. Предпочтительно ингибитор IL-1 выбран из группы, состоящей из следующего: i) антагонист рецептора IL-1, предпочтительно антагонист рецептора IL-1 человека, предпочтительно антагонист рецептора IL-1 человека анакинра; ii) моноклональное антитело к IL-1, предпочтительно человеческое моноклональное антитело к IL-1, предпочтительно человеческое моноклональное
25 антитело к IL-1 канакинумаб или гевекизумаб, iii) человеческий димерный слитый белок к IL-1, предпочтительно человеческий димерный слитый белок к IL-1 рилонацепт; и iv) человеческий иммуноглобулин к IL-1 с двойным переменным доменом, предпочтительно человеческий иммуноглобулин к IL-1 с двойным переменным доменом лутикизумаб.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт
30 представляет собой ингибитор фактора некроза опухоли альфа (TNF α). Предпочтительно ингибитор фактора некроза опухоли альфа (TNF α) выбран из группы, состоящей из этанерцепта, инфликсимаба, адалимумаба, цертализумаба пэгола и голимумаба. Предпочтительно ингибитор TNF α представляет собой этанерцепт. Предпочтительно представляющий интерес генный продукт представляет собой этанерцепт.

35 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой антагонист рецептора IL-1.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой растворимый рецептор IL-1.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт
40 представляет собой ингибитор IL-17. Предпочтительно ингибитор IL-17 выбран из группы, состоящей из секукинумаба, бродалумаба и иксекизумаба.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор IL-12/IL-23. Предпочтительно ингибитор IL-12/IL-23 выбран из группы, состоящей из устекинумаба, рисанкизумаба, гуселькумаба и тилдракизумаба.

5 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор костимуляции Т-клеток. Предпочтительно ингибитор костимуляции Т-клеток представляет собой абатацепт.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой истощающий и ингибирующий В-клетки агент. Предпочтительно истощающий и ингибирующий В-клетки агент выбран из группы, состоящей из ритуксимаба, белимумаба, ианалумаба и табалумаба.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор IL-15. Предпочтительно ингибитор IL-15 представляет собой AMG-714.

15 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор IL-22. Предпочтительно ингибитор IL-22 представляет собой фезакунимаб.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор GM-CSF. Предпочтительно ингибитор GM-CSF представляет собой по меньшей мере один из лензилумаба и наmilумаба.

20 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой инсулиноподобный фактор роста (IGF-1).

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой фактор роста фибробластов (FGF). Предпочтительно фактор роста фибробластов (FGF) представляет собой rhFGF-18/спирфермин.

25 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор лиганда рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL). Предпочтительно ингибитор RANKL представляет собой деносумаб.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор 5а системы комплемента. Предпочтительно ингибитор 5а системы комплемента представляет собой C5aR-151.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой член семейства костных морфогенетических белков (BMP).

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой трансформирующий фактор роста-бета (TGF-β).

35 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой член семейства факторов дифференцировки роста (GDF).

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор интерлейкина-18. Предпочтительно ингибитор интерлейкина-18 представляет собой Тадекиниг альфа/IL-18-связывающий белок.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор IL-2. Предпочтительно ингибитор IL-2 представляет собой по меньшей мере один из базиликсимаба и даклизумаба.

5 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой рецептор растворимого TNF α (sTNF α) p55.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой рецептор sTNF α p75.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой рецептор sTNF α , слитый с IgG.

10 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор рецептора TNF α p55.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор рецептора sTNF α p75.

15 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой доминантно-негативную I κ B-киназу (dn-IKK- β).

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой интерлейкин-4 (IL-4).

20 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой интерлейкин-10 (IL-10). Предпочтительно IL-10 представляет собой F8IL10/Декавил.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой интерлейкин-13 (IL-13).

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор IL-33.

25 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор CCL17,

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой бета-интерферон (IFN- β).

30 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой тканевый ингибитор члена семейства MMP (TIMP),

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор активатора плазминогена (PAI).

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор сериновой протеазы (серпины).

35 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой сигнальную молекулу/фактор транскрипции. Предпочтительно сигнальная молекула/фактор транскрипции выбрана из группы, состоящей из SMAD, Sox9 и I κ B.

40 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой компонент внеклеточного матрикса. Предпочтительно компонент внеклеточного матрикса выбран из группы, состоящей из коллагена, олигомерного матриксного белка хряща (COMP), протеогликанов и эластина.

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой вазоактивный интестинальный пептид (VIP).

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой кластер дифференцировки 39 (CD39).

5 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой кластер дифференцировки 73 (CD73).

В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой супероксиддисмутазу (SOD).

10 В предпочтительных вариантах осуществления представляющий интерес генный продукт представляет собой последовательность-специфическую нуклеазу (комплекс) для функционального редактирования генома. Системы функционального редактирования генома для использования во всех вариантах осуществления изобретения известны специалистам в данной области техники и включают: нуклеазу на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN, Gaj et al. (2013) Trends Biotechnol. 31(7):397-405), нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN, Gaj et al. (2013) *выше*), мегануклеазы, такие как I-SceI (Arnould et al. (2007) J Mol Biol 371(1):49-65; Takeuchi et al. (2011) PNAS USA 108(32):13077-13082), РНК-управляемые эндонуклеазные системы, такие как CRISPR/Cas (Mali et al. (2013) Nat methods 10(10):957-963; Mali et al. (2013) Nat Biotechnol 31(9):833-838; Cong et al. (2013) Science 339(6121):819-823) и CRISPR/Cpf1 (Zetsche et al. (2015) Cell 163(3):759-771), образующие триплекс молекулы, синтетические полиамиды и дизайнерские белки с цинковыми пальцами (Uil et al. (2003) Nucleic Acids Res 31(21):6064-6078). В системах функционального редактирования генома используются нуклеазы, которые создают специфичные для сайта двухцепочечные разрывы в желаемых местах генома. Индуцированные двухцепочечные разрывы восстанавливаются посредством нехомологичного соединения концов или гомологичной рекомбинации. В результате получают целевые мутации. Замена дефектного гена (вызывающего заболевание или расстройство) на нормальный аллель в его естественном месте любым из этих методов выгодна, поскольку не требует включения в вирион гAAV полных кодирующих последовательностей и регуляторных последовательностей, когда нужно изменить только небольшую часть гена. Считается также, что экспрессия частично замененного гена в большей степени соответствует нормальной клеточной биологии, чем полные гены, переносимые вирионами. Предпочтительной системой редактирования генов является CRISPR (включающая CRISPR/Cpf1 и CRISPR-Cas), поскольку она быстрее и дешевле других методов. Основным преимуществом также является то, что CRISPR можно легко переназначить для нацеливания на различные последовательности ДНК с помощью одиночной направляющей РНК CRISPR. Таким образом, альтернативно или в комбинации с другим вариантом осуществления, в еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения геном гAAV содержит по меньшей мере одно из: (i) полинуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую по меньшей мере одну направляющую РНК (нРНК); при этом направляющая РНК в значительной степени комплементарна, предпочтительно комплементарна, целевой полинуклеотидной последовательности(-ям) в геноме; и (ii) полинуклеотид, содержащий последовательность,

40

кодирующую нуклеазу; где нуклеаза образует рибонуклеазный комплекс с направляющей РНК, и где рибонуклеазный комплекс делает сайт-специфические двухцепочечные разрывы ДНК в геноме.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок представляет собой модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит трансген, кодирующий представляющий интерес генный продукт. Предпочтительно представляющий интерес продукт гена представляет собой представляющий интерес продукт гена, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z

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



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

b. присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит трансген, кодирующий представляющий интерес генный продукт. Предпочтительно представляющий интерес продукт гена представляет собой представляющий интерес продукт гена, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок P4 AAV1, дополнительно содержит трансген, кодирующий представляющий интерес генный продукт. Предпочтительно представляющий интерес продукт гена представляет собой представляющий интерес продукт гена, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок P2 AAV2, дополнительно содержит трансген,

кодирующий представляющий интерес генный продукт. Предпочтительно представляющий интерес продукт гена представляет собой представляющий интерес продукт гена, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
5 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий
10 модифицированный капсидный белок A6 AAV7, дополнительно содержит трансген, кодирующий представляющий интерес генный продукт. Предпочтительно представляющий интерес продукт гена представляет собой представляющий интерес продукт гена, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
15 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий
20 модифицированный капсидный белок A2 AAV9, дополнительно содержит трансген, кодирующий представляющий интерес генный продукт. Предпочтительно представляющий интерес продукт гена представляет собой представляющий интерес продукт гена, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
25 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион
30 гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок A6 AAVrh10, дополнительно содержит трансген, кодирующий представляющий интерес генный продукт. Предпочтительно представляющий интерес продукт гена представляет собой представляющий интерес продукт гена, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
35 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион
40 гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок A2 AAVrh10, дополнительно содержит трансген, кодирующий представляющий интерес генный продукт. Предпочтительно

представляющий интерес продукт гена представляет собой представляющий интерес продукт гена, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок AAV-DJ-QR-P2, дополнительно содержит трансген, кодирующий представляющий интерес генный продукт. Предпочтительно представляющий интерес продукт гена представляет собой представляющий интерес продукт гена, как определено в данном документе выше.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит конститутивный промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит тканеспецифический промотор, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков

формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и b) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CMV, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и b) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CBA (куриного бета-актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и b) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор EF1 α , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и b) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий

модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор TGF- β (TGB1), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL1 β , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL8 (CXCL8), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP3, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой

экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ICAM1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS4, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COL1A1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более

предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор RUNX2, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COX2 (PTGS2), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор VEGF (VEGFA), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит конститутивный промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит тканеспецифический промотор, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CMV, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CBA (куриного бета-актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор EF1 α , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе,

дополнительно содержит промотор TGF- β (TGB1), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1).

5 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL1 β , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL8 (CXCL8), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP3, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ICAM1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS4, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COL1A1, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит С-концевую часть белка. В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор RUNX2, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COX2 (PTGS2), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV,

содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор VEGF (VEGFA), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит конститутивный промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит тканеспецифический промотор, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CMV, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CBA (куриного бета-актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

дополнительно содержит промотор MMP3, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

5 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ICAM1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

15 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS4, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

25 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COL1A1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

30 В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор RUNX2, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

40 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COX2 (PTGS2), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (AAV2 P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор VEGF (VEGFA), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит конститутивный промотор, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит тканеспецифический промотор, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно

содержит промотор CMV, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7).

5 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
10 содержит промотор CBA (куриного бета-актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
15 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
20 содержит промотор EF1 α , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID
25 NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
содержит промотор TGF- β (TGB1), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID
35 NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
содержит промотор IL1 β , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
40 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,

содержит промотор COL1A1, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7).

5 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
10 содержит промотор RUNX2, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
15 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
20 содержит промотор COX2 (PTGS2), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID
25 NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
содержит промотор VEGF (VEGFA), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID
35 NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
содержит конститутивный промотор, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
40 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит тканеспецифический промотор, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CMV, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CBA (куриного бета-актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор EF1 α , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно

содержит промотор TGF- β (TGB1), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9).

5 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
10 содержит промотор IL1 β , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
15 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL8 (CXCL8), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно
20 трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID
25 NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP3, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID
35 NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ICAM1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9).

40 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS4, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COL1A1, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор RUNX2, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COX2 (PTGS2), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно

содержит промотор VEGF (VEGFA), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит конститутивный промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит тканеспецифический промотор, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CMV, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CBA (куриного бета-актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор EF1 α , контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор TGF- β (TGB1), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL1 β , контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL8 (CXCL8), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе,

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COX2 (PTGS2), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит VEGF (VEGFA), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит конститутивный промотор, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит тканеспецифический промотор, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе,

дополнительно содержит промотор CMV, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CBA (куриного бета-актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор EF1 α , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор TGF- β (TGB1), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL1 β , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около

дополнительно содержит промотор COL1A1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор RUNX2, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COX2 (PTGS2), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит VEGF (VEGFA), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит конститутивный промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-

QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит тканеспецифический промотор, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CMV, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CBA (куриного бета-актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор EF1 α , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе,

дополнительно содержит промотор TGF- β (TGB1), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL1 β , контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL8 (CXCL8), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP3, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ICAM1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS4, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COL1A1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор RUNX2, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор COX2 (PTGS2), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе,

дополнительно содержит промотор VEGF (VEGFA), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит индуцибельный промотор, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, который обеспечивает экспрессию в клетках сустава, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор, обеспечивающий экспрессию в клетках сустава, представляет собой промотор, обеспечивающий экспрессию клеток пораженного артритом сустава. Предпочтительный промотор обеспечивает экспрессию по меньшей мере в одной из клеток соединительной ткани, синовиальных клеток, субсиновиальных клеток, интимальных макрофагов, FLS, хрящевых клеток, хондроцитов, хондробластов, адипоцитов, остеокластов и Т-клеток, предпочтительно промотор обеспечивает экспрессию в клетках FLS.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца

капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор SV40, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

5 В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один
10 аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
15 содержит промотор CAG (раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой
20 экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более
25 предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический
30 для печени промотор представляет собой промотор альфа-1-антитрипсина человека (hAAT).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков
35 формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий
40 модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена,

предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор представляет собой NFκB-чувствительный (индуцибельный) минимальный промотор CMV. Предпочтительно NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор модулятора воспаления, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор представляет собой промотор гена провоспалительного цитокина. Предпочтительно промотор гена провоспалительного цитокина представляет собой минимизированный промотор гена провоспалительного цитокина.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца

капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL-6 (HGF), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

5 В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один
10 аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и b) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
15 содержит промотор CXCL10, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная
20 последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и b) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца
25 капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP2, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
30 содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и b)
35 присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP13, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена,
40 как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMDEC1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP12, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где y представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и б) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS5, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один

аминокислотный остаток и где у представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и b) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор TNF α (TNF), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка. Предпочтительно аминокислотная последовательность Z; а) содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I: $y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$, где x представляет собой один аминокислотный остаток и где у представляет собой 0, 1 или 2 аминокислотных остатка; и b) присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор (основного) FGF (FGF2), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит индуцибельный промотор, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, который обеспечивает экспрессию в клетках сустава, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор, обеспечивающий экспрессию в клетках сустава, представляет собой промотор, обеспечивающий экспрессию клеток пораженного артритом сустава. Предпочтительный промотор обеспечивает экспрессию по меньшей мере в одной из клеток соединительной ткани, синовиальных клеток, субсиновиальных клеток, интимальных макрофагов,

FLS, хрящевых клеток, хондроцитов, хондробластов, адипоцитов, остеокластов и Т-клеток, предпочтительно промотор обеспечивает экспрессию в клетках FLS.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1).

5 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор SV40, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CAG (раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор альфа-1-антитрипсина человека (hAAT).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно,

специфический для печени промотор представляет собой промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1).

5 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор представляет собой NFκB-чувствительный (индуцибельный) минимальный промотор CMV. Предпочтительно NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в 15 Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID 20 NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор модулятора воспаления, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно 25 промотор представляет собой промотор гена провоспалительного цитокина. Предпочтительно промотор гена провоспалительного цитокина представляет собой минимизированный промотор гена провоспалительного цитокина.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). 30 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL-6 (HGF), контролирующий экспрессию трансгена, 35 предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 40 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере

80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CXCL10, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

5 В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере
10 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP2, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
15 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере
20 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP13, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1).
25 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере
30 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMDEC1, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
35 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере
40 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP12, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит С-концевую часть белка. В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS5, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор TNF α (TNF), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 1 (P4 AAV1). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор (основного) FGF (FGF2), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит индуцибельный промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, который обеспечивает экспрессию в клетках сустава, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор, обеспечивающий экспрессию в клетках сустава, представляет собой промотор, обеспечивающий экспрессию клеток пораженного артритом сустава. Предпочтительный промотор обеспечивает экспрессию по меньшей мере в одной из клеток соединительной ткани, синовиальных клеток, субсиновиальных клеток, интимальных макрофагов, FLS, хрящевых клеток, хондроцитов, хондробластов, адипоцитов, остеокластов и Т-клеток, предпочтительно промотор обеспечивает экспрессию в клетках FLS.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор SV40, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CAG (раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно,

специфический для печени промотор представляет собой промотор альфа-1-антитрипсина человека (hAAT).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

5 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, 10 дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок 15 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, 20 содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор представляет собой NFκB-чувствительный (индуцибельный) минимальный промотор CMV. Предпочтительно NFκB- 25 чувствительный (индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 30 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор модулятора воспаления, контролирующий экспрессию 35 трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор представляет собой промотор гена провоспалительного цитокина. Предпочтительно промотор гена провоспалительного цитокина представляет собой минимизированный промотор гена провоспалительного цитокина.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок 40 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,

дополнительно содержит промотор ADAMDEC1, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

5 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP12, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

15 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS5, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2).

25 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор TNF α (TNF), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. В предпочтительных вариантах

30 осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 2 (P2 AAV2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор (основного) FGF (FGF2), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7).

40 Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно
5 содержит индуцибельный промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
10 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, который обеспечивает экспрессию в клетках сустава, который контролирует
15 экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор, обеспечивающий экспрессию в клетках сустава, представляет собой промотор, обеспечивающий экспрессию клеток пораженного артритом сустава. Предпочтительный промотор обеспечивает экспрессию по меньшей мере в одной из клеток соединительной ткани, синовиальных клеток, субсиновиальных клеток, интимальных макрофагов, FLS, хрящевых клеток,
20 хондроцитов, хондробластов, адипоцитов, остеокластов и Т-клеток, предпочтительно промотор обеспечивает экспрессию в клетках FLS.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
25 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор SV40, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как
30 определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%,
80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID
35 NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CAG (раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном
40 документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор альфа-1-антитрипсина человека (hAAT).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор представляет собой NF κ B-чувствительный (индуцибельный) минимальный промотор CMV. Предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор модулятора воспаления, контролирующий экспрессию трансгена,

предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор представляет собой промотор гена провоспалительного цитокина. Предпочтительно промотор гена провоспалительного цитокина представляет собой минимизированный промотор гена провоспалительного цитокина.

5 В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере
10 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL-6 (HGF), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
15 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий
20 модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CXCL10, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
25 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий
30 модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP2, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
35 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 3 (A6 AAV7). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий
40 модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP13, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор (основного) FGF (FGF2), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

5 В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере
10 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит индуцибельный промотор, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
15 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий
20 модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, который обеспечивает экспрессию в клетках сустава, который контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор, обеспечивающий экспрессию в клетках сустава, представляет собой промотор, обеспечивающий экспрессию клеток пораженного артритом сустава. Предпочтительный
25 промотор обеспечивает экспрессию по меньшей мере в одной из клеток соединительной ткани, синовиальных клеток, субсиновиальных клеток, интимальных макрофагов, FLS, хрящевых клеток, хондроцитов, хондробластов, адипоцитов, остеокластов и Т-клеток, предпочтительно промотор обеспечивает экспрессию в клетках FLS.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
30 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий
35 модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор SV40, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
40 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID

NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CAG (раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор альфа-1-антитрипсина человека (hAAT).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор представляет собой NF κ B-чувствительный (индуцибельный) минимальный промотор CMV. Предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9).

Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор модулятора воспаления, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор представляет собой промотор гена провоспалительного цитокина. Предпочтительно промотор гена провоспалительного цитокина представляет собой минимизированный промотор гена провоспалительного цитокина.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL-6 (HGF), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CXCL10, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион гAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP2, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 4 (A2 AAV9). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Предпочтительно аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор (основного) FGF (FGF2), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит индуцибельный промотор, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, который обеспечивает экспрессию в клетках сустава, который контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор, обеспечивающий экспрессию в клетках сустава, представляет собой промотор, обеспечивающий экспрессию клеток пораженного артритом сустава. Предпочтительный промотор обеспечивает экспрессию по меньшей мере в одной из клеток соединительной ткани, синовиальных клеток, субсиновиальных клеток, интимальных макрофагов, FLS, хрящевых клеток, хондроцитов, хондробластов, адипоцитов, остеокластов и Т-клеток, предпочтительно промотор обеспечивает экспрессию в клетках FLS.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе,

дополнительно содержит промотор SV40, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CAG (раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор альфа-1-антитрипсина человека (hAAT).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе,

дополнительно содержит NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор представляет собой NFκB-чувствительный (индуцибельный) минимальный промотор CMV. Предпочтительно NFκB-чувствительный (индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор модулятора воспаления, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор представляет собой промотор гена провоспалительного цитокина. Предпочтительно промотор гена провоспалительного цитокина представляет собой минимизированный промотор гена провоспалительного цитокина.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL-6 (HGF), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CXCL10, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по

меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP2, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

5 В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по
10 меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP13, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
15 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион
20 rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMDEC1, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
25 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион
30 rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP12, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
35 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион
40 rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS5, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор TNF α (TNF), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 5 (A6 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор (основного) FGF (FGF2), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит индуцибельный промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, который обеспечивает экспрессию в клетках сустава, который контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор, обеспечивающий экспрессию в клетках сустава, представляет собой промотор, обеспечивающий экспрессию клеток пораженного артритом сустава. Предпочтительный промотор обеспечивает экспрессию по меньшей мере в одной из клеток соединительной ткани, синовиальных клеток, субсиновиальных клеток, интимальных макрофагов,

FLS, хрящевых клеток, хондроцитов, хондробластов, адипоцитов, остеокластов и Т-клеток, предпочтительно промотор обеспечивает экспрессию в клетках FLS.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор SV40, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CAG (раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор альфа-1-антитрипсина человека (hAAT).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно,

специфический для печени промотор представляет собой промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор представляет собой NF κ B-чувствительный (индуцибельный) минимальный промотор CMV. Предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор модулятора воспаления, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор представляет собой промотор гена провоспалительного цитокина. Предпочтительно промотор гена провоспалительного цитокина представляет собой минимизированный промотор гена провоспалительного цитокина.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL-6 (HGF), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по

меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CXCL10, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

5 В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по
10 меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP2, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
15 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по
20 меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP13, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
25 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по
30 меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMDEC1, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок
35 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по
40 меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP12, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS5, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор TNF α (TNF), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 6 (A2 AAVrh10). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор (основного) FGF (FGF2), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит индуцибельный промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ

ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор, который обеспечивает экспрессию в клетках сустава, причем этот промотор контролирует экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор, обеспечивающий экспрессию в клетках сустава, представляет собой промотор, обеспечивающий экспрессию клеток пораженного артритом сустава. Предпочтительный промотор обеспечивает экспрессию по меньшей мере в одной из клеток соединительной ткани, синовиальных клеток, субсиновиальных клеток, интимальных макрофагов, FLS, хрящевых клеток, хондроцитов, хондробластов, адипоцитов, остеокластов и Т-клеток, предпочтительно промотор обеспечивает экспрессию в клетках FLS.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор SV40, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CAG (раннего энхансера цитомегаловируса/куриного β -актина), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор альфа-1-антитрипсина человека (hAAT).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит специфический для печени промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно, специфический для печени промотор представляет собой промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина).

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор представляет собой NF κ B-чувствительный (индуцибельный) минимальный промотор CMV. Предпочтительно NF κ B-чувствительный (индуцибельный) промотор CMV представляет собой промотор, описанный в Khoury et al. 2007, J Gene Med, 9: 596-604.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион rAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор модулятора воспаления, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе. Предпочтительно промотор представляет собой промотор гена провоспалительного цитокина. Предпочтительно промотор гена провоспалительного цитокина представляет собой минимизированный промотор гена провоспалительного цитокина.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей

мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор IL-6 (HGF), контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор CXCL10, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP2, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP13, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMDEC1, контролирующей экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор MMP12, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор ADAMTS5, контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор TNF α (TNF), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 7 (AAV-DJ-QR-P2). Предпочтительно модифицированный капсидный белок имеет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Предпочтительно аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Предпочтительно вирион gAAV, содержащий модифицированный капсидный белок, как определено в данном документе, дополнительно содержит промотор (основного) FGF (FGF2), контролирующий экспрессию трансгена, предпочтительно трансгена, как определено в данном документе.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к композиции gAAV для применения при лечении, профилактике или подавлении симптомов, связанных с заболеванием суставов, где композиция gAAV содержит вирион gAAV по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или эксципиент, предпочтительно

фармацевтически приемлемый носитель. Такой фармацевтически приемлемый носитель, разбавители, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или эксципиент можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. В композициях по настоящему изобретению можно использовать любой подходящий фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или эксципиент (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997). Предпочтительные фармацевтические формы должны быть в комбинации со стерильным физиологическим раствором, раствором декстрозы или буферным раствором или другими фармацевтически приемлемыми стерильными жидкостями. В качестве альтернативы можно использовать твердый носитель, такой как, например, гранулы-микроносители.

Фармацевтические композиции, как правило, стерильны и стабильны в условиях производства и хранения. Фармацевтические композиции могут быть составлены в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для обеспечения высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено включением в композицию агента, замедляющего всасывание, например, моностеаратных солей и желатина. Вирион парвовируса можно вводить в виде болюса или в виде состава с контролируемым высвобождением, например, в композиции, которая включает полимер с замедленным высвобождением или другие носители, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Например, могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры, полимолочная кислота и сополимеры полимолочной-полигликолевой кислот (PLG). Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «эксципиент» предпочтительно включает любые и все растворители, дисперсионные среды, материалы для покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и замедляющие абсорбцию агенты, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для предусмотренного для немедленного приема приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какой-либо обычный носитель или агент несовместим с активным соединением, предполагается его применение в фармацевтических композициях по данному изобретению.

Может быть выгодным изготовление парентеральных композиций в единичной дозированной форме для удобства введения и единообразия дозировки. В контексте данного документа единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для подлежащих лечению субъектов; каждая единица

5 содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы оказывать необходимый терапевтический эффект, вместе с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификации для единичных дозированных форм согласно изобретению могут напрямую зависеть от уникальных характеристик активного соединения и конкретного достигаемого терапевтического действия, и ограничений, свойственных области техники составления соединений, например,

10 активного соединения для лечения патологического состояния у индивидуумов.

Дополнительные активные соединения также могут быть включены в фармацевтические композиции по данному изобретению. Руководство по совместному применению дополнительных терапевтических средств можно найти, например, в Справочнике по лекарственным средствам и специальностям (CPS) Канадской ассоциации фармацевтов.

15 В одном варианте осуществления композиция gAAV дополнительно содержит пустые частицы (т.е. частицы, состоящие только из капсида, таким образом, не содержащие геном gAAV). Поэтому, альтернативно или в комбинации с другим вариантом осуществления, в другом варианте осуществления настоящего изобретения композиция gAAV по данному изобретению дополнительно содержит пустой капсид в соотношении пустого капсида к вириону gAAV по меньшей мере 1:1, более

20 предпочтительно по меньшей мере 5:1, еще более предпочтительно по меньшей мере 10:1. Композиция gAAV может содержать вирион gAAV, как определено выше, и пустой капсид, такой как, например, определенный в WO 2016/055437, которая включена в данный документ посредством ссылки, и как описано в Aalbers et al. (2017) Hum. Gene Ther. 28(2):168-178. Пустой капсид может быть того же серотипа или другого серотипа по сравнению с трансгенным вектором gAAV из

25 композиции по изобретению. Предпочтительно пустой капсид относится к тому же серотипу, что и вирион gAAV. В такой композиции gAAV пустой капсид и капсид вириона gAAV могут содержать модифицированный капсидный белок по изобретению, предпочтительно модифицированные капсидные белки того же типа. Однако также включена композиция gAAV, в которой пустые капсиды имеют другой серотип или представляют собой по-разному модифицированные капсидные белки

30 по сравнению с модифицированными капсидными белками вириона gAAV. Кроме того, включена композиция gAAV, в которой пустые капсиды имеют смесь серотипов, такую как, но не ограничиваясь ими, смесь капсидов AAV2 и AAV5. Авторы изобретения сообщают об усилении эффекта экспрессии трансгена в суставах после внутрисуставного введения вирионов gAAV, смешанных со значительным количеством пустых капсидов. Предпочтительно вирион gAAV и пустой капсид

35 присутствуют в композиции в соотношении пустого капсида к вириону gAAV по меньшей мере 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 50:1, 100:1 или 1000:1, предпочтительно по меньшей мере 5:1 (т.е. количество пустых капсидов, которое по меньшей мере в 5 раз превышает количество трансгенных векторов gAAV). Предпочтительно указанная композиция содержит вирион gAAV и пустой капсид в соотношении пустого капсида к трансгенному вектору gAAV по меньшей мере 10000:1, 5000:1,

40 4000:1, 3000:1, 2000:1, 1000:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1 или 5:1, предпочтительно не более 1000:1. Предпочтительно указанная композиция

содержит вирион гAAV и пустые капсиды в соотношении пустого капсида к вириону гAAV от 1:1 до 100:1, от 2:1 до 100:1, от 5:1 до 100:1, от 1:1 до 20:1, от 2:1 до 20:1 или предпочтительно от 5:1 до 20:1.

Выше в данном документе представлен вариант осуществления, в котором вирион гAAV и пустые капсиды присутствуют в одной композиции. В настоящее изобретение также включен альтернативный вариант осуществления, в котором вирион гAAV и пустые капсиды присутствуют в (по меньшей мере, двух или более) отдельных различных композициях. В данном альтернативном варианте осуществления вирион гAAV и пустые капсиды можно вводить отдельно по времени (например, последовательно) и/или локализации, при этом под локализацией следует понимать место введения. Кроме того, вирион гAAV и пустые капсиды можно вводить одновременно, например, по существу в одно и то же время, необязательно в разных местах.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к композиции гAAV и иммунодепрессанту для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов, где композиция гAAV является такой, как определено выше, и где лечение или профилактика включает введение индивидууму композиции гAAV и введение иммунодепрессанта. В WO 2016/055437, включенной в данный документ посредством ссылки, описывается усиливающийся эффект иммунодепрессанта на экспрессию трансгена AAV, когда субъектов лечили как иммунодепрессантами, так и вирионами гAAV. Кроме того, в WO 2016/055437 описан неожиданный синергетический эффект иммунодепрессанта вместе с пустыми векторами на экспрессию трансгена гAAV. В одном варианте осуществления иммунодепрессант применяется отдельно от композиции гAAV, причем под отдельным понимается отдельное место и/или время. В таком варианте осуществления иммунодепрессант и композиция гAAV могут присутствовать в отдельных и различных композициях. Иммунодепрессант, вирион гAAV и, необязательно, пустые векторы могут даже присутствовать в отдельной, отличной композиции. В еще одном варианте осуществления иммунодепрессант и композиция гAAV могут присутствовать в одной композиции. В дополнительном варианте осуществления вирион гAAV и иммунодепрессант присутствуют в одной композиции, и предпочтительно эту композицию используют при лечении вместе с отдельной композицией, содержащей пустой капсид. В еще одном варианте осуществления иммунодепрессант и пустой капсид присутствуют в одной композиции, и предпочтительно эту композицию используют при лечении вместе с отдельной композицией, содержащей вирион гAAV. Таким образом, изобретение также обеспечивает композицию, содержащую пустой капсид и иммунодепрессант, как определено в данном документе, композицию, содержащую вирион гAAV и иммунодепрессант, как определено в данном документе, и композицию, содержащую композицию гAAV и иммунодепрессант, как определено в данном документе.

Предпочтительно иммунодепрессант для применения в настоящем изобретении представляет собой ингибитор клеток врожденного иммунитета, предпочтительно ингибитор макрофагов. Клетку врожденного иммунитета определяют в данном документе как нейтрофил, макрофаг, моноцит, эозинофил, базофил или дендритную клетку, которая потенциально может участвовать в воспалительном ответе на чужеродное вещество. Ингибитор клеток врожденного иммунитета определяют в данном документе как агент, который приводит к снижению активности

клеток врожденного иммунитета и/или количества клеток врожденного иммунитета. Ингибитор макрофагов определяют в данном документе как агент, который приводит к снижению активности макрофагов и/или количества макрофагов. Под «макрофагом» в данном документе понимают клетку врожденного иммунитета, которая поглощает и расщепляет клеточный дебрис, чужеродные вещества, микробы и раковые клетки в процессе, называемом фагоцитозом. Предпочтительно ингибитор клеток врожденного иммунитета или макрофагов по изобретению приводит к снижению по меньшей мере на 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95% или предпочтительно 100% количества или активности клеток врожденного иммунитета или макрофагов по сравнению с исходным количеством или активностью клеток врожденного иммунитета или макрофагов до лечения. Активность и/или количество клеток врожденного иммунитета или макрофагов можно определить с помощью любого подходящего анализа, известного специалисту в данной области техники, такого как, но не ограничиваясь им, колориметрический анализ с помощью МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)2,5-дифенилтетразолия бромид) для определения цитотоксической активности макрофагов *in vitro*, как описано Ferrari et al. (Journal of Immunological Methods, 131 (1990) 165-172), путем измерения уровней цитокинов (например, CCL2, TNF), при помощи гистологических и гистохимических методов обнаружения, например, путем мечения CD68 или магнитно-резонансной томографии *in vivo* (MPT), обнаружение поглощения суперпарамагнитного оксида железа (SPIO) макрофагами, предпочтительно после внутривенного введения SPIO, согласно Yi-Xiang J. Wang (Quant. Imaging Med Surg (2011)1:35-40). Обнаружение может быть либо *in vitro* или *in vivo*. Предпочтительно обнаружение *in vivo* проводят на животных моделях, предпочтительно на крысах или мышах.

Предпочтительно иммунодепрессант представляет собой глюкокортикоид и/или бисфосфонат, предпочтительно липосомальный бисфосфонат. Конкретными неограничивающими примерами глюкокортикоидов являются кортизол, кортизон, преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон, бетаметазон, триамцинолон, беклометазон, флудрокортизона ацетат, дезоксикортикостерона ацетат и альдостерон. Предпочтительно иммунодепрессант представляет собой триамцинолон. Конкретными неограничивающими примерами бисфосфонатов являются этидронат, клодронат, тилудронат, памидронат, неридронат, олпадронат, алендронат, ибандронат, ризедронат и золедронат. Предпочтительно бисфосфонат представляет собой инкапсулированный в липосомы бисфосфонат или липосомальный бисфосфонат, предпочтительно липосомальный клодронат. Предпочтительно глюкокортикоид не представляет собой дексаметазон. Следует понимать, что ингибитор воспаления или макрофагов по данному изобретению не ограничивается глюкокортикоидами и/или бисфосфонатом. Например, ингибитор воспаления или макрофагов по данному изобретению может также представлять собой антитело против воспаления или истощающее макрофаги антитело, такое как антитело к F4/80. Предпочтительно такое антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. Другими релевантными иммунодепрессантами, используемыми в настоящем изобретении, являются цитостатические препараты (например, алкилирующие агенты и/или антиметаболиты, такие как метотрексат), препараты, модифицирующие пуриnergический сигнальный путь (например, метотрексат, аналоги аденозина, антагонисты или агонисты аденозиновых рецепторов), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП, например, ибупрофен, диклофенак, мелоксикам,

напроксен, ацетилсалициловая кислота), биологические препараты, такие как блокаторы TNF (например, инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, цертолизумаб, голимумаб), блокаторы IL-6 (например, тоцилизумаб), блокаторы IL-2 (например, базиликсимаб, даклизумаб), блокаторы IL-1 β (например, анакинра, рилонацепт, канакинумаб), IL-17 (секукинумаб, бродалумаб, иксекинумаб),
 5 анти-IL-12/IL-23 (устекинумаб), ингибитор PDE4 (апремиласт) муромонаб, абатацепт и/или ритуксимаб и/или другие соединения, такие как гидроксихлорохин, хлорохин, лефлуномид, сульфасалазин, азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, соль золота, ингибиторы mTOR (например, рапамицин/сиролимус, эверолимус) и пеницилламин.

Предпочтительно композиция gAAV и/или композиция, содержащая пустые капсиды, и/или
 10 композиция, содержащая иммунодепрессант, дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавители, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или эксципиент, как определено в другом месте данного документа.

Предпочтительно генная терапия по настоящему изобретению дополнительно включает введение иммунодепрессанта, как определено в данном документе, либо присутствующего в
 15 композиции gAAV, либо входящего в состав отдельной, отличающейся композиции, т.е. отдельной и отличной от композиции gAAV. При введении композицию gAAV и/или пустые капсиды, и/или иммунодепрессант по изобретению доставляют индивидууму, клетке, ткани или органу указанного индивидуума, предпочтительно индивидууму, страдающему от патологического состояния или заболевания, как определено в данном документе. Предпочтительно композицию gAAV и
 20 иммунодепрессант вводят одновременно. Под одновременным введением в данном документе следует понимать введение в более или менее одинаковое время, предпочтительно с разницей не более 15 мин, 30 мин, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 12 часов или 24 часов, предпочтительно с разницей не более 15 мин. В еще одном варианте осуществления композицию gAAV и иммунодепрессант вводят последовательно, при этом предпочтительно иммунодепрессант вводят перед композицией
 25 gAAV. Предпочтительно иммунодепрессант вводят по меньшей мере за 1 час, 3 часа, 12 часов, 24 часа, 2 дня, 4 дня или 1 неделю до введения композиции gAAV. В случае, если вирионы gAAV и пустые капсиды присутствуют в отдельных композициях, иммунодепрессант можно вводить одновременно или в течение по меньшей мере 15 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 1 дня, 2 дней или 1 недели до введения пустых капсид, и пустые капсиды в свою очередь вводят одновременно или в
 30 течение по меньшей мере 15 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 1 дня, 2 дней или 3 дней до введения вириона gAAV.

В вариантах осуществления, определенных в данном документе, иммунодепрессант можно вводить повторно, то есть до и/или одновременно с композицией gAAV. Как указано выше, предпочтительно композиция gAAV содержит значительное количество пустых капсидов. Кроме
 35 того, изобретение охватывает введение как трансгенных векторов gAAV, так и пустых капсидов в виде отдельных различных композиций, которые можно вводить одновременно или последовательно в способе или применении по данному изобретению. Если они входят в состав отдельных композиций, трансгенные векторы gAAV и пустые капсиды предпочтительно вводят одновременно. В дополнительном варианте осуществления пустые капсиды вводят не более чем
 40 за 3 дня, 2 дня, 1 день, 24 часа, 12 часов, 3 часа, 2 часа, 1 час, 30 мин, 15 мин или 5 мин, предпочтительно не более чем за 24 часа, до введения трансгенного вектора gAAV. Кроме того, если

они находятся в отдельных композициях, трансгенные векторы gAAV и пустые капсиды предпочтительно вводят в одно и то же место.

Доза иммунодепрессанта зависит от типа иммунодепрессанта. Специалисту в данной области техники известны эффективные дозировки. Предпочтительная терапевтическая эффективная доза триамцинолона указана выше. Предпочтительная терапевтически эффективная доза липосомального клондроната предпочтительно представляет собой терапевтически эффективную дозу, известную специалисту в данной области техники, например, предпочтительно 80-320 мг/доза внутрисуставно, более предпочтительно 160 мг/доза внутрисуставно (Barrera et al. 2000, Arthritis & Rheumatism Vol 43(9), p1951-1959).

Как правило, заболевание суставов называют артропатией, а при воспалении одного или более суставов заболевание называют артритом. Большинство заболеваний суставов связаны с артритом, однако повреждение суставов, вызванное внешней физической травмой, обычно не называется артритом. Используемый в данном документе термин «заболевание суставов», также обозначаемый как «артрит», определяется в данном документе как форма заболевания суставов, которое включает воспаление одного или более суставов. В настоящее время считается, что существует более ста различных форм артрита. Под «заболеванием суставов» в данном документе понимают «боль в суставах» или «поражение суставов». В предпочтительном варианте осуществления заболевание суставов выбрано из группы, состоящей из следующего: болезнь Стилла у взрослых, анкилозирующий спондилит, артрит, боли в спине, болезнь Бехчета, тупая травма, бурсит, болезнь отложения пирофосфата кальция (CPPD), синдром запястного канала, хондромалиция надколенника, синдром хронического утомления, комплексный регионарный болевой синдром, криопирин-связанные периодические синдромы (CAPS), дегенеративное заболевание межпозвонковых дисков, дисплазия тазобедренного сустава, синдром Элерса-Данлоса, семейная средиземноморская лихорадка, фибромиалгия, инфекционная эритема, гигантоклеточный артериит, подагра, гемохроматоз, инфекционный артрит, воспалительный артрит, воспалительное заболевание кишечника, замена сустава, ювенильный артрит, ювенильный дерматомиозит (JD), ювенильный идиопатический артрит (JIA), ювенильный ревматоидный артрит, ювенильная склеродермия, болезнь Кавасаки, волчанка, волчанка у детей и подростков, болезнь Лайма, смешанное заболевание соединительной ткани (включая полимиозит, дерматомиозит), остеоартрит (OA), остеопороз, болезнь Педжета, палиндромный ревматизм, пателлофеморальный болевой синдром, детские ревматические болезни, системная красная волчанка у детей, ревматическая полимиалгия, псевдоподагра, псориатический артрит, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторная симпатическая дистрофия, синдром Рейтера, ревматическая лихорадка, ревматизм, ревматоидный артрит, склеродермия, септический артрит, болезнь Шегрена, спинальный стеноз, спондилоартрит, болезнь Стилла, системный ювенильный идиопатический артрит, системная эритематозная волчанка, системная эритематозная волчанка у детей и подростков, системный склероз, темпоральный артериит, тендинит, васкулит и синдром Вегенера. В еще одном предпочтительном варианте осуществления заболевание суставов выбрано из группы, состоящей из следующего: ревматоидный артрит (RA), ювенильный ревматоидный артрит, остеоартроз (OA), подагра, псевдоподагра, спондилоартрит (SpA), псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, септический артрит, артрит, ювенильный идиопатический артрит,

тупая травма, замена сустава и болезнь Стилла. В более предпочтительном варианте осуществления заболевание суставов представляет собой поражение суставов, которое включает воспаление одного или более суставов. Предпочтительно заболевание суставов выбрано из группы, состоящей из следующего: ревматоидный артрит (RA), ювенильный ревматоидный артрит, 5 остеоартрит (OA), подагра, псевдоподагра, спондилоартрит (SpA), псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, септический артрит, артрит, ювенильный идиопатический артрит и болезнь Стилла.

Альтернативно или в сочетании с другим вариантом осуществления, в еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вирион gAAV или композицию 10 gAAV вводят системно и/или местно. Композицию gAAV и/или пустые капсиды, и/или иммунодепрессант по данному изобретению можно вводить прямо или опосредованно с использованием подходящих средств, известных в данной области техники. Способы и применения по изобретению включают доставку и введение композиции gAAV и/или пустого вектора и/или иммунодепрессанта системно, регионарно или локально, или любым путем, например, путем 15 инъекции, инфузии, перорально (например, перорально или ингаляционно), или местно (например, трансдермально). Иллюстративные пути введения и доставки включают внутривенный (в/в), внутрисуставной, внутривнутрибрюшинный (в/б), внутриартериальный, внутримышечный, парентеральный, подкожный, внутривнутриплевральный, местный, дермальный, внутрикожный, трансдермальный, парентеральный, т.е. трансмукозальный, внутривнутричерепной, интраспинальный, 20 пероральный (алиментарный), мукозальный, респираторный, интраназальный, посредством интубации, внутривнутрилегочный, инстилляцию в легкие, буккальный, подъязычный, внутривнутрисосудистый, интратекальный, внутривнутриполостной, ионофоретический, интраокулярный, глазной, внутривнутрихрусталиковый, внутривнутрижелезистый, внутривнутриорганный, внутривнутрилимфатический. С учетом прогресса, который уже достигнут к настоящему времени, ожидаются усовершенствования средств 25 для обеспечения индивидуума или клетки, ткани, органа указанного индивидуума композицией gAAV и/или пустыми капсидами и/или иммунодепрессантом по данному изобретению. Такие будущие усовершенствования, конечно, могут быть включены для достижения упомянутого эффекта данного изобретения. При введении композиции gAAV и/или пустых капсидов, и/или иммунодепрессанта по данному изобретению предпочтительно, чтобы такая комбинация и/или композиция были 30 растворены в растворе, совместимом со способом доставки. Для внутривенного, подкожного, внутримышечного, интратекального, внутрисуставного и/или интравентрикулярного введения предпочтительно, чтобы раствор представлял собой физиологический раствор. В случае, если иммунодепрессант присутствует в композиции gAAV по данному изобретению, иммунодепрессант вводят в то же место, что и композицию gAAV, т.е. предпочтительно местно, как указано выше. В 35 варианте осуществления, в котором иммунодепрессант содержится в отдельной композиции, отличной от композиции gAAV, иммунодепрессант можно вводить системно, предпочтительно внутримышечно или внутривенно. Композицию gAAV также можно вводить местно, предпочтительно в участок тела, содержащий значительное количество макрофагов, как определено в данном документе, и иммунодепрессант вводят системно, предпочтительно внутримышечно или 40 внутривенно. В данное изобретение также включен вариант осуществления, в котором иммунодепрессант и композицию gAAV, даже если они присутствуют в разных композициях, вводят

в одно и то же место, предпочтительно местно, более предпочтительно внутрисуставно. Как дополнительно указано в данном документе, введение таких отдельных композиций может быть либо одновременным, либо последовательным. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения местно вводят по меньшей мере одно из композиции гAAV и иммунодепрессанта. Более предпочтительно местное введение представляет собой внутрисуставное введение. «Внутрисуставная инъекция» (также известная как «инъекция в сустав» или «интраартикулярная инъекция») в данном документе определяется как инъекция или инфузия в сустав. Внутрисуставную инъекцию, как правило, используют для введения противовоспалительного средства в воспаленный сустав.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к композиции гAAV, содержащей вирион гAAV по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или эксципиент, предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель, как определено в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления композиция дополнительно содержит пустые капсиды, как определено в данном документе, и/или иммунодепрессант, как определено в данном документе.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики или подавления симптомов, связанных с заболеванием суставов, где способ включает стадию внутрисуставного введения лекарственного средства, содержащего эффективное количество вириона гAAV, как определено в данном документе, или композиции гAAV, как определено выше.

«Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество нуклеиновой кислоты, конструкции нуклеиновой кислоты, вириона гAAV или фармацевтической композиции может варьироваться в зависимости от таких факторов, как течение болезни, возраст, пол и масса субъекта, подлежащего лечению, и способности нуклеиновой кислоты, конструкции нуклеиновой кислоты, вириона гAAV или фармацевтической композиции вызывать желаемый ответ у субъекта. Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Терапевтически эффективным количеством также обычно является такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты нуклеиновой кислоты, конструкции нуклеиновой кислоты, вириона гAAV или фармацевтической композиции перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата, такого как предотвращение или ингибирование различных патологических состояний. Профилактическая доза может быть использована у субъектов до возникновения заболевания или на более ранней стадии заболевания, и в некоторых случаях профилактически эффективное количество может быть больше или меньше терапевтически эффективного количества. Вводимая доза может в значительной степени зависеть от состояния и антропометрических показателей субъекта, которого лечат, а также от терапевтического состава, частоты и пути введения. Схемы продолжения терапии, включая дозу, состав и частоту введения, могут определяться первоначальным ответом и клинической оценкой.

Термин «субъект» или «пациент» используется в данном документе взаимозаменяемо и относится к животному, включая человека, который подвергается лечению композициями и/или гAAV по настоящему изобретению. Соответственно, термин «субъект» или «пациент» включает, но не ограничивается ими, человека, отличного от человека примата, такого как шимпанзе и другие
 5 виды человекообразных обезьян и обезьян, или любое млекопитающее, такое как собака, кошка, лошадь, овца, свинья, корова и т.д. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения субъект, получающий гAAV в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой млекопитающее, более предпочтительно человека, собаку, кошку или лошадь, наиболее предпочтительно человека.

В этом документе и в формуле изобретения глагол «содержать» и его спряжения используются в неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за словом, включены, но элементы, специально не упомянутые, не исключены. Кроме того, отсылка к элементу, указанному в единственном числе, не исключает возможности присутствия более одного элемента, если из контекста четко не следует наличие одного и только одного элемента. Таким
 10 образом, слово в единственном числе, как правило, означает «по меньшей мере один».

Слово «приблизительно» или «около» при использовании в связи с числовым значением (приблизительно 10, около 10) предпочтительно означает, что значение может представлять собой заданное значение, составляющее $10 \pm$ более или менее 10% от значения.

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

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Настоящее изобретение будет рассмотрено более подробно ниже со ссылкой на прилагаемые
 25 графические материалы:

Фиг. 1: Скрининг серотипов капсида на клетках HEK293T и FLS. Неочищенный лизат, содержащий 7 мутантных серотипов капсида (плюс AAV5), экспрессирующих желтый флуоресцентный белок (YFP), использовали для трансдукции клеток HEK293T или 3 различных
 30 линий клеток FLS (каждая от разных пациентов с RA). Через 72 часа (HEK293T) или 6 дней (FLS) клетки анализировали на процент клеток, экспрессирующих YFP, с помощью проточной цитометрии. На панели А показан % клеток HEK 293T, экспрессирующих YFP; на панели В показан процент клеток, экспрессирующих YFP, в 3 различных линиях клеток FLS; на панели С показана средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) в клетках HEK293T; на панели D показана СИФ в 3 различных
 35 линиях клеток FLS (все клетки); на панели Е показана СИФ в 3 различных линиях клеток FLS (только положительная популяция). Легенда к образцу приведена в таблице 2.

Фиг. 2: Капсидные мутанты демонстрируют повышенную экспрессию люциферазы по сравнению с диким AAV5 в клетках FLS. Очищенный AAV (4 мутантных серотипа или AAV5), экспрессирующий слитый белок YFP-Лус, использовали для трансдукции трех разных линий клеток
 40 FLS от разных пациентов с RA: BB5498 (FLS 1), BB5540 (FLS 2) и BB7144 (FLS 3) с использованием двух MOI (20000 или 100000 частиц гAAV на клетку). Через 4 дня клетки лизировали и измеряли

экспрессию люциферазы. Данные представлены в виде абсолютных уровней экспрессии люциферазы (RLU; белые столбцы) или кратности увеличения по сравнению с AAV5 (черные столбцы). На панели А показана FLS 1 при MOI 20 тыс.; на панели В показана FLS 1 при MOI 100 тыс.; на панели С показан FLS 2 при MOI 20 тыс.; на панели D показана FLS 2 при MOI 100 тыс.; на панели Е показана FLS 3 при MOI 20 тыс.; и на панели F показана FLS 3 при MOI 100 тыс. Незакрашенные столбцы указывают на люциферазу (RLU), а закрашенные столбцы указывают на «кратность увеличения» по сравнению с AAV5. В другом эксперименте три дополнительные линии клеток FLS от пациентов с RA трансдуцировали AAV (7 мутантных серотипов или AAV5), экспрессирующим люциферазу: BB4308 (FLS 4), BX 1592 (FLS 5), BB4426 (FLS 6) с использованием 2 MOI (10 тыс. или 100 тыс. частиц гAAV на клетку). На панели G показана FLS 4 при MOI 10 тыс.; на панели H показана FLS 4 при MOI 100 тыс.; на панели I показана FLS 5 при MOI 10 тыс.; на панели J показана FLS 5 при MOI 100 тыс.; на панели K показана FLS 6 при MOI 10 тыс.; и на панели L показана FLS 3 при MOI 100 тыс.

Эффективность трансдукции 7 мутантных серотипов или AAV5 (MOI 100 тыс.) также оценивали в клетках HEK293T (панель M). Незакрашенные столбцы указывают на экспрессию люциферазы (RLU), а закрашенные столбцы указывают на «кратность увеличения» по сравнению с AAV5.

Фиг. 3А: Капсидные мутанты демонстрируют повышенную экспрессию генов *in vivo*. Два капсидных мутанта (AAV9-A2 и AAV7-A6) сравнивали с wtAAV5 с использованием модели воздушной синовиальной сумки. Вектор, экспрессирующий люциферазу, вводили на 0 день после формирования воздушной сумки, а экспрессию люциферазы измеряли с помощью визуализации живых животных (IVIS) на 3 день после трансдукции. Показанные данные представляют собой люминесценцию (фотон/секунда/квадратный сантиметр м²/стерадиан) в воздушной сумке в среднем + стандартная ошибка среднего.

Фиг. 3В. Во втором эксперименте 5 выбранных капсидных мутантов (AAV1-P4, AAV7-A6, AAV9-A2, AAVrh10-A2, AAVrh10-A6) и wtAAV5 вводили в коленные суставы мышей. Вектор, экспрессирующий люциферазу, вводили на 0 день, и экспрессию измеряли с помощью визуализации живых организмов (IVIS) в указанные моменты времени после введения. Показанные данные представляют собой люминесценцию (фотон/секунда/квадратный сантиметр м²/стерадиан) (левая панель) в среднем + стандартная ошибка среднего. **P<0,05, ***P<0,01, ****P<0,00001 по сравнению с wtAAV5 на 14 день. Фиг. 3С: Кратность увеличения по сравнению с wtAAV5.

Фиг. 4: Выравнивание в формате CLUSTAL с помощью MAFFT FFT-NS-I (v7,215). Под выравниванием находится ключ, обозначающий консервативный остаток (*) и неконсервативную мутацию ().

Фиг. 5: Множественное выравнивание последовательностей CLUSTAL с помощью MUSCLE (3,8). Под выравниванием находится ключ, обозначающий консервативный остаток (*); консервативную мутацию (:); полуконсервативную мутацию (.); и неконсервативную мутацию ().

Фиг. 6: Выравнивание вставок P4, A2, A6, P2 и QR-P2 в формате CLUSTAL (SEQ ID NO: 8–12) с помощью MAFFT FFT-NS-I (v7,215). Под выравниванием находится ключ, обозначающий консервативный остаток (*) и неконсервативную мутацию ().

Фиг. 7: Множественное выравнивание последовательностей вставок P4, A2, A6, P2 и QR-P2 (SEQ ID NO: 8-12) в CLUSTAL с помощью MUSCLE (3,8). Под выравниванием находится ключ, обозначающий консервативный остаток (*) и неконсервативную мутацию ().

Фиг. 8: Уровни экспрессии hTNFR2 в супернатанте трансдуцированных капсидными мутантами EF1 α -hTNFR-IgG1 AAV клеток HEK293T/17.

Перечень последовательностей

В Таблице 1 представлена легенда для ссылок на последовательности в соответствии с SEQ ID NO.

Таблица 1: Легенда для ссылок на последовательности

SEQ ID NO:	серотип	Модифицированный капсид/вставка/дикий тип
1	AAV1	Модифицированный капсид
2	AAV2	Модифицированный капсид
3	AAV7	Модифицированный капсид
4	AAV9	Модифицированный капсид
5	AAVrh10	Модифицированный капсид
6	AAVrh10	Модифицированный капсид
7	AAV-DJ-QR	Модифицированный капсид
8	Вставка A2	Вставка
9	Вставка A6	Вставка
10	Вставка P2	Вставка
11	Вставка P4	Вставка
12	Вставка QR-P2	Вставка
13	AAV1	Капсид дикого типа
14	AAV2	Капсид дикого типа
15	AAV7	Капсид дикого типа
16	AAV9	Капсид дикого типа
17	AAVrh10	Капсид дикого типа
18	AAV-DJ-QR	Синтетический капсид
19	AAV5	Капсид дикого типа

Примеры

Пример 1

Первоначальный скрининг библиотеки капсидов

1.1. Материалы и способы

96-луночные реакционные планшеты (и затем высушенными) неочищенным лизатом, содержащим AAV из 91 различных серотипов капсида AAV, были получены от Dirk Grimm и Kathleen Börner из Гейдельбергского университета. Каждый вектор кодировал трансген YFP, управляемый промотором CMV. Поскольку FLS являются первичными клетками-мишенями в суставе, библиотеку капсидных мутантов AAV подвергали скринингу на серотипы, демонстрирующие повышенную экспрессию в человеческих FLS, выделенных из суставов пациентов с ревматоидным артритом (RA-FLS) (как

описано в van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427). RA-FLS высевали (2500/лунка, 37°C / 5% CO₂) непосредственно в реакционные планшеты (DMEM-GlutaMAX-I (Gibco, арт. 31966-021), 10% FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка Gold, Gibco, арт. A15-151), 10 мМ HEPES (Gibco, арт. 15630-056), 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, арт. 15710-049), 100 Ед/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, арт. P0781) и все лунки визуализировали на предмет экспрессии YFP с помощью флуоресцентной микроскопии через 6 дней.

1.2. Результаты

Эффективность трансдукции капсидных мутантов по сравнению с WT-AAV5 в FLS у пациентов с RA.

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

Неочищенные лизаты всех 7 векторов использовали в анализе трансдукции *in vitro* в 3 разных линиях клеток FLS пациентов и в клетках HEK293T (пример 2).

Таблица 2: Легенда для образца к Фиг. 1

Образец	Серотип капсида	Вставка/модифицированная последовательность	Вставка	Положение в VP1	SEQ ID NO:
5	5	отсутствует	отсутствует	-	19
61	AAV1	GQSGNDVRSANAQAA	P4	588–602	1
33	AAV9	GQRGNYSRGVDAQAA	A2	586–600	4
34	AAVrh10	GQRGNYSRGVDAQAA	A2	588–602	6
50	AAV2	QGQSGCDCRGDCFCA (QAA)	P2	585–602	2
88	AAV-DJ-QR	QGQRGCDCRGDCFCA(QAA)	QR-P2	587–604	7
43	AAV7	GQRGNEARVREAQAA	A6	587–601	3
46	AAVrh10	GQRGNEARVREAQAA	A6	588–602	5

Пример 2

Экспрессия неочищенных лизатов 7 выбранных мутантов

2.1. Материалы и способы

Продукция AAV

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

Аликвоты неочищенного лизата для каждого из выбранных 7 капсидных мутантов (плюс wtAAV5 в качестве контроля) использовали для трансдукции клеток (HEK293T или 3 различных линий клеток FLS, выделенных от пациентов с RA), и экспрессию YFP измеряли с помощью проточной цитометрии через 3 (HEK293T) или 5 дней (FLS) после трансдукции. В частности, HEK293T высевали

в 96-луночный планшет (Greiner Bio-One, арт. 655180) по 45000 клеток на лунку. RA-FLS высевали в 96-луночный планшет по 2500 клеток на лунку. После инкубации в течение ночи супернатанты клеток заменяли 40 мкл DMEM-glutaMAX-I (Gibco 31966-021), содержащей 0,001% раствор плюроники F68 (Sigma P5556). Лизаты вируса добавляли *in duplo* по 10 мкл на лунку. Через 4 часа

5 доксорубин (конечная концентрация 0,4 мкМ) (Sigma D1515) (доксорубин повышает эффективность трансдукции AAV) в DMEM-glutaMAX-I, содержащем FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка Gold, Gibco, арт. A15-151), конечная концентрация 1%) был добавлен в лунки (50 мкл на лунку). На следующий день среду FLS удаляли и добавляли DMEM-glutaMAX-I (10% FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка Gold, Gibco, арт. A15-

10 151), 10 мМ HEPES (Gibco, арт. 15630), 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, арт. 15710-049), 100 ЕД/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, арт. P0781)) (200 мкл на лунку). Среду для клеток HEK293T не меняли. Три (клетки HEK293T) или через 6 дней (FLS) после трансдукции клетки обрабатывали трипсином с использованием 0,5% трипсина/ЭДТА (Gibco, арт. 15400-054) в PBS (Gibco, арт. 10010) и анализировали экспрессию YFP с помощью проточной цитометрии (FACSCanto

15 II, BD Biosciences). Для всех клеток определяли как процент экспрессирующих клеток, так и среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ).

2.2. Результаты

Неочищенные лизаты всех 7 векторов использовали в анализе трансдукции *in vitro* в 3

20 разных линиях клеток FLS пациентов и в клетках HEK293T. Клетки анализировали на процент клеток, экспрессирующих YFP, с помощью флуоресцентной микроскопии (данные не показаны) или проточной цитометрии (Фиг. 1, панели A-E). Несмотря на некоторую изменчивость между типами клеток, все мутантные капсиды давали более высокую экспрессию как в клетках FLS, так и в клетках HEK293T, чем AAV5-WT (Фиг. 1). В таблице 2 представлены легенды образцов для Фиг. 1. На

25 основании этих результатов для дальнейшего исследования были выбраны четыре капсидных мутанта (см. пример 3).

Пример 3

Тестирование in vitro вариантов капсида в HEK293T и FLS

30

3.1 Материалы и способы

3.1.1 Четыре мутантных капсидных белка, AAV9-A2, AAV7-A6, AAV1-P4 и AAVDJ-QR-P2, были дополнительно исследованы. Был создан очищенный вектор (градиент йодиксанола), экспрессирующий слитый белок YFP-люцифераза (для обеспечения возможности визуализации

35 (YFP), а также количественного определения с помощью анализа люциферазы). Три разные первичные линии FLS, выделенные от пациентов с ревматоидным артритом (как описано в van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427) трансдуцировали каждым серотипом в 2 дозах вектора (MOI 20000 или 100000) и через 4 дня клетки собирали и экспрессию генов определяли количественно с помощью анализа люциферазы (набора для анализа люциферазы от Promega).

40 Более подробно, RA-FLS высевали по 2500 клеток/лунка в 96-луночный планшет (Greiner Bio-One, арт. 655207) в среду (DMEM-GlutaMAX (Gibco, арт. 31966-021), 10% FBS (инактивированная

нагреванием (HI) бычьей сыворотки Gold, арт. A15-151), 10 мМ HEPES (Gibco, арт. 15630-056), 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, арт. 15710-049), 100 ЕД/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich Merck, арт. P0781). Через 48 ч среду удаляли и добавляли вирус (в среде DMEM-Glutamax, содержащей 0,001% плюроники-68 (Sigma, арт. p5556)) при MOI 20000 или 100000. Через 4 часа добавляли среду, содержащую доксорубин (Sigma, арт. D1515, конечная концентрация 0,4 мкМ) и FBS (конечная концентрация 1%).

Через 24 часа среду заменяли на DMEM-GlutaMAX (10% FBS, 10 мМ HEPES, 50 мкг/мл гентамицина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). Через четыре дня после трансдукции клетки однократно промывали 100 мкл PBS (Gibco, арт. 10010) и определяли активность люциферазы с использованием системы анализа люциферазы ONE Glo™ (Promega, арт. E6110): добавляли 100 мкл лизирующего буфера и клетки помещали на шейкер на 10 мин, 900 об/мин при комнатной температуре. Затем 20 мкл лизата переносили на белый 96-луночный планшет, добавляли 80 мкл субстрата (на 3' (темнота) и определяли активность люциферазы на люминометре (1 слунка, Synergy HT, Biotek).

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

3.1.3. 7 капсидных мутантов из того же препарата, как описано в 3.1.2, также тестировали в клетках HEK293T. В частности, HEK293T высевали в 96-луночный планшет (Greiner Bio-One, арт. 655180) по 50000 клеток на лунку. После инкубации в течение ночи супернатанты клеток заменяли DMEM-glutaMAX-I (Gibco 31966-021), содержащей 0,001% раствор плюроники F68 (Sigma P5556). Различные векторы были добавлены *in duplo* с MOI 100000. В этом протоколе была выполнена коррекция пустого капсида, как описано в 3.1.2. Через 4 часа в лунки добавляли доксорубин (конечная концентрация 0,4 мкМ) (Sigma D1515) в DMEM-glutaMAX-I-содержащей FBS (инактивированная нагреванием (HI) бычья сыворотка Gold, Gibco, арт. A15-151), конечная концентрация 1%. Через три дня после трансдукции клетки собирали и экспрессию гена определяли количественно с помощью анализа люциферазы (набор для анализа люциферазы от Promega) на люминометре (BMG Labtech Fluostar Omega).

3.2. Результаты

3.2.1 *In vitro* трансдукции трех разных линий клеток FLS проводили с использованием рекомбинантного AAV, содержащего один из 4 мутантных капсидов (а также AAV5 в качестве контроля, полученного аналогичным образом) в соответствии с протоколом, описанным в 3.1.1. Все 4 серотипа показали повышенные уровни экспрессии по сравнению с AAV5, от 2-кратного до 35-кратного увеличения, в зависимости от используемого серотипа и линии клеток (Фиг. 2A-F).

3.2.2 В другой серии экспериментов эффективность трансдукции *in vitro* 7 мутантных капсидов (а также контроль AAV5, полученный аналогичным образом) оценивали на 3 линиях клеток

FLS. Все 7 серотипов продемонстрировали повышенный уровень экспрессии люциферазы по сравнению с AAV5, от 6-кратного до 55-кратного увеличения в зависимости от используемого серотипа и линии клеток (Фиг. 2G-L)

3.2.3 Аналогичный эксперимент был проведен на клетках НЕК293Т. Трансдукция всеми 7 серотипами привела к усилению экспрессии люциферазы по сравнению с wtAAV5, в диапазоне от 2-кратного до 12-кратного увеличения (Фиг. 2M).

Пример 4

Исследование *in vivo* на модели воздушной синовиальной сумки

4.1. Материалы и способы

Животные

Самок мышей Balb/c (в возрасте 8–10 недель и весом 20–25 г; (Harlan, Боксмер, Нидерланды)) содержали в отдельных вентилируемых клетках в виварии Академического медицинского центра в Амстердаме. Пища и вода были доступны *ad libitum*. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с рекомендациями Комитета по этике исследований на животных Амстердамского университета.

Модель воздушной синовиальной сумки (APS)

Два серотипа, AAV9-A2 и AAV7-A6, сравнивали с wtAAV5. Модель воздушной синовиальной сумки была адаптирована из Edwards et al (1981; J Pathol 134: 147-156). На 0-й день 3 мл воздуха вводили подкожно в дорзальную кожу 7-9-недельных самок мышей Balb/cOlaHsd (Harlan) (0-й день). Сразу же после формирования воздушной сумки удаляли 1 мл воздуха и добавляли 1 мл AAV (2e10 векторных геномов/мышь в PBS (Gibco, арт. 10010), содержащем 0,001% плуроника F68 (Sigma, арт. p5556)) в воздушный мешок. Через три дня после трансдукции экспрессию генов измеряли с помощью визуализации животных *in vivo*.

Визуализация экспрессии люциферазы

Экспрессию люциферазы измеряли на 3-й день. Первоначально планировалось продолжать мониторинг экспрессии в течение 3 месяцев после введения вектора, однако парвовирусная инфекция в виварии привела к преждевременному прекращению всех текущих экспериментов. Субстрат в виде калиевой соль D-люциферина (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, штат Массачусетс, США) вводили внутривентриально (150 мг/кг массы тела, в объеме около 200 мкл). Подсчет фотонов производили через 10 минут после введения субстрата в течение 5 минут с использованием камеры на основе сенсоров приборов с зарядовой связью (ПЗС) и охлаждением (Photon Imager, Biospace Lab, Париж, Франция), а обработку изображений и количественную оценку, и анализ интенсивности сигнала выполняли с использованием M3 Vision (Biospace Lab). Количество фотонов, испускаемых в секунду на квадратный сантиметр на стерадиан, рассчитывали как показатель активности люциферазы.

Общие условия содержания животных и заявление о соблюдении этических норм

Формирование воздушной сумки, введение вектора и визуализацию *in vivo* проводили под анестезией изофлураном (3 %-ный изофлуран и кислород). В конце экспериментов животных умерщвляли путем пункции сердца под анестезией изофлураном с последующим смещением шейных позвонков. Исследования были рассмотрены и одобрены комитетом по содержанию и использованию животных Амстердамского университета и проводили в строгом соответствии с рекомендациями Закона королевства Нидерландов о защите животных (голландский: «Wet op Dierproeven»). Животные содержались в стерильных условиях в виварии Амстердамского университета.

4.2. Результаты

На основании этих многообещающих результатов было проведено предварительное исследование *in vivo* с использованием модели воздушной синовиальной сумки (APS), с помощью которой два серотипа, AAV9-A2 и AAV7-A6, сравнивались с wtAAV5. Из-за неудачной инфекции в виварии, которая потребовала преждевременного прекращения этого исследования, мы смогли получить данные только в один момент времени, на 3-й день после введения вектора. В этот момент времени было ясно, что капсидные мутанты вызывали повышенную экспрессию генов по сравнению с AAV5, при этом AAV7-A6 демонстрировал увеличение экспрессии в ~ 6 раз, а AAV9-A2 ~ 22 раза (Фиг. 3А).

Пример 5:

Исследование *in vivo*: внутрисуставные инъекции здоровым животным

5.1. Материалы и методы

Животные

Самцов мышей DBA1/J (возраст 12 недель, Envigo) помещали в отдельные вентилируемые клетки в виварии Академического медицинского центра в Амстердаме. Пища и вода были доступны *ad libitum*. Все эксперименты на животных были проведены после одобрения Центральной комиссией по экспериментам на животных (CCD) и Комитетом по этике исследований на животных Амстердамского университета, Нидерланды.

Исследование экспрессии

Пять gAAV, содержащих капсидные мутанты, то есть AAV9-A2, AAV1-P4, AAV7-A6, AAVrh10-A6 и AAVrh10-A2, сравнивали с wtAAV5. Поскольку капсидная нагрузка может влиять на экспрессию (Aalbers CJ et al., Hum Gene Ther 2017;28 (2):168-178), препараты gAAV корректировали с учетом капсидной нагрузки путем добавления пустых частиц wtAAV5. Здоровым мышам (n=9 в группе) внутрисуставно вводили вектор AAV, несущий ген люциферазы в оба колена ($7,5 \times 10^9$ вирусных геномов на колено). Экспрессию гена определяли с помощью визуализации *in vivo* в несколько моментов времени после введения вектора.

Визуализация экспрессии люциферазы

Экспрессию люциферазы определяли в указанные моменты времени (Фиг. 3B). В каждый момент времени субстрат в виде калиевой соль D-люциферина (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, штат Массачусетс, США) вводили внутривенно (150 мг/кг массы тела, в объеме около 200 мкл).

- 5 Подсчет фотонов проводили через 15 минут после введения субстрата в течение 5 минут с использованием камеры на основе сенсоров приборов с зарядовой связью (ПЗС) и охлаждением (Photon Imager, Biospace Lab, Париж, Франция). Обработку изображений, количественную оценку и анализ интенсивности сигнала проводили с помощью M3 Vision (Biospace Lab). Количество фотонов, испускаемых в секунду на квадратный сантиметр на стерадиан, рассчитывали как показатель
- 10 активности люциферазы.

Общие условия содержания животных и заявление о соблюдении этических норм

Введение вектора и визуализацию *in vivo* проводили под анестезией изофлураном (4 %-ный изофлуран и кислород). Исследования проводили в строгом соответствии с рекомендациями Закона

15 королевства Нидерландов о защите животных (голландский: «Wet op Dierproeven»). Животные содержались в стерильных условиях в виварии Амстердамского университета.

5.2. Результаты

- В первый момент времени, на 3-й день, AAV-опосредованная экспрессия в колоне обнаруживается
- 20 во всех группах и увеличивается со временем (Фиг. 3B). Все капсидные мутанты, кроме AAV1-P4, демонстрируют повышенную экспрессию по сравнению с wtAAV5, при этом AAV9-A2 демонстрирует самую высокую экспрессию (увеличение примерно в 5 раз по сравнению с wtAAV5 на 14-й день) (Фиг. 3C). Уровни экспрессии на 14-й день от высокого к низкому: AAV9-A2 > AAVrh10-A2 > AAVrh10-A6 > AAV7-A6 > wtAAV5 > AAV1-P4. На 7-й день AAVrh10-A2, AAV9-A2 и AAVrh10-A6 демонстрируют
- 25 значительно повышенную экспрессию по сравнению с wtAAV5 (**P<0,05, ***P<0,01, ****P<0,00001 по сравнению с wtAAV5 на 14-й день. (Фиг. 3B).

Пример 6:

Определение титров нейтрализующих антител против капсидных мутантов в сыворотке

30 *крови человека*

6.1 Материалы и методы

- Клетки HEK293T высевали в среду DMEM, содержащую 9% FBS, 0,9% пенициллина/стрептомицина, в 96-луночные планшеты с прозрачным дном. Клетки оставляли на 24 часа (при 37°C, 5% CO₂) перед
- 35 трансдукцией. Образцы сыворотки человека (полученные из Французского института крови) разводили следующим образом: чистая неразведенная сыворотка – 1:4 – 1:16 – 1:64 – 1:256 – 1:1024 (неразведенная сыворотка означает 1 объем вируса на 1 объем сыворотки). Образец объединенной плазмы мышей (от 10 мышей DBA/1, взятых через 42 дня после внутрисуставной инъекции вектора AAV5) серийно разбавляли в FBS следующим образом: 1:10 – 1:50 – 1:250 – 1:6250. – 1:31 250.
- 40 Раствор человеческого внутривенного иммуноглобулина (IVig, Sanquin, партия 15D30H4560A) серийно разводили в полулогарифмическом масштабе от 1:10 до 1:10000. Образцы и контроли

инкубировали вместе с соответствующим капсидным мутантом или вектором wtAAV5 в течение 30 минут $\pm$ 5 мин при 35-38°C при MOI 2500 (как определено ранее). Через 48 $\pm$ 2 часа добавляли реагент люциферазы и измеряли люминесцентное излучение с помощью микропланшетного ридера VictorX. Титры ингибирования трансдукции определяли как максимальное разведение сыворотки, все еще связанное с обнаруживаемой нейтрализующей активностью, т.е. нейтрализующей активностью >50%.

6.2 Результаты

Как показано в Таблице 3, 70-85% образцов не содержали нейтрализующих антител против wtAAV5 или 7 капсидных мутантов. Большинство образцов имели общую реактивность против семи капсидных мутантов, таким образом, образец сыворотки, обладающий реактивностью против капсида AAV5 дикого типа, также реагировал против других капсидов. По уровню ответа они также были сопоставимы между капсидными мутантами. Для каждого капсидного мутанта указано количество образцов, которые не реагировали (Н/О= не обнаружено). Эти данные приведены только в качестве информации, так как очень сложно сравнивать титры для разных векторов. Что касается образца объединенной сыворотки мыши из суставов, инъектированных внутрисуставно, то он реагировал только против капсида AAV5 дикого типа, который использовали для иммунизации животных, тогда как против мутантных капсидов ответа не наблюдали (таблица 3). Все капсидные мутанты и AAV5 дикого типа были нейтрализованы IVIg (титры >100) (данные не показаны).

Таблица 3: Для каждого образца сыворотки, а также объединенной мышинной плазмы указывается ингибирующий титр, который соответствует самому высокому разведению, все еще связанному с обнаруживаемой нейтрализующей активностью. Титры > 8 считаются серопозитивными.

Положительные сигналы выделены жирным шрифтом/курсивом. Н/О = не обнаружено

	AAV5	AAV9A 2	AAV-DJ- QR-P2	AAVrh1 0-A2	AAV1- P4	AAV2- P2	AAV7- A6	AAVrh1 0-A6
образец 1	256	256	256	256	>1024	256	>1024	>1024
образец 2	4	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
образец 3	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
образец 4	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
образец 5	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
образец 6	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
образец 7	64	64	64	256	256	64	256	256
образец 8	16	16	16	64	16	64	64	64
образец 9	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
образец 10	4	4	16	4	64	64	64	64

образец 11	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O
образец 12	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	1	H/O	H/O
образец 13	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O
образец 14	H/O	1	H/O	H/O	4	1	H/O	1
образец 15	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O
образец 16	1	1	4	4	4	16	1	1
образец 17	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O
образец 18	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O
образец 19	H/O	H/O	H/O	H/O	4	H/O	H/O	H/O
образец 20	4	256	64	4	H/O	256	16	16
% отрицательных образцов	85	80	75	85	80	70	75	75
мышинная плазма	256	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O

Пример 7:

In vitro экспрессия капсидных мутантов AAV, содержащих промотор EF1 α и трансген hTNFR2-IgG1, в клетках HEK293T/17.

Материалы и методы

Были созданы три вектора AAV (AAV5wt, AAV9A2, AAVrh10A2) (аффинная очистка на основе антител и градиентная очистка хлоридом цезия), экспрессирующие TNFR2-IgG1 человека (этанерцепт), и проведена оценка уровня экспрессии в клетках HEK293T/17. AAV5wt представляет собой AAV5 дикого типа, AAV9A2 содержит модифицированный капсидный белок AAV9 A2, а AAVrh10A2 содержит модифицированный капсидный белок A2 AAVrh10.

В частности, клетки HEK293T/17 высевали в 48-луночный планшет (Costar, арт. № 3548) по 105000 клеток на лунку. После инкубации в течение ночи супернатанты клеток заменяли DMEM glutaMAX-I (Gibco 31966-021), содержащей 0,001% раствор плуроника F68 (Sigma P5556). Различные векторы добавляли в двух повторностях с множественностью заражения (MOI) 100000. Через 4 часа доксорубин (конечная концентрация 0,4 мкМ) (Sigma D1515) или доксорубин (конечная концентрация 0,4 мкМ) (Sigma D1515) в сочетании с ЛПС (конечная концентрация 1 мкг/мл) (Sigma, кат. № L2880-10 мг) (ЛПС индуцирует воспаление клеток) в DMEM-glutaMAX-I, содержащем FBS (инактивированную теплом (HI)) бычьей сыворотку (Gibco, арт. 10270-106) (конечная концентрация

1%), добавляли в лунки. Через три дня после трансдукции собирали супернатант и определяли уровни hTNFR2-IgG1 в супернатанте с помощью растворимого набора hTNFR2 DuoSet Elisa (R&D systems кат. № DY726).

5 Результаты

. Трансдукция с помощью AAV9A2 и AAVrh10A2 приводила к повышенным уровням экспрессии hTNFR2 по сравнению с wtAAV5, в диапазоне от 9 до 13 раз в нестимулированных и стимулированных ЛПС клетках. (Фиг. 8).

10 Заключение

Вирионы, содержащие модифицированный капсидный белок AAV9A2 или AAVrh10A2, приводят к более высоким уровням экспрессии генов в клетках HEK293/17 по сравнению с вирионами AAV5wt.

Настоящее изобретение было описано выше со ссылкой на ряд иллюстративных вариантов осуществления, приведенных на графических материалах. Возможны модификации и альтернативные реализации некоторых частей или элементов, и они включены в объем охраны, определенный в прилагаемой формуле изобретения

20

25

30

35

40

5 ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV – англ.: recombinant adeno-associated virus), содержащий модифицированный капсидный белок и промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес генный продукт, причем вирион rAAV предназначен для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов, при этом модифицированный капсидный белок содержит в С-концевой части белка аминокислотную последовательность Z, остатки которой экспонированы на поверхности капсидного белка, предпочтительно при этом представляющий интерес продукт представляет собой иммунодепрессант.

2. Вирион rAAV для применения по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность Z:

а. содержит или состоит из последовательности аминокислотных остатков формулы I:



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

б. присутствует в положении, соответствующем положению 100-200, предпочтительно 120-180, более предпочтительно 130-170, более предпочтительно 140-160 аминокислотных остатков от С-конца капсидного белка AAV дикого типа.

3. Вирион rAAV для применения по п. 1 или п. 2, в котором представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор IL-6.

4. Вирион rAAV для применения по п. 1 или п. 2, в котором представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор TNFα.

5. Вирион rAAV для применения по п. 1 или п. 2, в котором представляющий интерес генный продукт представляет собой ингибитор IL-1.

6. Вирион rAAV для применения по п. 3, в котором ингибитор IL-6 выбран из группы, состоящей из антагониста рецептора IL-6, гуманизированного моноклонального антитела к IL-6, химерного

моноклонального антитела к IL-6, гуманизированного кроличьего моноклонального антитела к IL-6 и растворимого рецептора IL-6, предпочтительно при этом по меньшей мере один из следующего:

i) антагонист рецептора IL-6 представляет собой по меньшей мере один из тоцилизумаба и сарилумаба;

5 ii) гуманизированное моноклональное антитело к IL-6 представляет собой по меньшей мере одно из олокизумаба и сирукумаба;

iii) химерное моноклональное антитело к IL-6 представляет собой силтуцимаб; и

iv) гуманизированное кроличье моноклональное антитело к IL-6 представляет собой клазакизумаб.

10

7. Вирион gAAV для применения по п. 4, отличающийся тем, что ингибитор TNF α выбран из группы, состоящей из этанерцепта, инфликсимаба, адалимумаба, цертилизумаба пэгола и голимумаба, предпочтительно при этом ингибитор TNF α представляет собой этанерцепт.

15 8. Вирион gAAV для применения по п. 5, отличающийся тем, что ингибитор IL-1 выбран из группы, состоящей из следующего:

i) антагонист рецептора IL-1, предпочтительно антагонист рецептора IL-1 человека, предпочтительно антагонист рецептора IL-1 человека анакинра;

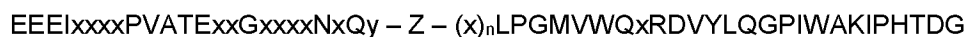
20 ii) моноклональное антитело к IL-1, предпочтительно человеческое моноклональное антитело к IL-1, предпочтительно человеческое моноклональное антитело к IL-1, канакинумаб или гевокизумаб

iii) человеческий димерный слитый белок к IL-1, предпочтительно человеческий димерный слитый белок к IL-1 рилонацепт; и

25 iv) человеческий иммуноглобулин к IL-1 с двойным вариабельным доменом, предпочтительно человеческий иммуноглобулин к IL-1 с двойным вариабельным доменом лутикизумаб

9. Вирион gAAV для применения по любому из предшествующих пунктов, в котором промотор представляет собой конститутивный промотор или индуцибельный промотор, предпочтительно промотор представляет собой NF κ B-чувствительный промотор, предпочтительно NF κ B-чувствительный промотор CMV, предпочтительно NF κ B-чувствительный минимальный промотор CMV.

35 10. Вирион gAAV для применения по любому из предшествующих пунктов, в котором последовательность Z содержится в модифицированном капсидном белке в месте, представленном формулой II:



40

a. где Z, x и y имеют значения, определенные в п. 2; и

b. где n равен 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15.

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

5 i) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 1, и где аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 1 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11,

10 ii) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 2, и где аминокислоты в положениях 585-602 SEQ ID NO: 2 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10,

15 iii) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 3, и где аминокислоты в положениях 587-601 SEQ ID NO: 3 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9,

20 iv) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 4, и где аминокислоты в положениях 586-600 SEQ ID NO: 4 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8,

v) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 5, и где аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 5 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9,

25 vi) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 6, и где аминокислоты в положениях 588-602 SEQ ID NO: 6 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и

30 vii) аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, имеющей SEQ ID NO: 7, и где аминокислоты в положениях 587-604 SEQ ID NO: 7 имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12,

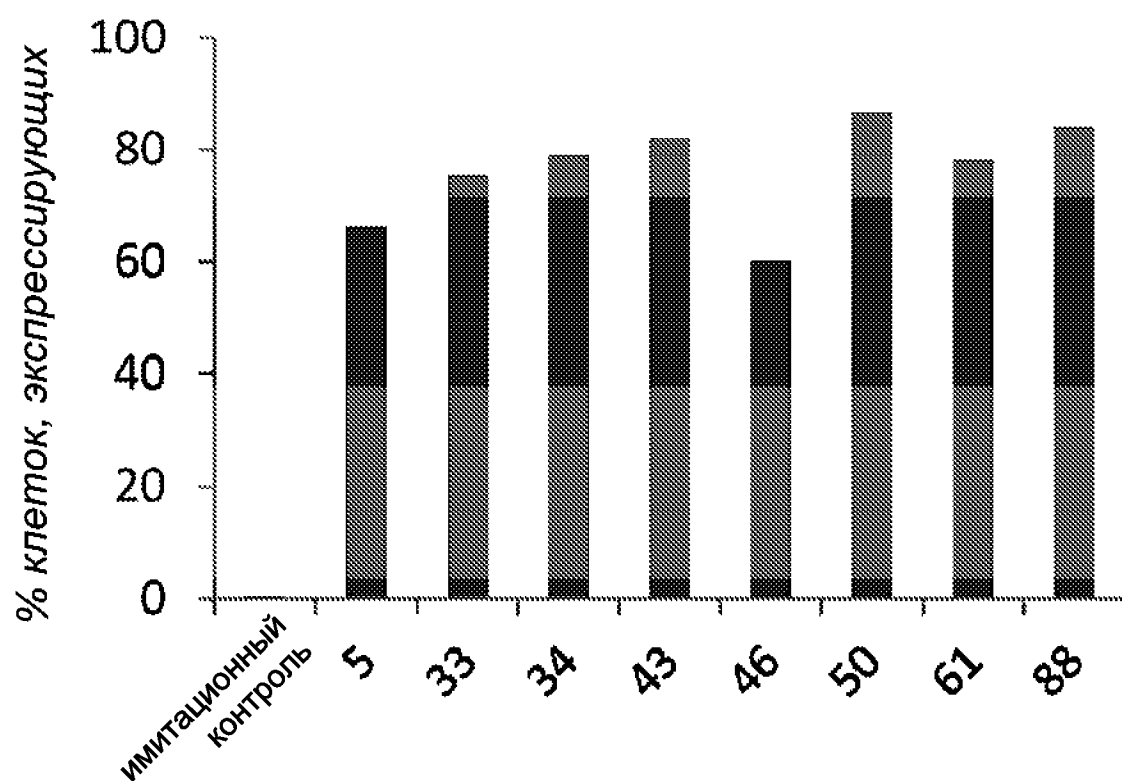
35 при этом модифицированный капсидный белок обеспечивает по меньшей мере двукратное увеличение экспрессии, предпочтительно в клетках FLS человека, по сравнению с немодифицированным капсидным белком с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-19, когда тестировали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

40 12. Вирион gAAV для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что капсидный белок содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из

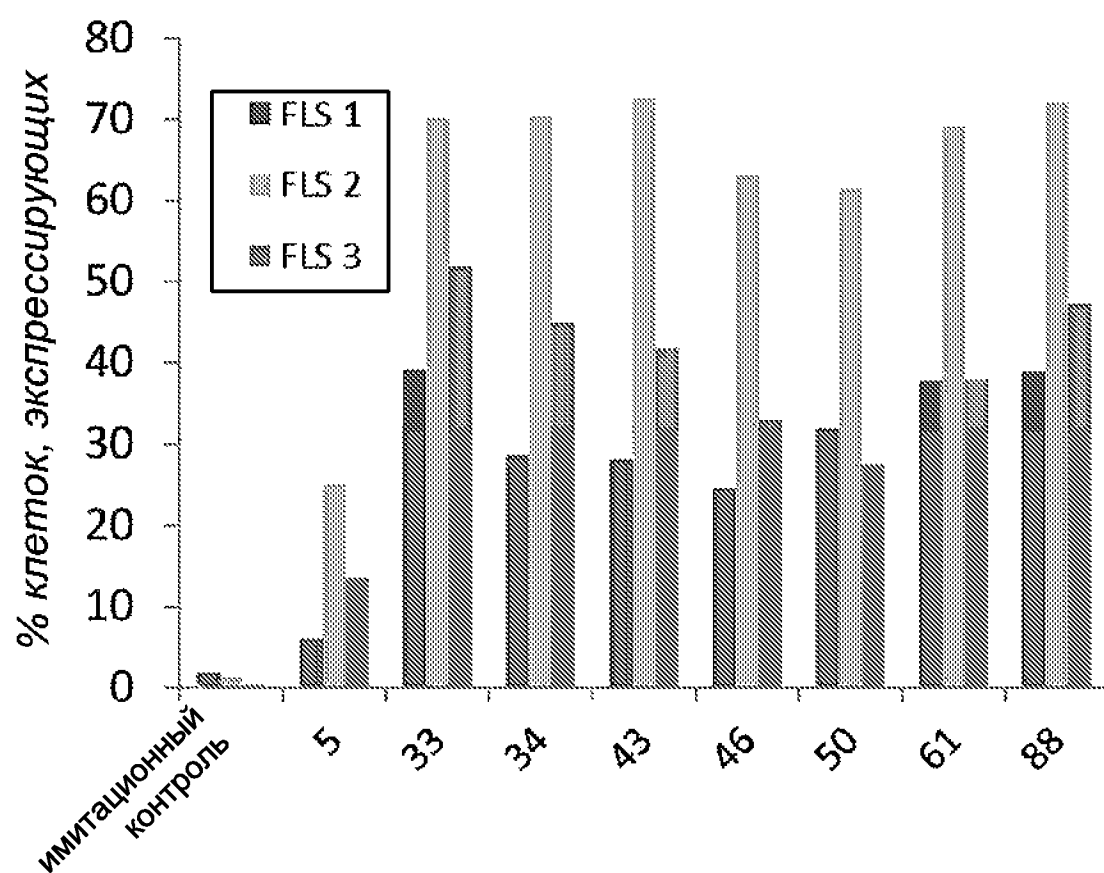
группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–7, предпочтительно при этом капсидный белок содержит или состоит из SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6.

13. Композиция гAAV для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов, причем композиция гAAV содержит вирион гAAV, как определено в любом из пп. 1-12, и фармацевтически приемлемый носитель.
14. Композиция гAAV и иммунодепрессант для применения при лечении или профилактике заболевания суставов или для применения при лечении или профилактике симптомов, связанных с заболеванием суставов, причем композиция гAAV является такой, как определена в п. 13, и при этом лечение или профилактика включает введение композиции гAAV и введение иммунодепрессанта индивидууму.
15. Вирион гAAV для применения по любому из пп. 1–12, композиция гAAV для применения по п. 13 или композиция гAAV и иммунодепрессант для применения по п. 14, отличающиеся тем, что заболевание суставов выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита (RA), ювенильного ревматоидного артрита, остеоартрита (OA), подагры, псевдоподагры, спондилоартрита (SpA), псориатического артрита, анкилозирующего спондилита, септического артрита, артрита, ювенильного идиопатического артрита, тупой травмы, замены сустава и болезни Стилла.
16. Вирион гAAV для применения по любому из пп. 1-12 или композиция гAAV для применения по п. 13, где вирион гAAV и/или композицию гAAV вводят системно и/или местно.
17. Композиция гAAV и иммунодепрессант для применения по п. 14, где по меньшей мере одно из композиций гAAV и иммунодепрессанта вводят местно.
18. Вирион гAAV или композиция гAAV для применения по п. 16 и/или композиция гAAV и иммунодепрессант для применения по п. 17, отличающиеся тем, что местное введение представляет собой внутрисуставное введение.

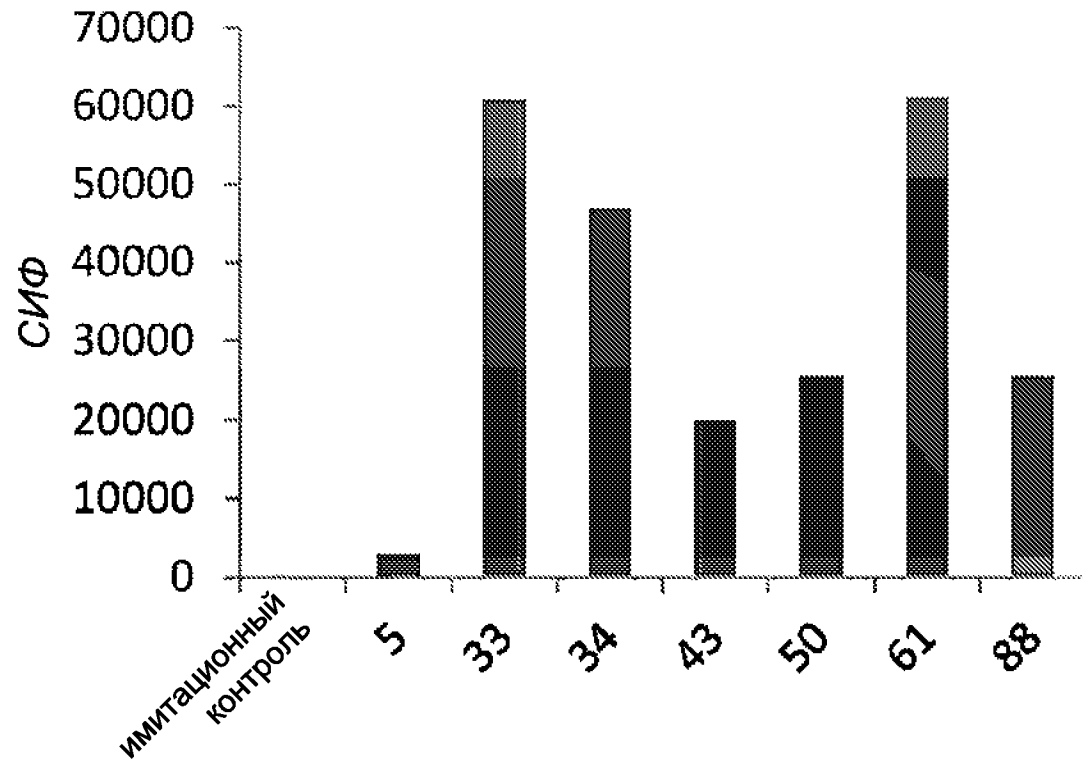
Фиг. 1А



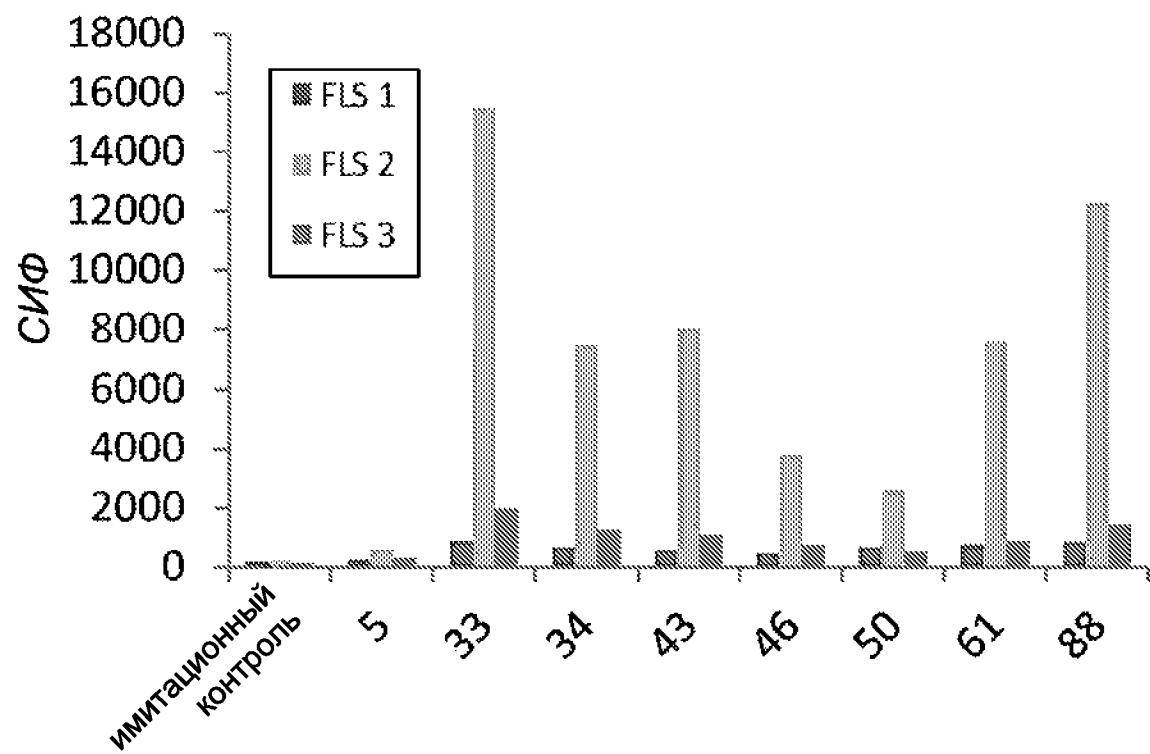
Фиг. 1В



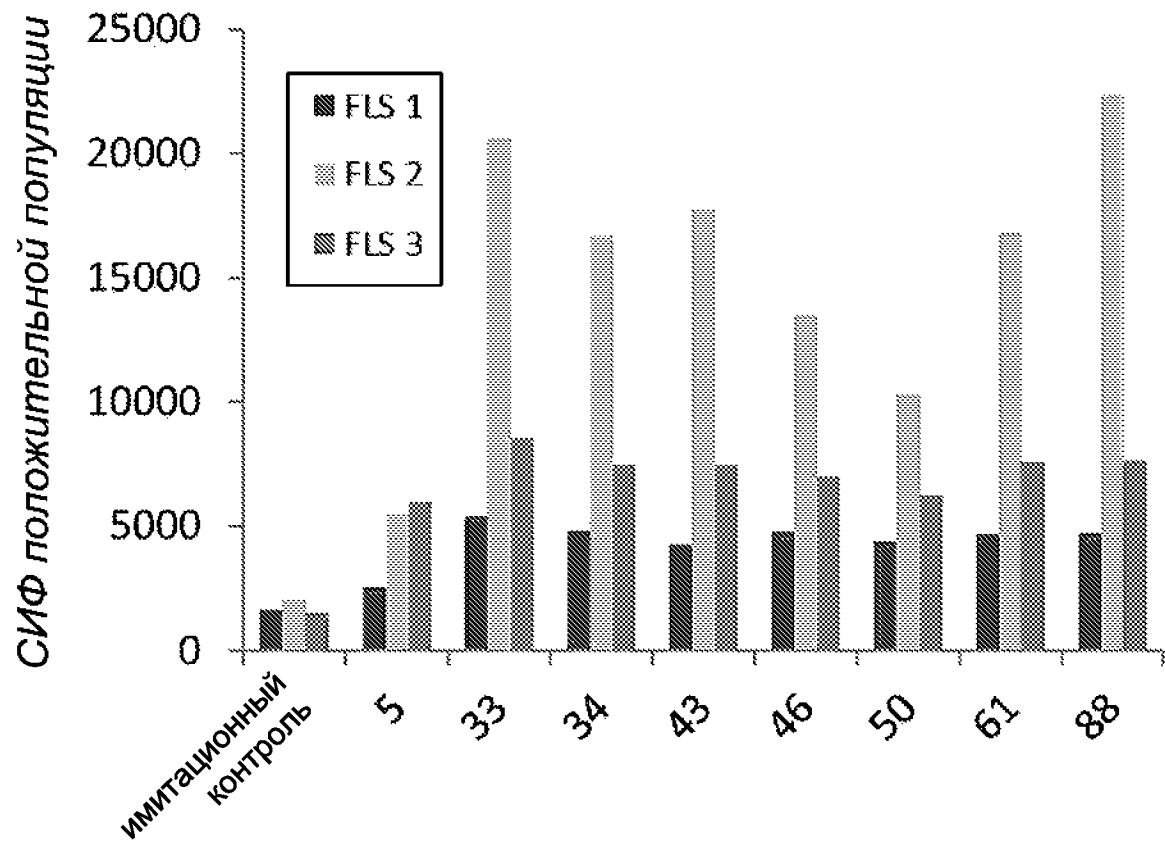
Фиг. 1С



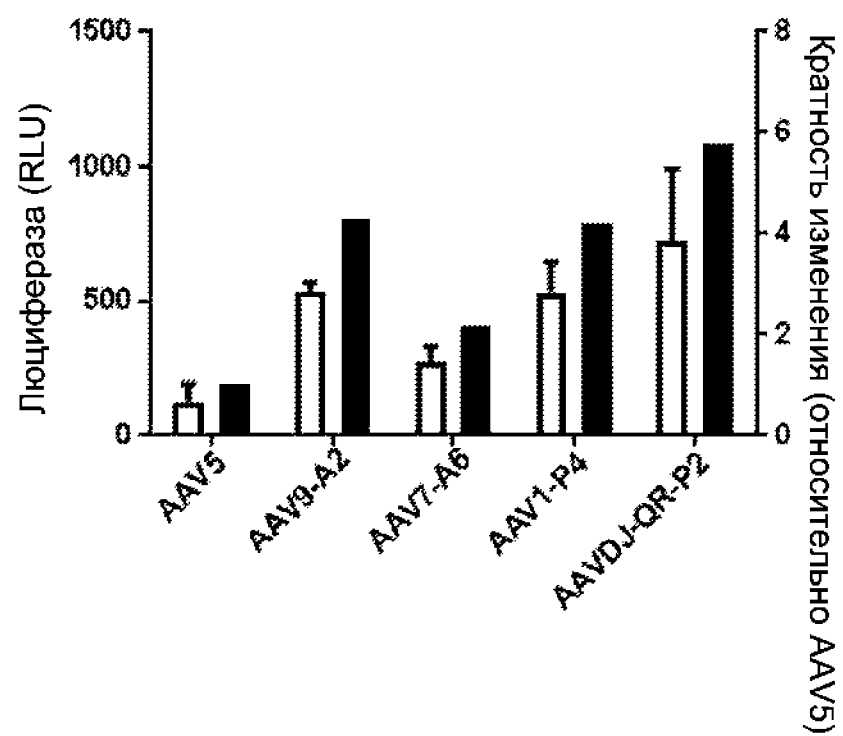
Фиг. 1D



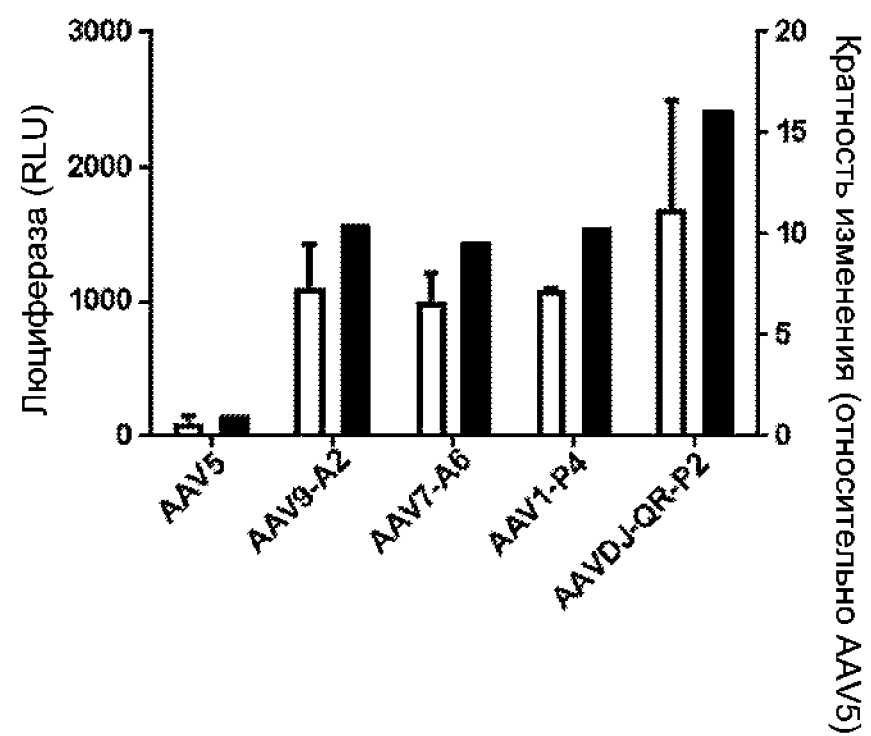
Фиг. 1Е



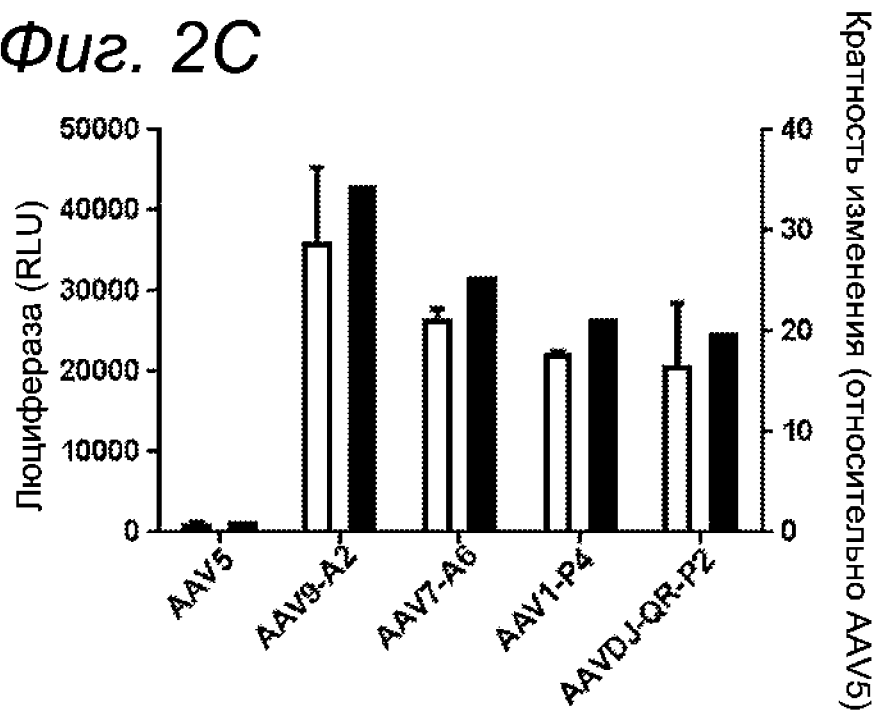
Фиг. 2А



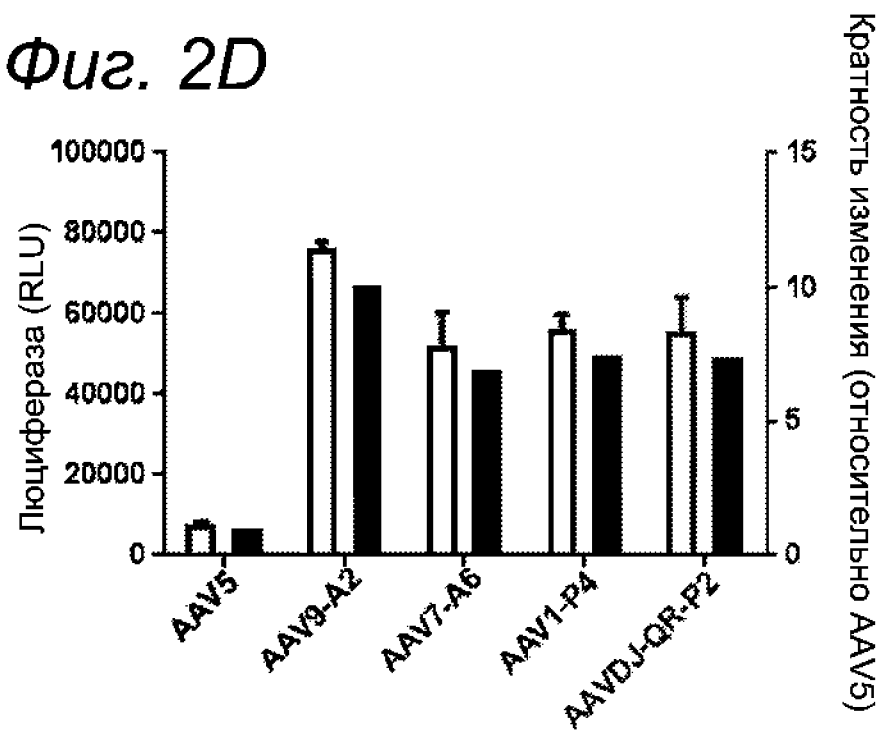
Фиг. 2В



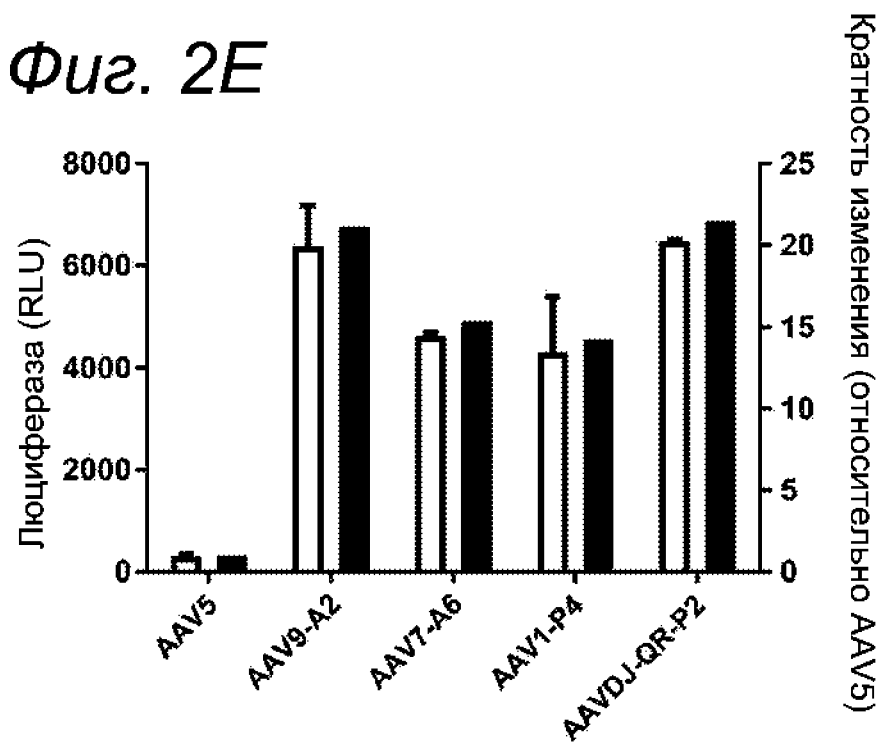
Фиг. 2С



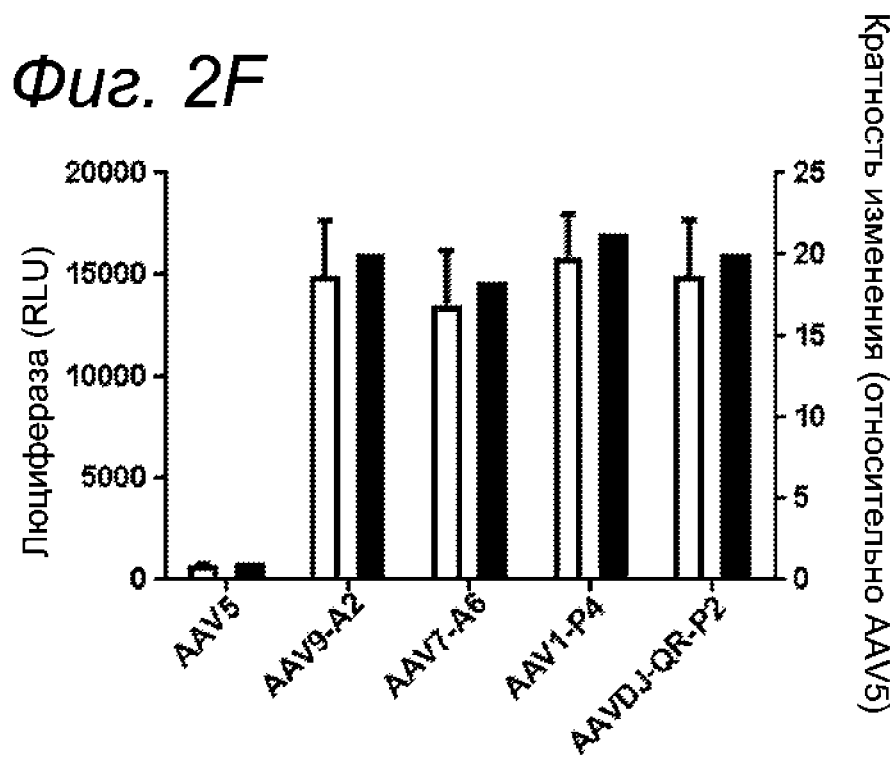
Фиг. 2D



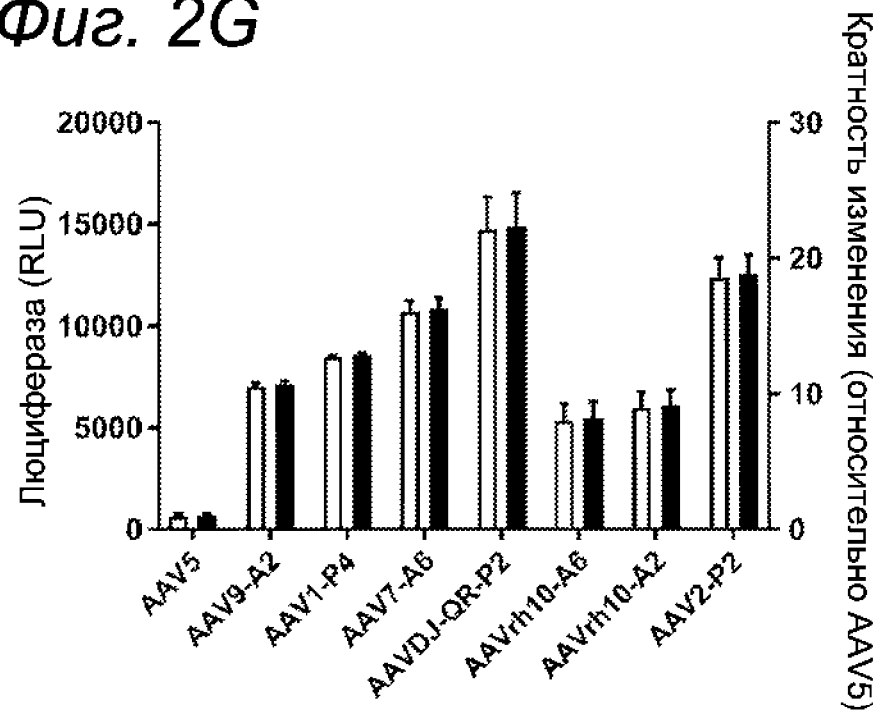
Фиг. 2E



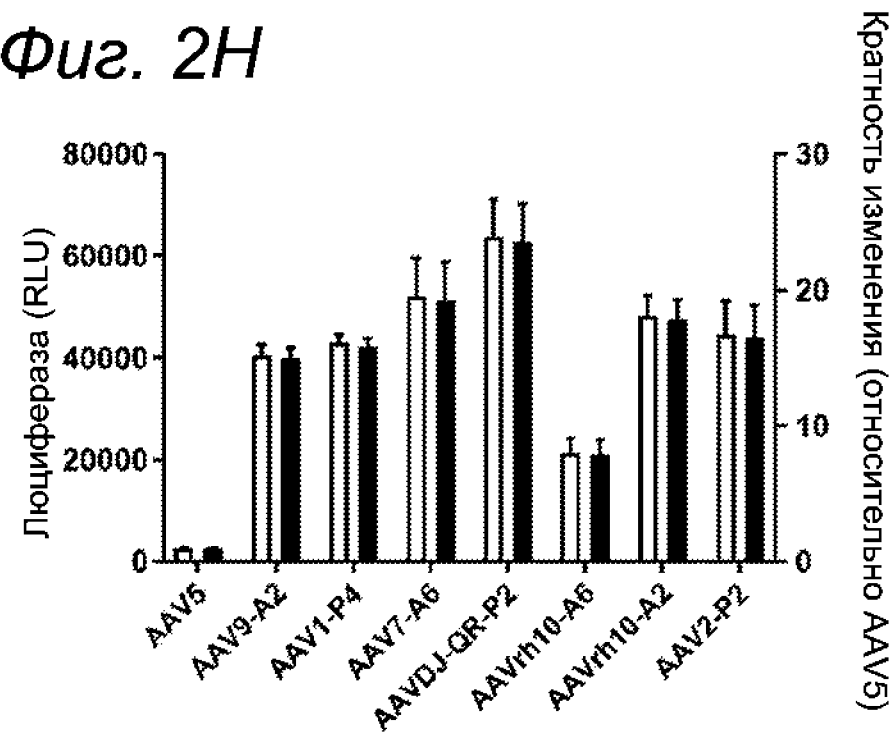
Фиг. 2F



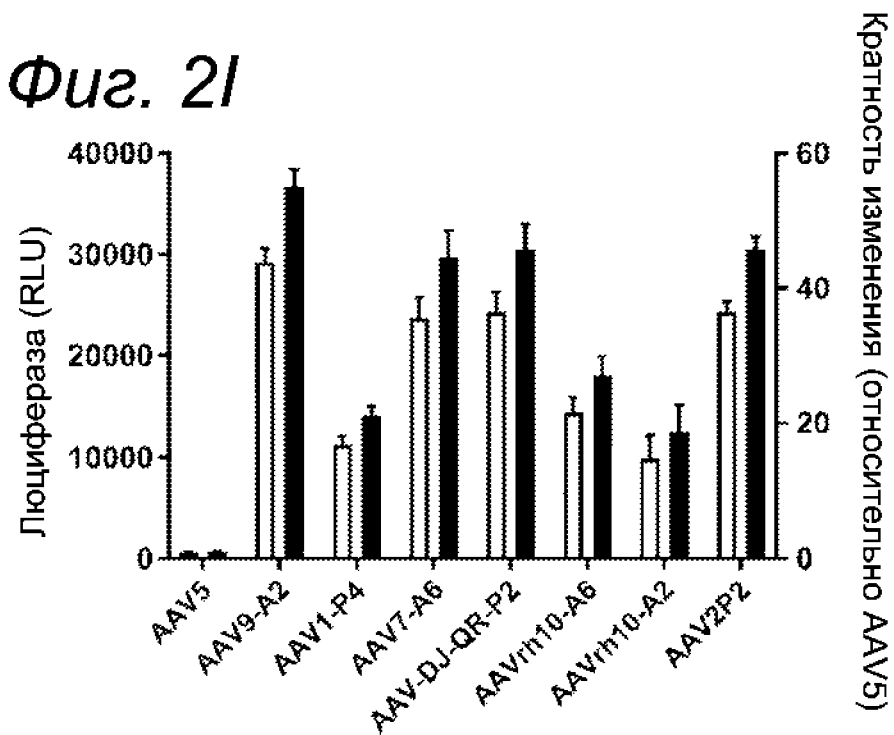
Фиг. 2G



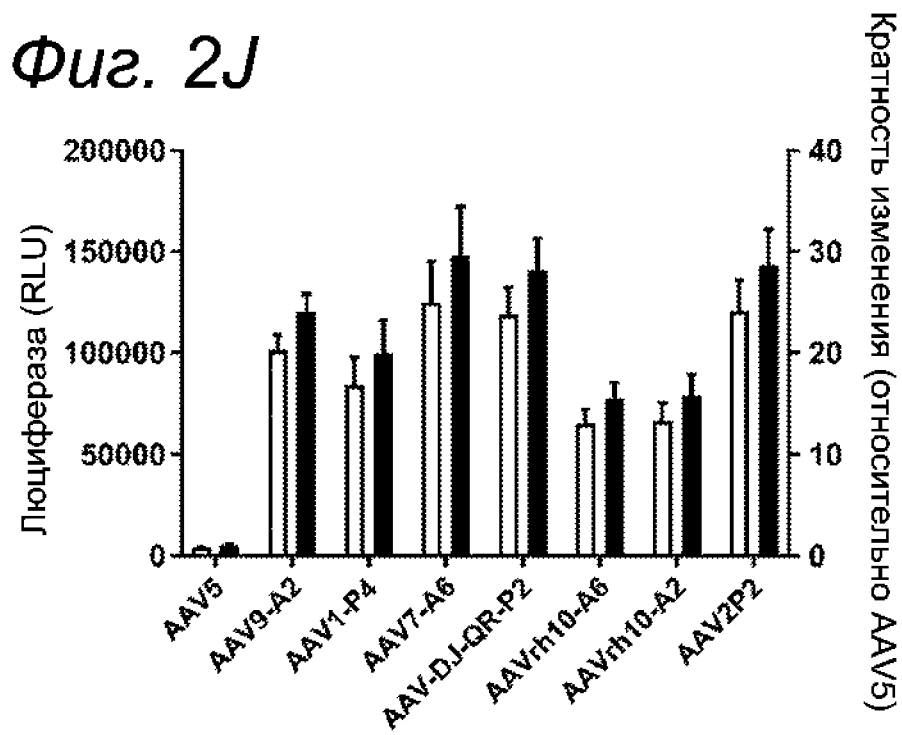
Фиг. 2H



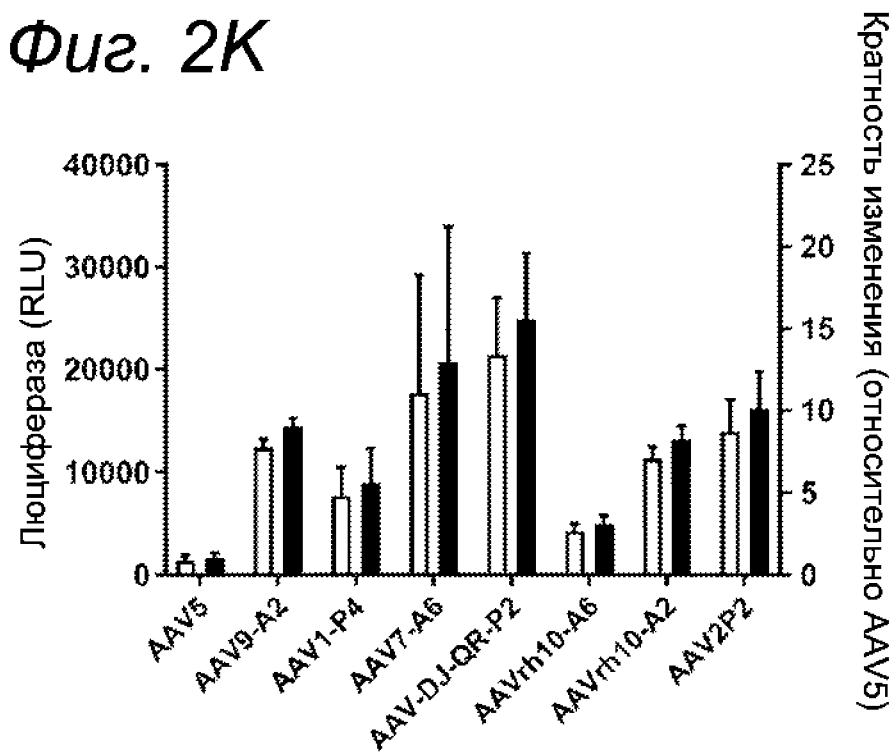
Фиг. 2I



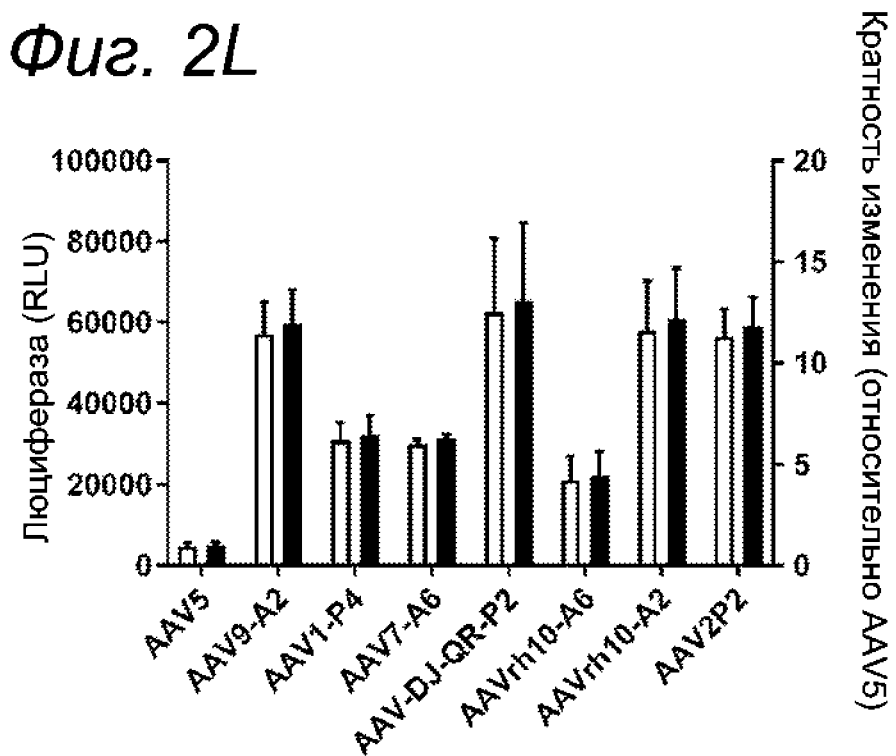
Фиг. 2J



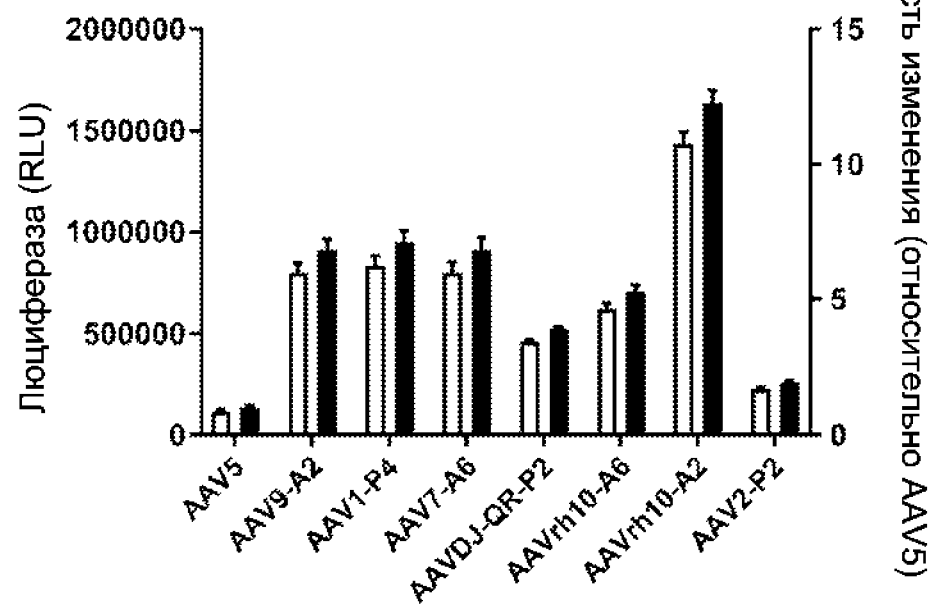
Фиг. 2K



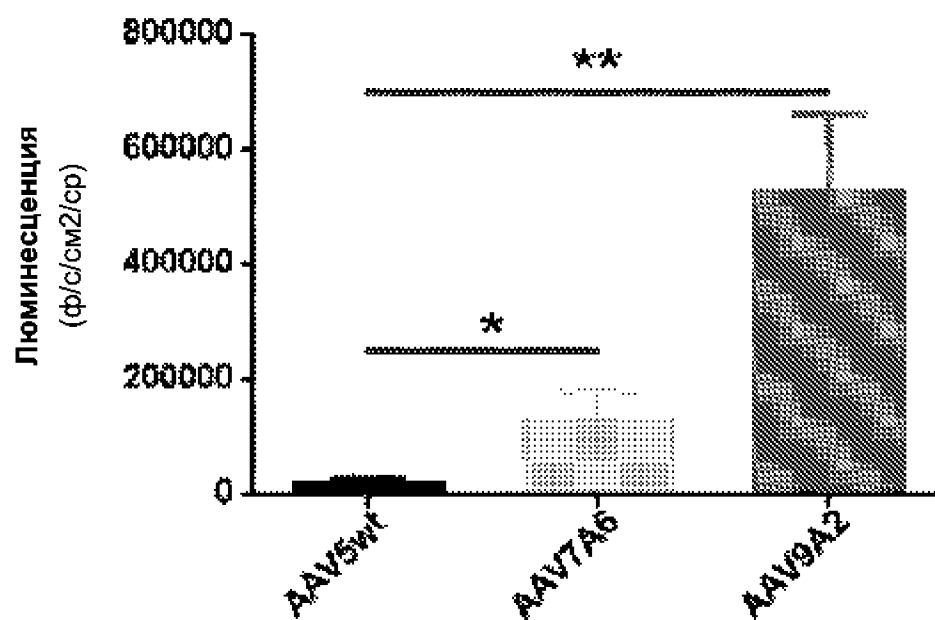
Фиг. 2L



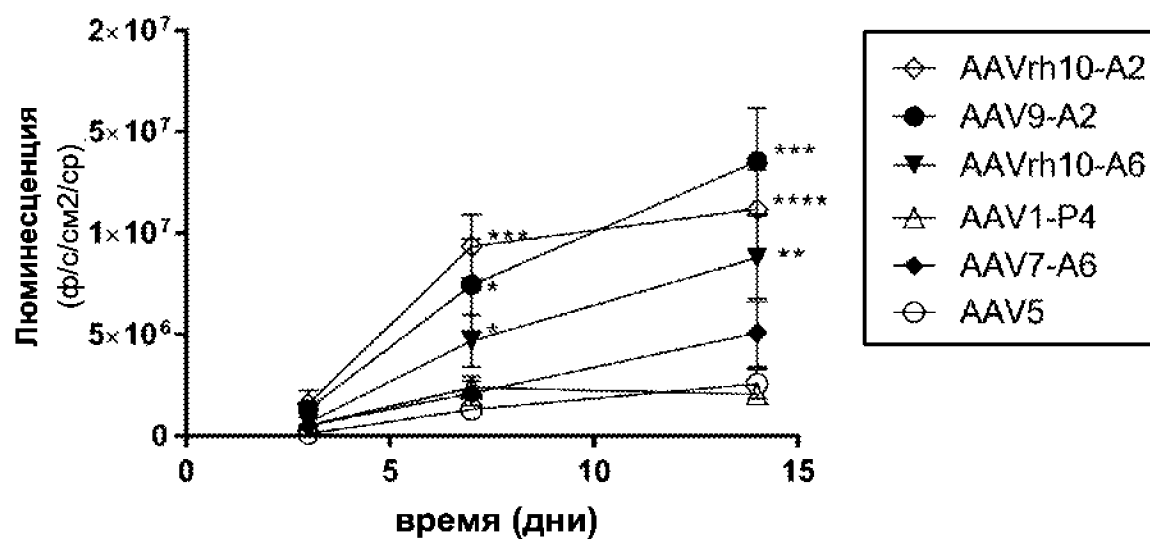
Фиг. 2М



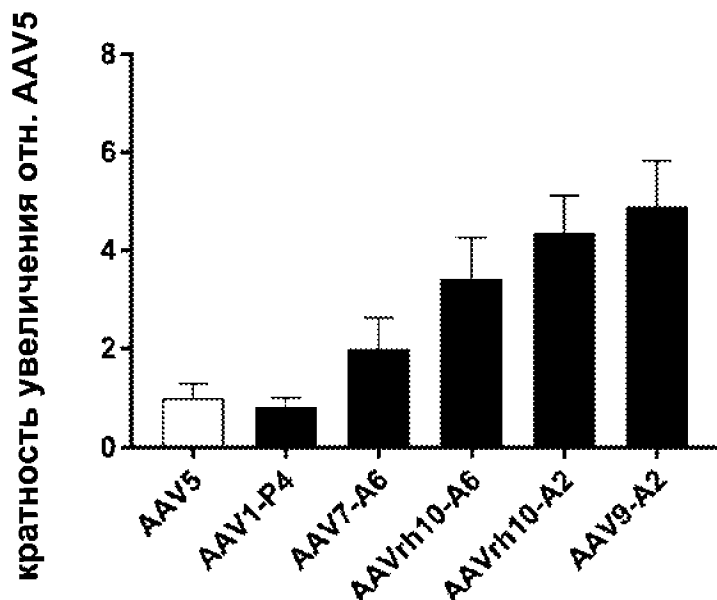
Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 4

Выравнивание в формате CLUSTAL с помощью MAFFT FFT-NS-i (v7,215)

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

Фиг. 5

Множественное выравнивание последовательностей
CLUSTAL с помощью MUSCLE (3,8)

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

Фиг. 6

Выравнивание в формате CLUSTAL с помощью MAFFT
FFT-NS-i (v7,215)

```
insertP4      -ggsgndvrs--anaqaa
insertA2      -gqrgnysrg--vdaqaa
insertA6      -gqrgnearv--reaqaa
insertP2      qggsgcdcrgrdcfcaqaa
insertQR-P2   qggrgcdcrgrdcfcaqaa
              ** *      *      ****
```

Фиг. 7

Множественное выравнивание последовательностей CLUSTAL с помощью MUSCLE (3,8)

insertP2	QGQSGCDCRGDCFCAQAA
insertQR-P2	QGQRGCDCRGDCFCAQAA
insertP4	-GQSGNDVRS--NAQAA
insertA2	-GQRGNYSRGV--DAQAA
insertA6	-GQRGNEARVR--EAQAA
	** * * ****

Фиг. 8

Экспрессия hTNFR2 на основе капсидного мутанта AAV в клетках HEK293T/17

