

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290716** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.19

(51) Int. Cl. *C07K 14/47* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.16

(54) ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ НИМАННА-ПИКА ТИПА C

(31) 62/916,749; 62/923,253; 63/082,425;
63/082,899

(32) 2019.10.17; 2019.10.18; 2020.09.23;
2020.09.24

(33) US

(86) PCT/US2020/056031

(87) WO 2021/076925 2021.04.22

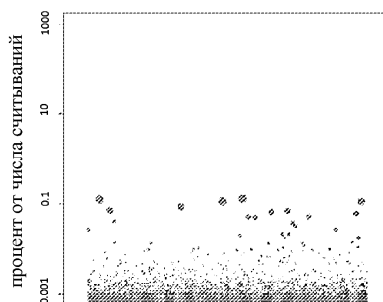
(71) Заявитель:
СТРАЙДБАЙО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Маккой Дэниел, Бэрри Гарретт,
Дисмьюк Девид (US)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Предложены генно-терапевтические композиции и способы лечения, предупреждения и/или устранения NPC1. Более конкретно, в изобретении предложены векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) для доставки нуклеиновых кислот и нуклеиновые кислоты (включая кассеты для переноса на основе AAV) для лечения, предупреждения и/или устранения NPC1.

Раунд 1 Ввод,
(Пред-эволюция)



A1

202290716

202290716

A1

**ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ НИМАННА-ПИКА ТИПА С
ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США No. 63/082899, поданной 24 сентября 2020 года, предварительной заявки на патент США No. 63/082425, поданной 23 сентября 2020 года, предварительной заявки на патент США No. 62/923253, поданной 18 октября 2019 года, и предварительной заявки на патент США No. 62/916749, поданной 17 октября 2019 года, каждая из которых включена в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

**ОПИСАНИЕ ТЕКстового ФАЙЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ
ВИДЕ**

Содержание текстового файла, представленного здесь в электронном виде, включено посредством ссылки во всей своей полноте: копия Перечня последовательностей в формате, читаемом компьютером (название файла: STRD_021_02WO_SeqList_ST25.txt, дата записи 14 октября 2020 года, размер файла примерно 425 килобайт).

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящая заявка относится к рекомбинантным векторам на основе аденоассоциированных вирусов (AAV). В некоторых воплощениях рекомбинантные AAV-векторы ускользают от нейтрализующих антител без уменьшения эффективности трансдукции.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Болезнь Ниманна-Пика типа С1 (NPC1) представляет собой нейродегенеративное расстройство, характеризующееся накоплением холестерина в эндолизосомальных компартментах. Ее вызывают мутации в гене, кодирующем NPC1, представляющим собой эндолизосомальный белок, опосредующий внутриклеточные пути транспорта холестерина.

NPC1 может присутствовать у младенцев, детей или взрослых. У новорожденных может присутствовать асцит и тяжелое заболевание печени из-за инфильтрации печени и/или дыхательная недостаточность из-за инфильтрации легких.

У других младенцев при отсутствии заболевания печени или легких имеет место гипотония и задержка развития. Классический дебют происходит в среднем-позднем детском возрасте с протекающим без явных симптомов началом атаксии, вертикального надъядерного паралича взора (VSGP) и деменции. Часто присутствует дистония и судороги. Дизартрия и дисфагия со временем становятся ограничивающими, делая невозможным пероральное питание; гибель обычно происходит в конце второй или в третьей декаде от аспирационной пневмонии. У взрослых более вероятно присутствие деменции или психиатрических симптомов.

Было показано, что 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин (HPBCD) уменьшает накопление холестерина и липидов и продлевает выживаемость в моделях NPC1 у животных. Однако не существует способов лечения NPC1, одобренных Управлением по контролю за продуктами и лекарственными средствами США (FDA). Соответственно, существует насущная потребность в композициях и способах лечения, устранения и/или предупреждения NPC1.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Здесь предложены генно-терапевтические композиции и способы для лечения, предупреждения и/или устранения NPC1. Более конкретно, в настоящем изобретении предложены векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) и нуклеиновые кислоты (включая нуклеиновые кислоты, содержащие кассеты для переноса на основе AAV для лечения, предупреждения и/или устранения NPC1.

В некоторых воплощениях вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса содержит: (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180, и (2) нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид; где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса; где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; транскрипционный ген, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR.

В некоторых воплощениях вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса содержит: (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180, или последовательность, содержащую от примерно 1 до примерно 25 аминокислотных мутаций относительно SEQ ID NO: 180; и (2) нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид; где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса; где кассета для переноса

содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансен, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR.

В некоторых воплощениях кассета для переноса содержит интронную последовательность. В некоторых воплощениях интронная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях интронная последовательность может быть расположена между промотором и трансгеном.

В некоторых воплощениях 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3003. В некоторых воплощениях 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3004.

В некоторых воплощениях промотор представляет собой промотор СВА. В некоторых воплощениях промотор содержит последовательность SEQ ID NO: 3005.

В некоторых воплощениях белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3001. В некоторых воплощениях трансен содержит последовательность SEQ ID NO: 3002.

В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40. В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования содержит последовательность SEQ ID NO: 3012.

В некоторых воплощениях кассета для переноса содержит энхансер.

В некоторых воплощениях кассета для переноса содержит последовательность SEQ ID NO: 3014. В некоторых воплощениях кассета для переноса содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3015-3019.

Также здесь предложены композиции, содержащие AAV-вектор по изобретению. Также здесь предложены клетки, содержащие AAV-вектор по изобретению.

Также здесь предложены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту эффективного количества AAV-вектора, нуклеиновой кислоты, композиции или клетки по изобретению. В некоторых воплощениях у субъекта присутствует болезнь Ниманна-Пика типа С. В некоторых воплощениях субъект представляет собой субъекта-человека.

Эти и другие воплощения далее описаны более подробно.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А-1В. Пузырьковые диаграммы, демонстрирующие анализ разнообразия библиотек, направленной эволюции и обогащения новых областей узнавания антитела (antigenic footprints). Исходные (Фиг. 1А) и эволюционировавшие библиотеки с первого раунда (Фиг. 1Б) и второго раунда (Фиг. 1В) эволюции подвергали высокопроизводительному секвенированию с использованием платформы Illumina MiSeq. После анализа с использованием специализированного Perl-скрипта обогащенные аминокислотные последовательности наносили на график. Каждый пузырек обозначает аминокислотную последовательность отдельной субъединицы капсидного белка с радиусом пузырька пропорциональным числу считываний для этого варианта в соответствующей библиотеке. По оси y представлен процент от общего числа считываний для прогона секвенирования. Для простоты визуализации данные распределены вдоль оси x. Процент уменьшения уникальных клонов (96,5%) прямо показывает, что многочисленные “не соответствующие” (“un-fit”) последовательности были удалены после первого и второго раунда эволюции. Доминантные изоляты были выбраны для дальнейшего анализа.

Фиг. 2. Объемный выход AAV-векторов, содержащих белковые капсиды, содержащие варианты субъединиц капсидного белка STRD.101 и STRD.102, по сравнению с AAV9 дикого типа. Столбики означают среднее $\pm$ 95%-ный доверительный интервал (CI).

Фиг. 3. Показатели инфекционности AAV-STRD.101 и AAV9 дикого типа определяли с помощью стандартного анализа TCID₅₀. Данные представлены на графике в виде натурального log числа частиц, необходимого для генерации инфекционной единицы (Соотношение P:I). Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Фиг. 4А-4Г. Трансдукция клеток U87 (Фиг. 4А), клеток N2A (Фиг. 4Б), клеток Sy5Y (Фиг. 4В) и клеток U2OS (Фиг. 4Г) рекомбинантными AAV-векторами, содержащими субъединицу STRD.101 капсидного белка и упаковывающими люциферазный трансген, по сравнению с векторами AAV9 дикого типа, сходным образом упаковывающими последовательность люциферазы. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку.

Фиг. 5. Репрезентативные флуоресцентно-микроскопические изображения, демонстрирующие экспрессию tdTomato в коронарных вибротомных срезах через 24

часа после фиксации 4% PFA (параформальдегид). Толщина каждого среза составляет 25 мкм. На верхней панели представлены изображения нативной флуоресценции tdTomato, полученные с использованием линзы объектива 4X. На нижней панели представлены изображения нативной флуоресценции tdTomato, полученные с использованием линзы объектива 10X.

Фиг. 6. Репрезентативные иммуногистохимические изображения, показывающие экспрессию tdTomato в коронарных вибротомных срезах через 24 часа после фиксации 4% PFA. Толщина каждого среза составляет 25 мкм.

Фиг. 7. Репрезентативные флуоресцентно-микроскопические изображения, показывающие экспрессию tdTomato в вибротомных срезах печени через 24 часа после фиксации 4% PFA. Толщина каждого среза составляет 25 мкм. На панелях показана нативная флуоресценция tdTomato с контрастным окрашиванием DAPI (4',6-диамидин-2-фенилиндол).

Фиг. 8. Репрезентативные флуоресцентно-микроскопические изображения, показывающие экспрессию tdTomato в вибротомных срезах сердца через 24 часа после фиксации 4% PFA. Толщина каждого среза составляет 50 мкм. На панелях показана нативная флуоресценция tdTomato с контрастным окрашиванием DAPI.

Фиг. 9. Биораспределение рекомбинантных AAV у приматов, не являющихся человеком. Горизонтальная прямая показывает предел обнаружения.

На **Фиг. 10А** представлен график, показывающий лизосомальный фенотип, определенный путем измерения накопления LysoTracker[®], в клетках U2OS дикого типа; клетках U2OS, дефицитных по NPC1, (NPC1^{-/-}) и клетках NPC1^{-/-}, трансдуцированных AAV2-hNPC с множественностью заражения (MOI) 5x10³ или 10x10³. Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего теста ANOVA. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM).

На **Фиг. 10Б** представлен график, показывающий накопление холестерина, определенное с использованием окрашивания филипином, в клетках U2OS дикого типа, клетках U2OS, дефицитных по NPC1, (NPC1^{-/-}) и клетках NPC1^{-/-}, трансдуцированных AAV2-hNPC с множественностью заражения (MOI) 5x10³ или 10x10³. Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего теста ANOVA. Планки погрешностей представляют собой SEM.

На **Фиг. 11** представлена кривая выживаемости Каплана-Мейера, показывающая выживаемость мышей NPC1^{-/-} после ретроорбитальной инъекции солевым раствором

или AAV9-hNPC1. Все животные, инъецированные AAV9-hNPC1, выжили на протяжении эксперимента и были умерщвлены в возрасте примерно 100 суток для гистологического анализа.

На **Фиг. 12** представлена балльная оценка поведенческого фенотипа в возрасте примерно 10 недель (70 суток) мышей дикого типа; мышей NPC1^{-/-}, инъецированных солевым раствором, или мышей NPC1^{-/-}, инъецированных AAV9-hNPC1. Статистическую значимость определяли с использованием непарного Т-критерия, и планки погрешностей обозначают SEM.

На **Фиг. 13** представлено число соскальзываний в тесте прохождения по балансиру в возрасте примерно 8 недель (56 суток) мышей дикого типа; мышей NPC1^{-/-}, получавших солевой раствор, или мышей NPC1^{-/-}, получавших AAV9-hNPC1. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Здесь предложены рекомбинантные AAV-векторы, ускользающие от распознавания антителами и/или селективно направленные на ткани ЦНС (центральной нервной системы). Эти AAV-векторы могут быть полезны для лечения, предупреждения и/или устранения заболеваний, таких как NPC1.

AAV полезны в качестве агентов доставки генов и представляют собой мощные инструменты для генной терапии человека. С использованием AAV можно достичь доставки ДНК с высокой частотой и стабильной экспрессии в разнообразных клетках как *in vivo*, так и *in vitro*. В отличие от других вирусных векторных систем AAV не требует активного деления клеток для стабильной интеграции в клетки-мишени.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такие же значения, как обычно понимает специалист средней квалификации в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Терминология, используемая здесь в подробном описании изобретения, предназначена исключительно для описания определенных воплощений и не предназначена ограничивать объем настоящего изобретения.

Все публикации, заявки на патент, патенты, номера доступа в базе GenBank или в других, а также другие ссылки, упоминаемые здесь, включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех задач.

Обозначение положений аминокислот в субъединицах капсидного белка AAV в описании и прилагаемой формуле настоящего изобретения приведено в соответствии с

нумерацией VP1. Специалист в данной области техники понимает, что описанные здесь модификации, если они включены в ген *cap* AAV, могут приводить к модификациям в областях VP1, VP2 и/или VP3. Альтернативно, VP1, VP2 и/или VP3 могут экспрессироваться независимо для достижения модификации только в одном или двух из этих участков (VP1, VP2, VP3, VP1+VP2, VP1+VP3 или VP2+VP3).

Определения

Следующие термины используют здесь в описании и прилагаемой формуле изобретения.

Формы существительных единственного числа предназначены также включать формы множественного числа, если контекст явно не указывает иное.

Кроме того, подразумевают, что термин “примерно”, как его используют здесь, в отношении измеряемой величины, такой как значение длины полинуклеотидной или полипептидной последовательности, доза, время, температура и тому подобное, предназначен охватывать разброс $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$ или даже $\pm 0,1\%$ от указанного значения.

Также, как его используют здесь, выражение “и/или” относится к любым и всем возможным комбинациям одного или более чем одного из связанных перечисленных пунктов, а также к отсутствию комбинаций, когда его интерпретируют как альтернативу (“или”), и охватывает таковые.

Если в контексте не указано иное, конкретно подразумевается, что различные признаки, описанные здесь, можно использовать в любой комбинации. Кроме того, в некоторых воплощениях любой признак или комбинация признаков, изложенный(ая) здесь, может быть исключен(а) или не включен(а). Для дополнительной иллюстрации, если например в материалах заявки указано, что определенная аминокислота может быть выбрана из A, G, I, L и/или V, это выражение также указывает, что эта аминокислота может быть выбрана из любого подмножества этих аминокислот, например A, G, I или L; A, G, I или V; A или G; только L и так далее, как если бы каждая такая субкомбинация была специально изложена здесь. Кроме того, такое выражение также указывает, что одна или более чем одна из указанных аминокислот может быть исключена. Например, в некоторых воплощениях аминокислота не является A, G или I; не является A; не является G или V; и так далее, как если бы каждое такое возможное исключение было специально изложено здесь.

Как их используют здесь, термины “уменьшать”, “уменьшает”, “уменьшение” и подобные термины обозначают уменьшение по меньшей мере примерно на 10%, примерно на 15%, примерно на 20%, примерно на 25%, примерно на 35%, примерно на 50%, примерно на 75%, примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 97% или более.

Как их используют здесь, термины “увеличивать”, “улучшать”, “усиливать”, “усиливает”, “усиление” и подобные термины обозначают увеличение по меньшей мере примерно на 10%, примерно на 15%, примерно на 20%, примерно на 25%, примерно на 50%, примерно на 75%, примерно на 100%, примерно на 150%, примерно на 200%, примерно на 300%, примерно на 400%, примерно на 500% или более.

Термин “парвовирус”, как его используют здесь, охватывает семейство Parvoviridae, включая автономно реплицирующиеся парвовирусы и депендовирусы. Автономные парвовирусы включают представителей родов *Protoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Bocaparvovirus* и подсемейства *Densovirus*. Примеры автономных парвовирусов включают “минут-вирус” мыши, бычий парвовирус, парвовирус собак, парвовирус кур, вирус панлейкопении кошек, парвовирус кошек, парвовирус гусей, парвовирус H1, парвовирус мускусной утки, вирус B19 и любой другой автономный парвовирус, известный в настоящее время или который будет открыт позже, но не ограничиваясь ими. Специалисту в данной области техники известны другие автономные парвовирусы. См., например, BERNARD N. FIELDS et al, VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers; Cotmore *et al.* Archives of Virology DOI 10.1007/s00705-013-1914-I).

Как его используют здесь, термин “аденоассоциированный вирус” (AAV) включает AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAV типа rh32.33, AAV типа rh8, AAV типа rh10, AAV типа rh74, AAV типа hu.68, птичий AAV, бычий AAV, AAV собак, AAV лошадей, овечий AAV, AAV змей, AAV бородатой ящерицы, AAV2i8, AAV2g9, AAV-LK03, AAV7m8, AAV Anc80, AAV PHP.B и любой другой AAV, известный в настоящее время или который будет открыт позже, не ограничиваясь ими. См., например, BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers). Было идентифицировано несколько серотипов и клад AAV (см., например, Gao et al, (2004) J. Virology 78:6381-6388; Moris et al, (2004) Virology 33:375-383; и

Таблица 2). Примеры последовательностей субъединиц капсидного белка AAV для AAV1-9, AAVrh.10 и AAV11 представлены в SEQ ID NO: 1-11.

Как его используют здесь, термин “химерный AAV” относится к AAV, содержащему белковый капсид, содержащий субъединицы капсидного белка с участками, доменами, индивидуальными аминокислотами, которые имеют происхождение из двух или более чем двух различных серотипов AAV. В некоторых воплощениях химерный AAV содержит субъединицу капсидного белка, состоящую из первого участка, который происходит из первого серотипа AAV, и второго участка, который происходит из второго серотипа AAV. В некоторых воплощениях химерный AAV содержит субъединицу капсидного белка, состоящую из первого участка, который происходит из первого серотипа AAV, второго участка, который происходит из второго серотипа AAV, и третьего участка, который происходит из третьего серотипа AAV. В некоторых воплощениях химерный AAV может содержать участки, домены, индивидуальные аминокислоты, имеющие происхождение из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и/или AAV12. Например, химерный AAV может включать участки, домены и/или индивидуальные аминокислоты из первого и второго серотипа AAV, как показано ниже (Таблица 1), где AAVX+Y обозначает химерный AAV, включающий последовательности, происходящие из AAVX и AAVY:

ТАБЛИЦА 1: Химерные AAV

	Второй AAV серотип												
		AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9	AAV10	AAV11	AAV12
Первый AAV серотип	AAV1	х	AAV1+2	AAV1+3	AAV1+4	AAV1+5	AAV1+6	AAV1+7	AAV1+8	AAV1+9	AAV1+10	AAV1+11	AAV1+12
	AAV2	AAV2+1	х	AAV2+3	AAV2+4	AAV2+5	AAV2+6	AAV2+7	AAV2+8	AAV2+9	AAV2+10	AAV2+11	AAV2+12
	AAV3	AAV3+1	AAV3+2	х	AAV3+4	AAV3+5	AAV3+6	AAV3+7	AAV3+8	AAV3+9	AAV3+10	AAV3+11	AAV3+12
	AAV4	AAV4+1	AAV4+2	AAV4+3	х	AAV4+5	AAV4+6	AAV4+7	AAV4+8	AAV4+9	AAV4+10	AAV4+11	AAV4+12
	AAV5	AAV5+1	AAV5+2	AAV5+3	AAV5+4	х	AAV5+6	AAV5+7	AAV5+8	AAV5+9	AAV5+10	AAV5+11	AAV5+12
	AAV6	AAV6+1	AAV6+2	AAV6+3	AAV6+4	AAV6+5	х	AAV6+7	AAV6+8	AAV6+9	AAV6+10	AAV6+11	AAV6+12
	AAV7	AAV7+1	AAV7+2	AAV7+3	AAV7+4	AAV7+5	AAV7+6	х	AAV7+8	AAV7+9	AAV7+10	AAV7+11	AAV7+12
	AAV8	AAV8+1	AAV8+2	AAV8+3	AAV8+4	AAV8+5	AAV8+6	AAV8+7	х	AAV8+9	AAV8+10	AAV8+11	AAV8+12
	AAV9	AAV9+1	AAV9+2	AAV9+3	AAV9+4	AAV9+5	AAV9+6	AAV9+7	AAV9+8	х	AAV9+10	AAV9+11	AAV9+12
	AAV10	AAV10+1	AAV10+2	AAV10+3	AAV10+4	AAV10+5	AAV10+6	AAV10+7	AAV10+8	AAV10+9	х	AAV10+11	AAV10+12
	AAV11	AAV11+1	AAV11+2	AAV11+3	AAV11+4	AAV11+5	AAV11+6	AAV11+7	AAV11+8	AAV11+9	AAV11+10	х	AAV11+12
	AAV12	AAV12+1	AAV12+2	AAV12+3	AAV12+4	AAV12+5	AAV12+6	AAV12+7	AAV12+8	AAV12+9	AAV12+10	AAV12+11	х

Путем включения индивидуальных аминокислот или участков из множества серотипов AAV в одну субъединицу капсидного белка можно получить субъединицы капсидного белка, обладающие множеством желаемых свойств, которые по отдельности имеют происхождение из множества серотипов AAV.

Геномные последовательности различных серотипов AAV и автономных парвовирусов, а также последовательности нативных концевых повторов (TR), белков Rep и субъединиц капсидного белка известны в данной области техники. Такие последовательности можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. См., например, номера доступа в GenBank NC_002077, NC_001401, NC_001729, NC_001863, NC_001829, NC_001862, NC_000883, NC_001701, NC_001510, NC_006152, NC_006261, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC_001358, NC_001540, AF513851, AF513852, AY530579; описания которых включены в данное описание посредством ссылки для предоставления информации о парвовирусе и последовательностях нуклеиновых кислот и аминокислотных последовательностях AAV. Также см., например, Srivistava et al., (1983) J. Virology 45:555; Chiorini et al., (1998) J Virology 71:6823; Chiorini et al., (1999) J. Virology 73: 1309; Bantel-Schaal et al., (1999) J Virology 73:939; Xiao et al, (1999) J Virology 73:3994; Muramatsu et al., (1996) Virology 221:208; Shade et al, (1986) J. Virol. 58:921; Gao et al, (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:11854; Moris et al, (2004) Virology 33:375-383; публикации международных заявок WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; и патент США No. 6156303; описания которых включены в данное описание посредством ссылки для предоставления информации о парвовирусе и последовательностях нуклеиновых кислот и аминокислотных последовательностях AAV. Также см. Таблицу 2. Структуры белкового капсида автономных парвовирусов и AAV описаны более подробно в BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, том 2, главы 69 & 70 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers). Также см. описание кристаллической структуры AAV2 (Xie et al., (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. 99: 10405-10), AAV9 (DiMattia et al., (2012) J. Virol. 86:6947-6958), AAV8 (Nam et al, (2007) J. Virol. 81: 12260-12271), AAV6 (Ng et al., (2010) J. Virol. 84:12945-12957), AAV5 (Govindasamy et al. (2013) J. Virol. 87, 11187-11199), AAV4 (Govindasamy et al. (2006) J. Virol. 80:11556-11570), AAV3B (Lerch et al., (2010) Virology 403:26-36), BPV (Kailasan et al., (2015) J. Virol. 89:2603-2614) и CPV (Xie et al, (1996) J. Mol. Biol. 6:497-520 и Tsao et al, (1991) Science 251:1456-64).

ТАБЛИЦА 2: Серотипы и клады AAV

	Номер доступа GenBank		Номер доступа GenBank		Номер доступа GenBank
Полные геномы		Клада C		Rh57	AY530569
Аденоассоциированный вирус 1	NC_002077, AF063497	Hu9	AY530629	Rh50	AY530563
Аденоассоциированный вирус 2	NC_001401	Hu10	AY530576	Rh49	AY530562
Аденоассоциированный вирус 3	NC_001729	Hu11	AY530577	Hu39	AY530601
Аденоассоциированный вирус 3В	NC_001863	Hu53	AY530615	Rh58	AY530570
Аденоассоциированный вирус 4	NC_001829	Hu55	AY530617	Rh61	AY530572
Аденоассоциированный вирус 5	Y18065, AF085716	Hu54	AY530616	Rh52	AY530565
Аденоассоциированный вирус 6	NC_001862	Hu7	AY530628	Rh53	AY530566
Птичий AAV ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828	Hu18	AY530583	Rh51	AY530564
Птичий AAV штамм DA-1	NC_006263, AY629583	Hu15	AY530580	Rh64	AY530574
Бычий AAV	NC_005889, AY388617, AAR26465	Hu16	AY530581	Rh43	AY530560
AAV11	AAT46339, AY631966	Hu25	AY530591	AAV8	AF513852
AAV12	ABI16639, DQ813647	Hu60	AY530622	Rh8	AY242997
Клада A		Ch5	AY243021	Rh1	AY530556
AAV1	NC_002077, AF063497	Hu3	AY530595	Клада F	
AAV6	NC_001862	Hu1	AY530575	Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu.48	AY530611	Hu4	AY530602	Hu31	AY530596
Hu 43	AY530606	Hu2	AY530585	Hu32	AY530597
Hu 44	AY530607	Hu61	AY530623	HSC1	MI332400.1
Hu 46	AY530609	Клада D		HSC2	MI332401.1
Клада B		Rh62	AY530573	HSC3	MI332402.1
Hu. 19	AY530584	Rh48	AY530561	HSC4	MI332403.1

Hu. 20	AY530586	Rh54	AY530567	HSC5	MI332405.1
Hu 23	AY530589	Rh55	AY530568	HSC6	MI332404.1
Hu22	AY530588	Cy2	AY243020	HSC7	MI332407.1
Hu24	AY530590	AAV7	AF513851	HSC8	MI332408.1
Hu21	AY530587	Rh35	AY243000	HSC9	MI332409.1
Hu27	AY530592	Rh37	AY242998	HSC11	MI332406.1
Hu28	AY530593	Rh36	AY242999	HSC12	MI332410.1
Hu 29	AY530594	Cy6	AY243016	HSC13	MI332411.1
Hu63	AY530624	Cy4	AY243018	HSC14	MI332412.1
Hu64	AY530625	Cy3	AY243019	HSC15	MI332413.1
Hu13	AY530578	Cy5	AY243017	HSC16	MI332414.1
Hu56	AY530618	Rh13	AY243013	HSC17	MI332415.1
Hu57	AY530619	Клада E		Hu68	
Hu49	AY530612	Rh38	AY530558	Клональный изолят	
Hu58	AY530620	Hu66	AY530626	AAV5	Y18065, AF085716
Hu34	AY530598	Hu42	AY530605	AAV 3	NC_001729
Hu35	AY530599	Hu67	AY530627	AAV 3B	NC_001863
AAV2	NC_001401	Hu40	AY530603	AAV4	NC_001829
Hu45	AY530608	Hu41	AY530604	Rh34	AY243001
Hu47	AY530610	Hu37	AY530600	Rh33	AY243002
Hu51	AY530613	Rh40	AY530559	Rh32	AY243003
Hu52	AY530614	Rh2	AY243007	Другие	
Hu T41	AY695378	Bb1	AY243023	Rh74	
Hu S17	AY695376	Bb2	AY243022	AAV бородатой ящерицы	
Hu T88	AY695375	Rh10	AY243015	AAV змеи	NC_006148.1
Hu T71	AY695374	Hu17	AY530582		
Hu T70	AY695373	Hu6	AY530621		
Hu T40	AY695372	Rh25	AY530557		
Hu T32	AY695371	Pi2	AY530554		
Hu T17	AY695370	Pi1	AY530553		
Hu LG15	AY695377	Pi3	AY530555		

Рекомбинантные AAV-векторы (гAAV) можно получить в культуре с помощью клеточных линий, продуцирующих вирусы. Термины “клетка, продуцирующая вирус”, “клеточная линия, продуцирующая вирус” или “клетка-продуцент вируса” относятся к клеткам, используемым для продукции вирусных векторов. Клетки HEK293 и 293T представляют собой клеточные линии, обычно используемые для продукции вирусов. В Таблице 3 ниже перечислены примеры клеточных линий, продуцирующих вирусы, для различных вирусных векторов. Для продукции гAAV обычно необходимо присутствие трех элементов в клетке: 1) трангена, фланкированного последовательностями инвертированного концевых повтора AAV (ITR), 2) генов гер и сар AAV и 3) последовательностей белков вируса-помощника. Эти три элемента могут быть предоставлены на одной или более чем одной плазмиде, и клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована ими.

Таблица 3: Примеры клеточных линий, продуцирующих вирусы

Вирусный вектор	Примеры клеточной(ых) линии(й), продуцирующей(их) вирусы
Аденовирус	HEK293, 911, pTG6559, PER.C6, GH329, N52.E6, HeLa-E1, UR, VLI-293
Аденоассоциированный вирус (AAV)	HEK293, Sf9
Ретровирус	HEK293
Лентивирус	293T

Термин “HEK293” относится к клеточной линии, изначально полученной из эмбриональных клеток почки человека, выращенных в тканевой культуре. Клеточная линия HEK293 хорошо растет в культуре, и ее обычно используют для продукции вирусов. Как его используют здесь, термин “HEK293” также может относиться к одному или более чем одному варианту клеточных линий HEK293, то есть, клеточных линий, имеющих происхождение от исходной клеточной линии HEK293, которые дополнительно содержат одно или более чем одно генетическое изменение. Много вариантов линий HEK293 было разработано и оптимизировано для одного или более чем одного конкретного применения. Например, клеточная линия 293T содержит большой Т-антиген SV40, который делает возможной эписомальную репликацию трансфицированных плазмид, содержащих ориджин репликации SV40, приводя к повышенной экспрессии желаемых генных продуктов.

Термин “Sf9” относится к клеточной линии насекомых, которая представляет собой клональный изолят, имеющий происхождение от родительской клеточной линии

Spodoptera frugiperda IPLB-Sf-21-AE. Клетки Sf9 можно выращивать в отсутствие сыворотки и можно культивировать прикрепленными или в суспензии.

Термин “реагент для трансфекции” означает композицию, которая усиливает перенос нуклеиновой кислоты в клетки. Некоторые реагенты трансфекции, обычно используемые в данной области техники, включают один или более чем один липид, который связывается с нуклеиновыми кислотами и с клеточной поверхностью (например, LipofectamineTM).

Как его используют здесь, термин “множественность заражения” или “MOI” относится к числу вирионов, контактирующих с клеткой. Например, культивируемые клетки могут контактировать с AAV с MOI в диапазоне от 1×10^2 до 1×10^5 вирионов на клетку.

Термин “самокомплементарный AAV” или “scAAV” относится к рекомбинантному AAV-вектору, содержащему нуклеиновую кислоту (то есть, ДНК), которая образует димерную молекулу инвертированного повтора, которая спонтанно отжигается, приводя к более ранней и более массивной экспрессии трансгена по сравнению с традиционными одноцепочечными (ss) геномами AAV. См., например, McCarty, D.M., et al., *Gene Therapy* 8, 1248-1254 (2001). В отличие от традиционного ssAAV, scAAV может обходить синтез второй цепи, этап, ограничивающий скорость экспрессии генов. Кроме того, двухцепочечный scAAV менее склонен к разрушению ДНК после трансдукции вируса, что таким образом увеличивает число копий стабильных эписом. Примечательно, что обычно scAAV может нести геном, состоящий только примерно из 2,4 т.о., половины традиционного AAV-вектора. В некоторых воплощениях описанные здесь AAV-векторы представляют собой самокомплементарные AAV.

Как его используют здесь, термин “пептид” относится к короткой аминокислотной последовательности. Термин “пептид” можно использовать для отсылки на часть или участок аминокислотной последовательности субъединицы капсидного белка AAV. Пептид может представлять собой пептид, который в природе присутствует в нативном капсидном белке AAV, или пептид, который не встречается в природе в нативном капсидном белке AAV. Природные пептиды AAV в капсидном белке AAV могут быть заменены на не встречающиеся в природе пептиды. Например, можно произвести замену в капсидном белке AAV на не встречающийся в природе

пептид для обеспечения модифицированного капсидного белка, так что природный пептид заменен на не встречающийся в природе пептид.

Термин “тропизм”, как его используют здесь, относится к предпочтительному пути входа вируса в определенные клетки или ткани, возможно с последующей экспрессией (например, транскрипцией и, возможно, трансляцией) последовательности(ей), заключенной(ых) в вирусном геноме, в клетке, например, для рекомбинантного вируса, экспрессией интересующего трансгена.

Как их используют здесь, термины “системный тропизм” и “системная трансдукция” (и эквивалентные термины) указывают на то, что вирусный вектор или вирусоподобная частица, как описано здесь, проявляет тропизм в отношении тканей всего организма (например, мозга, легкого, скелетной мышцы, сердца, печени, почки и/или поджелудочной железы) или трансдуцирует таковые, соответственно. В некоторых воплощениях достигается системная трансдукция мышечных тканей (например, скелетной мышцы, диафрагмы и сердечной мышцы). В некоторых воплощениях достигается системная трансдукция тканей скелетной мускулатуры. Например, в некоторых воплощениях по существу все скелетные мышцы всего организма трансдуцированы (хотя эффективность трансдукции может варьировать в зависимости от типа мышц). В некоторых воплощениях достигается системная трансдукция мышц конечностей, сердечной мышцы и мышцы диафрагмы. Возможно, вирусный вектор или вирусоподобную частицу вводят системным путем (например, таким системным путем как внутривенный, внутрисуставной или внутрилимфатический).

Альтернативно, в некоторых воплощениях вирусный вектор или вирусоподобную частицу доставляют локально (например, в подушечку стопы, внутримышечно, внутрикожно, подкожно, местно). В некоторых воплощениях вирусный вектор или вирусоподобную частицу доставляют локально в ткань центральной нервной системы (ЦНС), такую как головной мозг или спинной мозг. В некоторых воплощениях вирусный вектор или вирусоподобную частицу вводят путем интратекальной, интрацеребральной или интрацеребровентрикулярной инъекции.

Если не указано иное, “эффективную трансдукцию”, или “эффективный тропизм”, или подобные понятия можно определить относительно соответствующего контроля (например, по меньшей мере примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95% или большая степень

трансдукции или тропизма относительно контроля). В некоторых воплощениях вирусный вектор (например AVV-вектор) эффективно трансдуцирует или обладает эффективным тропизмом в отношении скелетной мышцы, сердечной мышцы, мышцы диафрагмы, поджелудочной железы (включая клетки β -островков), селезенки, желудочно-кишечного тракта (например, эпителия и/или гладкой мышцы), клеток центральной нервной системы, легкого, клеток суставов и/или почки. Соответствующие контроли будут зависеть от разнообразных факторов, включая желаемый профиль тропизма. Например, AAV8 и AAV9 являются высокоэффективными в трансдуцировании скелетной мышцы, сердечной мышцы и мышцы диафрагмы, но имеют недостаток в том, что также с высокой эффективностью трансдуцируют печень. Таким образом, можно идентифицировать вирусные векторы AAV8 или AAV9, демонстрирующие эффективную трансдукцию скелетной, сердечной мышц и/или мышцы диафрагмы, но со значительно меньшей эффективностью трансдукции печени. Кроме того, поскольку интересующий профиль тропизма может отражать тропизм в отношении множества тканей-мишеней, имеет значение, чтобы соответствующий вирусный вектор мог представлять собой некоторый компромисс. Для иллюстрации, вирусный вектор может быть менее эффективен, чем AAV8 или AAV9, в трансдуцировании скелетной мышцы, сердечной мышцы и/или мышцы диафрагмы, но тем не менее из-за низкого уровня трансдукции печени может быть очень желательным.

Сходным образом можно определить то, что вирус “не эффективно трансдуцирует”, или “не имеет эффективного тропизма” к определенной ткани, или подобные выражения, по отношению к соответствующему контролю. В некоторых воплощениях вирусный вектор не трансдуцирует эффективно (то есть, не имеет эффективного тропизма) печень, почки, половые железы и/или половые клетки. В некоторых воплощениях нежелательная трансдукция ткани(ей) (например, печени) составляет примерно 20% или менее, примерно 10% или менее, примерно 5% или менее, примерно 1% или менее, примерно 0,1% или менее от уровня трансдукции желаемой(ых) ткани(ей)-мишени(ей) (например, скелетной мышцы, мышцы диафрагмы, сердечной мышцы и/или клеток центральной нервной системы).

Как их используют здесь в связи с AAV-вектором (или его белковым капсидом, субъединицей капсидного белка или пептидом), термины “селективно связывается”, “селективное связывание” и подобные термины относятся к связыванию AAV-вектора

(или белкового капсида, субъединицы капсидного белка или ее пептида) с мишенью способом, зависимым от присутствия определенной молекулярной структуры. В некоторых воплощениях селективное связывание относится к связыванию AAV преимущественно с определенной мишенью без существенного или значительного связывания с другими мишенями. В некоторых воплощениях AAV-вектор (или его белковый капсид, субъединица капсидного белка или пептид) специфически связывается с рецептором в интересующей клетке или ткани, но не демонстрирует существенного или значительного связывания с другими рецепторами.

Термин “полинуклеотид” означает последовательность нуклеотидных оснований, и она может представлять собой последовательности РНК, ДНК или гибрида ДНК-РНК (включая как природные, так и не встречающиеся в природе нуклеотиды). В некоторых воплощениях полинуклеотид представляет собой либо одноцепочечную, либо двухцепочечную последовательность ДНК.

Как его используют здесь, термин “выделенный” в отношении полинуклеотида (например, “выделенная ДНК” или “выделенная РНК”) означает полинуклеотид, по меньшей мере частично отделенный от по меньшей мере некоторых других компонентов природного организма или вируса, например, структурных компонентов клетки или вируса или других полипептидов или нуклеиновых кислот, которые обычно обнаруживают ассоциированными с этим полинуклеотидом. В некоторых воплощениях “выделенный” нуклеотид обогащен по меньшей мере примерно в 10 раз, примерно в 100 раз, примерно в 1000 раз, примерно в 10000 раз или более по сравнению с исходным материалом.

Аналогичным образом, термин “выделенный” в отношении полипептида означает полипептид, который по меньшей мере частично отделен от по меньшей мере некоторых других компонентов природного организма или вируса, например, структурных компонентов клетки или вируса или других полипептидов или нуклеиновых кислот, которые обычно обнаруживают ассоциированными с полипептидом. В некоторых воплощениях “выделенный” полипептид обогащен по меньшей мере примерно в 10 раз, примерно в 100 раз, примерно в 1000 раз, примерно в 10000 раз или более по сравнению с исходным материалом.

Как их используют здесь, термины “выделять” или “очищать” (или их грамматические эквиваленты) в отношении вирусного вектора означают по меньшей мере частичное отделение вирусного вектора от по меньшей мере некоторых других

компонентов исходного материала. В некоторых воплощениях “выделенный” или “очищенный” вирусный вектор обогащен по меньшей мере примерно в 10 раз, примерно в 100 раз, примерно в 1000 раз, примерно в 10000 раз или более по сравнению с исходным материалом.

“Терапевтический” полипептид или белок представляет собой полипептид или белок, способный облегчать, уменьшать, предупреждать, замедлять и/или стабилизировать симптомы, возникающие из-за отсутствия или дефекта белка в клетке или у субъекта, и/или представляет собой полипептид, который иным образом обеспечивает полезное действие субъекту, например, обладает противораковым действием или улучшает приживаемость трансплантата.

Под терминами “лечить”, “лечащий” или “лечение” (и их грамматическими вариантами) понимают уменьшение, по меньшей мере частичное улучшение или стабилизацию тяжелого состояния субъекта, и/или достижение некоторого облегчения, смягчения, уменьшения или стабилизации по меньшей мере одного клинического симптома, и/или отсрочку прогрессирования заболевания или расстройства.

Термины “предупреждать”, “предупреждающий” и “предупреждение” (и их грамматические варианты) относятся к предупреждению и/или отсрочке начала заболевания, расстройства и/или клинического(их) симптома(ов) у субъекта и/или уменьшению тяжести начала заболевания, расстройства и/или клинического(их) симптома(ов) относительно состояния при отсутствии описанных здесь композиций и/или способов. Предупреждение может быть полным, например, полное отсутствие заболевания, расстройства и/или клинического(их) симптома(ов). Также предупреждение может быть частичным, так что появление заболевания, расстройства и/или клинического(их) симптома(ов) у субъекта и/или тяжесть начала легче относительно состояния при отсутствии описанных здесь композиций и/или способов.

Как его используют здесь, термин “эффективное количество” означает количество AAV-вектора, нуклеиновой кислоты или другого агента, предложенного здесь, которое является эффективным для лечения или предупреждения заболевания или расстройства у субъекта или для облегчения его признака или симптома. “Эффективное количество” может варьировать, например, в зависимости от заболевания и/или симптомов заболевания, тяжести заболевания и/или симптомов заболевания или расстройства, возраста, массы и/или здоровья пациента, которого лечат, и оценки лечащего врача, делающего назначение. В каждом конкретном случае

подходящее количество может быть определено специалистом в данной области техники или может допускаться определение путем рутинного экспериментирования.

Как их используют здесь, термины “вирусный вектор”, “вектор” относятся к вирусной (например, AAV) частице, которая функционирует как носитель для доставки нуклеиновой кислоты и которая содержит векторный геном (например, нуклеиновую кислоту, содержащую трансген), упакованный в вирион или вирусоподобную частицу.

“Вектор на основе аденоассоциированного вируса ” или “AAV-вектор” обычно содержит белковый капсид и нуклеиновую кислоту (например нуклеиновую кислоту, содержащую трансген), инкапсидированную в белковый капсид. Термин “белковый капсид” означает почти сферическую белковую оболочку, содержащую отдельные “субъединицы капсидного белка” (например, примерно 60 субъединиц капсидного белка), связанные и организованные с T=1 икосаэдральной симметрией. Белковые капсиды описанных здесь AAV-векторов содержат множество субъединиц капсидного белка. Когда AAV-вектор описан как содержащий субъединицу капсидного белка AAV, следует понимать, что AAV-вектор содержит белковый капсид, где белковый капсид содержит одну или более чем одну субъединицу капсидного белка AAV. Как его используют здесь, термин “капсидный белок” иногда применяют для ссылки на субъединицу капсидного белка. Термин “частица, подобная вирусу” или “вирусоподобная частица” относится к белковому капсиду, который не содержит какого-либо векторного генома или нуклеиновой кислоты, содержащей кассету для переноса или трансгена.

В некоторых воплощениях AAV-вектор может содержать нуклеиновую кислоту, содержащую “кассету для переноса”, то есть, нуклеиновую кислоту, содержащую одну или более чем одну последовательность, которая может быть доставлена в клетку с помощью AAV. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота является самокомплементарной (то есть, двухцепочечной). В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота не является самокомплементарной (то есть, является одноцепочечной).

Термины “векторный геном гAAV” или “геном гAAV” означают геном AAV (то есть, вДНК (вирусная ДНК)), который содержит одну или более чем одну гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты. Обычно гAAV-векторы требуют только инвертированного(ных) концевых(ых) повтора(ов) (ITR) в *цис*-положении для активации репликации нуклеиновой кислоты. Все другие вирусные

последовательности являются необязательными и могут быть представлены в *транс*-положении (Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97). Обычно, векторный геном гAAV сохраняет только одну или две последовательности ITR с тем, чтобы максимально увеличить размер трансгена, который можно эффективно упаковать в AAV-вектор. Последовательности, кодирующие структурные и неструктурные белки, могут быть предоставлены в *транс*-положении (например, на плазмиде, или путем стабильной интеграции последовательностей в упаковывающую клетку). В некоторых воплощениях векторный геном гAAV содержит по меньшей мере одну последовательность ITR (например, последовательность ITR AAV), возможно два ITR (например, два ITR AAV), которые обычно находятся на 5' и 3'-концах векторного генома (то есть, 5'-ITR и 3'-ITR) и фланкируют гетерологичную нуклеиновую кислоту, но не обязательно непосредственно прилегают к ней.

Описанные здесь вирусные векторы могут дополнительно быть “нацеленными” вирусными векторами (например, имеющими направленный тропизм) и/или “гибридными” вирусными векторами (то есть такими, у которых вирусные ITR и вирусный белковый капсид происходят от различных вирусов), как описано в публикации международной заявки WO00/28004 и Chao et al, (2000) Molecular Therapy 2:619. В некоторых воплощениях вирусные векторы нацелены на клетку и/или ткань ЦНС.

Описанные здесь вирусные векторы дополнительно могут представлять собой дуплексные вирусные частицы, описанные в публикации международной заявки WO 01/92551 (содержание которой включено в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте). Следовательно, в некоторых воплощениях двухцепочечные (дуплексные) геномы могут быть упакованы в вирусные белковые капсиды, описанные здесь. Кроме того, белковый капсид, субъединицы белкового капсида или геномные элементы могут содержать другие модификации, включая вставки, делеции и/или замены.

Как его используют здесь, термин “аминокислота” охватывает любую природную аминокислоту, ее модифицированные формы и синтетические аминокислоты. Природные левовращающие (L-) аминокислоты представлены в Таблице 4.

ТАБЛИЦА 4: Аминокислотные остатки и аббревиатуры

Аминокислотный остаток	Аббревиатура	
	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота (аспартат)	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота (глутамат)	Glu	E
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

Альтернативно, аминокислота может представлять собой остаток модифицированной аминокислоты (неограничивающие примеры представлены в Таблице 5) и/или может представлять собой аминокислоту, модифицированную путем посттрансляционной модификации (например ацетилирования, амидирования, формилирования, гидроксилирования, метилирования, фосфорилирования или сульфатирования). Способы химической модификации аминокислот известны в данной области техники (см., например, Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 1st edition, Academic Press, 1996).

ТАБЛИЦА 5: Модифицированные аминокислотные остатки

Модифицированный аминокислотный остаток	Аббревиатура
Производные аминокислотных остатков	
2-Аминоадипиновая кислота	Aad
3-Аминоадипиновая кислота	bAad
бета-аланин, бета-Аминопропионовая кислота	bAla
2-Аминомасляная кислота	Abu
4-Аминомасляная кислота, Пиперидиновая кислота	4Abu
6-Аминокапроновая кислота	Acp
2-Аминогептановая кислота	Ahe
2-Аминоизомасляная кислота	Aib
3-Аминоизомасляная кислота	bAib
2-Аминопимелиновая кислота	Apm
t-бутилаланин	t-BuA
Цитруллин	Cit
Циклогексилаланин	Cha
2,4-Диаминомасляная кислота	Dbu
Десмозин	Des
2,21-Диаминопимелиновая кислота	Dpm
2,3-Диаминопропионовая кислота	Dpr
N-Этилглицин	EtGly
N-Этиласпарагин	EtAsn
Гомоаргинин	hArg
Гомоцистеин	hCys
Гомосерин	hSer
Гидроксилизин	Hyl
Алло-гидроксилизин	aHyl
3-Гидроксипролин	3Hyp
4-Гидроксипролин	4Hyp
Иодесмозин	Ide
Алло-Изолейцин	alle
Метионин сульфоксид	MSO
N-Метилглицин, саркозин	MeGly
N-Метилизолейцин	Melle
6-N-Метиллизин	MeLys
N-Метилвалин	MeVal
2-Нафтилаланин	2-Nal
Норвалин	Nva

Норлейцин	Nle
Орнитин	Orn
4-Хлорфенилаланин	Phe(4-Cl)
2-Фторфенилаланин	Phe(2-F)
3-Фторфенилаланин	Phe(3-F)
4-Фторфенилаланин	Phe(4-F)
Фенилглицин	Phg
Бета-2-тиенилаланин	Thi

Кроме того, не встречающаяся в природе аминокислота может представлять собой “неприродную” аминокислоту (как описано Wang et al., Annu Rev Biophys Biomol Struct. 35:225-49 (2006)). Эти неприродные аминокислоты можно использовать преимущественно для химического связывания интересующих молекул с белковым капсидом или субъединицей капсидного белка AAV.

Модифицированные субъединицы белкового капсида, белковые капсиды AAV и содержащие их AAV-векторы

AAV-векторы

Дополнительно здесь предложены векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), содержащие (1) белковый капсид, содержащий рекомбинантные субъединицы капсидного белка, и (2) кассету для переноса, инкапсидированную в белковый капсид. В некоторых воплощениях рекомбинантные субъединицы капсидного белка (включая участки VP1, VP2 и/или VP3) могут содержать в своей аминокислотной последовательности пептид, который не встречается ни в одной из природных последовательностей субъединиц капсидного белка AAV. Субъединицы капсидного белка, содержащие описанные здесь пептиды, могут придавать вирусным векторам одно или более чем одно желаемое свойство, включая без ограничения способности избегать нейтрализующие антитела. Следовательно, описанные здесь AAV-векторы позволяют преодолеть ограничения, связанные с традиционными AAV-векторами.

Соответственно, в некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), содержащие (1) один или более чем один рекомбинантный капсидный белок и (2) кассету для переноса, инкапсидированную в белковый капсид; где капсидный белок содержит пептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 12-20. В некоторых воплощениях

кассета для переноса содержит 5'- и 3'-инвертированный концевой повтор AAV. В некоторых воплощениях кассета для переноса содержит трансген (например трансген NPC1). В некоторых воплощениях кассета для переноса является двухцепочечной. В некоторых воплощениях кассета для переноса является одноцепочечной. В некоторых воплощениях трансген кодирует терапевтический белок или РНК. В некоторых воплощениях последовательность рекомбинантного капсидного белка по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична нативной последовательности капсидного белка AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, бычьего AAV или птичьего AAV. В некоторых воплощениях последовательность рекомбинантного капсидного белка по меньшей мере на 90% идентична последовательности капсидного белка нативного AAV9.

В некоторых воплощениях пептид расположен в положениях аминокислот, соответствующих аминокислотам 451-458 субъединицы капсидного белка нативного AAV9 или эквивалентных аминокислотных остатков AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, бычьего AAV или птичьего AAV, и пептид выбран из любой из SEQ ID NO: 12-18. В некоторых воплощениях пептид расположен в положениях аминокислот, соответствующих аминокислотам 587-594 субъединицы капсидного белка нативного AAV9 или эквивалентных аминокислотных остатков AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, бычьего AAV или птичьего AAV, и пептид выбран из SEQ ID NO: 19 или 20.

В некоторых воплощениях рекомбинантная субъединица капсидного белка содержит: а) первый пептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 12-18, и б) второй пептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 19-20. В некоторых воплощениях первый пептид представляет собой аминокислоты в положениях 451-458, и второй пептид представляет собой аминокислоты 587-594, где нумерация аминокислот основана на субъединице капсидного белка нативного AAV9, или эквивалентные аминокислотные остатки в AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, бычьим AAV или птичьим AAV.

В некоторых воплощениях пептид ингибирует связывание по меньшей мере одного антитела с белковым капсидом или его субъединицей капсидного белка. В некоторых воплощениях пептид ингибирует нейтрализацию инфекционности AAV-вектора антителом.

В некоторых воплощениях пептид селективно связывается с рецептором, экспрессируемым на поверхности клетки центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых воплощениях клетка представляет собой премоторную зону коры, таламус, кору мозжечка, зубчатое ядро мозжечка, спинной мозг или ганглий задних корешков. В некоторых воплощениях пептид селективно связывается с рецептором, экспрессируемым на поверхности клетки сердца.

В некоторых воплощениях вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса содержит: (1) белковый капсид, содержащий мутантную субъединицу капсидного белка AAV9, и (2) кассету для переноса, инкапсидированную в белковый капсид, где субъединица капсидного белка содержит пептид, имеющий последовательность $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8$ (SEQ ID NO: 158) в положении аминокислот 451-458 последовательности нативной субъединицы капсидного белка AAV9, где пептид не присутствует в последовательности нативной субъединицы капсидного белка AAV9. В некоторых воплощениях X^1 не является I, X^2 не является N, X^3 не является G, X^4 не является S, X^5 не является G, X^6 не является Q, X^7 не является N, и/или X^8 не является Q. В некоторых воплощениях X^1 представляет собой S, F, Q, G, K или R. В некоторых воплощениях X^2 представляет собой C, G, R, D, T или Q. В некоторых воплощениях X^3 представляет собой Q, V, G, Y, R, F или D. В некоторых воплощениях X^4 представляет собой P, Q, A или R. В некоторых воплощениях X^5 представляет собой T, N, A, P или I. В некоторых воплощениях X^6 представляет собой V, Q, A или I. В некоторых воплощениях X^7 представляет собой M, P, R, Q или N. В некоторых воплощениях X^8 представляет собой N, L, F, E, H или A. В некоторых воплощениях X^1 представляет собой S, X^2 представляет собой C, X^3 представляет собой Q, X^4 представляет собой P, X^5 представляет собой T, X^6 представляет собой V, X^7 представляет собой M, и X^8 представляет собой N. В некоторых воплощениях X^1 представляет собой F, X^2 представляет собой G, X^3 представляет собой V, X^4 представляет собой P, X^5 представляет собой N, X^6 представляет собой Q, X^7 представляет собой P, и X^8 представляет собой L. В некоторых воплощениях X^1 представляет собой Q, X^2 представляет собой R, X^3 представляет собой G, X^4

представляет собой Q, X⁵ представляет собой A, X⁶ представляет собой A, X⁷ представляет собой P, и X⁸ представляет собой F. В некоторых воплощениях X¹ представляет собой G, X² представляет собой D, X³ представляет собой Y, X⁴ представляет собой A, X⁵ представляет собой P, X⁶ представляет собой I, X⁷ представляет собой R, и X⁸ представляет собой E. В некоторых воплощениях X¹ представляет собой K, X² представляет собой T, X³ представляет собой R, X⁴ представляет собой R, X⁵ представляет собой I, X⁶ представляет собой V, X⁷ представляет собой Q, и X⁸ представляет собой H. В некоторых воплощениях X¹ представляет собой F, X² представляет собой G, X³ представляет собой F, X⁴ представляет собой P, X⁵ представляет собой N, X⁶ представляет собой Q, X⁷ представляет собой P, и X⁸ представляет собой L. В некоторых воплощениях X¹ представляет собой R, X² представляет собой Q, X³ представляет собой D, X⁴ представляет собой Q, X⁵ представляет собой P, X⁶ представляет собой I, X⁷ представляет собой N, и X⁸ представляет собой A.

В некоторых воплощениях вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса содержит: (1) белковый капсид, содержащий мутантную субъединицу капсидного белка AAV9, и (2) кассету для переноса, инкапсидированную в белковый капсид, где субъединица капсидного белка содержит пептид, имеющий последовательность X¹-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-X⁸ (SEQ ID NO: 158) в положении аминокислот 587-594 последовательности нативной субъединицы капсидного белка AAV9, где пептид не присутствует в последовательности нативной субъединицы капсидного белка AAV9. В некоторых воплощениях X¹ не является A, X² не является Q, X³ не является A, X⁴ не является Q, X⁵ не является A, X⁶ не является Q, X⁷ не является T, и/или X⁸ не является G. В некоторых воплощениях X¹ представляет собой S. В некоторых воплощениях X² представляет собой K или T. В некоторых воплощениях X³ представляет собой V. В некоторых воплощениях X⁴ представляет собой E или D. В некоторых воплощениях X⁵ представляет собой S. В некоторых воплощениях X⁶ представляет собой W или I. В некоторых воплощениях X⁷ представляет собой T или A. В некоторых воплощениях X⁸ представляет собой E или I. В некоторых воплощениях X¹ представляет собой S, X² представляет собой K, X³ представляет собой V, X⁴ представляет собой E, X⁵ представляет собой S, X⁶ представляет собой W, X⁷ представляет собой T, и X⁸ представляет собой E. В некоторых воплощениях X¹ представляет собой S, X² представляет собой T, X³ представляет собой V, X⁴

представляет собой D, X⁵ представляет собой S, X⁶ представляет собой I, X⁷ представляет собой A, и X⁸ представляет собой I.

В некоторых воплощениях вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса содержит: (1) белковый капсид, содержащий рекомбинантную субъединицу капсидного белка, и (2) кассету для переноса, инкапсидированную в белковый капсид, где субъединица капсидного белка содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности любой из SEQ ID NO: 165-187. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 165-187. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180.

В некоторых воплощениях AAV-вектор селективно доставляет кассету для переноса в клетку или ткань центральной нервной системы. В некоторых воплощениях ткань центральной нервной системы представляет собой премоторную зону коры, таламус, кору мозжечка, зубчатое ядро мозжечка, спинной мозг или ганглий задних корешков. В некоторых воплощениях AAV-вектор доставляет кассету для переноса в мозг, но не доставляет AAV-вектор в сердце. В некоторых воплощениях AAV-вектор доставляет кассету для переноса в мозг и в сердце. В некоторых воплощениях доставка кассеты для переноса происходит в большей степени в мозг, чем в сердце. В некоторых воплощениях доставка кассеты для переноса происходит примерно в одинаковой степени в мозг и в сердце.

Субъединицы капсидного белка AAV и белковые капсиды, содержащие такие субъединицы

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложена субъединица капсидного белка аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая одну или более чем одну аминокислотную модификацию (например замену и/или делецию) по сравнению с нативной субъединицей капсидного белка AAV, где одна или более чем одна модификация изменяет один или более чем один антигенный участок на субъединице капсидного белка AAV. Модификация одного или более чем одного антигенного участка приводит к уменьшению распознавания антителом одного или более чем одного антигенного участка и/или ингибированию нейтрализации

инфекционности вирусной частицы, содержащей субъединицу капсидного белка AAV. Одна или более чем одна аминокислотная модификация (например, замена и/или делеция) может быть в одном или более чем одном антигене “отпечатке (footprint)”, идентифицированном путем картирования пептидных эпитопов и/или исследования криоэлектронной микроскопией комплексов AAV-антитело, содержащих субъединицы капсидного белка AAV. В некоторых воплощениях один или более чем один антигенный участок представляет собой общий антигенный мотив или САМ, как описано в заявке WO 2017/058892, включенной в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых воплощениях антигенные участки расположены в переменном участке (VR) субъединицы капсидного белка AAV, таком как VR-I, VR-II, VR-III, VR-IV, VR-V, VR-VI, VR-VII, VR-VIII, VR-IX. В некоторых воплощениях один или более чем один антигенный участок расположен в петле HI субъединицы капсидного белка AAV.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh32.22, бычьего AAV или птичьего AAV содержит аминокислотную модификацию (например замену или делецию) в одном или более чем одном из участков, определенных в Таблице 6 ниже.

ТАБЛИЦА 6: Примеры антигенных или других участков на различных субъединицах капсидного белка AAV, которые могут быть частично или полностью заменены/замещены. Представлена относительная нумерация VP1 остатков последовательности нативной субъединицы капсидного белка AAV

Последовательность AAV1 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Последовательность AAV2 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Последовательность AAV3 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Последовательность AAV4 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Последовательность AAV5 (номера аминокислот)	SEQ ID NO
SASTGAS (262-268)	2591	SQSGAS (262-267)	2601	SQSGAS (262-267)	2611	RLGESL QS (253-260)	2621	EIKSGSVD GS (249-258)	2631
VFMIPQY GYL (370-379)	2592	VFMVPQY GYL (369-378)	2602	VFMVPQ YGYL (369-378)	2612	VFMVPQ YGYC (360-369)	2622	VFTLPQY GYA (360-369)	2632
NQSGSA QNK (451-459)	2593	TPSGTTT QS (450-458)	2603	TTSGTTN QS (451-459)	2613	GTTLNA GTA (445-453)	2623	STNNTGG VQ (440-448)	2633
SV (472-473)	2594	RD (471-472)	2604	SL (472-473)	2614	SN (466-467)	2624	AN (458-459)	2634
KTDNNN SN (493-500)	2595	SADNNNS E (492-499)	2605	ANDNNN SN (493-500)	2615	ANQNYKI PATGS (487-498)	2625	SGVNRAS (479-485)	2635
KDDEDK F (528-534)	2596	KDDEEKF (527-533)	2606	KDDEEK F (528-534)	2616	GPADSK F (527-533)	2626	LQGSNTY (515-521)	2636
SAGASN (547-552)	2597	GSEKTN (546-551)	2607	GTTASN (547-552)	2617	QNGNTA (545-560)	2627	ANPGTTA T (534-541)	2637
STDPATG DVH (588-597)	2598	NRQAATA DVN (587-596)	2608	NTAPTTG TVN (588-597)	2618	SNLPTV DRLT (583-595)	2628	TTAPATG TYN (577-586)	2638
AN (709-710)	2599	VN (708-709)	2609	VN (709-710)	2619	NS (707-708)	2629	QF (697-698)	2639
DNNGLY T (716-722)	2600	DTNGVYS (715-721)	2610	DTNGVY S (716-722)	2620	DAAGKY T (714-720)	2630	DSTGEYR (704-710)	2640

AAV6 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAV7 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAV8 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAV9 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAVrh8 (номера аминокислот)	SEQ ID NO
SASTGAS (262-268)	2641	SETAGST (263-269)	2651	NGTSGG AT (263- 270)	2661	NSTSGG SS (262- 269)	2671	NGTSGGS T (262- 269)	2681
VFMIPQY GYL (370- 379)	2642	VFMIPQY GYL (371- 380)	2652	VFMIPQY GYL (372- 381)	2662	VFMIPQY GYL (371-380)	2672	VFMVPQY GYL (371- 380)	2682
NQSGSA QNK (451-459)	2643	NPGGTA GNR (453- 461)	2653	TTGGTA NTQ (453-461)	2663	INGSGQ NQQ (451-459)	2673	QTTGTGG TQ (451- 459)	2683
SV (472- 473)	2644	AN (474- 475)	2654	AN (474- 475)	2664	AV (472- 473)	2674	AN (472- 473)	2684
KTDNNN SN (493- 500)	2645	LDQNNNS N (495- 502)	2655	TGQNNN SN (495- 502)	2665	VTQNNN SE (493- 500)	2675	TNQNNNS N (493- 500)	2685
KDDKDK F (528- 534)	2646	KDDEDRF (530-536)	2656	KDDEER F (530- 536)	2666	KEGEDR F (528- 534)	2676	KDDDDRf (528-534)	2686
SAGASN (547-552)	2647	GATNKT (549-554)	2657	NAARDN (549-554)	2667	GTGRDN (547-552)	2677	GAGNDG (547-552)	2687
STD PATG DVH (588- 897)	2648	NTAAQTQ VVN (589- 598)	2658	NTAPQIG TVNS (590-600)	2668	QAQAQT GWVQ (588-597)	2678	NTQAQTG LVH (588- 597)	2688
AN (709- 710)	2649	TG (710- 711)	2659	TS (711- 712)	2669	NN (709- 710)	2679	TN (709- 710)	2689
DNNGLY T (716- 722)	2650	DSQGVY S (717- 723)	2660	NTEGVY S (718- 724)	2670	NTEGVY S (716- 722)	2680	NTEGVYS (716-722)	2690

AAVrh10 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAV10 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAV11 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAV12 (номера аминокислот)	SEQ ID NO	AAVrh32.33 (номера аминокислот)	SEQ ID NO
NGTSGGS T (263- 270)	2691	NGTSGG ST (263- 270)	2701	RLGTTSS S (253- 260)	2711	RIGTTAN S (262- 269)	2721	RLGTTSNS (253-260)	2731
VFMIPQY GYL (372- 381)	2692	VFMIPQY GYL (372- 381)	2702	VFMVPQ YGYC (360-369)	2712	VFMVPQ YGYC (369-378)	2722	VFMVPQYG YC (360-369)	2732
STGGTAG TQ (453- 461)	2693	STGGTQ GTQ (453- 461)	2703	GETLNQ GNA (444-452)	2713	GNSLNQ GTA (453-461)	2723	GETLNQGN A (444-452)	2733
SA (474- 475)	2694	SA (474- 475)	2704	AF (465- 466)	2714	AY (474- 475)	2724	AF (465-466)	2734
LSQNNNS N (495- 502)	2695	LSQNNNS N (495- 502)	2705	ASQNYKI PASGG (486-497)	2715	ANQNYKI PASGG (495-506)	2725	ASQNYKIPA SGG (486- 497)	2735
KDDEERF (530-536)	2696	KDDEERF (530-536)	2706	GPSDGD F (526- 532)	2716	GAGDSD F (535- 541)	2726	GPSDGDF (526-532)	2736
GAGKDN (549-554)	2697	GAGRDN (549-554)	2707	VTGNTT (544-549)	2717	PSGNTT (553-558)	2727	VTGNTT (544-549)	2737
NAAPIVG AVN (590- 599)	2698	NTGPIVG NVN (590- 599)	2708	TTAPITG NVT (585- 594)	2718	TTAPHIA NLD (594-503)	2728	TTAPITGNV T (585-594)	2738
TN (711- 712)	2699	TN (711- 712)	2709	SS (706- 707)	2719	NS (715- 716)	2729	SS (706-707)	2739
NTDGTYS (718-724)	2700	NTEGTYS (718-724)	2710	DTTGKYT (713-719)	2720	DNAGNY H (722- 728)	2730	DTTGKYT (713-719)	2740

Бычий AAV (номера аминокислот)	SEQ ID NO	Птичий AAV (номера аминокислот)	SEQ ID NO
RLGSSN AS (255- 262)	2741	RIQGPSG G (265- 272)	2751
VFMVPQ YGYC (362-371)	2742	IYTIQYG YC (375- 384)	2752
GGLNQ GNS (447-455)	2743	VSQAGS SGR (454- 462)	2753
SG (468- 469)	2744	AA (475- 476)	2754
ASQNYKI PQGRN (489-500)	2745	ASNITKN NVFSV (496-507)	2755
ANDATDF (529-535)	2746	FSGEPDR (533-539)	2756
ITGNTT (547-552)	2747	VYDQTTA T (552- 559)	2757
TTVPTVD DVD (588- 597)	2748	VTPGTRA AVN (595- 604)	2758
DS (709- 710)	2749	AD (716- 717)	2759
DNAGAY K (716- 722)	2750	SDTGSYS (723-729)	2760

В некоторых воплощениях аминокислотная замена замещает любые восемь аминокислот в субъединице капсидного белка AAV из любого из следующих серотипов: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh32.22, бычий AAV или птичий AAV. Например, аминокислотная замена может замещать следующие аминокислоты (нумерация VP1): 355-362, 363-370, 371-378, 379-386, 387-394, 395-402, 403-410, 411-418, 419-426, 427-434, 435-442, 443-450, 451-458, 459-466, 467-474, 475-482, 483-490, 491-498, 499-506, 507-514, 515-522, 523-530, 531-538, 539-546, 547-554, 555-562, 563-570, 571-578, 579-586, 587-594, 595-602, 603-610, 611-618, 619-626, 627-634, 635-642, 643-650, 651-658, 659-666, 667-674, 675-682, 683-690, 691-698, 699-706, 707-714, 715-722 в любом из перечисленных выше серотипов AAV.

В некоторых воплощениях аминокислотная замена выбрана из любой из SEQ ID NO: 19-20. В некоторых воплощениях аминокислотная замена по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой последовательности из SEQ ID NO: 12-18. В некоторых воплощениях замена представляет собой аминокислоты, соответствующие аминокислотам 587-594 субъединицы капсидного белка AAV9 дикого типа. В некоторых воплощениях замена представляет собой аминокислоты, соответствующие аминокислотам 587-594 субъединицы капсидного белка AAV1 дикого типа. В некоторых воплощениях замена представляет собой аминокислоты, соответствующие

аминокислотам 587-594 субъединицы капсидного белка AAV6 дикого типа. В некоторых воплощениях замена представляет собой аминокислоты, соответствующие аминокислотам 589-596 субъединицы капсидного белка AAV8 дикого типа. В некоторых воплощениях замена представляет собой аминокислоты, соответствующие аминокислотам 587-594 субъединицы капсидного белка AAVrh8 дикого типа. В некоторых воплощениях замена представляет собой аминокислоты, соответствующие аминокислотам 589-596 субъединицы капсидного белка AAVrh10 дикого типа.

В некоторых воплощениях аминокислотная замена выбрана из любой из SEQ ID NO: 18-20. В некоторых воплощениях аминокислотная замена по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой последовательности из SEQ ID NO: 18-20. В некоторых воплощениях замена представляет собой аминокислоты, соответствующие аминокислотам 451-458 субъединицы капсидного белка AAV9 дикого типа.

В некоторых воплощениях аминокислотная делеция содержит делецию по меньшей мере одной, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти или по меньшей мере десяти аминокислот по сравнению с субъединицей капсидного белка дикого типа.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну или более чем одну аминокислотную замену и одну или более чем одну аминокислотную делецию. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену и по меньшей мере одну аминокислотную делецию. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену и по меньшей мере одну аминокислотную делецию, где по меньшей мере одна аминокислотная замена и по меньшей мере одна аминокислотная делеция непосредственно примыкают друг к другу в аминокислотной последовательности субъединицы капсидного белка.

В некоторых воплощениях субъединицы капсидного белка модифицированы с получением такой субъединицы капсидного белка AAV, которая, когда присутствует в AAV-вирусной частице или AAV-вирусном векторе, проявляет фенотип селективного нацеливания на ЦНС (например, головного мозга, спинного мозга). В некоторых воплощениях субъединицы капсидного белка модифицированы с получением такой субъединицы капсидного белка AAV которая, когда присутствует в AAV-вирусной

частице или AAV-вирусном векторе, проявляет фенотип избегания нейтрализующих антител. Также AAV-вирусоподобная частица или AAV-вектор могут иметь фенотипическое свойство повышенной или поддерживаемой эффективности трансдукции дополнительно к фенотипическому свойству избегать нейтрализующие антитела и/или оказывать направленное действие на ЦНС.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна замена может вводить одну или более чем одну последовательность из субъединицы капсидного белка первого серотипа AAV в субъединицу капсидного белка второго серотипа AAV, который отличается от первого серотипа AAV.

Основную субъединицу капсидного белка AAV, к которой добавлены модификации, может представлять собой субъединица капсидного белка серотипа AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, AAVrh74, бычьего AAV, птичьего AAV или любого другого AAV, известного в настоящее время или который будет идентифицирован позже. В некоторых воплощениях основная субъединица капсидного белка AAV принадлежит серотипу AAV9. В некоторых воплощениях основная субъединица капсидного белка AAV является химерной. В некоторых воплощениях основная субъединица капсидного белка AAV представляет собой химерный AAV8/9.

Здесь предложено несколько примеров модифицированной субъединицы капсидного белка AAV. В нижеследующих примерах субъединица капсидного белка может содержать определенные описанные замены и в некоторых воплощениях может содержать меньше или больше замен, чем описанные замены. Как его используют здесь, термин “замена” может относиться к единичной аминокислотной замене или замене двух и более идущих подряд аминокислот. Например, в некоторых воплощениях субъединица капсидного белка может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и так далее единичных аминокислотных замен. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка может содержать одну или более чем одну замену нескольких идущих подряд аминокислот, например одну или более чем одну замену из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 идущих подряд аминокислот.

Кроме того, в некоторых описанных здесь воплощениях, где аминокислотный остаток заменен на любой аминокислотный остаток, отличный от аминокислотного остатка, присутствующего в аминокислотной последовательности дикого типа или

нативной аминокислотной последовательности, любой другой аминокислотный остаток может представлять собой любой природный или неприродный аминокислотный остаток, известный в данной области техники (см., например, Таблицы 2 и 4). В некоторых воплощениях замена может представлять собой консервативную замену, и в некоторых воплощениях замена может представлять собой неконсервативную замену. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну или более чем одну аминокислотную замену, где каждая аминокислотная замена индивидуально выбрана из SEQ ID NO: 12-18, как показано в Таблице 7.1.

ТАБЛИЦА 7.1: АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ

Аминокислотная замена	SEQ ID NO.
SCQPTVMN	12
FGVPNQPL	13
QRGQAAPF	14
GDYAPIRE	15
KTRRIVQH	16
FGFPNQPL	17
RQDQPINA	18

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну или более чем одну аминокислотную замену, где каждая аминокислотная замена выбрана из SEQ ID NO: 19-20, как показано в Таблице 7.2.

ТАБЛИЦА 7.2: АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ

Аминокислотная замена	SEQ ID NO.
SKVESWTE	19
STVDSIAI	20

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV может содержать первую замену, выбранную из последовательностей, перечисленных в Таблице 7.1, и вторую замену, выбранную из последовательностей, перечисленных в Таблице 7.2. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV может содержать первую замену, вторую замену как показано в Таблицах 7.3 и 7.4.

ТАБЛИЦА 7.3: КОМБИНАЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН

Первая замена (SEQ ID NO)	Вторая замена (SEQ ID NO)
12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18	19 или 20

ТАБЛИЦА 7.4 КОМБИНАЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН

Первая замена (SEQ ID NO)	Вторая замена (SEQ ID NO)
12	19
12	20
13	19
13	20
14	19
14	20
15	19
15	20
16	19
16	20
17	19
17	20
18	19
18	20

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит аминокислотную модификацию (например замену и/или делецию), где аминокислотная модификация изменяет один или более чем один экспонированный на поверхности участок, такой как антигенный участок, на субъединице капсидного белка AAV.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну или более чем одну аминокислотную замену, где по меньшей мере одна из аминокислотных замен содержит одну из SEQ ID NO: 19-20. В некоторых воплощениях замена замещает аминокислоты, соответствующие аминокислотам 587-594 субъединицы капсидного белка AAV9 дикого типа.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну или более чем одну аминокислотную замену, где по меньшей мере одна из аминокислотных замен содержит одну из SEQ ID NO: 12-18. В некоторых воплощениях замена замещает аминокислоты, соответствующие аминокислотам 451-458 субъединицы капсидного белка AAV9 дикого типа.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит замену, содержащую последовательность восьми аминокислот (X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8) (SEQ ID NO: 158), которая не встречается в последовательности нативной субъединицы капсидного белка. В некоторых воплощениях X^1 не является I, X^2 не является N, X^3 не является G, X^4 не является S, X^5 не является G, X^6 не является Q, X^7 не является N, и/или X^8 не является Q. В некоторых воплощениях X^1 представляет собой S, F, Q, G, K или R. В некоторых воплощениях X^2 представляет собой C, G, R, D,

[illegible]

В некоторых воплощениях X^1 не является А, X^2 не является Q, X^3 не является А, X^4 не является Q, X^5 не является А, X^6 не является Q, X^7 не является Т, и/или X^8 не является G. В некоторых воплощениях X^1 представляет собой S. В некоторых воплощениях X^2 представляет собой К или Т. В некоторых воплощениях X^3 представляет собой V. В некоторых воплощениях X^4 представляет собой Е или D. В некоторых воплощениях X^5 представляет собой S. В некоторых воплощениях X^6 представляет собой W или I. В некоторых воплощениях X^7 представляет собой Т или А.

В некоторых воплощениях X^8 представляет собой E или I. В некоторых воплощениях X^1 представляет собой S, X^2 представляет собой K, X^3 представляет собой V, X^4 представляет собой E, X^5 представляет собой S, X^6 представляет собой W, X^7 представляет собой T, и X^8 представляет собой E. В некоторых воплощениях X^1 представляет собой S, X^2 представляет собой T, X^3 представляет собой V, X^4 представляет собой D, X^5 представляет собой S, X^6 представляет собой I, X^7 представляет собой A, и X^8 представляет собой I.

В некоторых воплощениях белок субъединицы AAV содержит одну или более чем одну аминокислотную делецию, где аминокислотная делеция содержит делецию по меньшей мере шести или по меньшей мере восьми аминокислот по сравнению с субъединицей капсидного белка AAV дикого типа. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит делецию восьми последовательно идущих аминокислот по сравнению с последовательностью нативной субъединицы капсидного белка. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит делецию шести последовательно идущих аминокислот по сравнению с последовательностью нативной субъединицы капсидного белка.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит последовательность LSKTQTLK (SEQ ID NO: 1374) или последовательность LSKTDPQTLK (SEQ ID NO: 1375). В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV, содержащая SEQ ID NO: 1374 или 1375, принадлежит серотипу, выбранному из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV или бычьего AAV.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит первую замену, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12-18, и вторую замену, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19-20.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит аминокислотную делецию и замену, где замена содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12-20.

В некоторых воплощениях рекомбинантная субъединица капсидного белка имеет последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 9 (AAV9), и содержащую одну или

более чем одну из следующих аминокислотных замен: I451S, I451F, I451Q, I451G, I451K, I451R, N452C, N452G, N452R, N452D, N452T, N452Q, G453Q, G453V, G453Y, G453R, G453F, G453D, S454P, S454Q, S454A, S454R, G455T, G455N, G455A, G455P, G455I, Q456V, Q456A, Q456I, N457M, N457P, N457R, N457Q, Q458N, Q458L, Q458F, Q458E, Q458H, Q458A, A587S, Q588K, Q588T, A589V, Q590E, Q590D, A591S, Q592W, Q592I, T593A, G594E, G594I.

Любая из описанных здесь субъединиц капсидного белка AAV может дополнительно содержать модификацию (например замену или делецию) в петле HI. Петля HI представляет собой домен, выступающий на поверхности субъединицы капсидного белка AAV между β -цепями β H и β I, которые тянутся из каждой субъединицы вирусного белка (VP), охватывая соседний пятичленный (fivefold) VP. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь аминокислотных замен в петле HI. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну или более чем одну из следующих замен в петле HI: P661R, T662S, Q666G, S667D, где нумерация соответствует субъединице капсидного белка AAV8 дикого типа (SEQ ID NO: 8). В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну или более чем одну из следующих замен в петле HI: P659R, T660S, A661T, K664G, где нумерация соответствует субъединице капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 9).

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну, две, три или четыре аминокислотные замены, где каждая замена модифицирует отличный антигенный участок на субъединице капсидного белка AAV, и где по меньшей мере одна из аминокислотных замен изменяет петлю HI субъединицы капсидного белка.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит первую, вторую, третью и четвертую аминокислотную замену. В некоторых воплощениях по меньшей мере одна из замен изменяет петлю HI субъединицы капсидного белка. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит одну или более чем одну из следующих замен в петле HI: P661R, T662S, Q666G, S667D, где нумерация соответствует субъединице капсидного белка AAV8 дикого типа (SEQ ID NO: 8); или P659R, T660S, A661T, K664G, где нумерация соответствует субъединице капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 9). В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит

аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 185-187. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности любой из SEQ ID NO: 165-187.

Также здесь предложена нуклеиновая кислота, кодирующая одну или более чем одну из описанных здесь субъединиц капсидного белка AAV, или плазида, содержащая такую нуклеиновую кислоту. Нуклеотидная последовательность может представлять собой последовательность ДНК или последовательность РНК. В некоторых воплощениях клетка содержит одну или более чем одну нуклеиновую кислоту или плазмиду, описанную здесь.

В некоторых воплощениях белковый капсид AAV содержит субъединицу капсидного белка AAV, как описано здесь. Дополнительно здесь предложен вирусный вектор, содержащий белковый капсид AAV, а также композиция, содержащая белковый капсид AAV, субъединицу капсидного белка AAV и/или вирусный вектор в фармацевтически приемлемом носителе.

В некоторых воплощениях модификация одного или более чем одного антигенного участка приводит к уменьшенному связыванию антитела с одним или более чем одним антигенным участком. В некоторых воплощениях модификация одного или более чем одного антигенного участка приводит к ингибированию нейтрализации инфекционности вирусной частицы, содержащей субъединицу капсидного белка AAV.

Как описано здесь, последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности субъединиц капсидного белка из ряда AAV известны в данной области техники. Следовательно, аминокислоты “соответствующие” положениям аминокислот субъединиц капсидного белка нативного AAV можно легко определить для любого другого AAV (например, используя выравнивания последовательностей).

Модифицированные субъединицы капсидного белка можно получить путем модификации субъединицы капсидного белка любого AAV, известного в настоящее время или который будет открыт позже. Кроме того, основная субъединица капсидного белка AAV, которая подлежит модификации, может представлять собой природную субъединицу капсидного белка AAV (например, субъединицу капсидного белка AAV2,

AAV3a или 3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11 или любую из AAV, представленных в Таблице 2), но не ограничиваясь ими. Специалист в данной области техники понимает, что разнообразные манипуляции с субъединицами капсидного белка AAV известны в данной области техники, и настоящее изобретение не ограничено модификациями с природными субъединицами капсидного белка AAV. Например, подлежащий модификации капсидный белок может уже иметь изменения по сравнению с природным AAV (например, иметь происхождение от природной субъединицы капсидного белка AAV, например, AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или любого другого AAV, известного в настоящее время или открытого позже). В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка может представлять собой химерную субъединицу капсидного белка. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка может представлять собой сконструированную AAV, такую как AAV2i8, AAV2g9, AAV-LK03, AAV7m8, AAV Anc80, AAV PHP.B.

Следовательно, в некоторых воплощениях подлежащая модификации субъединица капсидного белка AAV может иметь происхождение от природного AAV, но дополнительно содержит одну или более чем одну чужеродную последовательность (например, экзогенную по отношению к нативному вирусу), которая вставлена и/или заменена в субъединице капсидного белка и/или была изменена путем делеции одной или более чем одной аминокислоты.

Соответственно, подразумевается, что ссылка здесь на определенную субъединицу капсидного белка AAV (например, субъединицу капсидного белка AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11 или субъединицу капсидного белка любого из AAV, показанных в Таблице 2, и так далее) охватывает нативную субъединицу капсидного белка, а также субъединицы капсидного белка, имеющие изменения отличные от модификаций, описанных здесь. Такие изменения включают замены, вставки и/или делеции. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, менее чем 20, менее чем 30, менее чем 40, менее чем 50, менее чем 60 или менее чем 70 аминокислот, вставленных в нее (отличных от вставок, описанных здесь) по сравнению с последовательностью нативной субъединицы капсидного белка AAV. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, менее чем 20, менее чем 30, менее

чем 40, менее чем 50, менее чем 60 или менее чем 70 аминокислотных замен (отличных от аминокислотных замен, описанных здесь) по сравнению с последовательностью нативной субъединицы капсидного белка AAV. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, менее чем 20, менее чем 30, менее чем 40, менее чем 50, менее чем 60 или менее чем 70 аминокислот по сравнению с последовательностью нативной субъединицы капсидного белка AAV.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 90%, примерно на 95%, примерно на 97%, примерно на 98% или примерно на 99% подобную или идентичную последовательности нативной субъединицы капсидного белка AAV.

Способы определения сходства или идентичности последовательностей между двумя или более чем двумя аминокислотными последовательностями известны в данной области техники. Сходство или идентичность последовательностей можно определить для нуклеиновой кислоты полной длины или для указанной части нуклеиновой кислоты. Сходство или идентичность последовательностей можно определить с помощью стандартных методов, включая, алгоритм локальной идентичности последовательностей от Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2, 482 (1981), алгоритм выравнивания идентичности последовательностей от Needleman & Wunsch, *J Mol. Biol.* 48,443 (1970), метод поиска сходства от Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444 (1988), компьютеризированные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), программы “Best Fit sequence”, описанную Devereux et al., *Nucl. Acid Res.* 12, 387-395 (1984), или путем проверки, но не ограничиваясь этим.

Другой подходящий алгоритм представляет собой алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., *J Mol. Biol.* 215, 403-410, (1990) и Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873-5787 (1993). Особенно полезной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, полученная от Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>. WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, для которых возможно установить значения по умолчанию. Эти параметры являются динамическими величинами и устанавливаются самой программой в зависимости от состава определенной последовательности и состава определенной

базы данных, относительно которой ведется поиск интересующей последовательности; однако, значения могут быть отрегулированы для повышения чувствительности.

Еще один полезный дополнительный алгоритм представляет собой “gapped BLAST”, опубликованный Altschul et al, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

Для задач настоящего изобретения, если не указано иное, процент идентичности рассчитывают с использованием Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), доступного онлайн на сайте blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Специалист в данной области техники понимает, что вместо него можно подходящим образом использовать другие алгоритмы.

В некоторых воплощениях белковый капсид содержит модифицированную субъединицу капсидного белка AAV, как описано здесь. В некоторых воплощениях белковый капсид представляет собой капсид парвовируса, который может дополнительно представлять собой автономный капсид парвовируса или капсид депендовируса. Возможно, белковый капсид представляет собой белковый капсид AAV. В некоторых воплощениях белковый капсид AAV представляет собой белковый капсид AAV1, AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, белковый капсид бычьего AAV, белковый капсид птичьего AAV или любого другого AAV, известного в настоящее время или который будет идентифицирован позже. Неограничивающий перечень серотипов AAV представлен в Таблице 2. Белковый капсид AAV может принадлежать любому серотипу AAV из перечисленных в Таблице 2 или быть получен из любого из вышеупомянутых серотипов путем введения одной или более чем одной вставки, замены и/или делеции. Молекулы, которые могут быть упакованы в модифицированный вирусный белковый капсид и перенесены в клетку, включают кассеты для переноса (например, гетерологичной ДНК или РНК), полипептиды, маленькие органические молекулы, металлы или их комбинации.

“Гетерологичные молекулы” определяют как молекулы, которые в природе не обнаруживаются при инфицировании AAV, например те, которые не кодируются геномом AAV дикого типа. Кроме того, терапевтически полезные молекулы могут быть ассоциированы с наружной частью химерного белкового капсида для переноса этих молекул в клетки-мишени хозяина. Такие ассоциированные молекулы могут включать ДНК, РНК, маленькие органические молекулы, металлы, углеводы, липиды и/или полипептиды. В некоторых воплощениях терапевтически полезная молекула

ковалентно связана (то есть, конъюгирована или подвергнута химическому сочетанию) с белковым капсидом или его капсидным белком. Способы ковалентного связывания молекул известны специалисту в данной области техники.

Модифицированные белковые капсиды также находят применение в выработке антител против новых структур белкового капсида. В качестве дополнительной альтернативы, экзогенная аминокислотная последовательность может быть вставлена в модифицированный белковый капсид или субъединицу его капсидного белка для презентации антигена клетке, например, для введения субъекту для получения иммунного ответа на экзогенную аминокислотную последовательность.

В некоторых воплощениях белковые капсиды могут быть введены для блокирования определенных клеточных сайтов до введения вирусного вектора, доставляющего нуклеиновую кислоту, кодирующую интересующий олигопептид или интересующую функциональную РНК, и/или одновременно (например, в течение минут или часов друг от друга) с таким введением. Например, белковые капсиды по изобретению могут быть доставлены для блокирования клеточных рецепторов на клетках печени, и вектор для доставки (например, AAV-вектор) может быть введен последовательно или одновременно, что может уменьшать трансдукцию клеток печени и усиливать трансдукцию других мишеней (например, скелетной, сердечной мышцы и/или мышцы диафрагмы).

Согласно некоторым воплощениям модифицированные белковые капсиды можно вводить субъекту до модифицированного вирусного вектора и/или одновременно с модифицированным вирусным вектором, как описано здесь. Кроме того, в настоящем изобретении предложены композиции и фармацевтические композиции, содержащие модифицированные белковые капсиды или субъединицы их капсидного белка по изобретению; возможно, такая композиция также содержит модифицированный вирусный вектор, как описано здесь.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота (возможно, выделенная нуклеиновая кислота) кодирует описанные здесь модифицированные субъединицы капсидного белка. Дополнительно предложены нуклеиновые кислоты и клетки (*in vivo* или в культуре), содержащие описанные здесь нуклеиновые кислоты и/или вирусные векторы. В качестве одного примера вирусный вектор может содержать: (а) белковый капсид, содержащий модифицированную субъединицу капсидного белка AAV, как описано здесь; и (б) нуклеиновую кислоту, содержащую по меньшей мере одну

последовательность концевого повтора, где нуклеиновая кислота инкапсидирована в белковый капсид AAV.

Подходящие вирусные векторы включают, например, аденовирус, AAV, герпесвирус, вирус коровьей оспы, поксвирусы, бакуловирус, лентивирус, коронавирусы и им подобные. Подходящие нуклеиновые кислоты включают плазмиды, фаг, YAC, BAC и им подобное, но не ограничиваясь ими. Такие нуклеиновые кислоты и клетки можно использовать, например, в качестве реагентов (например, вспомогательных упаковывающих конструкций или упаковывающих клеток) для продукции модифицированных вирусных белковых капсидов, субъединиц белкового капсида или вирусных векторов, как описано здесь.

Описанные здесь белковые капсиды и субъединицы капсидного белка можно получать любым способом, известным в данной области техники, например, путем использования бакуловирусной системы (Brown et al., (1994) *Virology* 198:477-488).

Модификации субъединицы капсидного белка AAV, как описано здесь, представляют собой “селективные” модификации. Этот подход противоположен более раннему исследованию с обменом целыми субъединицами и большими доменами между серотипами AAV (см., например, публикацию международной заявки WO 00/28004 и Nauck et al., (2003) *J. Virology* 77:2768-2774). В некоторых воплощениях “селективные” модификации приводят к вставке, и/или замене, и/или делеции примерно 20, 18, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 идущих подряд аминокислот или менее чем примерно 20, 18, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 идущих подряд аминокислот.

Описанные здесь модифицированные субъединицы капсидного белка и белковые капсиды могут дополнительно содержать любую другую модификацию, известную в настоящее время или которая будет идентифицирована позже. Например, субъединицы капсидного белка и белковые капсиды AAV могут быть химерными в том смысле, что они могут содержать всю субъединицу капсидного белка или ее часть от другого вируса, возможно другого парвовируса или AAV, например, как описано в публикации международной заявки WO 00/28004.

В некоторых воплощениях белковый капсид или субъединица капсидного белка может представлять собой нацеленный белковый капсид или нацеленную субъединицу капсидного белка, содержащий(ую) нацеливающую последовательность (например, замещенную или вставленную в белковый капсид или субъединицу капсидного белка),

которая направляет белковый капсид или субъединицу капсидного белка для взаимодействия с молекулами клеточной поверхности, присутствующими на желаемой(ых) ткани(ях)-мишени(ях) (см., например, публикацию международной заявки WO 00/28004 и Hauck *et al.*, (2003) *J. Virology* 77:2768-2774); Shi *et al.*, *Human Gene Therapy* 17:353-361 (2006) [описывающую вставку мотива связывания с рецептором интегрин RGD в положениях 520 и/или 584 субъединицы капсидного белка AAV]; и патент США No. 7314912 [описывающий вставку пептида PI, содержащего мотив RGD, вслед за положениями аминокислот 447, 534, 573 и 587 субъединицы капсидного белка AAV2]]. В данной области техники известны другие положения в субъединице капсидного белка AAV, допускающие вставки (например, положения 449 и 588, описанные Grifman *et al.*, *Molecular Therapy* 3:964-975 (2001)).

Например, белковый капсид или субъединица капсидного белка, как описано здесь, может иметь относительно неэффективный тропизм в отношении определенных интересующих тканей-мишеней (например, печени, скелетной мышцы, сердца, мышцы диафрагмы, почки, мозга, желудка, кишечника, кожи, эндотелиальных клеток и/или легких). Преимущественно нацеливающая последовательность может быть вставлена в эти векторы с низкой степенью трансдукции, таким образом придавая белковому капсиду (или субъединице его капсидного белка) желаемый тропизм и, возможно, селективный тропизм в отношении определенной(ых) ткани(ей). Субъединицы капсидного белка AAV, белковые капсиды и AAV-векторы, содержащие нацеливающие последовательности, описаны, например, в публикации международной заявки WO 00/28004. В качестве другого примера, одна или более чем одна не встречающаяся в природе аминокислота, как описано Wang *et al.*, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:225-49 (2006)), может быть включена в субъединицу капсидного белка AAV, как описано здесь, в ортогональном сайте, как средство для перенаправления вектора с низкой степенью трансдукции к желаемой(ым) ткани(ям)-мишени(ям). Преимущественно эти неприродные аминокислоты можно использовать для химического связывания интересующих молекул с субъединицей капсидного белка AAV, включая, без ограничения: гликаны (манноза – нацеливание на дендритные клетки); RGD, бомбезин или нейропептид для направленной доставки в определенные типы раковых клеток; РНК-аптамеры или пептиды, выбранные из фагового дисплея, нацеленного на определенные рецепторы клеточной поверхности, такие как рецепторы факторов роста, интегрины и им подобные.

В некоторых воплощениях нацеливающая последовательность может представлять собой последовательность субъединицы капсидного белка (например, последовательность автономного капсида парвовируса, последовательность субъединицы капсидного белка AAV или любую другую последовательность вирусного капсида), которая направляет инфекцию на определенный(е) тип(ы) клеток.

В качестве другого неограничивающего примера домен, связывающий гепарин или гепарансульфат (HS) (например, гепарин-связывающий домен респираторно-синцитиального вируса), может быть вставлен в субъединицу капсидного белка, которая обычно не связывается с рецепторами HS (например, AAV4, AAV5), или замещен на таковую, для придания полученному в результате мутанту способности связываться с гепарином и/или гепарансульфатом.

B19 инфицирует первичные эритроидные клетки-предшественники с использованием глобозида в качестве своего рецептора (Brown et al, (1993) Science 262: 114). Структура B19 была определена с разрешением 8 Å (Agbandje-McKenna et al, (1994) Virology 203: 106). Участок капсида B19, который связывается с глобозидом, был картирован между аминокислотами 399-406 (Chapman et al, (1993) Virology 194:419) в петлевом наружном участке между структурами β-бочонков E и F (Chipman et al, (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93:7502). Соответственно, домен связывания с глобозидным рецептором капсида B19 может быть заменен на субъединицу капсидного белка AAV для нацеливания белкового капсида или вирусного вектора, содержащего такой капсид, в эритроидные клетки.

В некоторых воплощениях экзогенная нацеливающая последовательность может представлять собой любую аминокислотную последовательность, кодирующую пептид, которая изменяет тропизм белкового капсида или вирусного вектора, содержащего модифицированную субъединицу капсидного белка AAV. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид или белок может быть природным или, альтернативно, полностью или частично синтетическим. Примеры нацеливающих последовательностей включают лиганды и другие пептиды, которые связываются с рецепторами и гликопротеинами клеточной поверхности, такими как последовательности пептида ROD, брадикинин, гормоны, пептидные факторы роста (например, эпидермальный фактор роста, фактор роста нервов, фактор роста фибробластов, тромбоцитарный фактор роста, инсулиноподобные факторы роста I и II и так далее), цитокины, меланоцит-стимулирующий гормон (например, α, β или γ),

нейропептиды и эндорфины, и им подобные, и их фрагменты, которые сохраняют способность направлять клетки к их соответствующим рецепторам. Другие иллюстративные пептиды и белки включают вещество Р, фактор роста кератиноцитов, нейропептид Y, гастрин-высвобождающий пептид, интерлейкин 2, лизоцим белка куриного яйца, эритропоэтин, гонадолиберин, кортикостатин, β -эндорфин, лейцинэнкефалин, риморфин, альфа-нео-энкефалин, ангиотензин, пневмадин, вазоактивный интестинальный пептид, нейротензин, мотилин и их фрагменты, как описано выше. В качестве еще одной дополнительной альтернативы в субъединице капсидного белка может быть произведена замена на связывающий домен из токсина (например, столбнячного токсина или токсинов змей, таких как альфа-бунгаротоксин, и тому подобных) в качестве нацеливающей последовательности. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV может быть модифицирована путем введения замены на “неклассический” импорт/экспорт сигнальный пептид (например, фактора роста фибробластов-1 и -2, интерлейкина 1, белка Tat HIV-1, белка VP22 вируса герпеса и тому подобных), как описано Cleves (*Current Biology* 7:R318 (1997)), в субъединицу капсидного белка AAV. Также охватываются пептидные мотивы, которые направляют захват определенными клетками, например пептидный мотив FVFLP (SEQ ID NO: 22) запускает захват клетками печени.

Методы фагового дисплея, а также другие методы, известные в данной области техники, можно использовать для идентификации пептидов, которые распознают любой интересующий тип клеток.

Нацеливающая последовательность может кодировать любой пептид, который направляет на сайт связывания клеточной поверхности, включая рецепторы (например, белок, углевод, гликопротеин или протеогликан). Примеры сайтов связывания клеточной поверхности включают гепарансульфат, хондроитинсульфат и другие гликозаминогликаны, группировки сиаловой кислоты, обнаруживаемые на муцинах, гликопротеинах и ганглиозидах, МНС-1-гликопротеины, углеводные компоненты, обнаруживаемые на мембранных гликопротеинах, включая маннозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, фукозу, галактозу и им подобные, но не ограничиваясь ими.

В некоторых воплощениях произведена замена на домен, связывающий гепарансульфат (HS) или гепарин, в субъединице капсидного белка (например, в субъединице белкового капсида AAV, которая в ином случае не связывается с HS или

гепарином). Из уровня техники известно, что связывание HS/гепарина опосредуется “основным участком”, богатым аргинином и/или лизином. В некоторых воплощениях можно использовать последовательность, следующую за мотивом BXXB (SEQ ID NO: 23), где “В” представляет собой основной остаток, и X является нейтральным и/или гидрофобным остатком. В качестве неограничивающего примера BXXB может представлять собой RGNR (SEQ ID NO: 24). В качестве другого неограничивающего примера BXXB заменяет аминокислоты в положениях 262-265 нативной субъединицы капсидного белка AAV2 или в соответствующих положениях субъединицы капсидного белка другого серотипа AAV.

В Таблице 8 представлены другие неограничивающие примеры подходящих нацеливающих последовательностей.

ТАБЛИЦА 8: НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
NSVRDL(G/S)	25	Muller et al., Nature Biotechnology 21: 1040-1046 (2003)
PRSVTVTP	26	Muller et al., Nature Biotechnology 21: 1040-1046 (2003)
NSVSSX(S/A)	27	Muller et al., Nature Biotechnology 21: 1040-1046 (2003)
NGR, NGRAHA	28	Grifman et al., Molecular Therapy 3:964-975 (2001)
QPEHSST	29	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
VNTANST	30	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
HGPMQS	31	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
PHKPPLA	32	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
IKNNEMW	33	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
RNLDTPM	34	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
VDSHRQS	35	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
YDSKTKT	36	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
SQLPHQK	37	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
STMQQNT	38	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
TERYMTQ	39	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
QPEHSST	40	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
DASLSTS	41	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
DLPNKT	42	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
DLTAARL	43	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
EPHQFNY	44	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
EPQSNHT	45	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
MSSWPSQ	46	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
NPKHNAT	47	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
PDGMRTT	48	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
PNNNKTT	49	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
QSTTHDS	50	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
TGSKQKQ	51	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
SLKHQAL	52	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
SPIDGEQ	53	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
WIFPWIQL	54	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CDCRGDCFC	55	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CNGRC	56	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CPRECES	57	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CTTHWGFTLC	58	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CGRRAGGSC	59	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CKTGRAKDC	60	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CVPELGHEC	61	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CRRETAWAK	62	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
VSWFSHRYSPFAVS	63	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
GYRDGYAGPILYN	64	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
XXXY*XXX	65	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
Y*E/MNW	66	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
RPLPLP	67	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
APPLPPR	68	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
DVFYPYPYASGS	69	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
MYWYPY	70	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
DITWDQLWDLMK	71	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CWDD(G/L)WLC	72	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
EWCEYLGGLRCYA	73	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
YXCXXGPXTWXCXP	74	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
IEGPTLRQWLAARA	75	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
LWXX(Y/W/F/H)	76	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
XFXXYLW	77	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
RWGLCD	78	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
MSRPACPPNDKYE	79	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CLRSRGC	80	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CHWMFSPWC	81	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
WXXF	82	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CSSRLDAC	83	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CLPVASC	84	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CGFECVRQCPERC	85	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CVALCREACGEGC	86	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
SWCEPGWCR	87	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
YSGWGW	88	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
GLSGGRS	89	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
LMLPRAD	90	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CSCFRDVCC	91	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CRDVSVIC	92	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CNGRC	93	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
MARSGL	94	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MARAKE	95	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MSRTMS	96	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
KCCYSL	97	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MYWGDSHWLQYWY E	98	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MLPLAT	99	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
EWLS	100	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SNEW	101	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
TNYL	102	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WIFPWIQL	103	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WDLAWMFRLPBT	104	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CTVALPGGYVRVC	105	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVPELGHEC	106	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CGRRAGGSC	107	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVAYCIEHHCWTC	108	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVFAHNYDYLC	109	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
		Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVFTSNYAFC	110	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
VHSPNKK	111	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CDCRGDCFC	112	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CRGDGWC	113	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
XRGCDX	114	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
PXX(S/T)	115	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CTTHWGFTLC	116	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SGKΓPRQITAL	117	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
A(A/Q)(N/A)(L/Y)(T/V/ M/R)(R/K)	118	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
VYMSPF	119	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MLPLAT	120	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
ATWLPPR	121	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
HTMYHHYQHHL	122	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SEBΓCAGPLQWLCE KYFG	123	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CGLLPBΓRPDRNVWR WLC	124	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
		163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CKGQCDRFKGLPWEC	125	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SGRSA	126	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WGFP	127	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
LWXXAr	128	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
XFXXYLW	129	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
AEPMPHSLNFSQYLW YT	130	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WAY(W/F)SP	131	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
IELLQAR	132	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
DITWDQLWDLMK	133	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
AYTKCSRQWRTCMT TH	134	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
PQNSKIPGPTFLDPH	135	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SMEPALPDWWWKMF K	136	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
ANTPCGPYTHDCPVK R	137	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
TACHQHVRMVRP	138	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
VPWMEPAYQRFL	139	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
DPRATPGS	140	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
FRPNRAQDYNTN	141	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CTKNSYLMC	142	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
C(R/Q)L/RT(G/N)XXG(A/V)GC	143	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CPIEDRPMC	144	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
HEWSYLAPYPWF	145	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MCPKHPLGC	146	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
RMWPSSTVNL SAGRR	147	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SAKTAVSQRVWLPSH RGGEP	148	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
KSREHVNNSACPSKRI TAAL	149	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
EGFR	150	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
AGLGVR	151	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
GTRQGHTMRLGVSD G	152	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
IAGLATPGWSHWLAL	153	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SMSIARL	154	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
HTFEPGV	155	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in

Последовательность	SEQ ID NO	Ссылка
		Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
NTSLKRISNKR1RRK	156	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
LRIKRKRRKRRKTRK	157	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

Y*представляет собой фосфо-Тур

В некоторых воплощениях нацеливающая последовательность может представлять собой пептид, который можно использовать для химического связывания (например, может содержать остатки аргинина и/или лизина, которые могут быть химически связаны через их R-группы) с другой молекулой, которая направляет вход в клетку.

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка AAV или белковый капсид может содержать мутацию, как описано в WO 2006/066066. Например, субъединица капсидного белка может содержать селективную аминокислотную замену в положении аминокислот 263, 705, 708 и/или 716 нативной субъединицы капсидного белка AAV2 или соответствующее(ие) изменение(я) в субъединице капсидного белка из другого серотипа AAV.

Дополнительно или альтернативно, в некоторых воплощениях субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор содержит селективную аминокислотную вставку непосредственно вслед за положением аминокислоты 264 субъединицы капсидного белка AAV2 или соответствующее изменение в субъединице капсидного белка из другого AAV. Под выражением “непосредственно вслед за положением аминокислоты X” понимают, что вставка расположена сразу после указанного положения аминокислоты (например, выражение “вслед за положением аминокислоты 264” указывает на точечную вставку в положении 265 или более длинную вставку, например от положения 265 до 268, и так далее).

Кроме того, в некоторых воплощениях субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор могут содержать аминокислотные модификации, такие как описаны в публикации РСТ-заявки No. WO 2010/093784 (например, 2i8) и/или в публикации РСТ-заявки No. WO 2014/144229 (например, двойной гликан).

В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор могут обладать эквивалентной или усиленной эффективностью трансдукции относительно эффективности трансдукции серотипа AAV, от которого происходит субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор могут обладать пониженной эффективностью трансдукции по сравнению с эффективностью трансдукции серотипа AAV, от которого происходит эта субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор может иметь эквивалентный или усиленный тропизм по сравнению с тропизмом серотипа AAV, от которого происходит субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор могут иметь измененный или отличающийся тропизм по сравнению с тропизмом серотипа AAV, от которого происходит субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор могут иметь тропизм к ткани мозга или быть сконструированными для придания такого тропизма. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка, белковый капсид или вирусный вектор могут иметь тропизм к ткани печени или быть сконструированными для придания такого тропизма.

Описанные здесь AAV-векторы можно использовать для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку или в субъекта. Например, модифицированный вектор можно использовать для лечения лизосомной болезни накопления, такой как мукополисахаридоз (например, синдром Слая [β -глюкуронидаза], синдром Гурлер [альфа-L-идуронидаза], синдром Шейе [альфа-L-идуронидаза], синдром Гурлер-Шейе [альфа-L-идуронидаза], синдром Гунтера [идуронат-сульфатаза], синдром Санфилиппо (А [гепаран-сульфамидаза], В [N-ацетилглюкозаминидаза], С [ацетил-СоА:альфа-глюкозаминид-ацетилтрансфераза], D [N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза]), синдром Моркио (А [галактозо-6-сульфат-сульфатаза], В [β -галактозидаза]), синдром Марото-Лами [N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза] и так далее), болезнь Фабри (а-галактозидаза), болезнь Гоше (глюкоцереброзидаза) или гликогеноз (например, болезнь Помпе; лизосомная кислая альфа-глюкозидаза), как описано здесь.

Специалист в данной области техники понимает, что для некоторых субъединиц капсидного белка AAV соответствующая модификация будет представлять собой вставку и/или замену в зависимости от того, присутствуют ли в вирусе аминокислоты в соответствующих положениях частично или полностью или, альтернативно, полностью отсутствуют.

В некоторых воплощениях вирусные векторы содержат описанные здесь модифицированные субъединицы капсидного белка и белковые капсиды. В некоторых воплощениях вирусный вектор представляет собой парвовирусный вектор (например, содержащий парвовирусный белковый капсид и/или векторный геном), например, AAV-вектор (например, содержащий белковый капсид и/или векторный геном AAV). В некоторых воплощениях вирусный вектор содержит модифицированный белковый капсид AAV, содержащий модифицированную субъединицу капсидного белка, как описано здесь, и векторный геном.

Например, в некоторых воплощениях вирусный вектор содержит: (а) модифицированный белковый капсид (например, модифицированный белковый капсид AAV), содержащий модифицированную субъединицу капсидного белка, описанную здесь; и (б) нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность концевого повтора (например, AAV TR), где нуклеиновая кислота, содержащая последовательность концевого повтора, инкапсидирована в модифицированный белковый капсид. Возможно нуклеиновая кислота может содержать два концевых повтора (например, два AAV TR).

В некоторых воплощениях вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вирусный вектор, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую интересующий полипептид или интересующую функциональную РНК. Рекомбинантные вирусные векторы описаны более подробно ниже.

В некоторых воплощениях вирусные векторы: (1) обладают пониженной способностью трансдуцировать печень по сравнению с уровнем трансдукции вирусным вектором без модифицированной субъединицы капсидного белка; (2) проявляют повышенный уровень системной трансдукции вирусным вектором у субъекта-животного по сравнению с уровнем, наблюдаемым для вирусного вектора без модифицированной субъединицы капсидного белка; (3) демонстрируют усиленное движение через эндотелиальные клетки по сравнению с уровнем движения вирусного

вектора без модифицированной субъединицы капсидного белка, и/или (4) проявляют селективное усиление трансдукции мышечной ткани (например, скелетной мышцы, сердечной мышцы и/или мышцы диафрагмы), (5) проявляют селективное усиление трансдукции ткани печени, и/или (6) уменьшение уровня трансдукции тканей мозга (например, нейронов) по сравнению с уровнем трансдукции вирусным вектором без модифицированной субъединицы капсидного белка. В некоторых воплощениях вирусный вектор проявляет системную трансдукцию в отношении печени.

В некоторых воплощениях вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса содержит: (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180 или 175; и (2) кассету для переноса, инкапсидированную в белковый капсид; где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; транскрипционный белок NPC1; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит последовательность SEQ ID NO: 180. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит последовательность SEQ ID NO: 175.

В некоторых воплощениях вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса содержит: (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180 или 175, или последовательность, содержащую от примерно 1 до примерно 25 аминокислотных мутаций относительно SEQ ID NO: 180 или 175; и (2) кассету для переноса, инкапсидированную в белковый капсид; где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; транскрипционный белок NPC1; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR. В некоторых воплощениях субъединица капсидного белка содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислотных мутаций относительно SEQ ID NO: 180 или 175.

В некоторых воплощениях длина по меньшей мере одного из 5'-ITR и 3'-ITR составляет от примерно 110 до примерно 160 нуклеотидов. В некоторых воплощениях 5'-ITR имеет такую же длину как 3'-ITR. В некоторых воплощениях 5'-ITR и 3'-ITR имеют разную длину. В некоторых воплощениях по меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR выделен из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего

AAV или бычьего AAV или имеет происхождение из такого генома. В некоторых воплощениях 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3003. В некоторых воплощениях 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3004.

В некоторых воплощениях промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых воплощениях промотор представляет собой индуцибельный промотор. В некоторых воплощениях промотор представляет собой тканеспецифичный промотор. В некоторых воплощениях промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379, промотора HSVTK, промотора CMV, раннего промотора SV40, позднего промотора SV40, промотора металлотioneина, промотора вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотора вируса аркомы Рауса (RSV), промотора полиэдрина, промотора β -актина кур (CBA), альфа-промотора EF-1, промотора дигидрофолатредуктазы (DHFR) и промотора фосфоглицеролкиназы (PGK). В некоторых воплощениях промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379 и промотора HSVTK. В некоторых воплощениях промотор содержит последовательность по меньшей мере на 95% или 100% идентичную одной из SEQ ID NO: 3005, SEQ ID NO: 3006, SEQ ID NO: 3007 или SEQ ID NO: 3008.

В некоторых воплощениях белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности белка NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности белка NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 98% идентичную последовательности белка NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3001.

В некоторых воплощениях трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 3002.

В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования выбран из сигнала полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (SV40), rBG, α -глобина, β -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) и бычьего гормона роста (bGH). В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40. В

некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования гBG.

В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования содержит последовательность по меньшей мере на 95% или 100% идентичную SEQ ID NO: 3012 или SEQ ID NO: 3013.

В некоторых воплощениях кассета для переноса дополнительно содержит энхансер. В некоторых воплощениях энхансер представляет собой энхансер CMV. В некоторых воплощениях энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 3009 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3009.

В некоторых воплощениях кассета для переноса дополнительно содержит интронную последовательность. В некоторых воплощениях интронная последовательность представляет собой химерную последовательность.

В некоторых воплощениях интронная последовательность представляет собой гибридную последовательность. В некоторых воплощениях интронная последовательность содержит последовательность, выделенную или имеющую происхождение из SV40. В некоторых воплощениях интронная последовательность содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3010-3011. В некоторых воплощениях AAV-кассета для переноса содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3014-3019.

Специалист в данной области техники понимает, что описанные здесь модифицированные субъединицы капсидного белка, белковые капсиды и вирусные векторы исключают такие субъединицы капсидного белка, белковые капсиды и вирусные векторы, которые имеют указанные аминокислоты в указанных положениях в их нативном состоянии (то есть, не являются мутантными).

Кассеты для переноса на основе AAV

Здесь описаны кассеты для переноса на основе AAV, нуклеиновые кислоты и плазмиды, используемые в продукции рекомбинантных векторов на основе аденоассоциированных вирусов (rAAV). Раскрытые здесь кассеты, нуклеиновые кислоты и плазмиды содержат последовательности, которые можно использовать для экспрессии одного или более чем одного трансгена, обладающего терапевтической эффективностью в улучшении, лечении и/или предупреждении одного или более чем одного заболевания или расстройства.

В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV содержат 5'-инвертированный концевой повтор (ITR), трансген и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV содержат 5'-ITR, промотор, трансген и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV содержат 5'-ITR, промотор, трансген, последовательность полиаденилирования и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV содержат 5'-ITR, промотор, трансген, последовательность полиаденилирования и 3'-ITR; где кассета для переноса содержит интронную последовательность. В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV содержат 5'-ITR, промотор, интронную последовательность, трансген, последовательность полиаденилирования и 3'-ITR. В некоторых воплощениях трансген кодирует белок NPC1 или его фрагмент или вариант.

Инвертированный концевой повтор

Последовательности инвертированного концевого повтора или ITR представляют собой последовательности, которые опосредуют интеграцию провируса AAV и упаковку ДНК AAV в вирионы. ITR вовлечены в разнообразные активности в жизненном цикле AAV. Например, последовательности ITR, которые могут образовывать шпильчатую структуру, участвуют в вырезании из плазмиды после трансфекции, репликации векторного генома и интеграции и высвобождении из генома клетки-хозяина.

Кассеты для переноса на основе AAV по изобретению могут содержать 5'-ITR и 3'-ITR. Длина последовательностей ITR может составлять от примерно 110 до примерно 160 нуклеотидов, например 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 или 160 нуклеотидов. В некоторых воплощениях длина последовательностей ITR может составлять примерно 141 нуклеотидов. В некоторых воплощениях 5'-ITR имеет такую же длину как 3'-ITR. В некоторых воплощениях 5'-ITR и 3'-ITR имеют разную длину. В некоторых воплощениях 5'-ITR длиннее чем 3'-ITR, а в других воплощениях 3'-ITR длиннее чем 5'-ITR.

ITR могут быть выделены или иметь происхождение из генома любого AAV, например AAV, перечисленных в Таблице 1. В некоторых воплощениях по меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR выделен или имеет происхождение из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12,

AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV или бычьего AAV. В некоторых воплощениях по меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR может представлять собой ITR дикого типа или мутированный ITR, выделенный или имеющий происхождение из представителя другого вида парвовирусов, отличного от AAV. Например, в некоторых воплощениях ITR может представлять собой ITR дикого типа или мутатный ITR, выделенный или имеющий происхождение из бокавируса или парвовируса B19.

В некоторых воплощениях ITR содержит модификацию для активации продукции scAAV. В некоторых воплощениях модификация для активации продукции scAAV представляет собой делецию последовательности концевой разрешения (TRS) из ITR. В некоторых воплощениях 5'-ITR представляет собой ITR дикого типа, и 3'-ITR представляет собой мутированный ITR, лишенный последовательности концевой разрешения. В некоторых воплощениях 3'-ITR представляет собой ITR дикого типа, и 5'-ITR представляет собой мутированный ITR, лишенный последовательности концевой разрешения. В некоторых воплощениях последовательность концевой разрешения отсутствует как на 5'-ITR, так и на 3'ITR. В других воплощениях модификация для активации продукции scAAV представляет собой замену ITR на другую последовательность, образующую шпильку, такую как последовательность, образующая кшПНК (короткую шпилечную ПНК).

В некоторых воплощениях 5'-ITR может содержать последовательность SEQ ID NO: 3003 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 3003. В некоторых воплощениях 3'-ITR может содержать последовательность SEQ ID NO: 3004 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 3004. В некоторых воплощениях 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3003, и 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3004.

В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV содержат один или более чем один “суррогатный” ITR, то есть, последовательность, не являющуюся ITR, которая выполняет такую же функцию как ITR. См., например, Xie, J. et al., *Mol. Ther.*, 25(6): 1363-1374 (2017). В некоторых воплощениях ITR в кассете для переноса на основе AAV заменен на суррогатный ITR. В некоторых воплощениях суррогатный ITR содержит последовательность, образующую шпильку. В некоторых воплощениях суррогатный ITR представляет собой последовательность, образующую короткую шпилечную (кш)ПНК.

Промоторы, энхансеры, репрессоры и другие регуляторные последовательности

Экспрессию генов могут контролировать нуклеотидные последовательности, называемые промоторами и энхансерами, фланкирующие кодирующую область для определенного белка.

Как его используют здесь, термин “промотор” относится к одной или более чем одной регуляторной последовательности нуклеиновой кислоты, которая направляет транскрипцию функционально связанной нуклеиновой кислоты. Промоторы могут включать последовательности нуклеиновой кислоты около сайта начала транскрипции, такого как ТАТА-элемент. Также промоторы могут включать цис-действующие полинуклеотидные последовательности, с которыми могут связываться транскрипционные факторы.

“Конститутивный” промотор представляет собой промотор, который является активным в большинстве условий окружающей среды и стадий развития. “Индукцибельный” промотор представляет собой промотор, который является активным при регулировании условий окружающей среды или стадии развития. Термин “функционально связанный” относится к функциональной связи между последовательностью, контролирующей экспрессию нуклеиновой кислоты (такую как промотор или набор сайтов связывания транскрипционных факторов) и второй последовательностью нуклеиновой кислоты, где последовательность, контролирующая экспрессию, направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

Также экспрессию генов может контролировать один или более чем один дистальный “энхансерный” или “репрессорный” элемент, который может быть расположен на расстоянии нескольких тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции. Энхансерные или репрессорные элементы регулируют транскрипцию способом, аналогичным цис-действующим элементам около сайта начала транскрипции, за исключением того, что энхансерные элементы могут действовать на расстоянии от сайта начала транскрипции.

В некоторых воплощениях описанные здесь кассеты для переноса на основе AAV содержат промотор. Их промотор может представлять собой, например, конститутивный промотор или индуцибельный промотор. В некоторых воплощениях промотор представляет собой тканеспецифичный промотор.

Примеры промоторов, которые можно использовать в описанных здесь кассетах для переноса на основе AAV, включают промотор CMV, ранний промотор SV40, поздний промотор SV40, промотор металлотионеина, промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор полиэдрина, промотор β -актина кур (CBA), промотор дигидрофолатредуктазы (DHFR) и промотор фосфоглицеролкиназы (PGK). В некоторых воплощениях промотор выбран из группы, состоящей из промотора β -актина кур (CBA), альфа-промотора EF-1 и короткого альфа-промотора EF-1. В некоторых воплощениях промотор содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 3005-3008, или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную таковой.

В некоторых воплощениях описанные здесь кассеты для переноса на основе AAV содержат энхансер. Энхансер может представлять собой, например, энхансер CMV. В некоторых воплощениях энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 3009 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 3009.

Неограничивающий перечень примеров тканеспецифичных промоторов и энхансеров, которые можно использовать в описанных здесь кассетах для переноса на основе AAV, включает: промотор редуктазы HMG-COA; стеролрегулирующий элемент 1 (SRE-1); промотор фосфоенолпируват карбоксикиназы (PEPCK); промотор С-реактивного белка (CRP) человека; промотор глюкокиназы человека; промотор холестерол-7-альфа-гидролазы (CYP-7); промотор бета-галактозидазы альфа-2,6 сиалилтрансферазы; промотор белка, связывающегося с инсулиноподобным фактором роста (IGFBP-1); промотор альдолазы В; промотор трансферрина человека; промотор коллагена типа I; промотор простатической кислой фосфатазы (PAP); промотор простатического секреторного белка 94 (PSP 94); промотор комплекса специфического антигена предстательной железы; промотор гена железистого калликреина человека (hgt-1); миоцит-специфический энхансер, связывающийся с фактором MEF-2; промотор мышечной креатинкиназы; промотор белка, ассоциированного с панкреатитом (PAP); энхансер транскрипции эластазы 1; энхансер промотор амилазы и эластазы, специфичной к поджелудочной железе; промотор гена панкреатической холестеролэстеразы; промотор утероглобина; промотор расщепления боковой цепи холестерина (SCC); промотор гамма-гамма енолазы (нейрон-специфической енолазы, NSE); промотор тяжелой цепи нейрофиламентов (NF-H); промотор CGL-1/гранзима В человека; промотор концевой дезокситрансферазы (TdT), лямбда 5, VpreB и Ick

(лимфоцит-специфической тирозинкиназы p56lck); промотор CD2 человека и его 3'-транскрипционный энхансер; промотор специфической активации NK и Т-клеток человека (NKG5); промотор тирозинкиназы pp60c-src; промотор орган-специфических неоантигенов (OSN), мол.масса 40 кДа (p40); промотор специфического антигена Р толстой кишки; промотор альфа-лактальбумина человека; промотор фосфоенолпируват-карбоксикиназы (PEPCK), промотор HER2/неу, промотор казеина, промотор IgG, промотор хорионического эмбрионального антигена, промотор эластазы, промотор дезаминазы порфобилиногена, промотор инсулина, промотор фактора-гормона роста, промотор тирозингидроксилазы, промотор альбумина, промотор альфафетопroteина, промотор рецептора ацетилхолина, промотор алкогольдегидрогеназы, промотор альфа- или бета-глобина, промотор рецептора Т-клеток, промотор остеокальцина, промотор IL-2, промотор рецептора IL-2, whey-промотор (war) и промотор МНС класса II.

Трансген

Описанные здесь кассеты для переноса на основе AAV содержат трансген для экспрессии в клетке-мишени.

Трансген может представлять собой любую(ые) интересующую(ие) гетерологичную(ые) последовательность(и) нуклеиновой кислоты. Такие нуклеиновые кислоты могут включать нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, включая терапевтические (например, для медицинского или ветеринарного применения) или иммуногенные (например, для вакцин) полипептиды или РНК. Альтернативно, нуклеиновая кислота может кодировать антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим, РНК, которые действуют на опосредованный сплайсosomal/ram-сплайсинг, интерферирующие РНК (РНКи), включая миРНК (малая интерферирующая РНК), кшРНК (короткая шпилечная РНК) или микроРНК, которые опосредуют “молчание” генов, и другие нетранслируемые РНК. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты может направлять редактирование генов. Например, нуклеиновая кислота может кодировать молекулу редактирования генов, такую как РНК-гид или нуклеаза. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота может кодировать нуклеазу с “цинковыми пальцами”, “хоуминг”-эндонуклеазу, TALEN (нуклеаза на основе эффектора, подобного активатору транскрипции), NgAgo (“agronaute”-эндонуклеаза), SGN (направляемая структурой эндонуклеаза) или RGN (РНК-направляемая эндонуклеаза), такую как нуклеаза Cas9 или нуклеаза Cpf1. В некоторых воплощениях

нуклеиновая кислота может иметь гомологию с локусом на хромосоме хозяина и рекомбинировать с таковым. Этот подход можно применять, например, для коррекции генетического дефекта клетки-хозяина.

Вирусные векторы по настоящему изобретению обеспечивают средство для доставки трансгенов в широкий диапазон клеток, включая делящиеся и неделящиеся клетки. Вирусные векторы можно использовать для доставки трансгена в клетку *in vitro*, например, для продукции полипептида *in vitro* или для генной терапии *ex vivo*. Дополнительно вирусные векторы являются полезными в способе доставки трансгена субъекту, нуждающемуся в такой доставке, например, для экспрессии иммуногенного или терапевтического полипептида или функциональной РНК. Таким образом, полипептид или функциональную РНК можно продуцировать *in vivo* у субъекта. Субъект может нуждаться в таком полипептиде из-за того, что субъект имеет недостаток полипептида. Далее способ может быть воплощен на практике по той причине, что продукция полипептида или функциональной РНК у субъекта может оказывать некоторое полезное действие. Как его используют здесь, термин “функциональная РНК” относится к некодирующей последовательности РНК, которая имеет одну или более чем одну функцию в клетке, такую как функции, описанные в предыдущем абзаце.

Также вирусные векторы можно использовать для доставки нуклеиновых кислот для продукции интересующего полипептида или интересующей функциональной РНК в культивируемые клетки или субъекту (например, при использовании субъекта в качестве биореактора для продукции полипептида или для наблюдения действия функциональной РНК на субъекта, например, в связи с методами скрининга).

В целом, вирусные векторы по настоящему изобретению можно применять для доставки трансгена, кодирующего полипептид или функциональную РНК для лечения и/или предупреждения любого состояния заболевания, для которого полезна доставка терапевтического полипептида или функциональной РНК.

В некоторых воплощениях трансген является полезным для лечения NPC1. В некоторых воплощениях трансген кодирует белок NPC1. Белок NPC1 может представлять собой, например, белок NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную или по меньшей мере на 98% идентичную последовательности белка NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1

содержит одно или более чем одно однонуклеотидное изменение из перечисленных в Таблице 9 (нумерация на основе SEQ ID NO: 3001 или 3020). В некоторых воплощениях белок NPC1 представляет собой укороченную форму белка NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3001 или последовательность по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 96% идентичную, по меньшей мере на 97% идентичную, по меньшей мере на 98% идентичную или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 3001. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3020 или а последовательность по меньшей мере 90% идентичную, по меньшей мере 95% идентичную, по меньшей мере 96% идентичную, по меньшей мере 97% идентичную, по меньшей мере 98% идентичную, или по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 3020. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3001 или 3020 с одним или более чем одним однонуклеотидным изменением из перечисленных в Таблице 9. В некоторых воплощениях белок NPC1 имеет последовательность, представленную в UniProt под номером доступа No. O15118, включенную в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых воплощениях трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 3002 или последовательность по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 96% идентичную, по меньшей мере на 97% идентичную, по меньшей мере на 98% идентичную или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 3002. В некоторых воплощениях трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 3002 или последовательность с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более изменениями нуклеиновой кислоты относительно SEQ ID NO: 3002. В некоторых воплощениях трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3001. В некоторых воплощениях трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3020.

Таблица 9: Последовательности вариантов NPC1

Положения пронумерованы на основе SEQ ID NO: 3001 или SEQ ID NO: 3020.

Положение	Мутация	Положение	Мутация	Положение	Мутация
63	C→R	691	P→L	1012	G→D
74	C→Y	695	L→V	1015	G→V
92	Q→R	700	D→N	1016	H→R

113	$C \rightarrow R$	703	$F \rightarrow S$	1023	$V \rightarrow G$
137	$T \rightarrow M$	724	$L \rightarrow P$	1034	$G \rightarrow R$
151	$S \rightarrow G$	727	$V \rightarrow F$	1035	$A \rightarrow V$
166	$P \rightarrow S$	734	$S \rightarrow I$	1036	$T \rightarrow K$
177	$C \rightarrow G$	742	$E \rightarrow K$	1036	$T \rightarrow M$
177	$C \rightarrow Y$	745	$A \rightarrow E$	1049	$A \rightarrow V$
215	$H \rightarrow R$	754	$M \rightarrow K$	1054	$A \rightarrow T$
222	$N \rightarrow S$	757	$V \rightarrow A$	1059	$R \rightarrow Q$
231	$V \rightarrow G$	763	$F \rightarrow L$	1061	$I \rightarrow T$
237	$P \rightarrow S$	767	$A \rightarrow V$	1062	$A \rightarrow V$
242	$D \rightarrow H$	775	$Q \rightarrow P$	1066	$T \rightarrow N$
242	$D \rightarrow N$	789	$R \rightarrow C$	1087	$F \rightarrow L$
247	$C \rightarrow Y$	789	$R \rightarrow G$	1088	$Y \rightarrow C$
248	$G \rightarrow V$	825	$Y \rightarrow C$	1089	$E \rightarrow K$
272	$M \rightarrow R$	849	$S \rightarrow I$	1094	$I \rightarrow T$
333	$G \rightarrow D$	858	$I \rightarrow V$	1097	$D \rightarrow N$
372	$R \rightarrow W$	862	$Q \rightarrow L$	1137	$N \rightarrow I$
378	$V \rightarrow A$	865	$S \rightarrow L$	1140	$G \rightarrow V$
380	$L \rightarrow F$	871	$Y \rightarrow C$	1142	$M \rightarrow T$
381	$W \rightarrow C$	873	$V \rightarrow A$	1150	$N \rightarrow K$
388	$A \rightarrow P$	874	$D \rightarrow V$	1156	$N \rightarrow I$
389	$R \rightarrow C$	888	$P \rightarrow S$	1156	$N \rightarrow S$
401	$P \rightarrow T$	889	$V \rightarrow M$	1165	$V \rightarrow M$
404	$R \rightarrow P$	890	$Y \rightarrow C$	1167	$F \rightarrow L$
404	$R \rightarrow Q$	899	$Y \rightarrow D$	1168	$C \rightarrow Y$
404	$R \rightarrow W$	910	$G \rightarrow S$	1174	$A \rightarrow V$
433	$P \rightarrow L$	917	$D \rightarrow Y$	1186	$R \rightarrow H$
434	$P \rightarrow L$	926	$A \rightarrow T$	1189	$E \rightarrow G$
434	$P \rightarrow S$	927	$A \rightarrow V$	1205	$T \rightarrow K$
451	$E \rightarrow K$	928	$Q \rightarrow P$	1205	$T \rightarrow R$
472	$L \rightarrow P$	929	$L \rightarrow P$	1212	$V \rightarrow L$
473	$S \rightarrow P$	934	$R \rightarrow Q$	1213	$L \rightarrow F$
474	$P \rightarrow L$	940	$S \rightarrow L$	1213	$L \rightarrow V$
479	$C \rightarrow Y$	942	$W \rightarrow C$	1216	$A \rightarrow V$
509	$Y \rightarrow S$	943	$I \rightarrow M$	1220	$I \rightarrow T$
510	$H \rightarrow P$	944	$D \rightarrow N$	1224	$F \rightarrow L$
511	$T \rightarrow M$	945	$D \rightarrow N$	1236	$G \rightarrow E$
512	$H \rightarrow R$	948	$D \rightarrow H$	1240	$G \rightarrow R$
518	$R \rightarrow Q$	948	$D \rightarrow N$	1249	$S \rightarrow G$
518	$R \rightarrow W$	948	$D \rightarrow Y$	1266	$R \rightarrow Q$
521	$A \rightarrow S$	950	$V \rightarrow M$		
537	$F \rightarrow L$	954	$S \rightarrow L$		
543	$P \rightarrow L$	956	$C \rightarrow Y$		
574	$T \rightarrow K$	958	$R \rightarrow L$		
576	$K \rightarrow R$	958	$R \rightarrow Q$		
605	$A \rightarrow V$	959	$V \rightarrow E$		
612	$E \rightarrow D$	961-966	$NITDQF \rightarrow S$		
615	$R \rightarrow C$	961	$N \rightarrow S$		

615	R→L	968	N→S		
631	M→R	971	V→G		
640	G→R	976	C→R		
642	M→I	978	R→C		
652	S→W	986	G→S		
660	G→S	992	G→A		
664	V→M	992	G→R		
666	S→N	992	G→W		
670	C→W	996	M→R		
673	G→V	1004	S→L		
684	L→F	1007	P→A		

Сигнал полиаделирования (Поли(A))

Сигналы полиаденилирования представляют собой нуклеотидные последовательности, обнаруживаемые почти во всех генах млекопитающих и контролирующие присоединение цепочки приблизительно из 200 остатков аденозина (поли(A)-хвост) к 3'-концу генного транскрипта. Поли(A)-хвост имеет отношение к стабильности мРНК, и мРНК, лишенные поли(A)-хвоста, быстро разрушаются. Также есть данные, подтверждающие что присутствие поли(A)-хвоста положительно влияет на трансляционную способность мРНК путем воздействия на инициацию трансляции.

В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV по изобретению содержат сигнал полиаденилирования. Сигнал полиаденилирования может быть выбран из сигнала полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (SV40), α -глобина, β -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) и бычьего гормона роста (bGH). В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40. В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования rBG. В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования содержит последовательность SEQ ID NO: 3012 или SEQ ID NO: 3013. В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования содержит последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3012 или SEQ ID NO: 3013.

Спейсерные последовательности

AAV-векторы обычно допускают вставки ДНК, имеющие определенный диапазон размеров, который обычно составляет от примерно 4 т.п.н. до примерно 5,2 т.п.н. или немного больше. Следовательно, для более коротких трансгенных

последовательностей может быть необходимо включение дополнительной нуклеиновой кислоты во фрагмент вставки для достижения требуемой длины, приемлемой для AAV-вектора. Соответственно, в некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать спейсерную последовательность. Спейсерная последовательность может представлять собой, например, последовательность длиной 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1000, 1000-1500, 1500-2000, 2000-2500, 2500-3000, 3000-3500, 3500-4000, 4000-4500 до 4500-5000 нуклеотидов. Спейсерная последовательность может быть расположена в кассете в любом желаемом положении, так чтобы она не препятствовала функционированию или активности вектора.

Интронные последовательности

В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать интронную последовательность. Включение интронной последовательности может усиливать экспрессию по сравнению с экспрессией в отсутствие интронной последовательности. В некоторых случаях интронная последовательность может увеличивать экспрессию гена, не функционируя в качестве сайта связывания для транскрипционных факторов. Например, интронная последовательность может увеличивать уровни транскриптов путем воздействия на скорость транскрипции, ядерный транспорт и стабильность транскриптов. В некоторых воплощениях интронная последовательность повышает эффективность трансляции мРНК.

В некоторых воплощениях интронная последовательность представляет собой гибридную или химерную последовательность. В некоторых воплощениях интронная последовательность выделена или имеет происхождение из интронной последовательности одного или более чем одного из SV40, β -глобина, бета-актина кур, мелкого вируса мышей (MVM), фактора IX и/или IgG человека (тяжелой или легкой цепи). В некоторых воплощениях интронная последовательность выделена или имеет происхождение из SV40. В некоторых воплощениях интронная последовательность является химерной. В некоторых воплощениях интронная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 3010 или SEQ ID NO: 3011 или последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей

мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 3010 или SEQ ID NO: 3011.

Интронная последовательность может быть расположена в любом месте кассеты для переноса, где она не мешает продукции AAV-вектора. Например, в некоторых воплощениях интронная последовательность может быть расположена между промотором и трансгеном.

Иллюстративные кассеты для переноса на основе AAV

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе аденоассоциированного вируса (AAV) содержит 5'-инвертированный концевой повтор (ITR), промотор, трансген, сигнал полиаденилирования и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе аденоассоциированного вируса (AAV) содержит 5'-инвертированный концевой повтор (ITR), промотор, интронную последовательность, трансген, сигнал полиаденилирования и 3'-ITR. В некоторых воплощениях трансген кодирует белок NPC1. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV дополнительно содержит энхансер. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV дополнительно содержит интронную последовательность.

В некоторых воплощениях 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3003, и 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3004. В некоторых воплощениях энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 3009. В некоторых воплощениях промотор содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3005-3008. В некоторых воплощениях интронная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 3010 или 3011. В некоторых воплощениях трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 3002. В некоторых воплощениях сигнал поли(A) содержит последовательность SEQ ID NO: 3012 или 3013. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3014-3019.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, промотор CBA, интрон SV40, трансген, кодирующий белок NPC1, сигнал полиаденилирования SV40 и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, промотор GUSB240, химерный интрон, трансген, кодирующий белок NPC1, сигнал полиаденилирования tBG и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, промотор

GUSB379, интрон SV40, трансген, кодирующий белок NPC1, сигнал полиаденилирования гBG и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, промотор GUSB240, химерный интрон, трансген, кодирующий белок NPC1, сигнал полиаденилирования SV40 и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, промотор GUSB240, интрон SV40, трансген, кодирующий белок NPC1, сигнал полиаденилирования SV40 и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, энхансер CMV, промотор HSVTK, трансген, кодирующий белок NPC1, сигнал полиаденилирования гBG и 3'-ITR.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3003; промотор CBA, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3005; интрон SV40, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3010; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 3001); сигнал полиаденилирования SV40, содержащий SEQ ID NO: 3012, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3004.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3003; промотор GUSB240, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3006; химерный интрон, содержащий SEQ ID NO: 3011; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 3001); сигнал полиаденилирования гBG, содержащий SEQ ID NO: 3013, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3004.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3003; промотор GUSB379, содержащий SEQ ID NO: 3006; интрон SV40, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3010; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 3001); сигнал полиаденилирования гBG, содержащий SEQ ID NO: 3013, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3004.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3003; промотор GUSB240, содержащий SEQ ID NO: 3007; химерный интрон, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3011; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 3001); сигнал полиаденилирования SV40, содержащий SEQ ID NO: 3012, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3004.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3003; промотор GUSB240, содержащий SEQ ID NO: 3006; интрон SV40, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3010; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 3001); сигнал полиаденилирования SV40, содержащий SEQ ID NO: 3012, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3004.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3003; энхансер CMV; промотор HSVTK, содержащий SEQ ID NO: 3008; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 3001); сигнал полиаденилирования rBG, содержащий SEQ ID NO: 3013, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3004.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса на основе AAV. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит трансген, где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3001. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит трансген, где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3020. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3001 или SEQ ID NO: 3020. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где нуклеиновая кислота содержит интронную последовательность; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3001 или SEQ ID NO: 3020. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор бета-актина кур; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где кассета для переноса содержит интронную последовательность; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3001 или SEQ ID NO: 3020. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; интронную последовательность; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3001 или SEQ ID NO: 3020. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит в

направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор бета-актина кур; интронную последовательность; трансген; сигнал полиаденилирования и 3'-ITR; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3001 или SEQ ID NO: 3020. Описанные здесь кассеты для переноса на основе AAV могут быть вставлены в вектор (например, плазмиду или бакмиду) с использованием стандартных молекулярно-биологических методов. Вектор (например, плаزمид или бакмида) может дополнительно содержать один или более чем один генетический элемент, используемый во время продукции AAV, включая, например, гены гер и сар AAV и последовательности белков вируса-помощника.

Способы получения вирусных векторов

Также здесь предложены способы получения вирусных векторов. В некоторых воплощениях способ получения AAV-вектора, избегающего нейтрализующие антитела, включает: а) идентификацию контактных аминокислотных остатков, образующих трехмерный антигенный футпринт, на субъединице капсидного белка или белковом капсиде AAV; б) генерирование библиотеки субъединиц капсидного белка AAV, содержащих аминокислотные замены контактных аминокислотных остатков, идентифицированных в (а); в) получение AAV-частиц, содержащих субъединицы капсидного белка из библиотеки субъединиц капсидного белка AAV из (б); г) приведение в контакт AAV-частиц из (в) с клетками в условиях, в которых может происходить инфицирование и репликация; д) отбор AAV-частиц, которые могут завершить по меньшей мере один цикл инфицирования и реплицироваться до титров, близких к контрольным AAV-частицам: 1) приведение в контакт AAV-частиц, выбранных в (д), с нейтрализующими антителами и клетками в условиях, в которых может происходить инфицирование и репликация; и ж) отбор AAV-частиц, которые не нейтрализуют нейтрализующие антитела в е). Неограничивающие примеры способов идентификации контактных аминокислотных остатков включают картирование пептидных эпитопов и/или криоэлектронную микроскопию.

Разрешение и идентификация контактных остатков антитела в трехмерном антигене футпринте дает возможность их последующей модификации путем случайного, рационального и/или “вырожденного” мутагенеза для генерирования избегающих антител белковых капсидов и/или субъединиц капсидного белка AAV, которые можно идентифицировать путем дальнейшего отбора или и/или скрининга.

Таким образом, в некоторых воплощениях способ получения AAV-вектора, избегающего нейтрализующие антитела включает: а) идентификацию контактных аминокислотных остатков, образующих трехмерных антигенных футпринт, на субъединицах капсидного белка или белковых капсидах AAV; б) генерирование субъединиц капсидного белка AAV, содержащих аминокислотные замены контактных аминокислотных остатков, идентифицированных в (а) путем случайного, рационального и/или “вырожденного” мутагенеза; в) получение AAV-частиц, содержащих субъединицы капсидного белка, из субъединиц капсидного белка AAV из (б); приведение в контакт AAV-частиц из (в) с клетками в условиях, в которых может происходить инфицирование и репликация; д) отбор AAV-частиц, которые могут завершить по меньшей мере один цикл инфицирования и реплицироваться до титров, близких к контрольным AAV-частицам; е) приведение в контакт AAV-частиц, выбранных в (д), с нейтрализующими антителами и клетками в условиях, в которых может происходить инфицирование и репликация; и ж) отбор AAV-частиц, которые не нейтрализуют нейтрализующие антитела в е).

Неограничивающие примеры способов идентификации контактных аминокислотных остатков включают картирование пептидных эпитопов и/или криоэлектронную микроскопию. Способ генерирования субъединиц капсидного белка AAV, содержащих аминокислотные замены контактных аминокислотных остатков путем случайного, рационального и/или “вырожденного” мутагенеза известны в данной области техники.

Такой всесторонний подход представляет собой технологическую платформу, которую можно применять для модификации любого белкового капсида и/или субъединицы капсидного белка AAV. Применение этой технологической платформы позволяет получить антигенные варианты AAV, имеющие происхождение из исходных образцов субъединиц капсидного белка AAV, без потери эффективности трансдукции. Как одно из преимуществ и полезных свойств, применение этой технологии расширяет контингент пациентов, подходящих для генной терапии AAV-векторами.

В некоторых воплощениях способ получения вирусного вектора включает обеспечение клетки: (а) образцом нуклеиновой кислоты, содержащим по меньшей мере одну последовательность TR (например, последовательность TR AAV), и (б) последовательностями AAV, достаточными для репликации образца нуклеиновой кислоты и инкапсидирования в белковые капсиды AAV (например, последовательности

гер AAV и последовательности сар AAV, кодирующие субъединицы капсида AAV). Возможно, образец нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере одну гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях образец нуклеиновой кислоты содержит две последовательности ITR AAV, расположенные 5' и 3' от гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты (если она присутствует), хотя они не обязательно непосредственно граничат с ней.

Образец нуклеиновой кислоты и последовательности гер и сар AAV предоставляют в таких условиях, что вирусный вектор, содержащий образец нуклеиновой кислоты, упакованный в белковый капсид AAV, продуцируется в клетке. Этот способ может дополнительно включать этап выделения вирусного вектора из клетки. Вирусный вектор может быть выделен из среды и/или путем лизиса клеток.

Клетка может представлять собой клетку, которая является перmissive для репликации вируса AAV. Можно использовать любую подходящую клетку, известную в данной области техники. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку млекопитающего. В качестве другого варианта клетка может представлять собой транс-комплементирующую упаковочную клеточную линию, которая обеспечивает функции, исключенные из дефектного по репликации вируса-помощника, например, клетки 293 или другие E1a-транскомплементирующие клетки.

Последовательности репликации и субъединиц капсидного белка AAV могут быть предоставлены любым способом, известным в данной области техники. Согласно текущим протоколам обычно гены гер/сар AAV экспрессируются на одной плазмиде. Последовательности репликации и упаковки AAV не обязательно должны быть предоставлены вместе, хотя это может быть удобно. Последовательности гер и/или сар AAV могут быть предоставлены любым вирусным или невирусным вектором. Например, последовательности гер/сар могут быть предоставлены гибридным аденовирусным или герпесвирусным вектором (например, вставленным в области E1a или E3 deletированного аденовирусного вектора). Векторы EBV также можно использовать для экспрессии генов сар и гер AAV. Одно из преимуществ данного способа заключается в том, что векторы EBV являются episomными, к тому же поддерживают большое число копий на протяжении последующих делений клетки (то есть, являются стабильно интегрированными в клетку как экстрахромосомные

элементы, обозначаемые как "ядерная эписома на основе EBV", см. Margolski, (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immun.* 158:67).

В качестве дополнительной альтернативы последовательности гер/сар могут быть стабильно включены в клетку.

Обычно последовательности гер/сар AAV не фланкированы TR для предупреждения высвобождения и/или упаковки этих последовательностей.

Образец нуклеиновой кислоты может быть предоставлен в клетке с помощью любого способа, известного в данной области техники. Например, образец может быть доставлен плазмидным или вирусным вектором. В некоторых воплощениях образец нуклеиновой кислоты доставлен герпесвирусным или аденовирусным вектором (например, вставлен в области E1a или E3 deletированного аденовируса). В качестве другой иллюстрации Palombo et al., (1998) *J. Virology* 72:5025 описывает бакуловирусный вектор, несущий ген-репортер, фланкированный TR AAV. Также векторы EBV можно использовать для доставки образца, как описано выше в отношении генов гер/сар.

В некоторых воплощениях образец нуклеиновой кислоты обеспечен реплицирующимся вирусом rAAV. В некоторых воплощениях провирус AAV, содержащий образец нуклеиновой кислоты, стабильно интегрирован в ядро клетки.

Для увеличения титров вируса в клетке могут быть обеспечены функции вируса-помощника (например, аденовируса или герпесвируса), который активирует продуктивную инфекцию AAV. Последовательности вирусов-помощников, необходимых для репликации AAV, известны в данной области техники. Обычно эти последовательности обеспечивает вектор аденовирусного или герпесвирусного помощника. Альтернативно, последовательности аденовируса или герпесвируса могут быть обеспечены другим невирусным или вирусным вектором, например, таким как неинфекционная аденовирусная миниплазида, которая несет все хелперные гены, активирующие эффективную продукцию AAV, как описано Ferrari et al., (1997) *Nature Med.* 3: 1295 и в патентах США No. 6040183 и 6093570.

Кроме того, функции вируса-помощника могут быть предоставлены упаковочной клеткой с хелперными последовательностями, встроенными в хромосому или поддерживаемыми как стабильный экстрахромосомный элемент. Обычно последовательности вируса-помощника не могут быть упакованы в вирионы AAV, например, не фланкированы ITR.

Специалист в данной области техники оценит возможное преимущество предоставления последовательностей репликации и субъединиц капсидного белка AAV и вируса-помощника (например, аденовирусных последовательностей) на одной хелперной конструкции. Эта хелперная конструкция может представлять собой невирусную или вирусную конструкцию. В качестве одной неограничивающей иллюстрации хелперная конструкция может представлять собой гибридный аденовирус или гибридный герпесвирус, содержащий гены гер/сар AAV.

В некоторых воплощениях последовательности гер/сар AAV и аденовирусные хелперные последовательности доставляет один вектор аденовируса-помощника. Далее этот вектор может дополнительно содержать образец нуклеиновой кислоты. Последовательности гер/сар AAV и/или гAAV-матрицы могут быть вставлены в область делеции (например, области E1a или E3) аденовируса.

В некоторых воплощениях последовательности гер/сар AAV и последовательности аденовируса-помощника доставляет один вектор аденовируса-помощника. Согласно этому воплощению гAAV-матрица может быть обеспечена в форме плазмидного образца.

В некоторых воплощениях последовательности гер/сар AAV и последовательности аденовируса-помощника обеспечивает один вектор аденовируса-помощника, и гAAV-матрица интегрирована клетку в форме провируса. Альтернативно, гAAV-матрица обеспечивает EBV-вектор, который поддерживается в клетке в форме экстрахромосомного элемента (например, в форме ядерной эписомы на основе EBV).

В некоторых воплощениях последовательности гер/сар AAV и последовательности аденовируса-помощника обеспечены одним аденовирусом-помощником. гAAV-матрица может быть обеспечена в виде отдельного реплицирующегося вирусного вектора. Например, гAAV-матрица может быть обеспечена гAAV-частицей или второй рекомбинантной аденовирусной частицей.

В соответствии с вышеописанными способами гибридный аденовирусный вектор обычно содержит аденовирусные 5'- и 3'-цис-последовательности, достаточные для репликации и упаковки аденовируса (то есть, аденовирусные концевые повторы и последовательность РАС). Последовательности гер/сар AAV и, если она присутствует, гAAV-матрица встроены в каркас аденовируса и фланкированы 5'- и 3'-цис-последовательностями, так что эти последовательности могут быть упакованы в

аденовирусные белковые капсиды. Как описано выше, последовательности аденовируса-помощника и последовательности *her/cap* AAV обычно не фланкированы ITR, так что эти последовательности не упакованы в вирионы AAV. Zhang et al., ((2001) Gene Ther. 18:704-12) описывают химерную хелперную конструкцию, содержащую как аденовирус, так и гены *her* и *cap* AAV.

Герпесвирус также можно использовать в качестве вируса-помощника в способах упаковки AAV. Гибридные герпесвирусы, кодирующие белок(ки) Rep AAV преимущественно могут облегчать масштабируемые схемы продукции AAV-вектора. Был описан гибридный вектор вируса простого герпеса типа I (HSV-1), экспрессирующий гены *her* и *cap* AAV-2 (Conway et al., (1999) Gene Therapy 6:986 и WO 00/17377).

В качестве дополнительной альтернативы вирусные векторы могут быть получены в клетках насекомых с использованием бакуловирусных векторов для доставки генов *her/cap* и образца гAAV, как описано, например, Urabe et al., (2002) Human Gene Therapy 13: 1935-43.

Запасы AAV-вектора, не содержащие контаминирующий вирус-помощник, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники. Например, AAV и вирус-помощник можно легко различить на основании размера. Также AAV можно отделить от вируса-помощника на основании сродства к гепариновому субстрату (Zolotukhin et al. (1999) Gene Therapy 6:973). Можно использовать делетированные дефектные по репликации вирусы-помощники, так чтобы любой контаминирующий вирус-помощник не обладал способностью к репликации. В качестве дополнительной альтернативы можно использовать аденовирус-помощник, лишенный экспрессии поздних генов, поскольку только экспрессия ранних генов аденовируса необходима для обеспечения упаковки AAV-вируса. Мутантные аденовирусы, дефектные по экспрессии поздних генов, известны в данной области техники (например, мутантные аденовирусы ts100K и ts149).

Рекомбинантные вирусные векторы

Описанные здесь вирусные векторы являются полезными для доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. В частности, вирусные векторы преимущественно можно применять для доставки или переноса нуклеиновых кислот в клетки животных, включая млекопитающих. Следовательно, в некоторых воплощениях нуклеиновая кислота может быть инкапсидирована в описанный здесь белковый

капсид. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота представляет собой кассету для переноса. В некоторых воплощениях кассета для переноса содержит векторный геном (например, 5'-ITR, трансген и 3'-ITR). В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота представляет собой кассету для переноса на основе AAV.

Последовательность кассеты для переноса, доставляемая вирусными векторами, может представлять собой любую(ые) интересующую(ие) гетерологичную(ые) последовательность(и) нуклеиновой кислоты. Интересующие нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, включая терапевтические (например, для медицинского или ветеринарного применения) или иммуногенные (например, для вакцин) полипептиды или РНК. В некоторых воплощениях кассета для переноса содержит 5'-ITR и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса содержит 5'-ITR, трансген и 3'-ITR. В некоторых воплощениях трансген кодирует терапевтический белок или РНК.

Терапевтические полипептиды включают белок-муковисцидозный трансмембранный регулятор (CFTR), дистрофин (включая мини- и микро-дистрофины, см., например, Vincent et al, (1993) Nature Genetics 5: 130; публикация заявки США No. 2003/017131; публикация международной заявки WO/2008/088895, Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 1 3714-13719 (2000); и Gregorevic et al., Mol. Ther. 16:657-64 (2008)), пропептид миостатин, фоллистатин, растворимый рецептор активина типа 11, IGF-1, аполипопротеины, такие как apoA (apoA1, apoA2, apoA4, apoA-V), apoB (apoB100, ApoB48), apoC (apoCI, apoCII, apoCIII, apoCIV), apoD, apoE, apoH, apoL, apo(a), противовоспалительные полипептиды, такие как доминантный мутант I kappa B, амилоид бета, тау, саркоспан, атрофин (Tinsley et al, (1996) Nature 384:349), мини-атрофин, факторы свертывающей системы крови (например, фактор VIII, фактор IX, фактор X и так далее), эритропоэтин, ангиостатин, эндостатин, каталазу, тирозин-гидроксилазу, супероксиддисмутазу, лептин, рецептор LDL, липопротеин-липазу, програнулин, орнитин-карбамилазу, β -глобин, α -глобин, спектрин, альфа-1-антитрипсин, аденозин-дезаминазу, гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазу, β -глюкоцереброзидазу, баттенин, сфингомиелиназу, лизосомальную гексозаминидазу A, дегидрогеназу разветвленных кетокислот, фратаксин, белок RP65, цитокины (например, альфа-интерферон, бета-интерферон, гамма-интерферон, интерлейкин-2, интерлейкин-4, альфа-синуклеин, паркин, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, лимфотоксин и тому подобное), пептидные факторы

роста, нейротрофические факторы и гормоны (например, соматотропин, инсулин, инсулиноподобные факторы роста 1 и 2, тромбоцитарный фактор роста, эпидермальный фактор роста, фактор роста фибробластов, фактор роста нервов, нейротрофический фактор -3 и -4, нейрофический фактор мозга, морфогенетические белки кости [включая RANKL (лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В) и VEGF (васкулярно-эндотелиальный фактор роста)], глиальный фактор роста, трансформирующий фактор роста - α и - β и тому подобное), хантингин, лизосомальную кислотную альфа-глюкозидазу, идуронат-2-сульфатазу, N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу, альфа-галактозидазу А, рецепторы (например, растворимый рецептор фактора некроза опухоли), S100A1, убиквитин-протеинлигазу Е3, парвальбумин, аденилатциклазу типа 6, молекулу, модулирующую транспорт кальция (например, SERCA_{2A}, ингибитор 1 PP1 и его фрагменты [например, WO 2006/029319 и WO 2007/100465]), молекулу, действующую на нокдаун киназы рецептора, сопряженного с G-белком, типа 2, такую как укороченный конститутивно активный bARKct, противовоспалительные факторы, такие как IRAP, белки анти-миостатины, аспартоацилазу, моноклональные антитела (включая одноцепочечные моноклональные антитела; пример Mab представляет собой Herceptin[®] Mab), нейропептиды и их фрагменты (например, галанин, Нейропептид Y (см., патент США 7071172)), ингибиторы ангиогенеза, такие как вазогибины и другие ингибиторы VEGF (например, Вазогибин 2 [см. WO JP2006/073052]), но не ограничиваясь ими. Другие иллюстративные гетерологичные последовательности нуклеиновой кислоты кодируют продукты генов саморазрушения (suicide genes (например, тимидинкиназу, цитидиндеаминазу, дифтерийный токсин и фактор некроза опухоли); белки, которые усиливают или ингибируют транскрипцию факторов хозяина (например, нуклеаза-“dead” Cas9, связанная с элементом-энхансером или ингибитором транскрипции; белки с цинковыми пальцами, связанные с элементом-энхансером или ингибитором транскрипции; эффекторы, подобные активатору транскрипции (TAL), связанные с элементом-энхансером или ингибитором транскрипции); белки, придающие устойчивость к лекарственным средствам, применяемым в терапии рака; продукты генов-супрессоров опухоли (например, p53, Rb, Wt-1), TRAIL, FAS-лиганд и любой другой полипептид, оказывающий терапевтическое действие на субъекта, нуждающегося в таком действии. Также AAV-векторы можно использовать для доставки моноклональных антител и фрагментов антител, например, антител или

фрагментов антител, направленных против миостатина (см., например, Fang et al., *Nature Biotechnology* 23:584-590 (2005)). Последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, включают таковые, кодирующие репортерные полипептиды (например, фермент). Репортерные полипептиды известны в данной области техники и включают ген зеленого флуоресцентного белка, β -галактозидазы, щелочной фосфатазы, люциферазы и хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, но не ограничиваясь ими.

Возможно, гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует секретируемый полипептид (например, полипептид, представляющий собой секретируемый полипептид в его нативном состоянии или сконструированный в секретируемой форме, например, путем функциональной связи с секреторной сигнальной последовательностью, которая известна в данной области техники).

Альтернативно, в некоторых воплощениях гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим (например, такой как описанно в патенте США No. 5877022), РНК, которые воздействуют на опосредуемый сплайсосомай/ram-сплайсинг (см., Puttaraju et al, (1999) *Nature Biotech.* 17:246; патент США No. 6013487; патент США No. 6083702), интерферирующие РНК (РНКи) включая миРНК, кшРНК или микроРНК, которые опосредуют “молчание” генов (смотрите, Sharp et al, (2000) *Science* 287:2431), и другие нетранслируемые РНК, такие как РНК-гид (Gorman et al., (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 :4929; патент США No. 5869248 Yuan et al.) и им подобные. Примеры нетранслируемых РНК включают интерферирующую РНК против продукта гена множественной лекарственной устойчивости (MDR) (например, для лечения и/или предупреждения опухолей и/или для введения в сердце для предупреждения повреждения вследствие химиотерапии); интерферирующую РНК против миостатина (например, при миодистрофии Дюшенна); интерферирующую РНК против VEGF (например, для лечения и/или предупреждения опухолей); интерферирующую РНК против фосфоламбана (например, для лечения сердечно-сосудистого заболевания, см., например, Andino et al., *J. Gene Med.* 10: 132-142 (2008) и Li et al., *Acta Pharmacol Sin.* 26:51-55 (2005)); ингибиторные или доминантно-негативные к фосфоламбану молекулы, такие как фосфоламбан S16E (например, для лечения сердечнососудистого заболевания, см., например, Hoshijima et al. *Nat. Med.* 8:864-871 (2002)); интерферирующую РНК к аденозинкиназе (например, при эпилепсии) и

интерферирующую РНК, направленную против патогенных организмов и вирусов (например, вируса гепатита В и/или С, вируса иммунодефицита человека, CMV, вируса простого герпеса, вируса папилломы человека и так далее).

Кроме того, может быть доставлена последовательность нуклеиновой кислоты, направляющая альтернативный сплайсинг. Для иллюстрации, антисмысловая последовательность (или другая ингибиторная последовательность), комплементарная 5'- и/или 3'-сайту сплайсинга 51 экзона дистрофина, может быть доставлена в сочетании с промотором малой ядерной (мя) РНК U1 или U7 для индуцирования пропуска этого экзона. Например, последовательность ДНК, содержащая промотор мяРНК U1 или U7, расположенный 5' к антисмысловой(ым)/ингибиторной(ым) последовательности(ям), может быть упакована и доставлена в модифицированном белковом капсиде.

В некоторых воплощениях может быть доставлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая направляет редактирование генов. Например, нуклеиновая кислота может кодировать РНК-гид (направляющую РНК). В некоторых воплощениях РНК-гид представляет собой единую направляющую РНК (sgRNA), содержащую последовательность крРНК (РНК, включающая спейсер из CRISPR-кассеты) и последовательность тракрРНК (транс-активирующая РНК, участвующая в образовании комплекса Cas9 с молекулами РНК). В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота может кодировать нуклеазу. В некоторых воплощениях нуклеаза представляет собой нуклеазу с цинковыми пальцами, “хоуминг”-эндонуклеазу, TALEN (нуклеаза на основе эффектора, подобного активатору транскрипции), NgAgo (“agronaute” эндонуклеаза), SGN (структурно-направляемая эндонуклеаза), RGN (РНК-направляемая нуклеаза) или их модифицированные или укороченные варианты. В некоторых воплощениях РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, нуклеазу Cas12(a) (Cpf1), нуклеазу Cas12b, нуклеазу Cas12c, TrpB-подобную нуклеазу, нуклеазу Cas13a (C2c2), нуклеазу Cas13b или их модифицированные или укороченные варианты. В некоторых воплощениях нуклеаза Cas9 выделена или имеет происхождение из *S. pyogenes* или *S. aureus*.

В некоторых воплощениях может быть доставлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая направляет нокдаун генов. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать миРНК, кшРНК, микроРНК или антисмысловую нуклеиновую кислоту. Также вирусный вектор может

содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, которая имеет гомологию с локусом на хромосоме хозяина и рекомбинирует с ним. Этот подход можно использовать, например, для корректировки генетического дефекта клетки-хозяина.

Также предложены вирусные векторы, экспрессирующие иммуногенный полипептид, например, для вакцинации. Нуклеиновая кислота может кодировать любой интересующий иммуноген, известный в данной области техники, включая иммуногены из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса гриппа, белки gag HIV или SIV, опухолевые антигены, раковые антигены, бактериальные антигены, вирусные антигены и им подобное, но не ограничиваясь ими.

Использование парвовирусов в качестве вакцинных векторов известно в данной области техники (см., например, Miyamura et al, (1994) Proc. Nat. Acad. Sci USA 91:8507; патент США No. 5916563 Young et al; патент США No. 5905040 Mazzara et al, патент США No. 5882652; патент США No. 5863541 Samulski et al). Антиген может присутствовать в капсиде парвовируса.

Альтернативно, антиген может экспрессироваться с гетерологичной нуклеиновой кислоты, введенной в рекомбинантный векторный геном. В некоторых воплощениях любой интересующий иммуноген, описанный здесь и/или известный в данной области техники, может быть обеспечен вирусными векторами, описанными здесь.

Иммуногенный полипептид может представлять собой любой полипептид, подходящий для вызова иммунного ответа и/или защиты субъекта от инфекции и/или заболевания, включая инфекции и заболевания, вызванные микроорганизмами, бактериями, простейшими, паразитами, грибами и/или вирусами, но не ограничиваясь ими. Например, иммуногенный полипептид может представлять собой иммуноген ортомиксовируса (например, иммуноген вируса гриппа, такой как поверхностный белок-гемагглютинин вируса гриппа (HA) или нуклеопротеин вируса гриппа или иммуноген вируса лошадиного гриппа) или иммуноген лентивируса (например, иммуноген вируса инфекционной анемии лошадей, иммуноген вируса иммунодефицита обезьян (SIV) или иммуноген вируса иммунодефицита человека (HIV), такой как белок оболочки GP 160 HIV или SIV, белки матрикса/капсидные белки HIV или SIV и продукты генов gag, pol и env HIV или SIV). Также иммуногенный полипептид может представлять собой иммуноген аренавируса (например, иммуноген вируса лихорадки Ласса, такой как нуклеокапсидный белок вируса лихорадки Ласса и

гликопротеин оболочки вируса лихорадки Ласса), иммуноген поксвируса (например, иммуноген вируса коровьей оспы, такой как продукты генов L1 или L8 коровьей оспы), иммуноген флавивируса (например, иммуноген вируса желтой лихорадки или иммуноген вируса японского энцефалита), иммуноген филовirusа (например, иммуноген вируса Эбола или иммуноген вируса марбургской болезни, такой как продукты генов NP и GP), иммуноген буньявируса (например, иммуногены вирусов RVFV (вирус лихорадки долины Рифт), CCHF (конго-крымская геморрагическая лихорадка) и/или SFS (острой лихорадки с тромбоцитарным синдромом) или иммуноген коронавируса (например, иммуноген инфекционного коронавируса человека, такой как гликопротеин оболочки коронавируса человека, или иммуноген вируса трансмиссионного гастроэнтерита свиней, или иммуноген вируса инфекционного бронхита птиц). Дополнительно иммуногенный полипептид может представлять собой иммуноген вируса полиомиелита, иммуноген вируса герпеса (например, иммуногены CMV (цитомегаловирус), EBV (вирус Эпштейна-Барра), HSV (вирус простого герпеса), иммуноген вируса эпидемического паротита, иммуноген вируса кори, иммуноген вируса краснухи, дифтерийный токсин или другой дифтерийный иммуноген, антиген возбудителя коклюша, иммуноген вируса гепатита (например, гепатита А, гепатита В, гепатита С и так далее) и/или иммуноген любой другой вакцины, известный в настоящее время в данной области техники или позднее идентифицированный как иммуноген.

Альтернативно, иммуногенный полипептид может представлять собой любой антиген опухолевых или раковых клеток. Возможно, опухолевый или раковый антиген экспрессируется на поверхности раковой клетки.

Примеры антигенов раковых и опухолевых клеток описаны S.A. Rosenberg (Immunity 10:281 (1991)). Другие иллюстративные раковые и опухолевые антигены включают продукт гена BRCA1, продукт гена BRCA2, gp100, тирозиназу, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, LAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β -катенин, MUM-1, каспазу-8, KIAA0205, HPVE, SART-1, FRAME, p15, меланомные опухолевые антигены (Kawakami et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3515; Kawakami et al., (1994) J. Exp. Med., 180:347; Kawakami et al., (1994) Cancer Res. 54:3124), MART-1, gp100, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, CEA, TRP-1, TRP-2, P-15, тирозиназу (Brichard et al., (1993) J Exp. Med. 178:489); продукт гена HER-2/neu (U.S. Pat. No. 4968603), CA 125, LK26, FB5 (эндосиалин), TAG 72, AFP, CA 19-9, NSE, DU-PAN-2, CA50, SPan-1, CA72-4, HCG,

STN (антиген сиалил-Tn), белки c-erbB-2, PSA, L-CanAg, рецептор эстрогена, глобулин молочного жира, белок-супрессор опухоли p53 (Levine, (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:623); муциновые антигены (публикация международной заявки No. WO 90/05142); теломеразы; белки ядерного матрикса; кислую фосфатазу предстательной железы; антигены вируса папилломы и/или антигены, известные в настоящее время или открытые позже, связанные со следующими типами рака: меланомой, аденокарциномой, тимомой, лимфомой (например, неходжкинской лимфомой, лимфомой Ходжкина), саркомой, раком легкого, раком печени, раком кишечника, лейкемией, раком матки, раком молочной железы, раком предстательной железы, раком яичника, раком шейки матки, раком мочевого пузыря, раком почки, раком поджелудочной железы, раком мозга и любыми другими типами рака или злокачественного состояния или их метастазами, известными в настоящее время или идентифицированными позже (смотрите, например, Rosenberg, (1996) Ann. Rev. Med. 47:481-91), но не ограничиваясь ими.

В качестве дополнительной альтернативы гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать любой полипептид, который желательно продуцировать в клетке *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Например, вирусные векторы можно вводить в культивируемые клетки и выделять из них продукт экспрессии гена.

Специалист в данной области техники понимает, что интересующая(ие) гетерологичная(ые) нуклеиновая(ые) кислота(ы) могут быть функционально связаны с подходящими регуляторными последовательностями. Например, гетерологичная нуклеиновая кислота может быть функционально связана с элементами, регулирующими экспрессию, такими как сигналы регуляции транскрипции/трансляции, ориджины репликации, сигналы полиаденилирования, внутренние участки посадки рибосомы (IRES), промоторы и/или энхансеры и им подобные.

Кроме того, регулируемая экспрессия интересующей(их) гетерологичной(ых) нуклеиновой(ых) кислоты(т) может быть достигнута на посттранскрипционном уровне, например, путем регулирования селективного сплайсинга различных интронов благодаря наличию или отсутствию олигонуклеотида, малой молекулы и/или другого соединения, которые селективно блокируют активность сплайсинга в определенных сайтах (например, как описано в WO 2006/119137).

Специалист в данной области техники понимает, что разнообразные промоторные/энхансерные элементы можно использовать в зависимости от желаемого

уровня и тканеспецифичной экспрессии. Промотор/энхансер может быть конститутивным или индуцибельным в зависимости от желаемого характера экспрессии. Промотор/энхансер может быть нативным или чужеродным и может представлять собой природную или синтетическую последовательность. Под чужеродным понимают, что участок инициации транскрипции не обнаруживается в хозяине дикого типа, в который введен участок инициации транскрипции.

В некоторых воплощениях промоторные/энхансерные элементы могут быть нативными по отношению к клетке-мишени или субъекту, которого лечат. В некоторых воплощениях промоторный/энхансерный элемент может быть нативным по отношению к гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты. Обычно промоторный/энхансерный элемент выбирают таким, чтобы он функционировал в интересующей(их) клетке(ах)-мишени(ях). Кроме того, в некоторых воплощениях промоторный/энхансерный элемент представляет собой промоторный/энхансерный элемент млекопитающего. Промоторный/энхансерный элемент может быть конститутивным или индуцибельным.

Индукцибельные элементы регуляции экспрессии обычно являются предпочтительными для тех применений, в которых желательно обеспечить регуляцию экспрессии гетерологичной(ых) последовательности(ей) нуклеиновой(ых) кислоты(т). Индуцибельные промоторные/энхансерные элементы для доставки генов могут представлять собой промоторные/энхансерные элементы тканеспецифичные или с тканевым предпочтением и включают специфичные или предпочтительные к мышцам (включая специфичные или предпочтительные к сердечной, скелетной и/или гладкой мышце), специфичные или предпочтительные к нервной ткани (включая специфичные или предпочтительные к ткани мозга), специфичные или предпочтительные к тканям глаза (включая специфичные к сетчатке и специфичные к роговице), специфичные или предпочтительные к печени, специфичные или предпочтительные к костному мозгу, специфичные или предпочтительные к поджелудочной железе, специфичные или предпочтительные к селезенке и специфичные или предпочтительные к легким промоторные/энхансерные элементы. Другие индуцибельные промоторные/энхансерные элементы включают гормон-индуцибельные и металл-индуцибельные элементы. Примеры индуцибельных промоторных/энхансерных элементов включают элемент on/off Tet, индуцибельный промотор RU486, экдизон-

индуцибельный промотор, тетрациclin-индуцибельный промотор и промотор металлотронеина, но не ограничиваясь ими.

В некоторых воплощениях, где гетерологичная(ые) последовательность(и) нуклеиновой(ых) кислоты(т) транскрибируется(ются) и затем транслируется(ются) в клетках-мишенях, специфические сигналы инициации обычно включают для эффективной трансляции вставленных последовательностей, кодирующих белки. Эти экзогенные последовательности регуляции трансляции, которые могут включать кодон инициации ATG и соседние последовательности, могут быть различного происхождения, как натуральные, так и синтетические.

Описанные здесь вирусные векторы обеспечивают средство для доставки гетерологичных нуклеиновых кислот в широкий диапазон клеток, включая делящиеся и не делящиеся клетки. Вирусные векторы можно применять для доставки интересующей нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, например, для продуцирования полипептида *in vitro* или для генотерапии *ex vivo*. Дополнительно вирусные векторы полезны в способе доставки нуклеиновой кислоты субъекту, нуждающемуся в такой доставке, например, для экспрессии иммуногенного или терапевтического полипептида или функциональной РНК. Таким образом, полипептид или функциональная РНК может быть продуцирован(а) *in vivo* у субъекта. Субъект может нуждаться в таком полипептиде вследствие недостатка у субъекта этого полипептида. Далее способ может быть воплощен на практике по той причине, что продукция этого полипептида или функциональной РНК у субъекта может оказывать некоторое полезное действие.

Также вирусные векторы можно использовать для получения интересующего полипептида или интересующей функциональной РНК в культивируемых клетках или у субъекта (например, при использовании субъекта в качестве биореактора для продукции полипептида или для наблюдения эффектов функциональной РНК у субъекта, например, в связи с методами скрининга).

В целом, описанные здесь вирусные векторы можно применять для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или функциональную РНК, для лечения и/или предупреждения любого состояния заболевания, для которого такая доставка терапевтического полипептида или функциональной РНК является полезной. Иллюстративные состояния заболевания включают, но не ограничиваясь ими, муковисцидоз (трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза) и другие заболевания легких, гемофилию А (Фактор VIII), гемофилию В (Фактор IX),

талассемию (β -глобин), анемию (эритропоэтин) и другие расстройства системы крови, болезнь Альцгеймера (GDF; непризилин), рассеянный склероз (β -интерферон), болезнь Паркинсона (глиальный нейротрофический фактор [GDNF]), болезнь Гентингтона (интерферирующая РНК для удаления повторов), болезнь Канавана, боковой амиотрофический склероз, эпилепсия (галанин, нейротрофические факторы) и другие неврологические расстройства, рак (эндостатин, ангиостатин, TRAIL, FAS-лиганд, цитокины, включая интерфероны; интерферирующая РНК, включая интерферирующую РНК против VEGF или продукт гена множественной лекарственной устойчивости, *miR-26a* [например, для гепатоцеллюлярной карциномы]), сахарный диабет (инсулин), мышечные дистрофии, включая мышечную дистрофию Дюшенна (дистрофин, мини-дистрофин, инсулино-подобный фактор роста I, саркогликан [например, α , β , γ], интерферирующая РНК против миостатического пропептида миостатина, фоллистатин, растворимый рецептор активина типа II, противовоспалительные полипептиды, такие как доминантный мутант каппа-B (Ikappa B), саркоспан, атрофин, мини-атрофин, антисмысловая или интерферирующая РНК против границ сплайсинга в гене дистрофина для индукции пропуска экзонов [см., например, WO/2003/095647], антисмысловые мРНК против U7 для индукции пропуска экзонов [см., например, WO/2006/021724] и антитела или фрагменты антител против миостатина или пропептида миостатина) и мышечную дистрофию Беккера 1 или 2, плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию (FSHD), болезнь Гоше (глюкоцереброзидаза), болезнь Гурлер (α -L-идуронидаза), недостаточность аденозиндезаминазы (аденозиндезаминаза), гликогенозы (например, болезнь Фабри [α -галактозидаза] и болезнь Помпе [лизосомальная кислая альфа-глюкозидаза]) и другие метаболические расстройства, врожденную эмфизему (альфа-1-антитрипсин), синдром Леша-Найхана (гипоксан-тингуанин-фосфорибозилтрансфераза), болезнь Ниманна-Пика (сфингомиелиназа), болезнь Тея-Сакса (лизосомальная гексозаминидаза A), лобно-височную деменцию, валинолейцинурию (дегидрогеназа разветвленных кетокислот), дегенеративные заболевания сетчатки (и другие заболевания глаз и сетчатки; например, PDGF для дегенерации желтого пятна и/или вазогинбин или другие ингибиторы VEGF или другие ингибиторы ангиогенеза для лечения/предупреждения болезней сетчатки, например, при диабете I-го типа), заболевания солидных органов, таких как мозг (включая болезнь Паркинсона [GDNF], астроцитомы [эндостатин, ангиостатин и/или интерферирующая РНК против VEGF], глиобластомы [эндостатин, ангиостатин и/или

интерферирующая РНК против VEGF]), печень, почка, сердце, включая застойную сердечную недостаточность или заболевание периферических артерий (PAD) (например, путем доставки ингибитора I протеинфосфатазы (I-1) и его фрагментов (например, IIC), *serca2a*, белков с цинковыми пальцами, которые регулируют ген фосфоламбана, *Barkct*, [32-адренергический рецептор, киназа адренергического рецептора-2 (BARK), фосфоинозитид-3-киназа (PI3-киназа), S100A1, парвальбумин, аденилатциклаза типа 6, молекула, которая действует на нокдаун киназы типа 2, сопряженной с G-белком, такая как укороченный конститутивно активный bARKct; кальсарцин, интерферирующая РНК против фосфоламбана; ингибиторные и доминантно-негативные молекулы против фосфоламбана, такие как фосфоламбан S16E и им подобные), артрит (инсулиноподобные факторы роста), заболевания суставов (инсулиноподобный фактор роста 1 и/или 2), гиперплазию интимы (например, путем доставки *enos* (эндотелиальная синтаза оксида азота), *inos* (индуцибельная синтаза оксида азота), улучшение приживаемости сердечных трансплантатов (супероксиддисмутаза), AIDS (синдром приобретенного иммунодефицита человека) (растворимый CD4), мышечную атрофию (инсулиноподобный фактор роста I), почечную недостаточность (эритропоэтин), анемию (эритропоэтин), артрит (противовоспалительные факторы, такие как I RAP и растворимый рецептор TNFa), гепатит (α-интерферон), недостаточность рецептора LDL (рецептор LDL), гипераммониемию (орнитинтранскарбамилаза), болезнь Краббе-Бенеке (галактоцереброзидаза), болезнь Баттена, спинномозговые атаксии, включая SCA1, SCA2 и SCA3, фенилкетонурию (фенилаланингидроксилаза), аутоиммунные заболевания и тому подобное. Раскрытые здесь композиции и способы дополнительно можно использовать после трансплантации органов для увеличения успеха трансплантации и/или для уменьшения отрицательных побочных эффектов трансплантации органа или вспомогательной терапии (например, путем введения иммуносупрессирующих агентов или ингибиторных нуклеиновых кислот для блокирования продукции цитокинов). В качестве другого примера можно вводить морфогенетические белки кости (включая BNP 2, 7 и им подобные, RANKL и/или VEGF) с костным аллотрансплантатом, например, после перелома или хирургического удаления у ракового пациента.

В некоторых воплощениях описанные здесь вирусные векторы можно использовать для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей

полипептид или функциональную РНК для лечения и/или предупреждения заболевания или расстройства печени. Заболевание или расстройство печени может представлять собой, например, первичный билиарный цирроз, неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатоз (NASH), аутоиммунный гепатит, гепатит В, гепатит С, алкогольную болезнь печени, фиброз, желтуху, первичный склерозирующий холангит (PSC), синдром Бадда-Киари, гемохроматоз, болезнь Вилсона, алкогольный фиброз, неалкогольный фиброз, стеатоз печени, синдром Жильбера, атрезию желчных протоков, недостаточность альфа-1-антитрипсина, синдром Алажиля, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз, гемофилию В, наследственный ангионевротический отек (HAE), гомозиготную идиопатическую гиперхолестеринемию (HoFH), гетерозиготную идиопатическую гиперхолестеринемию (HeFH), болезнь Гирке (GSD I), гемофилию А, метилмалониловую ацидемию, пропионовую ацидемию, гомоцистинурию, фенилкетонурию (PKU), тирозинемию типа 1, недостаточность аргиназы 1, недостаточность аргининосукцинатлиазы, недостаточность карбамоилфосфатсинтазы 1, цитруллинемию типа 1, недостаточность цитрина, синдром Криглера-Найяра типа 1, цистиноз, болезнь Фабри, гликогеноз 1b, недостаточность LPL, недостаточность N-ацетилглутаматсинтазы, недостаточность орнитинтранскарбамилазы, недостаточность орнитинтранслоказы, первичную гипероксалурию типа 1 или ADA SCID (тяжелый комбинированный иммунодефицит, вызванный недостаточностью аденозиндезаминазы).

Также описанные здесь композиции и способы можно использовать для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS). Например, описанный здесь вирусный вектор можно использовать для доставки нуклеиновой(ых) кислоты(т), ассоциированной(ых) со стволовыми клетками, в клетки, не являющиеся плюрипотентными, такие как зрелые фибробласты, клетки кожи, клетки печени, почечные клетки, жировые клетки, клетки сердца, нервные клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки и им подобные.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие факторы, ассоциированные со стволовыми клетками, известны в данной области техники. Неограничивающие примеры таких факторов, ассоциированных со стволовыми клетками и плюрипотенцией, включают Oct-3/4, семейство SOX (например, SOX1, SOX2, SOX3 и/или SOX 15), семейство Klf

(например, Klf1, Klf4 и/или Klf5), семейство Мус (например, С-мус, L-мус и/или N-мус), NANOG и/или LIN28.

Также описанные здесь способы можно воплощать на практике для лечения и/или предупреждения метаболического расстройства, такого как диабет (например, инсулин), гемофилии (например, Фактор IX или Фактор VIII), лизосомной болезни накопления, такой как мукополисахаридоз (например, синдром Слая [β -глюкуронидаза], синдром Гурлер [альфа-L-идуронидаза], синдром Шейе [альфа-L-идуронидаза], синдром Гурлер-Шейе [альфа-L-идуронидаза], синдром Гунтера [идуронатсульфатаза], синдром Санфилиппо III типа А [гепарансульфамидаза], В [N-ацетилглюкозаминидаза], С [ацетил-СоА:альфа-глюкозаминид-ацетилтрансфераза], D [N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза], синдром Моркио А [галактоза-сульфат-сульфатаза], В [β -галактозидаза], синдром Марото-Лами [N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза] и так далее), болезнь Фабри (альфа-галактозидаза), болезнь Гоше (глюкоцереброзидаза) или гликогеноз (например, болезнь Помпе; лизосомальная кислая альфа-глюкозидаза).

Перенос генов находит существенное применение для понимания и обеспечения терапии для болезненных состояний. Существует ряд наследственных заболеваний, для которых известны и клонированы дефектные гены. В целом, вышеупомянутые болезненные состояния делят на два класса: состояния недостаточности, обычно ферментов, которые обычно наследуются рецессивно, и несбалансированные состояния, в которых могут быть задействованы регуляторные или структурные белки, и которые обычно наследуются доминантно. Для заболеваний, представляющих собой состояния недостаточности, перенос генов можно использовать для доставки нормального гена в поврежденные ткани для заместительной терапии, а также для создания животных моделей для такого заболевания с использованием бессмысленных мутаций. Для заболеваний, представляющих собой несбалансированные состояния, перенос генов можно использовать для создания болезненного состояния в модельной системе, которую можно затем использовать для разработки противодействия болезненному состоянию. Следовательно, вирусные векторы, как описано здесь, позволяют лечить и/или предупреждать генетические заболевания.

Также описанные здесь вирусные векторы можно применять для обеспечения функциональной РНК в клетке *in vitro* или *in vivo*. Функциональная РНК может представлять собой, например, некодирующую РНК. В некоторых воплощениях

экспрессия функциональной РНК в клетке может уменьшать экспрессию определенного белка-мишени в клетке. Соответственно, функциональную РНК можно вводить для уменьшения экспрессии определенного белка у субъекта, нуждающегося в таком уменьшении. В некоторых воплощениях экспрессия функциональной РНК в клетке может увеличивать экспрессию определенного белка-мишени в клетке. Соответственно, функциональную РНК можно вводить для увеличения экспрессии определенного белка у субъекта, нуждающегося в таком увеличении. В некоторых воплощениях экспрессия функциональной РНК может регулировать сплайсинг определенной РНК-мишени в клетке. Соответственно, функциональную РНК можно вводить для регуляции сплайсинга определенной РНК у субъекта, нуждающегося в такой регуляции. В некоторых воплощениях экспрессия функциональной РНК в клетке может регулировать функцию определенного белка-мишени в клетке. Соответственно, функциональную РНК можно вводить для регуляции функции определенного белка у субъекта, нуждающегося в такой регуляции. Также функциональную РНК можно вводить в клетки *in vitro* для регуляции экспрессии генов и/или физиологии клеток, например, для оптимизации систем клеточных или тканевых культур или в способах скрининга.

Дополнительно, вирусные векторы, как описано здесь, находят применение в способах диагностики и скрининга, посредством которых интересующая нуклеиновая кислота временно или стабильно экспрессируется в системе клеточной культуры, или альтернативно, в модели трансгенного животного.

Также вирусные векторы можно использовать для различных нетерапевтических задач, включая использование в протоколах для оценки направленного воздействия на гены, клиренса, транскрипции, трансляции и тому подобного, как понимает специалист в данной области техники, но не ограничиваясь этим. Также вирусные векторы можно использовать для задач оценки безопасности (распространения, токсичности, иммуногенности и тому подобного). Такие данные, например, Управление по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств США рассматривает как часть контроля процесса одобрения, предшествующего оценке клинической эффективности.

В некоторых воплощениях вирусные векторы можно использовать для получения иммунного ответа у субъекта. Согласно этому воплощению вирусный вектор, содержащий гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенный полипептид, можно вводить субъекту, и у субъекта

развивается активный иммунный ответ против иммуногенного полипептида. Иммуногенные полипептиды являются такими как описано здесь выше. В некоторых воплощениях развивается защитный иммунный ответ.

Альтернативно, вирусный вектор можно вводить в клетку *ex vivo* и измененную клетку вводить субъекту. Вирусный вектор, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту, вводят в клетку и клетку вводят субъекту, где гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая иммуноген, может экспрессироваться и индуцировать у субъекта иммунный ответ против иммуногена. В некоторых воплощениях клетка представляет собой антиген-презентирующую клетку (например, дендритную клетку).

“Активный иммунный ответ” или “активный иммунитет” характеризуется “участием тканей и клеток хозяина после встречи с иммуногеном. Он включает дифференцировку и пролиферацию иммунокомпетентных клеток в лимфоретикулярных тканях, что приводит к синтезу антител или развитию клеточно-опосредованной реактивности, или и тому и другому.” Herbert B. Herscowitz, Immunophysiology: “Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation”, in IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985). Другими словами, активный иммунный ответ развивается у хозяина после контакта с иммуногеном путем инфекции или вакцинации. Активный иммунитет можно рассматривать по контрасту с пассивным иммунитетом, который приобретен путем переноса предварительно образованных веществ (антитела, фактора переноса, трансплантата тимуса, интерлейкина-2) из активно иммунизированного хозяина в неиммунизированный хозяин.

Термин “защитный” иммунный ответ или “защитный” иммунитет, как его используют здесь, показывает, что иммунный ответ придает субъекту некоторое преимущество в том, что он предупреждает или снижает частоту возникновения заболевания. Альтернативно, защитный иммунный ответ или защитный иммунитет может быть полезным в лечении и/или предупреждении заболевания, в частности рака или опухолей (например, путем предупреждения образования рака или опухолей, путем индуцирования регрессии рака или опухоли, и/или путем предупреждения метастаз, и/или путем предупреждения роста метастатических узелков). Защитные эффекты могут быть полными или частичными при условии, что польза от этого лечения превышает любые его недостатки.

В некоторых воплощениях вирусный вектор или клетку, содержащий(ую) гетерологичную нуклеиновую кислоту, можно вводить в иммунологически эффективном количестве, как описано ниже.

В некоторых воплощениях вирусные векторы можно вводить для иммунотерапии рака путем введения вирусного вектора, экспрессирующего один или более чем один антиген раковой клетки (или иммунологически похожую молекулу) или любой другой иммуноген, который продуцирует иммунный ответ против раковой клетки. Для иллюстрации, может быть получен иммунный ответ против антигена раковой клетки у субъекта путем введения вирусного вектора, содержащего гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген раковой клетки, например для лечения пациента с раком и/или для предупреждения развития рака у субъекта. Вирусный вектор можно вводить субъекту *in vivo* или путем применения способов *ex vivo*, как описано здесь.

Альтернативно, раковый антиген может экспрессироваться как часть субъединицы капсидного белка, или быть иначе ассоциированным с белковым капсидом (например, как описано выше).

В качестве другой альтернативы, любую другую терапевтическую нуклеиновую кислоту (например, интерферирующую РНК) или любой другой терапевтический полипептид (например, цитокин), известную(ый) в данной области техники, можно вводить для лечения и/или предупреждения рака.

Как его используют здесь, термин “рак” охватывает опухолеобразующие формы рака. Аналогично, термин “раковая ткань” охватывает опухоли. Термин “антиген раковой клетки” охватывает опухолевые антигены.

Термин “рак” имеет свое известное значение в данной области техники, например, неконтролируемый рост ткани, имеющей потенциал для распространения к удаленным участкам организма (то есть, метастазирования). Примеры рака включают меланому, аденокарциному, тимому, лимфому (например, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина), саркому, рак легкого, рак печени, рак кишечника, лейкемию, рак матки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки, рак поджелудочной железы, рак мозга и любой другой рак или злокачественное состояние, известный(ое) в настоящее время или идентифицированный(ое) позже, но не ограничиваясь ими. В некоторых воплощениях предложен способ лечения и/или предупреждения опухолеобразующих форм рака.

Термин “опухоль” также имеет известное значение в данной области техники, например, как аномальная масса недифференцированных клеток в многоклеточном организме. Опухоли могут быть злокачественными или доброкачественными. В некоторых воплощениях раскрытые здесь способы используют для предупреждения и лечения злокачественных опухолей.

Термины “лечащий рак”, “лечение рака” и эквивалентные термины предназначены обозначать, что тяжесть рака уменьшается или по меньшей мере частично устраняется, и/или развитие заболевания замедляется и/или контролируется, и/или заболевание стабилизируется. В некоторых воплощениях эти термины обозначают, что появление метастаз рака предупреждено или метастазы уменьшены или по меньшей мере частично устранены, и/или что рост метастатических узелков предупрежден, или уменьшен, или по меньшей мере частично устранен.

Термины “предупреждение рака” или “предупреждающий рак” и эквивалентные термины предназначены обозначать, что способы по меньшей мере частично устраняют или уменьшают и/или отсрочивают появление и/или тяжесть начала рака. Другими словами, вероятность или возможность начала рака у субъекта может быть уменьшена, и/или начало рака у субъекта может быть отсрочено.

В некоторых воплощениях клетки могут быть извлечены из субъекта, страдающего раком, и приведены в контакт с вирусным вектором, экспрессирующим антиген раковой клетки, как описано здесь. Затем модифицированную клетку вводят субъекту, тем самым вызывая иммунный ответ против антигена раковой клетки. Этот способ можно преимущественно применять у субъектов с ослабленным иммунитетом, которые не могут развивать достаточный иммунный ответ *in vivo* (то есть, не могут продуцировать усиливающие антитела в достаточных количествах).

В данной области техники известно, что иммунные ответы могут быть усилены с помощью иммуномодуляторных цитокинов (например, альфа-интерферона, бета-интерферона, гамма-интерферона, омега-интерферона, тау-интерферона, интерлейкина-1-альфа, интерлейкина-1 β , интерлейкина-2, интерлейкина-3, интерлейкина-4, интерлейкина-5, интерлейкина-6, интерлейкина-7, интерлейкина-8, интерлейкина-9, интерлейкина-10, интерлейкина-11, интерлейкина-12, интерлейкина-13, интерлейкина-14, интерлейкина-18, фактора роста В-клеток, лиганда CD40, фактора некроза опухоли-альфа, фактора некроза опухоли- β , моноцитарного хемоаттрактантного белка-1, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и лимфотоксина).

Соответственно, иммуномодуляторные цитокины (предпочтительно, цитокины, индуцирующие CTL (цитотоксические Т-лимфоциты)) можно вводить субъекту совместно с вирусным вектором. Цитокины можно вводить любым способом, известным в данной области техники. Экзогенные цитокины можно вводить субъекту, или альтернативно, нуклеиновая кислота, кодирующая цитокин, может быть доставлена субъекту с использованием подходящего вектора, и цитокин продуцирован *in vivo*.

Субъекты, фармацевтические композиции и способы введения

Вирусные векторы и вирусоподобные частицы, как описано здесь, находят применение как в ветеринарных, так и в медицинских применениях. Подходящие субъекты включают как птиц, так и млекопитающих. Термин “птичий”, как его используют здесь, включает кур, уток, гусей, перепелов, индеек, фазанов, попугаев, длиннохвостых попугаев и им подобных, но не ограничиваясь ими. Термин “млекопитающие”, как его используют здесь, включает человека, приматов, не являющихся человеком, крупный рогатый скот, овец, коз, лошадей, кошек, собак, зайцеобразных и так далее, но не ограничиваясь ими. Субъекты-люди включают новорожденных, детей, подростков, взрослых и пожилых субъектов.

В некоторых воплощениях субъект “нуждается” в описанных здесь способах.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция, содержащая вирусный вектор и/или вирусоподобную частицу в фармацевтически приемлемом носителе и, возможно, другие медицинские агенты, фармацевтические агенты, стабилизирующие агенты, буферы, носители, адъюванты, растворители и так далее. Для инъекции носитель обычно представляет собой жидкость. Для других способов введения носитель может быть как твердым, так и жидким. Для введения ингаляцией носитель может быть вдыхаемым, и возможно может находиться в форме твердых или жидких частиц.

Под термином “фармацевтически приемлемый” понимают вещество, которое не является токсичным или нежелательным вследствие других причин, то есть, вещество, которое можно вводить субъекту, не вызывая каких-либо нежелательных биологических эффектов.

Также здесь предложен способ переноса нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*. Вирусный вектор можно вводить в клетки с подходящей множественностью заражения согласно стандартным способам трансдукции, подходящим для определенных клеток-

мишеней. Титры вирусного вектора для введения могут варьировать в зависимости от типа и числа клеток-мишеней и определенного вирусного вектора, и могут быть определены специалистами в данной области техники без трудоемкого экспериментирования. В некоторых воплощениях в клетку вводят по меньшей мере примерно 10^3 инфекционных единиц, возможно по меньшей мере примерно 10^5 инфекционных единиц.

Клетка(и), в которые вводят вирусный вектор, могут представлять собой клетки любого типа, включая, нервные клетки (включая клетки периферической и центральной нервной системы, в частности, клетки мозга, такие как нейроны и олигодендроциты), клетки легких, клетки глаза (включая клетки сетчатки, пигментный эпителий сетчатки и клетки роговицы), эпителиальные клетки (например, кишечные и респираторные эпителиальные клетки), мышечные клетки (например, клетки скелетной мышцы, клетки сердечной мышцы, клетки гладкой мускулатуры и/или мышечные клетки диафрагмы), дендритные клетки, клетки поджелудочной железы (включая клетки островков), клетки печени, миокардиальные клетки, клетки кости (например, стволовые клетки костного мозга), гемопоэтические стволовые клетки, клетки селезенки, кератиноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки, клетки предстательной железы, половые клетки и им подобные, но не ограничиваясь ими. В некоторых воплощениях клетка может представлять собой любую клетку-предшественник. В качестве дополнительной возможности клетка может представлять собой стволовую клетку (например, нервную стволовую клетку, стволовую клетку печени). В качестве еще одной дополнительной альтернативы клетка может представлять собой раковую или опухолевую клетку. Кроме того, клетка может иметь происхождение от любого вида, как показано выше.

Вирусный вектор можно вводить в клетки *in vitro* с целью введения модифицированной клетки субъекту. В некоторых воплощениях клетки извлекают из субъекта, вводят в них вирусный вектор и затем клетки вводят обратно субъекту. Способы извлечения клеток из субъекта для проведения манипуляций *ex vivo* с последующим введением обратно субъекту известны в данной области техники (см., например, патент США No. 5399346). Альтернативно, рекомбинантный вирусный вектор можно вводить в клетки, полученные от субъекта-донора, в культивируемые клетки или в клетки из любого другого подходящего источника, и эти клетки вводить субъекту, нуждающемуся в таком введении (то есть, субъекту-“реципиенту”).

Подходящие клетки для доставки нуклеиновой кислоты *ex vivo* являются такими, как описано выше. Дозировки клеток для введения субъекту будут варьировать в зависимости от возраста, состояния и вида субъекта, типа клетки, нуклеиновой кислоты, экспрессируемой клеткой, способа введения и тому подобного. Обычно, по меньшей мере от примерно 10^2 до примерно 10^8 клеток или по меньшей мере от примерно 10^3 до примерно 10^6 клеток на дозу вводят в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых воплощениях клетки, трансдуцированные вирусным вектором, вводят субъекту в эффективном количестве в комбинации с фармацевтическим носителем.

В некоторых воплощениях вирусный вектор вводят в клетку и клетку можно вводить субъекту для получения иммунного ответа против доставленного полипептида (например, экспрессируемого в форме трансгена или в белковом капсиде). Обычно, вводят количество клеток, экспрессирующих иммунологически эффективное количество полипептида, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Термин “иммунологически эффективное количество” означает количество экспрессируемого полипептида, достаточное для развития активного иммунного ответа против этого полипептида у субъекта, которому вводят эту фармацевтическую композицию. В некоторых воплощениях дозировка является достаточной для получения защитного иммунного ответа (как определено выше). Полученная степень защиты не обязательно должна быть полной или постоянной, при условии, что польза от введения этого иммуногенного полипептида превышает любые его недостатки.

Следовательно, в некоторых воплощениях способ введения нуклеиновой кислоты в клетку включает приведение в контакт клетки с вирусным вектором, вирусной частицей и/или композицией, как описано здесь.

Также здесь предложен способ введения субъекту вирусного вектора, вирусной частицы и/или вирусоподобной частицы, как описано здесь. В некоторых воплощениях способ доставки нуклеиновой кислоты субъекту включает введение субъекту вирусной частицы, вирусного вектора и/или композиции, как описано здесь. Введение вирусных векторов, вирусных частиц и/или вирусоподобных частиц субъекту-человеку или животному, нуждающемуся в этом, можно проводить любыми способами, известными в данной области техники. Возможно, вирусный вектор, вирусную частицу и/или вирусоподобную частицу доставляют в эффективной дозе в фармацевтически

приемлемом носителе. В некоторых воплощениях доставляют эффективное количество вирусного вектора, вирусной частицы и/или вирусоподобной частицы.

Описанные здесь вирусные векторы и/или вирусоподобные частицы можно дополнительно вводить (например, в форме вакцины) для индукции иммунного ответа. Обычно, иммуногенные композиции содержат иммунологически эффективное количество вирусного вектора и/или вирусоподобной частицы в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Возможно, дозировка является достаточной для получения защитного иммунного ответа (как определено выше). Полученная степень защиты не обязательно должна быть полной или постоянной, при условии что польза от введения иммуногенного полипептида превышает любые его недостатки. Субъекты и иммуногены являются такими как описано выше.

Дозировки вирусного вектора или вирусоподобной частицы для введения субъекту зависят от способа введения, заболевания или состояния, которое лечат и/или предупреждают, индивидуального состояния субъекта, конкретного вирусного вектора или белкового капсида и доставляемой нуклеиновой кислоты и тому подобного, и могут быть определены рутинным способом. В некоторых воплощениях доза рекомбинантного AAV представляет собой эффективную дозу. Примеры эффективных доз могут представлять собой, например, дозу по меньшей мере примерно 10^5 , примерно 10^6 , примерно 10^7 , примерно 10^8 , примерно 10^9 , примерно 10^{10} , примерно 10^{11} , примерно 10^{12} , примерно 10^{13} , примерно 10^{14} , примерно 10^{15} трансдуцирующих единиц, возможно от примерно 10^8 до примерно 10^{13} трансдуцирующих единиц. В некоторых воплощениях эффективная доза рекомбинантного AAV представляет собой дозу в диапазоне от примерно 1×10^{11} до примерно 1×10^{15} векторных геномов на килограмм массы организма субъекта. Например, эффективная доза может составлять примерно 1×10^{11} , примерно 5×10^{11} , примерно 1×10^{12} , примерно 5×10^{12} , примерно 1×10^{13} , примерно 5×10^{13} , примерно 1×10^{14} , примерно 5×10^{14} или примерно 1×10^{15} векторных геномов на килограмм массы тела субъекта (вг/кг). В некоторых воплощениях доза вводимого AAV может составлять $2,8 \times 10^{13}$ вг/кг или $2,9 \times 10^{13}$ вг/кг. В некоторых воплощениях доза может составлять $2,1 \times 10^{13}$ вг или $3,0 \times 10^{13}$ вг.

В некоторых воплощениях можно использовать более чем одно введение (например, два, три, четыре или более чем четыре введения) для достижения желаемого уровня экспрессии гена за период, составляющий различные интервалы, например, за сутки, за неделю, за месяц, за год и так далее.

Примеры способов введения включают пероральное, ректальное, трансмукозальное, интраназальное, путем ингаляции (например, в форме аэрозоля), буккальное (например, сублингвальное), вагинальное, интратекальное, внутриглазное, трансдермальное, в матку (или в яйцеклетку (*in ovo*)), парентеральное (например, внутривенное, подкожное, интрадермальное, внутримышечное [включая введение в скелетную мышцу, мышцу диафрагмы и/или сердечную мышцу], интрадермальное, внутривисцеральное, интрацеребральное и интраартикулярное), местное (например, в поверхность как кожи, так и слизистой, включая поверхности дыхательных путей, и трансдермальное введение), внутрилимфатическое и им подобные, а также прямую инъекцию в ткань или орган (например, в печень, скелетную мышцу, сердечную мышцу, мышцу диафрагмы или мозг). Также можно проводить введение в опухоль (например, в опухоль или лимфатический узел или вблизи опухоли или лимфатического узла). Наиболее подходящий путь в каждом конкретном случае будет зависеть от природы и тяжести состояния, которое лечат и/или предупреждают, и от природы конкретного вектора, который используют.

Введение в скелетную мышцу включает, но не ограничивается этим, введение в скелетную мышцу конечностей (например, плечо, предплечье, бедро и/или голень), спину, шею, голову (например, язык), грудную клетку, живот, таз/промежность и/или пальцы. Подходящие скелетные мышцы включают *abductor digiti minimi* (в руке), *abductor digiti minimi* (в ноге), *abductor hallucis*, *abductor ossis metatarsi quinti*, *abductor pollicis brevis*, *abductor pollicis longus*, *adductor brevis*, *adductor hallucis*, *adductor longus*, *adductor magnus*, *adductor pollicis*, *anconeus*, *anterior scalene*, *articularis genus*, *biceps brachii*, *biceps femoris*, *brachialis*, *brachioradialis*, *buccinator*, *coracobrachialis*, *corrugator supercilii*, *deltoid*, *depressor anguli oris*, *depressor labii inferioris*, *digastric*, *dorsal interossei* (в руке), *dorsal interossei* (в ноге), *extensor carpi radialis brevis*, *extensor carpi radialis longus*, *extensor carpi ulnaris*, *extensor digiti minimi*, *extensor digitorum*, *extensor digitorum brevis*, *extensor digitorum longus*, *extensor hallucis brevis*, *extensor hallucis longus*, *extensor indicis*, *extensor pollicis brevis*, *extensor pollicis longus*, *flexor carpi radialis*, *flexor carpi ulnaris*, *flexor digiti minimi brevis* (в руке), *flexor digiti minimi brevis* (в ноге), *flexor digitorum brevis*, *flexor digitorum longus*, *flexor digitorum profundus*, *flexor digitorum superficialis*, *flexor hallucis brevis*, *flexor hallucis longus*, *flexor pollicis brevis*, *flexor pollicis longus*, *frontalis*, *gastrocnemius*, *geniohyoid*, *gluteus maximus*, *gluteus medius*, *gluteus minimus*, *gracilis*, *iliocostalis cervicis*, *iliocostalis lumborum*, *iliocostalis thoracis*,

iliacus, inferior gemellus, inferior oblique, inferior rectus, infraspinatus, interspinalis, intertransversi, lateral pterygoid, lateral rectus, latissimus dorsi, levator anguli oris, levator labii superioris, levator labii superioris alaeque nasi, levator palpebrae superioris, levator scapulae, long rotators, longissimus capitis, longissimus cervicis, longissimus thoracis, longus capitis, longus colli, lumbricals (в руке), lumbricals (в ноге), masseter, medial pterygoid, medial rectus, middle scalene, multifidus, mylohyoid, obliquus capitis inferior, obliquus capitis superior, obturator externus, obturator internus, occipitalis, omohyoid, opponens digiti minimi, opponens pollicis, orbicularis oculi, orbicularis oris, palmar interossei, palmaris brevis, palmaris longus, pectineus, pectoralis major, pectoralis minor, peroneus brevis, peroneus longus, peroneus tertius, piriformis, plantar interossei, plantaris, platysma, popliteus, posterior scalene, pronator quadratus, pronator teres, psoas major, quadratus femoris, quadratus plantae, rectus capitis anterior, rectus capitis lateralis, rectus capitis posterior major, rectus capitis posterior minor, rectus femoris, rhomboid major, rhomboid minor, risorius, sartorius, scalenus minimus, semimembranosus, semispinalis capitis, semispinalis cervicis, semispinalis thoracis, semitendinosus, serratus anterior, short rotators, soleus, spinalis capitis, spinalis cervicis, spinalis thoracis, splenius capitis, splenius cervicis, sternocleidomastoid, sternohyoid, sternothyroid, stylohyoid, subclavius, subscapularis, superior gemellus, superior oblique, superior rectus, supinator, supraspinatus, temporalis, tensor fascia lata, teres major, teres minor, thoracis, thyrohyoid, tibialis anterior, tibialis posterior, trapezius, triceps brachii, vastus intermedius, vastus lateralis, vastus medialis, zygomaticus major и zygomaticus minor и любую другую подходящую скелетную мышцу, известную в данной области техники, но не ограничиваясь ими.

Вирусный вектор и/или вирусоподобная частица может быть доставлен(а) в скелетную мышцу путем внутривенного введения, интраартериального введения, интраперитонеального введения, перфузии конечности (возможно, изолированной перфузии конечности ноги и/или руки; см., например Arruda et al., (2005) Blood 105: 3458-3464) и/или прямой внутримышечной инъекции. В некоторых воплощениях вирусный вектор и/или вирусоподобную частицу вводят в конечность (руку и/или ногу) субъекта (например, субъекта с мышечной дистрофией, такой как мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) или конечностно-поясная мышечная дистрофия (LGMD)) путем перфузии конечности, возможно изолированной перфузии конечности (например, путем внутривенного или внутрисуставного введения). В некоторых воплощениях вирусные векторы и/или вирусоподобные частицы преимущественно можно вводить

без применения "гидродинамических" методов. Доставку в ткань (например, в мышцу) векторов, известных в уровне техники, часто усиливают гидродинамическими методами (например, внутривенным/внутривенным введением в большом объеме), что повышает давление в сосудистом русле и облегчает способность вектора пересекать барьер эндотелиальных клеток. В некоторых воплощениях вирусные векторы и/или вирусоподобные частицы можно вводить в отсутствие гидродинамических методов, таких как инфузии большого объема и/или повышение внутрисосудистого давления (например, выше нормального систолического давления, например, повышение внутрисосудистого давления относительно нормального систолического давления менее чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%). Такие способы могут уменьшать или устранять побочные эффекты, связанные с гидродинамическими методами, такие как отек, повреждение нервов и/или повышение давления в какой-либо анатомической полости (compartment syndrome). Введение в сердечную мышцу включает введение в левое предсердие, правое предсердие, левый желудочек, правый желудочек и/или перегородку. Вирусный вектор или вирусоподобная частица может быть доставлен(а) в сердечную мышцу путем внутривенного введения, внутриартериального введения, такого как внутриаортальное введение, прямой сердечной инъекции (например, в левое предсердие, правое предсердие, левый желудочек, правый желудочек) и/или перфузии коронарной артерии.

В мышцу диафрагмы можно вводить любым подходящим способом, включая внутривенное введение, интраартериальное введение и/или интраперитонеальное введение.

Доставка в ткань-мишень также может быть достигнута путем доставки депо, содержащего вирусный вектор или вирусоподобную частицу. Как описано здесь, доставка "депо" относится к введению композиции с замедленным действием, которое позволяет медленное высвобождение и/или постепенное распространение вируса, так что вирус может действовать в течение более длительных периодов времени, чем возможно при стандартных инъекциях. В некоторых воплощениях депо, содержащее вирусный вектор или вирусоподобную частицу, имплантируют в ткань скелетной, сердечной мышцы и/или мышцы диафрагмы, или эта ткань может быть приведена в контакт с пленкой или другим матриксом, содержащим вирусный вектор или вирусоподобную частицу. Такие имплантируемые матриксы или субстраты описаны в патенте США No. 7201898.

В некоторых воплощениях вирусный вектор и/или соответствующую вирусоподобную частицу вводят в скелетную мышцу, мышцу диафрагмы и/или сердечную мышцу (например, для лечения и/или предупреждения мышечной дистрофии, сердечного заболевания [например, PAD или застойной сердечной недостаточности]).

В некоторых воплощениях описанные здесь композиции и способы применяют для лечения и/или предупреждения заболеваний или расстройств скелетной, сердечной мышцы и/или мышцы диафрагмы. Заболевания или расстройства мышц могут представлять собой, например, мышечную дистрофию, миопатию, заболевание мотонейронов и кардиомиопатию. Заболевания или расстройства мышцы могут представлять собой, например, дистрофинопатии, мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, миотонические дистрофии (например, миотоническую дистрофию 1 и 2), плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию (FDHD), мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, тазово-плечевую дистрофию, плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию, дистрофию мышц глазного яблока и глотки, дистальную мышечную дистрофию, наследственную мышечную дистрофию, ювенильную макулярную дистрофию, центронуклеарную миопатию, миопатию с поражением сердцевины мышечных волокон и миозит с включениями.

В некоторых воплощениях предложен способ лечения и/или предупреждения мышечной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом и/или предупреждении, включающий введение эффективного для лечения или предупреждения количества вирусного вектора субъекту-млекопитающему, где вирусный вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую дистрофин, мини-дистрофин, микро-дистрофин, пропептид миостатина, фоллистатин, растворимый рецептор активина типа II, IGF-1, противовоспалительные полипептиды, такие как доминантный мутант Икарра В, саркоспан, атрофин, микро-дистрофин, ламинин-α2, альфа-саркогликан, бета-саркогликан, гамма-саркогликан, дельта-саркогликан, IGF-1, антитело или фрагмент антитела против миостатина или пропептида миостатина и/или интерферирующую РНК против миостатина. В некоторых воплощениях вирусный вектор можно вводить в скелетную мышцу, мышцу диафрагмы и/или сердечную мышцу, как описано здесь.

Альтернативно, описанные здесь способы можно воплотить на практике для доставки нуклеиновой кислоты в скелетную, сердечную мышцу или мышцу

диафрагмы, которые используют в качестве платформы для продукции полипептида (например, фермента) или функциональной РНК (например, интерферирующей РНК, микроРНК, антисмысловой РНК), который(ая) в норме циркулирует в крови, или для системной доставки в другие ткани для лечения и/или предупреждения расстройства (например, метаболического расстройства, такого как диабет [например, инсулин], гемофилии [например, Фактор IX или Фактор VIII], мукополисахаридного расстройства [например, синдрома Слая, синдрома Гурлер, синдрома Шейе, синдрома Гурлер-Шейе, синдрома Гунтера, синдрома Санфилиппо А, В, С, D, синдрома Моркио, синдрома Марото-Лами и так далее] или лизосомной болезни накопления, такой как болезнь Гоше [глюкоцереброзидаза] или болезнь Фабри [α-галактозидаза А] или гликогеноза, такого как болезнь Помпе [лизосомальная кислая альфа-глюкозидаза]). Другие подходящие белки для лечения и/или предупреждения метаболических расстройств описаны здесь. Применение мышцы в качестве платформы для экспрессии интересующей нуклеиновой кислоты описано в публикации заявки на патент США 2002/0192189.

В некоторых воплощениях способ лечения и/или предупреждения метаболического расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение эффективного для лечения или предупреждения количества вирусного вектора в скелетную мышцу субъекта, где вирусный вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, где метаболическое расстройство представляет собой результат недостаточности и/или дефекта полипептида. Иллюстративные метаболические расстройства и гетерологичные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, описаны здесь. Возможно, полипептид секретируется (например, полипептид, представляющий собой секретируемый полипептид в его нативном состоянии или таковой, сконструированный в секретируемой форме, например, путем функциональной связи с секреторной сигнальной последовательностью, известной в данной области техники). Не ограничиваясь какой-либо определенной теорией, согласно этому воплощению введение в скелетную мышцу может приводить к секреции полипептида в системную циркуляцию и доставке в ткань-мишень (ткани-мишени). Способы доставки вирусных векторов в скелетную мышцу описаны здесь более подробно.

Описанные здесь способы можно осуществлять на практике для получения некодирующей РНК, такой как антисмысловая РНК, интерферирующая РНК или другие функциональные РНК(например, рибозим) для системной доставки.

В некоторых воплощениях способ лечения и/или предупреждения врожденной сердечной недостаточности или PAD у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение эффективного для лечения или предупреждения количества вирусного вектора субъекту-млекопитающему, где вирусный вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую, например, Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического эндоретикулума (SERCA2a), ангиогенный фактор, ингибитор фосфатазы I (I-1) и его фрагменты (например, II C), интерферирующую РНК против фосфоламбана; ингибиторную или доминантно-негативную к фосфоламбану молекулу, такую как форсфоламбан S16E, белок с цинковыми пальцами, который регулирует ген фосфоламбана, бета-2-адренергический рецептор, киназу бета-2-адренергического рецептора (BARK), PI3-киназу, кальсаркан, ингибитор киназы β -адренергического рецептора (PARKct), ингибитор 1 протеинфосфатазы 1 и его фрагменты (например, II C), S100A1, парвальбумин, аденилатциклазу типа 6, молекула, регулирующую нокдаун киназы типа 2 рецептора, сопряженного с G-белком, такую как укороченный конститутивно активный bARKct, Pim-1, PGC-I α , SOD-1, SOD-2, EC-SOD, калликреин, HIF, тимозин-p4, mir-1, mir-133, mir-206, mir-208 и/или mir-26a.

Инъецируемые препараты могут быть приготовлены в традиционных формах, либо жидких растворов, либо суспензий, твердых формах, подходящих для приготовления раствора или суспензии в жидкости перед инъекцией, или в форме эмульсий. Альтернативно, можно вводить вирусный вектор или вирусоподобную частицу местно, а не системно, например, в форме депо или композиции с замедленным высвобождением. Кроме того, вирусный вектор или вирусоподобная частица может быть доставлен(а) соединенной с хирургически имплантируемой матрицей (например, как описано в публикации заявки США No. US-2004-0013645-A1).

Раскрытые здесь вирусные векторы и/или вирусоподобные частицы можно вводить в легкие субъекта любыми подходящими способами, возможно путем введения аэрозольной суспензии вдыхаемых частиц, состоящих из вирусных векторов и/или вирусоподобных частиц, которые вдыхает субъект. Вдыхаемые частицы могут быть жидкими или твердыми. Аэрозоли жидких частиц, содержащих вирусные векторы и/или вирусоподобные частицы, можно получать любыми подходящими способами,

например с помощью управляемого давлением аэрозольного небулайзера или ультразвукового небулайзера, которые известны специалистам в данной области техники. См., например, патент США No. 4501729. Аналогично аэрозоли твердых частиц, содержащих вирусные векторы и/или вирусоподобные частицы, можно получать при помощи любого генератора аэрозоля твердых частиц лекарственного средства любым методом, известным в области фармацевтики.

Вирусные векторы и вирусоподобные частицы можно вводить в ткани ЦНС (например, мозг, глаз), и преимущественно это может приводить к более широкому распределению вирусного вектора или вирусоподобных частиц, чем наблюдается в отсутствие описанных здесь композиций и способов.

В некоторых воплощениях описанные здесь вирусные векторы можно вводить для лечения заболеваний ЦНС, включая генетические расстройства, нейродегенеративные расстройства, психиатрические расстройства и опухоли. Иллюстративные заболевания ЦНС включают аденомиелоневропатию (AMN), болезнь Альцгеймера, синдром Ангельмана, лобно-височную деменцию, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, синдром ломкой X-хромосомы, болезнь Канавана, болезнь Ли, болезнь Рефсума, синдром Туретта, первичный латеральный склероз, амиотрофический латеральный склероз, прогрессирующую мышечную атрофию, болезнь Пика, мышечную дистрофию, рассеянный склероз, злокачественную миостению, болезнь Бинсвангера, травму, связанная с повреждением спинного мозга или головы, болезнь Тея-Сакса (ганглиозидоз GM2), синдром Лейша-Найхана, ожирение MC4R, метахроматическую лейкодистрофию (MLD), MPS I (Гурлер/Шейе), MPS IIIA (Санфилиппо А), Ниманна-Пика C1, синдром Ретта, спинальную мышечную атрофию (SMA), недостаточность AADC, моногенный амиотрофический латеральный склероз (ALS), альфа-маннозидоз, аспартилглюкозаминурию, синдром Драве, гигантскую аксональную нейропатию, глобоидно-клеточную лейкодистрофию (Краббе), недостаточность Глут-1, ганглиозидоз GM1, детский нейрональный цероидный липофусциноз (INCL, Batten), ювенильный нейрональный цероидный липофусциноз (JNCL, Batten), поздний детский нейрональный цероидный липофусциноз (LINCL, Batten), MPS II (Hunter), MPS IIIB (Санфилиппо В), MPS IIIC (Санфилиппо С), MPS IVA (синдром Моркио), MPS VI (Марото-Лами), расстройства пероксисомального биогенеза (спектр синдрома Цельвегера), болезнь Сандхоффа (ганглиозидоз GM2), эпилепсию, церебральные инфаркты, психиатрические

расстройства, включая расстройства настроения (например, депрессию, биполярное аффективное расстройство, хроническое аффективное расстройство, вторичное расстройство настроения), шизофрению, зависимость от лекарственных средств (например, алкоголизм или зависимости от других веществ), неврозы (например, тревожность, навязчивое состояние, соматоформное расстройство, диссоциативное расстройство, печаль, послеродовую депрессию), психоз (например, галлюцинации и иллюзии), деменцию, паранойю, дефицит внимания, психосексуальные расстройства, нарушения сна, болевые расстройства, расстройства пищевого поведения или нарушение веса (например, ожирение, катексию, нервно-психическую анорексию или булемию) и рак и опухоли (например, опухоли гипофиза) ЦНС, но не ограничиваясь ими.

Расстройства ЦНС включают заболевания глаза, включая сетчатку, задний тракт (posterior tract) и зрительный нерв (например, пигментную дегенерацию сетчатки, диабетическую ретинопатию и другие дегенеративные заболевания сетчатки, увеит, возрастную дегенерацию желтого пятна, глаукому).

Большинство глазных заболеваний и расстройств, если не все, связано с одним или более чем одним из трех типов симптомов: (1) ангиогенез, (2) воспаление и (3) дегенерация. Описанные здесь вирусные векторы можно использовать для доставки антиангиогенных факторов; противовоспалительных факторов; факторов, замедляющих дегенерацию клеток, активирующих защиту клеток (cell sparing) или активирующих рост клеток, и комбинаций перечисленного.

Диабетическая ретинопатия, например, характеризуется ангиогенезом. Диабетическую ретинопатию можно лечить путем доставки одного или более чем одного антиангиогенного фактора, либо внутриглазным способом (например, в стекловидное тело), либо периокулярно (например, в субтенозово пространство). Также один или более чем один нейротрофический фактор может быть совместно доставлен, либо внутриглазным способом (например, в стекловидное тело), либо периокулярно.

Увеит включает воспаление. Один или более чем один противовоспалительный фактор можно вводить внутриглазным способом (например, в стекловидное тело или переднюю камеру) введения вирусного вектора.

Пигментная дегенерация сетчатки, для сравнения, характеризуется дегенерацией сетчатки. В некоторых воплощениях пигментную дегенерацию сетчатки можно лечить

путем внутриглазного (например, в стекловидное тело) введения вирусного вектора, кодирующего один или более чем один нейротрофический фактор.

Возрастная дегенерация желтого пятна включает как ангиогенез, так и дегенерацию сетчатки. Это расстройство можно лечить путем введения вирусных векторов по изобретению, кодирующих один или более чем один нейротрофический фактор, внутриглазным способом (например, в стекловидное тело), и/или один или более чем один антиангиогенный фактор внутриглазным или периокулярным способом (например, в субтеноново пространство).

Глаукома характеризуется повышенным глазным давлением и потерей клеток ганглия сетчатки. Лечение глаукомы включает введение одного или более чем одного нейропротекторного агента, защищающего клетки от эксайтотоксического повреждения, с использованием вирусных векторов по изобретению. Такие агенты включают антагонисты N-метил-D-аспартата (NMDA), цитокины и нейротрофические факторы, доставляемые внутриглазным путем, возможно интравитреально.

В некоторых воплощениях описанные здесь композиции и способы можно применять для лечения судорожных припадков, например, для уменьшения возникновения, частоты или тяжести припадков. Эффективность терапевтического лечения припадков можно оценить путем поведенческих (например, тремор, подергивание глаза или рта) и/или электрографических средств (большинство припадков имеют характерные электрографические нарушения). Следовательно, эпилепсию, которая характеризуется множественными припадками на протяжении длительного времени, также можно лечить.

В некоторых воплощениях способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту AAV-вектора, содержащего белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, где субъединица капсидного белка содержит любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 165-187. В некоторых воплощениях AAV-вектор содержит белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 175. В некоторых воплощениях AAV-вектор содержит белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 175. В некоторых воплощениях субъект имеет синдром Драве.

В некоторых воплощениях субъект имеет синдром Ретта. В некоторых воплощениях субъект имеет синдром Ангельмана. В некоторых воплощениях субъект имеет болезнь Ниманна-Пика. В некоторых воплощениях субъект имеет синдром ломкой X-хромосомы. В некоторых воплощениях субъект имеет болезнь Альцгеймера. В некоторых воплощениях субъект имеет болезнь Гоше. В некоторых воплощениях субъект имеет болезнь Гентингтона. В некоторых воплощениях субъект имеет болезнь Паркинсона. В некоторых воплощениях субъект имеет атаксию Фридрейха. В некоторых воплощениях AAV-вектор вводят субъекту путем интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции. В некоторых воплощениях AAV-вектор вводят субъекту путем интратекальной (IT) инъекции. В некоторых воплощениях AAV-вектор вводят субъекту путем внутривенной (IV) инъекции.

В некоторых воплощениях способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту AAV-вектора, содержащего белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, где субъединица капсидного белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175 или 180, где субъект имеет синдром Драве, синдром Ретта, синдром Ангельмана, болезнь Ниманна-Пика или синдром ломкой X-хромосомы, и где AAV-вектор вводят субъекту путем ICV- или IT-инъекции.

В некоторых воплощениях способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту AAV-вектора, содержащего белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, где субъединица капсидного белка содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175 или 180, где субъект имеет болезнь Гоше, болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона или атаксию Фридрейха, и где AAV-вектор вводят субъекту путем ICV- или IT-инъекции.

В некоторых воплощениях соматостатин (или его активный фрагмент) вводят в мозг с использованием вирусного вектора для лечения опухоли гипофиза. Согласно этому воплощению, вирусный вектор, кодирующий соматостатин (или его активный фрагмент), вводят в гипофиз путем микроинфузии. Аналогично, такое лечение можно использовать для лечения акромегалии (аномальной секреции гипофизом гормона роста). Последовательности нуклеиновой кислоты (например, номер доступа GenBank No. J00306) и аминокислоты (например, номер доступа GenBank No. P01166; содержит процессированные активные пептиды соматостатин-28 и соматостатин-14) соматостатина известны в данной области техники.

В некоторых воплощениях вирусный вектор может включать секреторный сигнал, как описано в патенте США No. 7071172.

В некоторых воплощениях вирусный вектор и/или вирусоподобную частицу вводят в ЦНС (например, в мозг или в глаз). Вирусный вектор или вирусоподобную частицу можно вводить в спинной мозг, ствол мозга (продолговатый мозг, мост), средний мозг (гипоталамус, таламус, эпителиум, гипофиз, черную субстанцию, эпифиз), мозжечок, конечный мозг (полосатое тело, головной мозг, включая затылочную, височную, теменную и фронтальную доли, кору головного мозга, базальные ганглии, гиппокамп и миндалину (portalamygdala)), лимбическую систему, неокортекс, полосатое тело, головной мозг и нижний холмик четверохолмия. Также вирусный вектор или вирусоподобную частицу можно вводить в различные области глаза, такие как сетчатка, роговица и/или оптический нерв.

Вирусный вектор и/или вирусоподобная частица может быть доставлена в спинномозговую жидкость (например, путем люмбальной пункции) для более рассеянного введения вектора. Вирусный вектор или вирусоподобную частицу можно дополнительно вводить внутриваскулярно в ЦНС в ситуациях, когда нарушен гематоэнцефалический барьер (например, при опухоли мозга или церебральном инфаркте).

Вирусный вектор и/или вирусоподобную частицу можно вводить в желаемую(ые) область(и) ЦНС любым путем, известным в данной области техники, включая интратекальную, внутриглазную, интрацеребральную, интравентрикулярную, внутривенную (например, в присутствии сахара, такого как маннит), интраназальную, внутриушную, внутриглазную (например, внутрь стекловидного тела, субретинально, в переднюю камеру) и периокулярную (например, в субтенозово пространство) доставку, а также внутримышечную доставку с ретроградной доставкой к моторным нейронам, но не ограничиваясь этим. В некоторых воплощениях вирусный вектор и/или вирусоподобную частицу вводят в жидкой композиции путем прямой инъекции (например, стереотаксической инъекции) в желаемую область или компартмент в ЦНС. В некоторых воплощениях вирусный вектор и/или вирусоподобная частица могут быть предоставлены путем местного нанесения в желаемую область или путем интраназального введения аэрозольной композиции. Введение в глаз можно выполнять путем местного нанесения жидких капель. В качестве дополнительной альтернативы

вирусный вектор или/или вирусоподобную частицу можно вводить в форме твердой композиции с медленным высвобождением (см., например, патент США No. 7201898).

В некоторых воплощениях вирусный вектор можно использовать для ретроградного транспорта для лечения и/или предупреждения заболеваний и расстройств, затрагивающих двигательные нейроны (например, бокового амиотрофического склероза (ALS); спинальной мышечной атрофии (SMA) и так далее). Например, вирусный вектор может быть доставлен в мышечную ткань, из которой он может мигрировать в нейроны.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры, включенные в данное описание исключительно для иллюстративных целей, не предназначены каким-либо образом ограничивать объем настоящего изобретения. Как их используют здесь, термины “STRD.101” и “STRD.102” используют для описания последовательностей субъединиц капсидного белка, и “AAV-STRD.101” и “AAV-STRD.102” используют для описания AAV-векторов, содержащих последовательности рекомбинантных или модифицированных субъединиц капсидного белка. Однако, в некоторых контекстах термины “STRD.101” и “STRD.102” можно использовать для описания AAV-векторов, содержащих белковый капсид, содержащий обозначенные субъединицы капсидного белка, как понимает специалист в данной области техники.

ПРИМЕР 1. Комбинаторное конструирование и отбор AAV-векторов, избегающих антитела

Избегающие антитела мутанты AAV получали в соответствии со следующим способом. Первый этап включает идентификацию конформационных 3D-антигенных эпитопов на поверхности капсидного белка капсида AAV, например с использованием криоэлектронной микроскопии. Затем выбранные остатки в антигенных мотивах подвергали мутагенезу с использованием вырожденных праймеров, где каждый кодон, замещенный нуклеотидами NNK, и фрагменты генов комбинировали вместе путем сборки по Гибсону и/или многоступенчатой ПЦР. Гены, кодирующие субъединицы капсидного белка, содержащие библиотеку вырожденных мутированных антигенных мотивов, клонировали в геном AAV дикого типа для замены оригинальной последовательности ДНК, кодирующей Сар, с получением плазмидной библиотеки. Затем плазмидными библиотеками трансфицировали клеточные линии-продуцента 293 аденовирусной плазмидой-помощником для получения библиотек AAV-субъединиц

капсидного белка, которые затем можно подвергать отбору. Успешное получение AAV-библиотек подтверждали секвенированием ДНК.

Для отбора новых штаммов AAV, способных избегать нейтрализующие антитела (NAbs) и/или действовать направленно на центральную нервную систему (ЦНС), с библиотеками AAV проводили множество раундов инфицирования приматов, не являющихся человеком. На каждой стадии интересующие ткани выделяли из субъектов-животных. Клеточные лизаты, собранные из интересующих тканей, подвергали секвенированию для идентификации изолятов AAV, избегающих нейтрализацию антителами. После множественных раундов инфицирования у приматов, не являющихся человеком, выделенные последовательности из каждого мутагенизируемого участка, комбинировали во всех сочетаниях и комбинациях.

В качестве конкретного примера общий антигенный мотив субъединицы капсидного белка AAV (VP1) подвергали мутагенезу, как описано выше. Затем вырожденные библиотеки (**Фиг. 1А**) подвергали первому раунду инфицирования у приматов, не являющихся человеком (внутривенная инъекция). Ткани собирали на 7 сутки после инфицирования и проводили секвенирование для идентификации отдельных изолятов AAV.

Различные рекомбинантные изоляты AAV были идентифицированы в образцах тканей, включая спинной мозг, ганглий задних корешков, лобную долю, височную долю, затылочную долю, путамен, бледный шар, таламус, миндалину, гиппокамп, черную субстанцию, мост, мозжечок, спинной мозг. Результаты этого первого раунда эволюции представлены на **Фиг. 1Б**.

Затем рекомбинантные AAV, выделенные во время первого раунда эволюции (**Фиг. 1Б**), повторно вводили во второго примата, не являющегося человеком. Ткани собирали на сутки 7 после инфицирования и проводили секвенирование для идентификации отдельных изолятов AAV. Результаты этого второго раунда эволюции представлены на **Фиг. 1В**.

Рекомбинантные AAV с самой высокой частотой секвенировали. Замены, присутствующие в этих AAV, показаны в Таблицах 7.1 и 7.2. Эти данные показывают, что рекомбинантные вирионы AAV, имеющие субъединицы капсидного белка, содержащие замены, перечисленные в Таблицах 7.1 и 7.2, избегают нейтрализующие антитела *in vivo* у приматов, не являющихся человеком, и имеют тропизм в отношении желаемых тканей-мишеней.

ПРИМЕР 2: Возможность производства рекомбинантных AAV-векторов

Для определения возможности производства различных рекомбинантных AAV, идентифицированных в Примере 1, в промышленном масштабе AAV получали стандартными способами и выход сравнивали с таковым для векторов на основе AAV дикого типа.

AAV получали в клетках HEK293 в соответствии со стандартным протоколом тройной трансфекции. Вкратце, клетки трансфицировали: (1) плазмидой, содержащей последовательность субъединицы капсидного белка AAV9 дикого типа, последовательность варианта субъединицы капсидного белка STRD.101 (SEQ ID NO: 180) или последовательность варианта субъединицы капсидного белка STRD.102 (SEQ ID NO: 175), (2) плазмидой, содержащей 5' ITR, трансген и последовательность 3' ITR, и (3) плазмидой, содержащей гены-помощники, необходимые для продукции AAV. Два разных трансгена использовали с каждой субъединицей капсидного белка в самокомплементарных конструкциях. Затем клетки лизировали и вирионы очищали с использованием аффинной колонки, ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl и диализа. Затем измеряли выход каждого AAV с использованием способа количественной оценки на основе ПЦР.

Как показано на **Фиг. 2**, выход рекомбинантных AAV-векторов, содержащих субъединицы капсидного белка STRD.101 и STRD.102, был сходным с выходом AAV9 дикого типа. Эти данные подтверждают, что рекомбинантные AAV, содержащие рекомбинантные субъединицы капсидного белка, подходят для промышленного производства.

ПРИМЕР 3: Трансдукция с использованием рекомбинантных AAV-вирусных векторов *in vitro*

Для подтверждения того, обладают ли в целом рекомбинантные AAV-векторы из Примера 1 инфективностью и способностью трансдуцировать клетки в культуре, были получены различные AAV-векторы в соответствии со стандартными протоколами.

Инфективность рекомбинантных AAV тестировали с использованием стандартного исследования TCID₅₀. Вкратце, клетки HeLaRC32 инфицировали рекомбинантными AAV-частицами в присутствии аденовируса (Ad5) в дозах, охватывающих 5 порядков. Через 72 часа ДНК экстрагировали и репликацию векторного генома количественно оценивали посредством количественной ПЦР.

Соотношение числа частиц к инфективности рассчитывали для определения инфективности. Как показано на **Фиг. 3**, коэффициент инфективности вектора AAV-STRD.101 был ниже по сравнению с таковым AAV9 дикого типа. Поскольку более низкий коэффициент инфективности переходит в более высокую эффективность, AAV-STRD.101 является более инфекционным, чем AAV9 дикого типа.

Отдельно инфективность также определяли в различных клеточных линиях. Была выполнена упаковка люциферазного трансгена в рекомбинантный AAV, и его приводили в контакт с клетками в культуре в дозе 10000 векторных геномов (вг) на клетку. Через 48 часа после инфицирования клетки лизировали. Лизат приводили в контакт с биолюминесцентным субстратом и измеряли относительные единицы флуоресценции (RFU). Как показано на **Фиг. 4А-4Г**, векторы AAV-STRD.101 инфицировали клетки U87 (линия клеток глиобластомы человека, **Фиг. 4А**), клетки N2A (клеточная линия, происходящая от нервного валика мыши, **Фиг. 4Б**), клетки SY5Y (линия клеток нейробластомы человека, **Фиг. 4В**) и клетки U2OS (линия клеток остеосаркомы человека, **Фиг. 4Г**) на уровне, сравнимом с AAV9 дикого типа.

Соответственно, эти данные показывают, что рекомбинантные векторы AAV из Примера 1 могут эффективно трансдуцировать клетки в культуре.

ПРИМЕР 4: Характеризация *in vivo* рекомбинантных AAV, нацеленных на центральную нервную систему

Рекомбинантные субъединицы капсидного белка STRD.101 и STRD.102 были выбраны для характеристики *in vivo*. Были сконструированы рекомбинантные AAV, содержащие эти субъединицы капсидного белка и упаковывающие нативный флуоресцентный трансген tdTomato. Рекомбинантные AAV вводили новорожденным мышам путем интрацеребровентрикулярной инъекции на сутки 0. Через три недели после инъекции ткани мозга собирали и фиксировали для оценки экспрессии путем визуального определения флуоресценции tdTomato. На **Фиг. 5** представлены репрезентативные изображения, показывающие экспрессию tdTomato на вибротомных коронарных срезах через 24 часа после фиксации 4% PFA. Эти же самые срезы также визуализировали с помощью иммуногистохимии (**Фиг. 6**). Как показано на изображениях, представленных на **Фиг. 5** и **Фиг. 6**, каждый из векторов AAV9, AAV-STRD.102 и AAV-STRD.101 имел различное распределение в тканях мозга с наиболее высоким уровнем экспрессии трансгена, локализованным вблизи от сайта инъекции. Взятые вместе эти данные показывают, что протестированные рекомбинантные AAV

успешно доставляют трансген к клеткам-мишеням *in vivo* после интрацеребровентрикулярной инъекции.

Векторы AAV-STRD.101 и AAV-STRD.102, упаковывающие tdTomato, также вводили четырем взрослым мышам путем внутривенной инъекции в дозе $5,5 \times 10^{13}$ вг/кг. Через три недели после инъекции печень и сердце извлекали и фиксировали для оценки профиля экспрессии путем визуального определения флуоресценции tdTomato.

На **Фиг. 7** представлены репрезентативные изображения от одной мыши, показывающие экспрессию tdTomato на вибраторных срезах печени через 24 часа после фиксации 4% PFA. Заметно, что векторы AAV-STRD.102 и AAV-STRD.101 не были нацелены на печень по сравнению с AAV9 дикого типа. Это желательное свойство оказалось неожиданным, поскольку никакого скрининга по этому признаку в печени не проводилось во время эволюции.

На **Фиг. 8** представлены репрезентативные изображения от одной мыши, показывающие экспрессию tdTomato на вибраторных срезах сердца через 24 часа после фиксации 4% PFA. Заметно, что протестированные векторы имеют различный тропизм в отношении сердца. В частности, вектор AAV-STRD.102 был менее инфекционным в отношении сердца по сравнению с AAV-STRD.101. Поскольку никакого скрининга в отношении сердца не проводили во время эволюции, эта дифференциальная трансдукция оказалась совершенно неожиданной.

Взятые вместе эти данные показывают, что векторы AAV-STRD.102 и AAV-STRD.101 можно с успехом использовать для нацеливания на ткани ЦНС *in vivo*, они избегают выведения печенью и представляют собой высокоэффективные средства для генной терапии. Учитывая их различный тропизм (то есть, AAV-STRD.101 был более инфекционным в сердце по сравнению с AAV-STRD.102), эти векторы представляют собой высокоэффективные средства для геннотерапевтического лечения определенных желаемых тканей.

ПРИМЕР 5: Биораспределение рекомбинантных AAV у приматов, не являющихся человеком

Рекомбинантные AAV вводили приматам, не являющимся человеком, для изучения биораспределения. Рекомбинантные AAV вводили путем внутривенной (IV) и интрацереброваскулярной (ICV) инъекции (**Фиг. 9**). AAV-STRD.101 вводили в дозе $2,9 \times 10^{13}$ векторных геномов на килограмм (вг/кг) путем IV-инъекции и $2,1 \times 10^{13}$ вг путем ICV-инъекции (черные точки). AAV-STRD.102 вводили в дозе $2,8 \times 10^{13}$ вг/кг

путем IV-инъекции и $3,0 \times 10^{13}$ вг путем ICV-инъекции (белые точки). Через 30 суток животных умерщвляли и измеряли вирусную нагрузку в различных тканях ЦНС путем количественной ПЦР.

Как показано на **Фиг. 9**, как AAV-STRD.102, так и AAV-STRD.101 инфицировали различные ткани ЦНС. Дополнительно, поскольку AAV демонстрировали высокие уровни трансдукции, эти данные подтверждают, что эти AAV вероятно избегают нейтрализующие антитела *in vivo*.

ПРИМЕР 6: Способ клеточной терапии для лечения субъекта, нуждающегося в этом

Клетки трансдуцировали *ex vivo* с использованием AAV-вектора. Для некоторых задач клетки могут быть аутогенными (то есть, взятыми у того же субъекта, которого лечат) или аллогенными (то есть, взятыми у другого субъекта/донора). После трансдукции клеток с использованием AAV и после подтверждения экспрессии трансгена клетки вводили субъекту с использованием стандартных клинических методов.

Клетки можно вводить субъекту однократно или введение можно повторять многократно. Число введенных клеток варьирует в зависимости, например, от заболевания или состояния, которое лечат, тяжести заболевания/состояния субъекта и роста и массы тела субъекта.

ПРИМЕР 7: Геннотерапевтический способ лечения субъекта, нуждающегося в этом

Описанные здесь AAV-векторы (например, AAV-вектор, содержащий субъединицу капсидного белка, имеющую последовательность SEQ ID NO: 175 или 180) вводят субъекту, нуждающемуся в этом, где субъект имеет заболевание или расстройство ЦНС. AAV-вектор вводят субъекту однократно или введение можно повторять многократно. Введение можно проводить одним или более чем одним путем, таким как внутривенная (IV), интрацеребровентрикулярная (ICV) или интратекальная (IT) инъекция. Доза AAV-вектора варьирует в зависимости, например, от заболевания или состояния, которое лечат, тяжести заболевания/состояния субъекта и роста и массы тела субъекта. Например, доза AAV, вводимого субъекту, может составлять $2,8 \times 10^{13}$ вг/кг или $2,9 \times 10^{13}$ вг/кг при введении AAV-вектора путем IV-инъекции. При введении AAV-вектора путем ICV-инъекции доза может составлять $2,1 \times 10^{13}$ вг или $3,0 \times 10^{13}$ вг.

Согласно некоторым протоколам AAV-вектор можно вводить субъекту как IV-инъекцией, так и ICV-инъекцией.

ПРИМЕР 8: Получение рекомбинантного AAV-вектора в клетках млекопитающих

Предложено три плазмиды. Первая плазида содержит кассету для переноса, содержащую трансген (SEQ ID NO: 3002), кодирующий NPC1, фланкированный двумя ITR (SEQ ID NO: 3003 и 3004). Первая плазида содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3014-3019. Вторая плазида содержит последовательности, кодирующие гены Rep и Cap. Третья плазида содержит различные “хелперные” последовательности, необходимые для продукции AAV (E4, E2a и VA).

Этими тремя плазмидами трансфицировали клетки-продуценты вируса (например, HEK293) с использованием подходящего реагента для трансфекции (например, Lipofectamine™). После инкубации при 37°C в течение заранее установленного периода времени AAV-частицы собирали из среды или клетки лизировали для высвобождения AAV-частиц. Затем AAV-частицы очищали и титровали с использованием либо количественной ПЦР (qPCR), либо цифровой капельной ПЦР (ddPCR) в соответствии со стандартными способами. AAV-частицы можно хранить при -80°C для дальнейшего использования.

ПРИМЕР 9: Получение рекомбинантного AAV-вектора в клетках насекомых

Предложен первый рекомбинантный бакуловирусный вектор. Первый рекомбинантный бакуловирусный вектор содержит последовательность кассеты для переноса, содержащую трансген (SEQ ID NO: 3002), кодирующий NPC1, фланкированный двумя ITR (SEQ ID NO: 3003 и 3004). Кассета для переноса содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3014-3019.

Проводили коинфицирование клеток насекомых (например, Sf9) в суспензионной культуре первым рекомбинантным бакуловирусным вектором и по меньшей мере одним дополнительным рекомбинантным бакуловирусным вектором, содержащим последовательности, кодирующие белки Rep и Cap AAV (например, субъединицу капсидного белка STRD.101 или STRD.012). После инкубации при 28°C в течение заранее установленного времени AAV-частицы собирали из среды или клетки лизировали для высвобождения AAV-частиц. Затем AAV-частицы очищали и титровали с использованием либо количественной ПЦР (qPCR), либо цифровой

капельной ПЦР (ddPCR) в соответствии со стандартными способами. AAV-частицы можно хранить при -80°C для дальнейшего использования.

ПРИМЕР 10: Исследование эффективности *in vitro*

Для определения способности описанных здесь кассет для переноса на основе AAV восстанавливать лизосомальный фенотип NPC1 в культивируемых клетках был получен рекомбинантный вектор AAV2, упаковывающий кассету для переноса hNPC1 (SEQ ID NO: 3014) в клетках HEK293 с использованием протокола тройной трансфекции (см., например, Пример 1). Затем вектор AAV2-hNPC1 использовали для трансдукции клеток U2OS дикого типа (остеосаркомы) и клеток U2OS, которые не экспрессируют NPC1 (NPC1^{-/-}) *in vitro* с множественностью заражения (MOI) либо 5×10^3 (5K), либо 10×10^3 (10K). Затем клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 .

Клетки NPC1 проявляют характерное накопление холестерина в лизосомах, что можно контролировать путем наблюдения за размером и числом лизосом в клетке. В этом исследовании лизосомальный фенотип контролировали путем измерения накопления флуоресцентного красителя органелл, LysoTracker[®] (ThermoFisher Scientific[®]), в клетках. Через 72 часа после трансдукции вектором AAV2-hNPC1 к клеткам добавляли 50 мМ LysoTracker[®]. Через 2 часа клетки фиксировали и измеряли флуоресценцию LysoTracker[®].

Результаты представлены на **Фиг. 10А**. Как ожидалось, клетки U2OS дикого типа не демонстрировали существенного накопления флуоресценции LysoTracker[®] в лизосомах, в то время как клетки NPC1^{-/-} демонстрировали такое накопление. Клетки, трансдуцированные AAV2-hNPC1 с MOI либо 5K, либо 10K, демонстрировали существенное уменьшение накопления флуоресценции LysoTracker[®] в лизосомах.

В отдельном исследовании клетки, трансдуцированные hNPC1, фиксировали и окрашивали филипином, представляющим собой гистохимический краситель на холестерин. Краситель филипин, выделенный из *Streptomyces filipinensis*, приобретали от Polysciences и использовали в конечной концентрации 50 мкг/мл. Клетки визуализировали с помощью Pico Automated Cell Imaging System (ImageXpress[®]) и количественно оценивали окраску филипином. Результаты представлены на **Фиг. 10Б**. Как и ожидалось, клетки U2OS дикого типа не демонстрировали существенного накопления холестерина, в то время как клетки NPC1^{-/-} демонстрировали такое накопление. Клетки, трансдуцированные AAV2-hNPC1 с MOI либо 5K, либо 10K, демонстрировали существенное уменьшение накопления холестерина.

Взятые вместе эти данные показывают, что трансдукция клеток с использованием AAV2-hNPC успешно восстанавливала лизосомальный фенотип в дефицитных по NPC1 клетках U2OS.

ПРИМЕР 11: Исследование эффективности *in vivo*

Для определения способности описанных здесь кассет для переноса на основе AAV восстанавливать фенотип NPC1 *in vivo*, был получен рекомбинантный вектор AAV9, упаковывающий кассету для переноса hNPC1 (SEQ ID NO: 3014), в клетках HEK293 с использованием протокола тройной трансфекции (см., например, Пример 1). Мышам, дефицитным по NPC1 (то есть, мышам NPC1^{-/-}), в возрасте примерно 24-28 суток внутривенно вводили солевой раствор или вектор AAV9-hNPC1 в дозе $3,0 \times 10^{14}$ векторных геномов на килограмм (вг/кг) путем ретро-орбитальной инъекции. Результаты представлены на **Фиг. 11**. Все мыши, получавшие солевой раствор, умерли к возрасту примерно 80 суток. Однако, все животные, получавшие инъекции AAV9-hNPC1, выжили во время этого эксперимента. Мышей, инъецированных AAV9-hNPC1, умерщвляли в возрасте примерно 100 суток для анализа.

Также мышей подвергали тесту прогулки по балансиру (balance beam walking test), где измеряли число соскальзываний по мере прохождения мыши по балансиру. Этот тест проводили в возрасте примерно 8 недель (56 суток). Как показано на **Фиг. 13**, мыши дикого типа не соскальзывали с балансира. Несмотря на отсутствие статистически значимого различия в числе соскальзываний между мышами NPC1^{-/-}, получавшими AAV9-hNPC1, и мышами NPC1^{-/-}, получавшими солевой раствор, среднее число соскальзываний, наблюдаемых в группе AAV9-hNPC1, было меньше.

Баллы поведенческого фенотипа мышей также оценивали в возрасте примерно 10 недель (70 суток). Балл поведенческого фенотипа представляет собой суммарный балл измерения симптомов различных заболеваний, включая нарушение груминга, походки, кифоз, тест на бортике (ledge test), зажим задних конечностей и тремор (см. Alam et al, Sci Transl Med, 2016; Guyenet et al, J Vis Exp, 2010). Как показано на **Фиг. 12**, мыши NPC1^{-/-}, получавшие AAV9-hNPC1, имели существенно более низкий коэффициент по сравнению с мышами NPC1^{-/-}, получавшими солевой раствор.

Взятые вместе эти данные показывают, что AAV9-hNPC1 может по меньшей мере частично уменьшать фенотипические проявления заболевания у мышей, дефицитных по NPC1.

ПРИМЕР 12: Тестирование вектора STRD.101, упаковывающего кассету, кодирующую NPC1 *in vitro* и *in vivo*

Вектор AAV-STRD.101, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую кассету для переноса, кодирующую NPC1 человека (например, кассету для переноса SEQ ID NO: 14) получали согласно способу из Примера 8 или 9. Этот вектор здесь обозначен как AAV-STRD.101-hNPC1.

Затем для определения способности вектора AAV-STRD.101 восстанавливать лизосомальный фенотип NPC1 в культивируемых клетках вектор AAV-STRD.101-hNPC1 использовали для трансдукции клеток U2OS дикого типа (остеосаркома) и клеток U2OS, которые не экспрессируют NPC1 (NPC1^{-/-}) *in vitro*, с множественностью заражения (MOI) либо 5×10^3 (5K), либо 10×10^3 (10K). Затем клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Клетки NPC1 проявляют характерное накопление холестерина в лизосомах, которое можно контролировать путем наблюдения размера и числа лизосом в клетке. Соответственно, лизосомальный фенотип контролируют путем измерения накопления флуоресцентного раствора для органелл, LysoTracker[®] (ThermoFisher Scientific[®]), в клетках. Через 72 часа после трансдукции вектором AAV2-hNPC1 50 мМ LysoTracker[®] добавляли к клеткам. Через 2 часа клетки фиксировали и измеряли флуоресценцию LysoTracker[®].

В отдельном исследовании клетки, трансдуцированные вектором AAV-STRD.101-hNPC1, фиксировали и окрашивали с использованием филипина, гистохимического красителя на холестерин. Краситель филипин, полученный из *Streptomyces filipinensis*, использовали в конечной концентрации 50 мкг/мл. Клетки визуализировали с использованием Pico Automated Cell Imaging System (ImageXpress[®]) и количественно оценивали окраску филипином.

Вектор AAV-STRD.101-hNPC1 также тестировали для определения его способности восстанавливать фенотип NPC1 *in vivo*. Мышам в возрасте примерно 24-28 суток, дефицитным по NPC1 (то есть, мышам NPC1^{-/-}), внутривенно путем ретро-орбитальной инъекции вводили либо солевой раствор, либо вектор AAV9-hNPC1 в дозе $3,0 \times 10^{14}$ вг/кг. Выживаемость контролировали до возраста по меньшей мере 100 суток.

Также мышей подвергали тесту прогулки по балансиру (balance beam walking test), где измеряли число соскальзываний по мере прохождения мыши по балансиру. Этот тест проводили в возрасте примерно 8 недель (56 суток).

Баллы поведенческого фенотипа мышей также оценивали в возрасте примерно 10 недель (70 суток). Балл поведенческого фенотипа представляет собой суммарный балл измерения симптомов различных заболеваний, включая нарушение груминга, походки, кифоз, тест на бортике (ledge test), зажим задних конечностей и тремор (см. Alam et al, Sci Transl Med, 2016; Guyenet et al, J Vis Exp, 2010).

Вышеприведенное описание служит исключительно для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначено ограничивать его каким-либо образом. Изобретение определено прилагаемой формулой изобретения с эквивалентами пунктов, включенными в данное описание.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВОПЛОЩЕНИЯ

Независимо от прилагаемой формулы изобретения следующие пронумерованные воплощения также являются частью настоящего раскрытия.

1. Вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса, содержащий: (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180 или 175; и (2) нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид; где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса; где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансгенную последовательность, кодирующую белок NPC1; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR.

2. AAV-вектор согласно воплощению 1, где длина по меньшей мере одного из 5'-ITR и 3'-ITR составляет от примерно 110 до примерно 160 нуклеотидов.

3. AAV-вектор согласно воплощению 1 или 2, где 5'-ITR имеет такую же длину как 3'-ITR.

4. AAV-вектор согласно воплощению 1 или 2, где 5'-ITR и 3'-ITR имеют разную длину.

5. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-4, где по меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR выделен или имеет происхождение из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV или бычьего AAV.

6. AAV-вектор согласно воплощению 1, где 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3003.

7. AAV-вектор согласно воплощению 1, где 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3004.

8. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-7, где промотор представляет собой конститутивный промотор.

9. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-7, где промотор представляет собой индуцибельный промотор.

10. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-9, где промотор представляет собой тканеспецифичный промотор.

11. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-7, где промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379, промотора HSVTK, промотора CMV, раннего промотора SV40, позднего промотора SV40, промотора металлотионеина, промотора вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотора саркомы Рауса (RSV), промотора полиэдрина, промотора β -актина кур (CBA), альфа-промотора EF-1, промотора дигидрофолатредуктазы (DHFR) и промотора фосфоглицераткиназы (PGK).

12. AAV-вектор согласно воплощению 11, где промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379 и промотора HSVTK.

13. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-7, где промотор содержит последовательность по меньшей мере на 95% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 3005, SEQ ID NO: 3006, SEQ ID NO: 3007 или SEQ ID NO: 3008.

14. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-13, где белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека.

15. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-13, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

16. AAV-вектор согласно воплощению 15, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

17. AAV-вектор согласно воплощению 16, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 98% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

18. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-13, где белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3001.

19. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-13, где трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 3002.

20. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-18, где сигнал полиаденилирования выбран из обезьяньего вируса 40 (SV40), rBG, α -глобина, β -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) и бычьего гормона роста (bGH).

21. AAV-вектор согласно воплощению 20, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40.

22. AAV-вектор согласно воплощению 20, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования rBG.

23. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-19, где сигнал полиаденилирования содержит последовательность по меньшей мере на 95% или 100% идентичную SEQ ID NO: 3012 или SEQ ID NO: 3013.

24. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-23, где кассета дополнительно содержит энхансер.

25. AAV-вектор согласно воплощению 24, где энхансер представляет собой энхансер CMV.

26. AAV-вектор согласно воплощению 24, где энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 3009 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3009.

27. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-26, где кассета дополнительно содержит интронную последовательность.

28. AAV-вектор согласно воплощению 27, где интронная последовательность представляет собой химерную последовательность.

29. AAV-вектор согласно воплощению 27, где интронная последовательность представляет собой гибридную последовательность.

30. AAV-вектор согласно воплощению 27, где интронная последовательность содержит последовательность, выделенную или имеющую происхождение из SV40.

31. AAV-вектор согласно воплощению 27, где интронная последовательность содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3010-3011.

32. AAV-вектор согласно воплощению 1, где AAV-кассета для переноса содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3014-3019.

33. Вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса, содержащий: (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180 или 175, или последовательность, содержащую от примерно 1 до примерно 25 аминокислотных мутаций относительно SEQ ID NO: 180 или 175; и (2) кассету для переноса, инкапсидированную в белковый капсид; где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансгенную последовательность, кодирующую белок NPC1; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR.

34. Композиция, содержащая AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-33.

35. Композиция согласно воплощению 34, где композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

36. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества AAV-вектора согласно любому из воплощений 1-33 или композиции согласно любому из воплощений 34-35.

37. Способ согласно воплощению 36, где субъект имеет болезнь Ниманна-Пика типа C.

38. Способ согласно воплощению 36 или 37, где субъект представляет собой субъекта-человека.

39. Вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса, содержащий: (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180 или 175; и (2) кассету для переноса, инкапсидированную в белковый капсид; где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансгенную последовательность, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3002; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR.

40. Вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса, содержащий: (1) белковый капсид, содержащий капсидный белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 180 или 175; и (2) нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид; где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса; где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансгенную последовательность, кодирующую белок NPC1, где

белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3001; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR.

41. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-33, 39 и 40, где AAV-вектор селективно доставляет кассету для переноса в клетку или ткань центральной нервной системы.

42. AAV-вектор согласно воплощению 41, где ткань центральной нервной системы представляет собой премоторную кору, таламус, кору мозжечка, зубчатое ядро мозжечка, спинной мозг или ганглий задних корешков.

43. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-33, 39 и 40, где AAV-вектор доставляет кассету для переноса в мозг, но не доставляет AAV-вектор в сердце.

44. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-33, 39 и 40, где AAV-вектор доставляет кассету для переноса в мозг и в сердце.

45. AAV-вектор согласно воплощению 44, где доставка кассеты для переноса происходит в большей степени в мозг, чем в сердце.

46. AAV-вектор согласно воплощению 44, где доставка кассеты для переноса происходит примерно в одинаковой степени в мозг и в сердце.

47. Клетка, содержащая AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-33 и 39-46.

48. Способ введения кассеты для переноса в клетку *in vitro*, включающий приведение клетки в контакт с AAV-вектором согласно любому из воплощений 1-33 и 39-46.

49. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-33 и 39-46 для применения в качестве лекарственного средства.

50. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-33 и 39-46 для применения в способе лечения или предупреждения болезни Ниманна-Пика типа C у субъекта, нуждающегося в этом.

51. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-33 и 39-46, где субъединица капсидного белка содержит последовательность SEQ ID NO: 180.

52. AAV-вектор согласно любому из воплощений 1-33 и 39-46, где субъединица капсидного белка содержит последовательность SEQ ID NO: 175.

53. Кассета для переноса на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);

промотор; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где трансген кодирует белок NPC1.

54. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 53, где длина по меньшей мере одного из 5'-ITR и 3'-ITR составляет от примерно 110 до примерно 160 нуклеотидов.

55. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 53 или 54, где 5'-ITR имеет такую же длину как 3'-ITR.

56. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 53 или 54, где 5'-ITR и 3'-ITR имеют разную длину.

57. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-56, где по меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR выделен или имеет происхождение из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV или бычьего AAV.

58. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 53, где 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3003.

59. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 53, где 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3004.

60. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-59, где промотор представляет собой конститутивный промотор.

61. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-59, где промотор представляет собой индуцибельный промотор.

62. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-59, где промотор представляет собой тканеспецифичный промотор.

63. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-59, где промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379, промотора HSVTK, промотора CMV, раннего промотора SV40, позднего промотора SV40, промотора металлотинеина, промотора вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV), промотора полиэдрина, промотора β -актина кур (CBA), альфа-промотора EF-1, промотора дигидрофолатредуктазы (DHFR) и промотора фосфоглицераткиназы (PGK).

64. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 63, где промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379 и промотора HSVTK.

65. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-59, где промотор содержит последовательность по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 3005, SEQ ID NO: 3006, SEQ ID NO: 3007 или SEQ ID NO: 3008.

66. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-65, где белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека.

67. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-65, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

68. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 67, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

69. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 68, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 98% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

70. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-65, где белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3001.

71. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-65, где трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 3002.

72. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-71, где сигнал полиаденилирования выбран из сигнала полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (SV40), rBG, α -глобина, β -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) и бычьего гормона роста (bGH).

73. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 72, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40.

74. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 72, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования rBG.

75. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-71, где сигнал полиаденилирования содержит последовательность по меньшей мере на 95% или 100% идентичную SEQ ID NO: 3012 или SEQ ID NO: 3013.

76. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-75, где кассета дополнительно содержит энхансер.

77. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 76, где энхансер представляет собой энхансер CMV.

78. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 76, где энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 3009 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3009.

79. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-78, где кассета дополнительно содержит интронную последовательность.

80. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 79, где интронная последовательность представляет собой химерную последовательность.

81. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 79, где интронная последовательность представляет собой гибридную последовательность.

82. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 79, где интронная последовательность содержит последовательности, выделенную или имеющую происхождение из SV40.

83. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 79, где интронная последовательность содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 3010-3011.

84. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 53, где AAV-кассета для переноса содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 3014-3019.

85. Плазмида, содержащая кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-84.

86. Клетка, содержащая кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-84 или плазмиду согласно воплощению 85.

87. Способ получения рекомбинантного AAV-вектора, включающий приведение в контакт AAV-продуцирующей клетки с кассетой для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-84 или плазмидой согласно воплощению 85.

88. Рекомбинантный AAV-вектор, полученный способом согласно воплощению 87.

89. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 88, где вектор принадлежит серотипу, выбранному из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV и бычьего AAV.

90. Композиция, содержащая кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-84, плазмиду согласно воплощению 85, клетку согласно воплощению 86 или рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 88 или 89.

91. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества кассеты для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 53-84, плазмиды согласно воплощению 85, клетки согласно воплощению 86 или рекомбинантного AAV-вектора согласно воплощению 88 или 89.

92. Способ согласно воплощению 91, где субъект страдает от болезни NPC1.

93. Способ согласно воплощению 91 или 92, где субъект представляет собой субъекта-человека.

94. Вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса, содержащий: (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180; и (2) нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид; где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса; где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR.

95. Вектор на основе аденоассоциированного (AAV) вируса, содержащий: (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180 или последовательность, содержащую от примерно 1 до примерно 25 аминокислотных мутаций относительно SEQ ID NO: 180; и (2) нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид; где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса; где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR.

96. AAV-вектор согласно воплощению 94 или 95, где кассета для переноса содержит интронную последовательность.

97. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-96, где интронная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

98. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-97, где 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3003.

99. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-98, где 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3004.

100. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-99, где промотор представляет собой промотор CBA.

101. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-99, где промотор содержит последовательность SEQ ID NO: 3005.

102. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-101, где белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека.

103. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-101, где белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3001.

104. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-101, где трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 3002.

105. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-104, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40.

106. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-104, где сигнал полиаденилирования содержит последовательность SEQ ID NO: 3012.

107. AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-106, где кассета содержит энхансер.

108. AAV-вектор согласно воплощению 94, где кассета для переноса на основе AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 3014.

109. AAV-вектор согласно воплощению 94, где кассета для переноса на основе AAV содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 3015-3019.

110. Композиция, содержащая AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-109.

111. Клетка, содержащая AAV-вектор согласно любому из воплощений 94-109.

112. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества AAV-вектора согласно любому из воплощений 94-109, композиции согласно воплощению 110 или клетки согласно воплощению 111.

113. Способ согласно воплощению 112, где субъект имеет болезнь Ниманна-Пика типа C.

114. Способ согласно воплощению 112 или 113, где субъект представляет собой субъекта-человека.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий:
 - (1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180; и
 - (2) нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид;
где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса;
где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3':
5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
промотор;
трансен, кодирующий белок NPC1;
сигнал полиаденилирования; и
3'-ITR.
2. AAV-вектор по п. 1, где кассета для переноса содержит интронную последовательность.
3. AAV-вектор по п. 2, где интронная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 10.
4. AAV-вектор по п. 1, где 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3003.
5. AAV-вектор по п. 1, где 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3004.
6. AAV-вектор по п. 1, где промотор представляет собой промотор β -актина кур (CBA).
7. AAV-вектор по п. 1, где промотор содержит последовательность SEQ ID NO: 3005.
8. AAV-вектор по п. 1, где белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека.
9. AAV-вектор по п. 1, где белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 3001.
10. AAV-вектор по п. 1, где трансен содержит последовательность SEQ ID NO: 3002.
11. AAV-вектор по п. 1, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (SV40).

12. AAV-вектор по п. 1, где сигнал полиаденилирования содержит последовательность SEQ ID NO: 3012.

13. AAV-вектор по п. 1, где кассета содержит энхансер.

14. AAV-вектор по п. 1, где кассета для переноса на основе AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 3014.

15. AAV-вектор по п. 1, где кассета для переноса на основе AAV содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 3015-3019.

16. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий:

(1) белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, содержащую последовательность SEQ ID NO: 180, или последовательность, содержащую от примерно 1 до примерно 25 аминокислотных мутаций относительно SEQ ID NO: 180; и

(2) нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид;

где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса;

где кассета для переноса содержит в направлении от 5' к 3':

5'-инвертированный концевой повтор (ITR);

промотор;

транскрипционный белок NPC1;

сигнал полиаденилирования; и

3'-ITR.

17. Композиция, содержащая AAV-вектор по любому из п.п. 1-16.

18. Клетка, содержащая AAV-вектор по любому из п.п. 1-16.

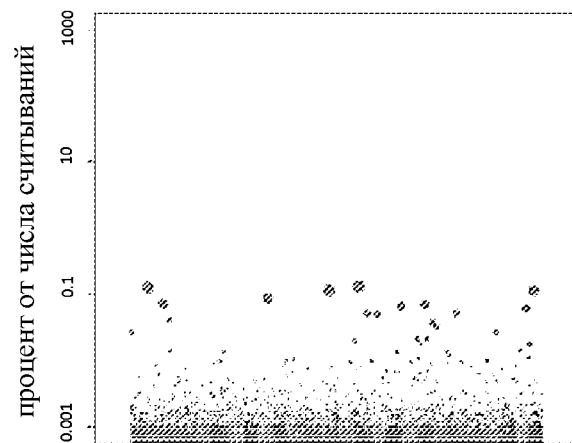
19. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества AAV-вектора по любому из п.п. 1-16, композиции по п. 17 или клетки по п. 18.

20. Способ по п. 19, где субъект имеет болезнь Ниманна-Пика типа C.

21. Способ по п. 19 или 20, где субъект является субъектом-человеком.

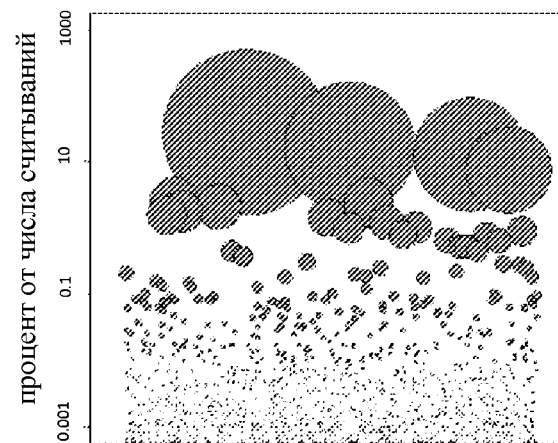
Фиг. 1А

Раунд 1 Ввод,
(Пред-эволюция)



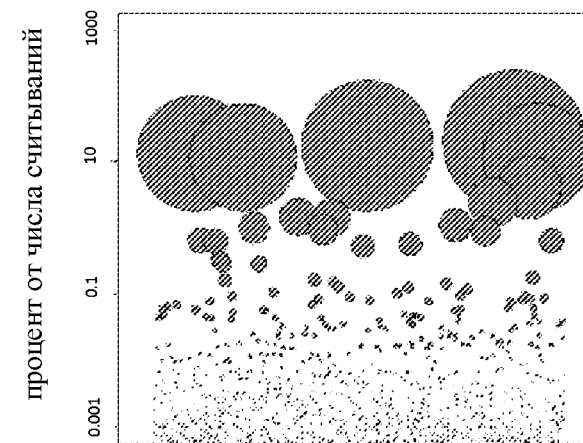
Фиг. 1Б

Раунд 1 Выход,
Раунд 2 Ввод

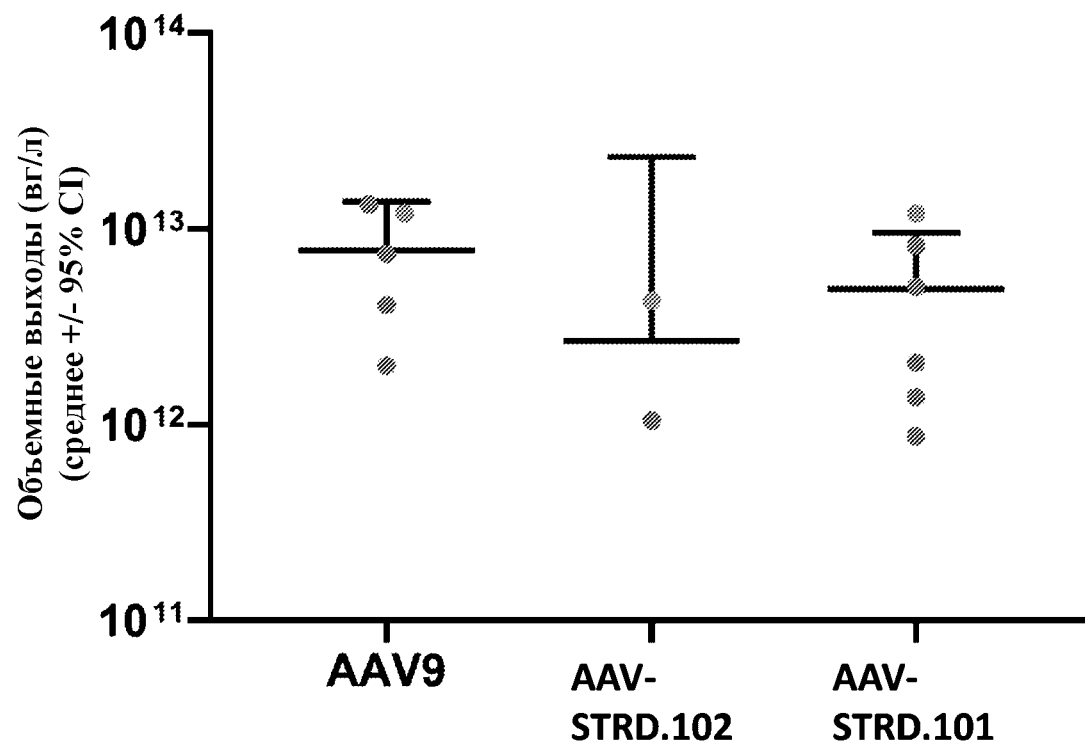


Фиг. 1В

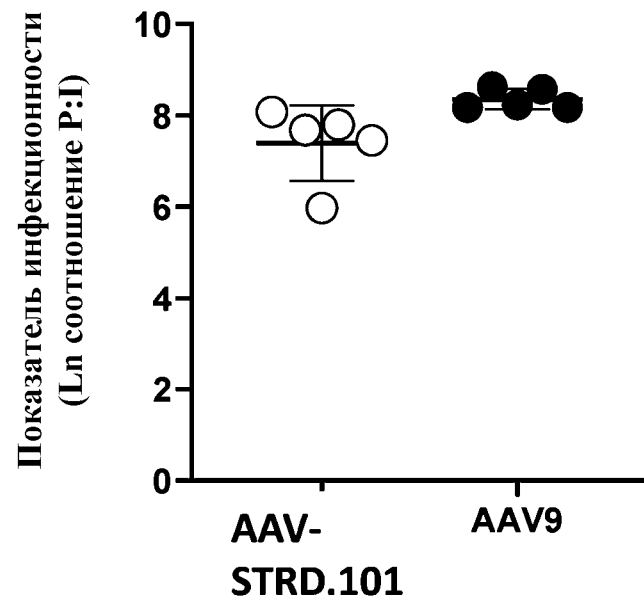
Раунд 2 Выход



96,5% уменьшение
уникальных клонов

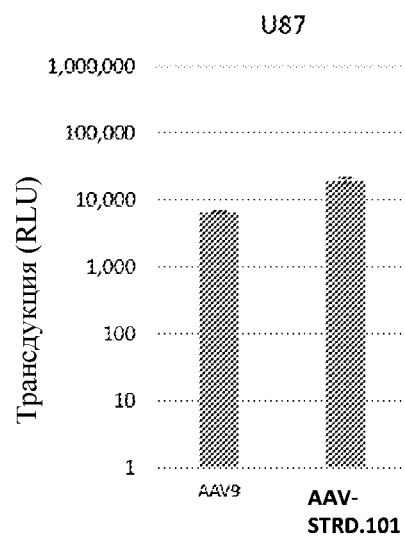


Фиг. 2

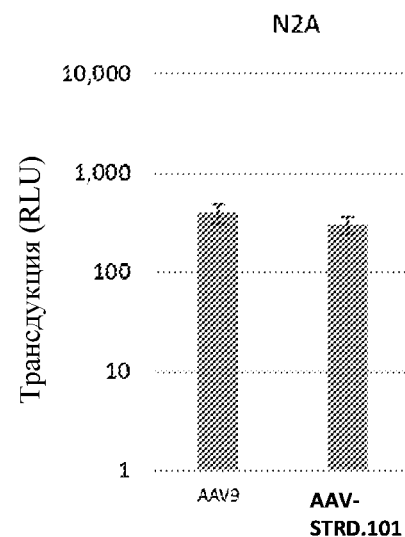


Фиг. 3

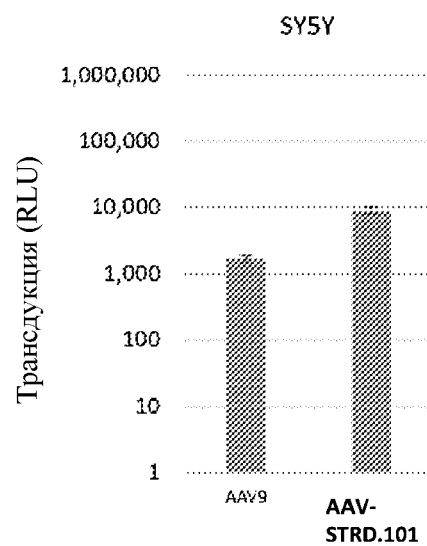
Фиг. 4А



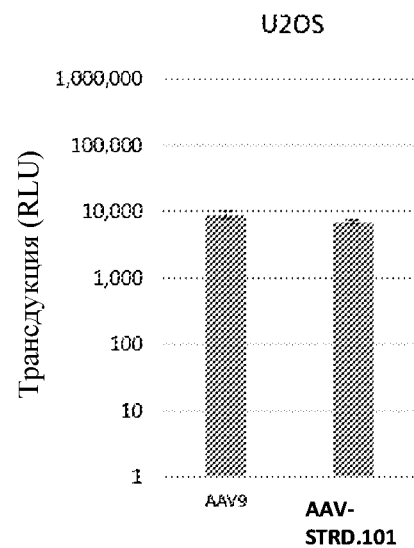
Фиг. 4В

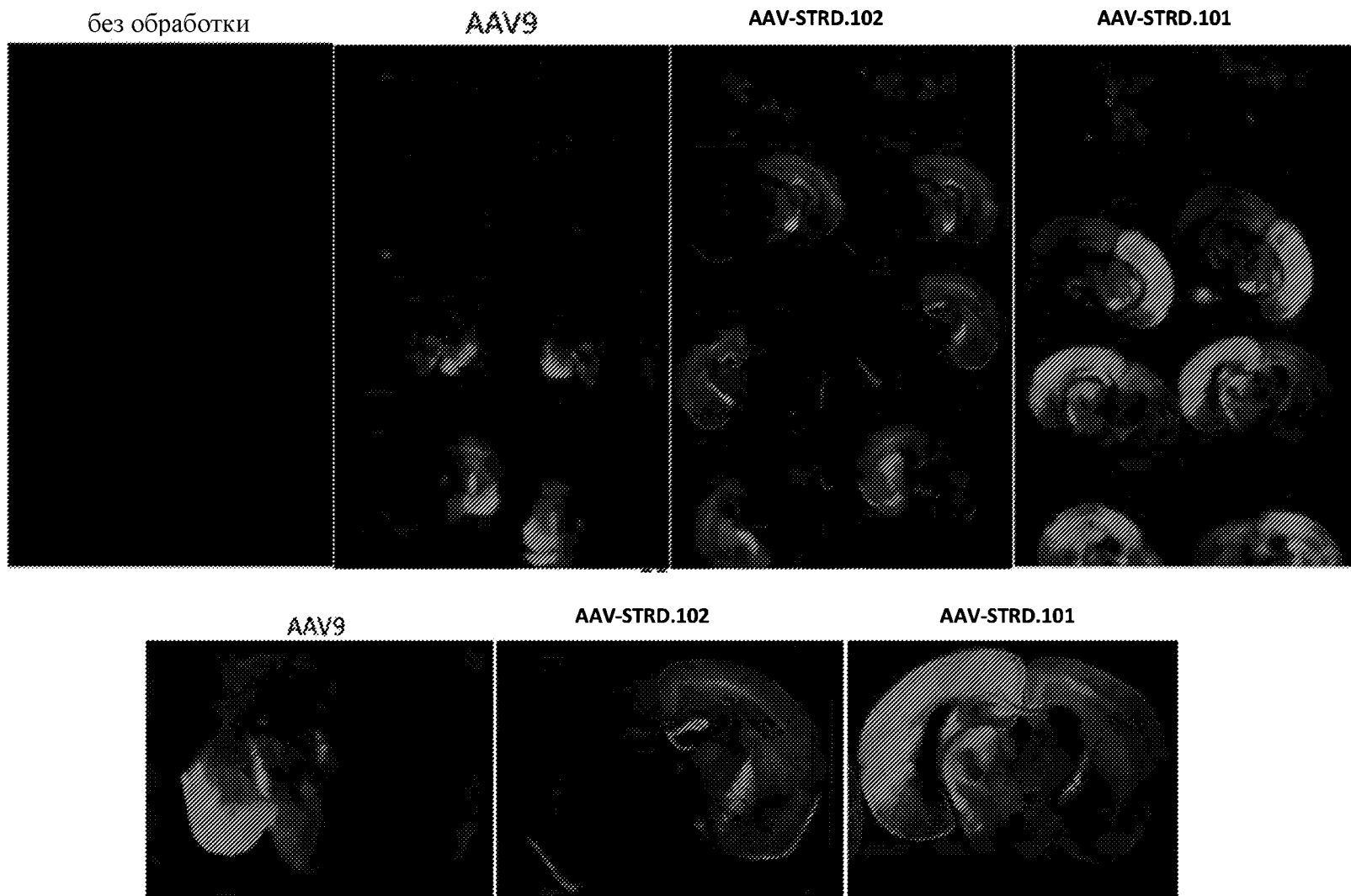


Фиг. 4Б

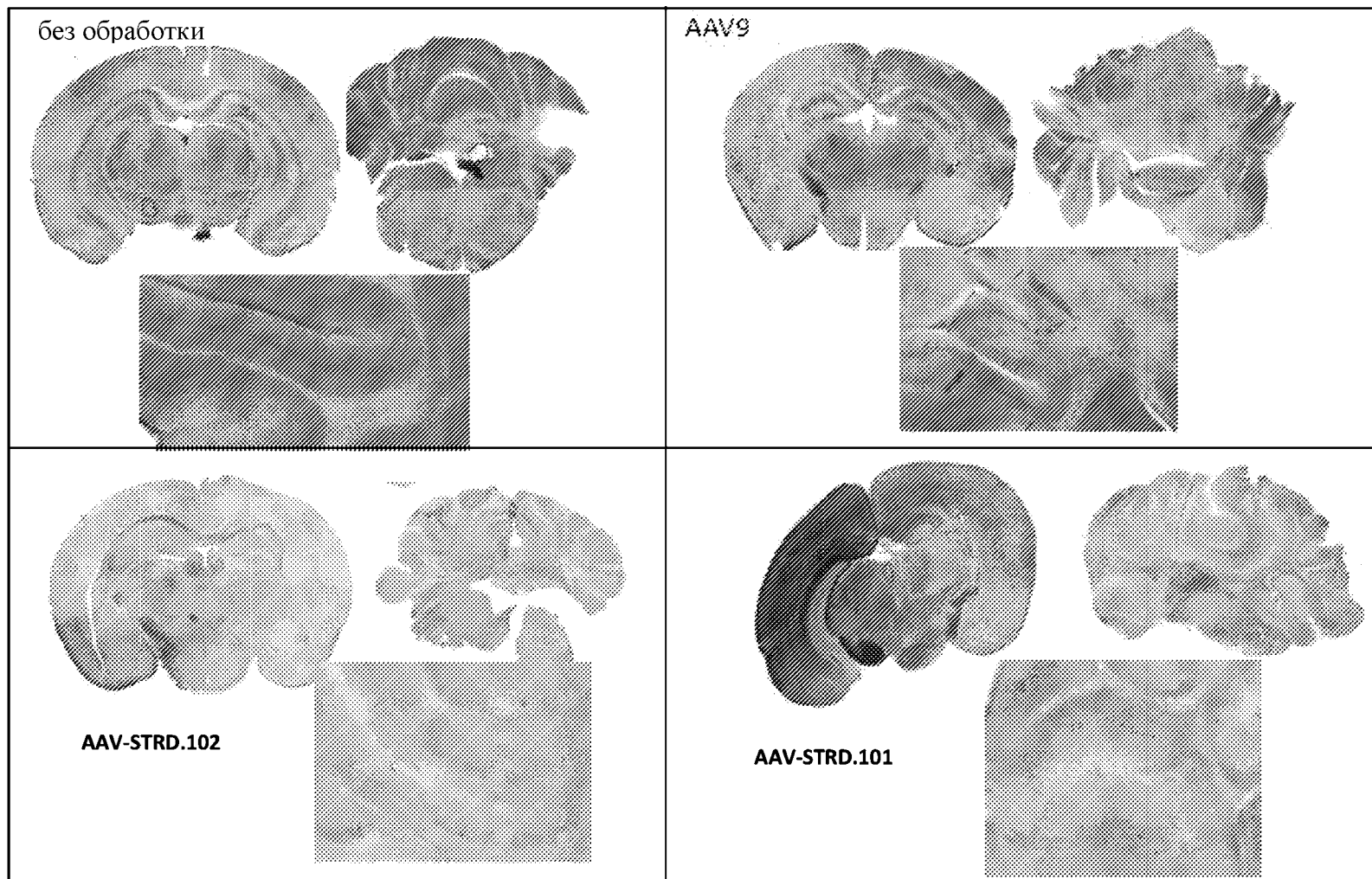


Фиг. 4Г

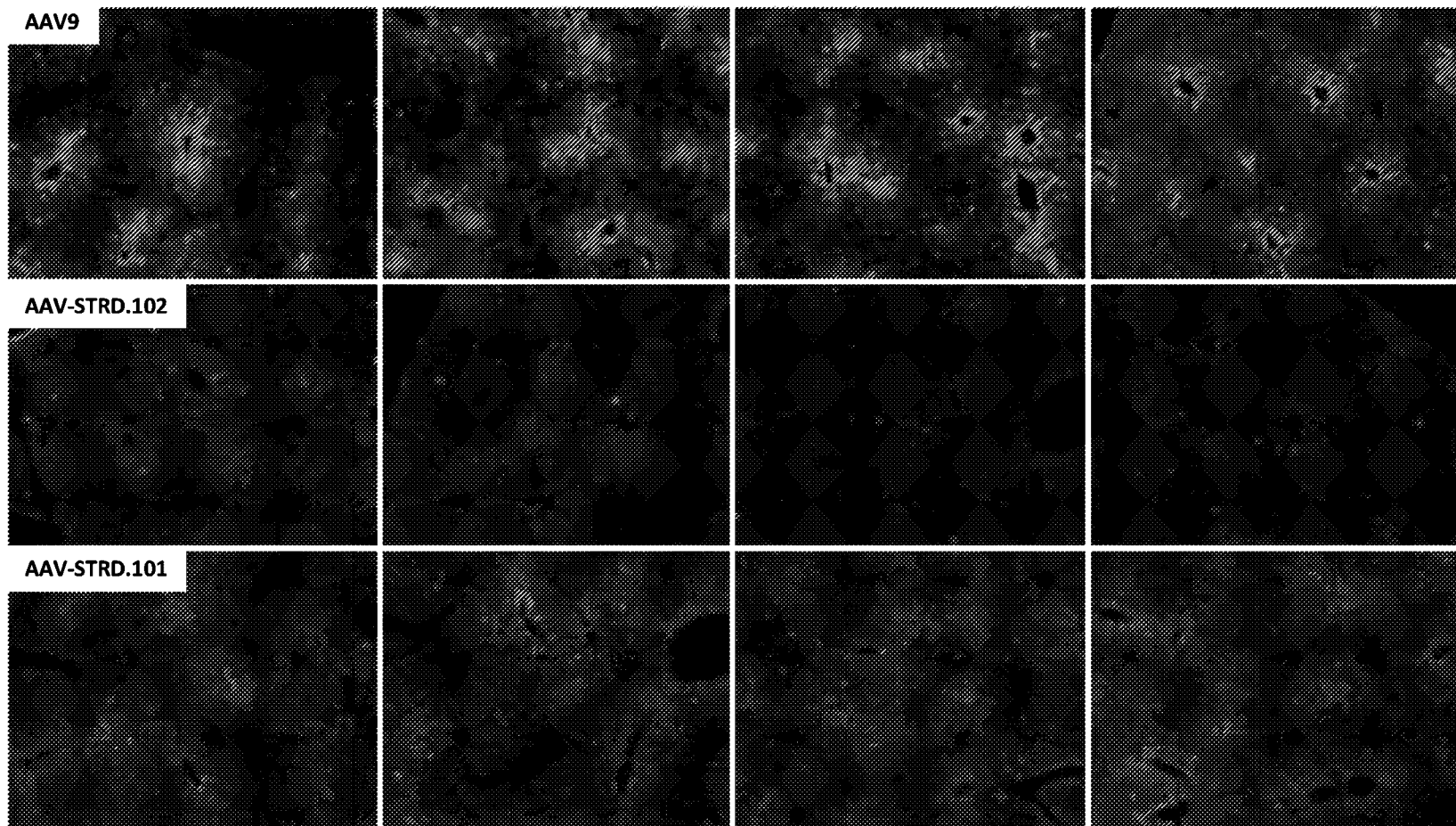




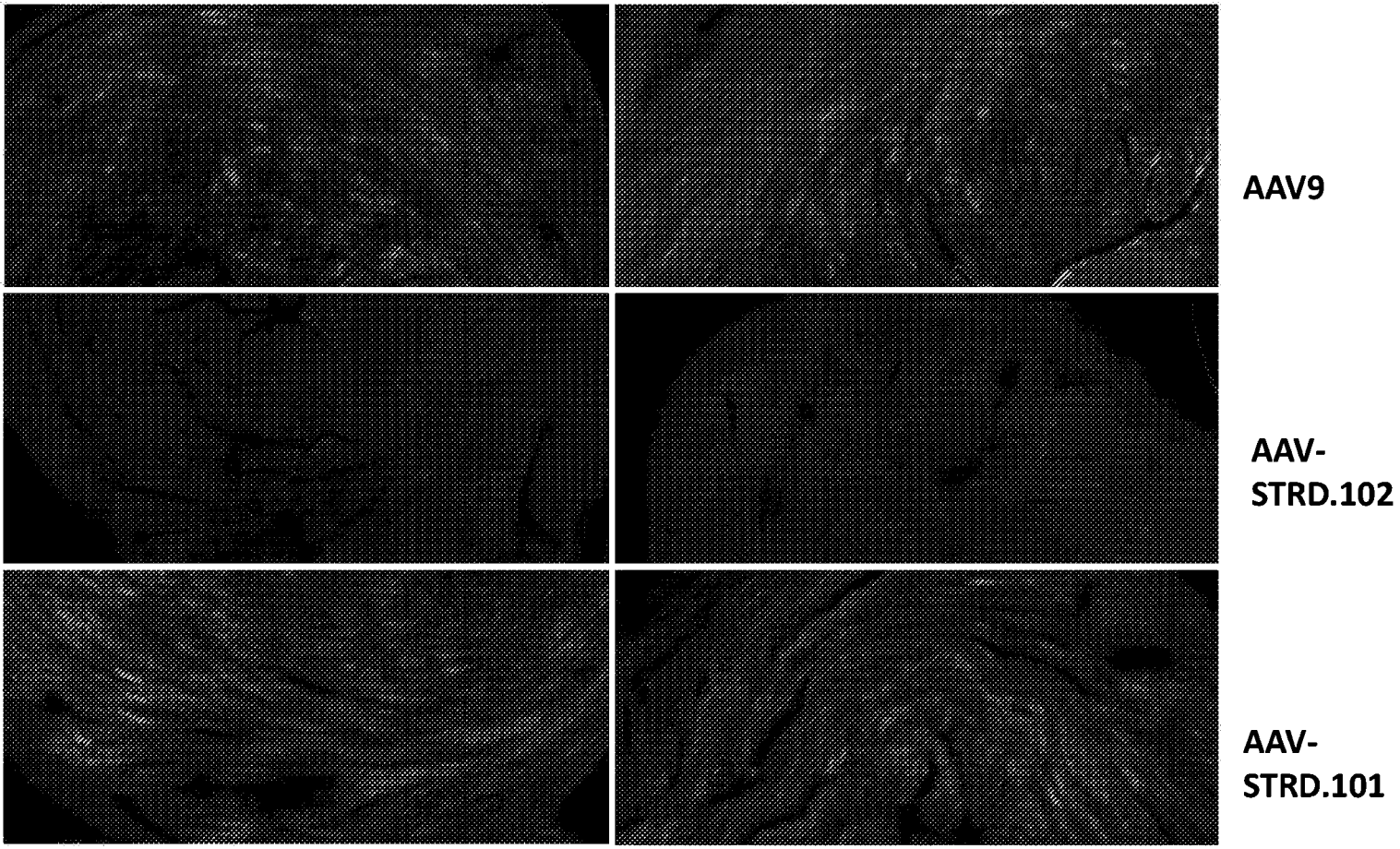
Фиг. 5



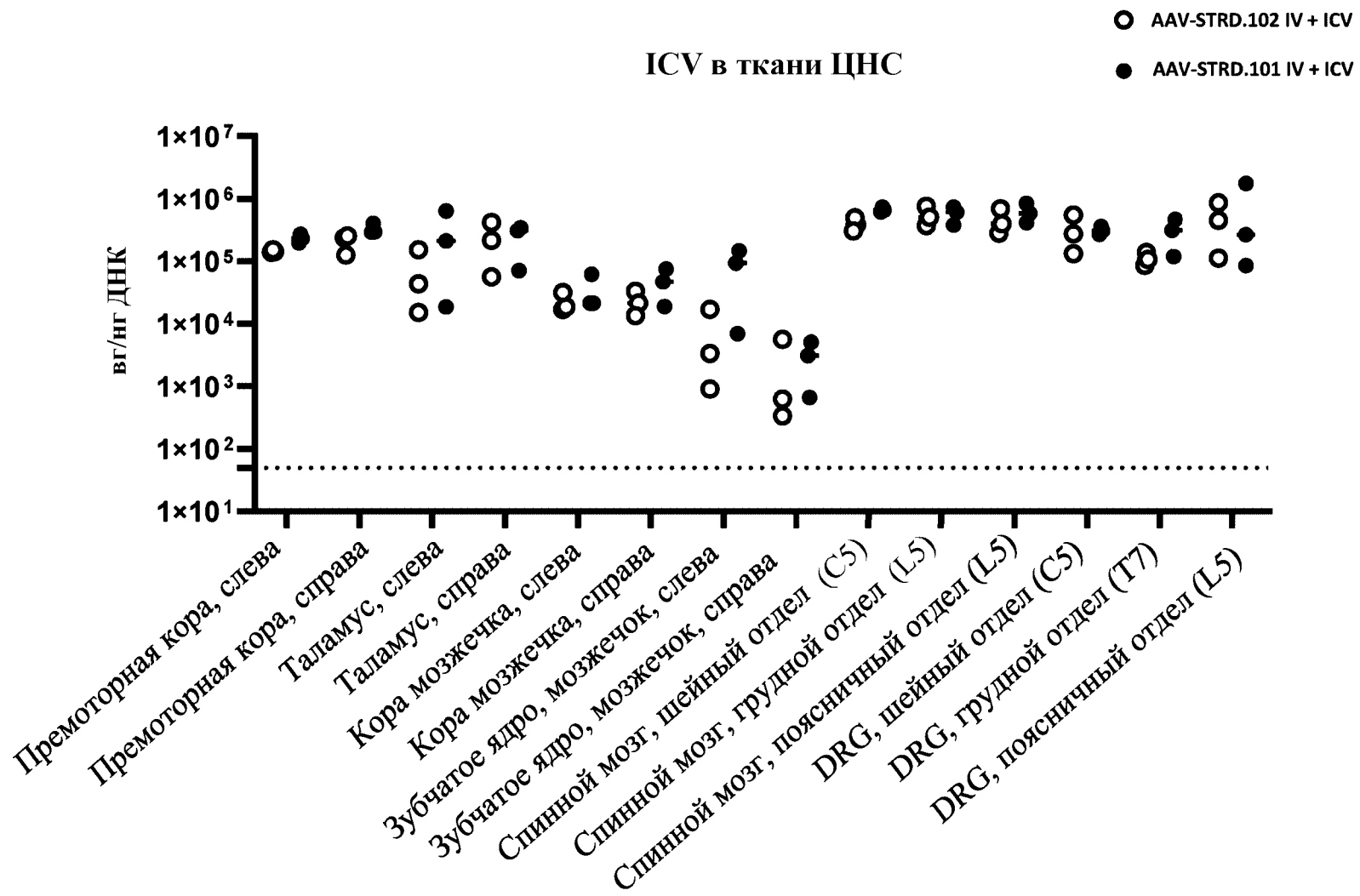
Фиг. 6



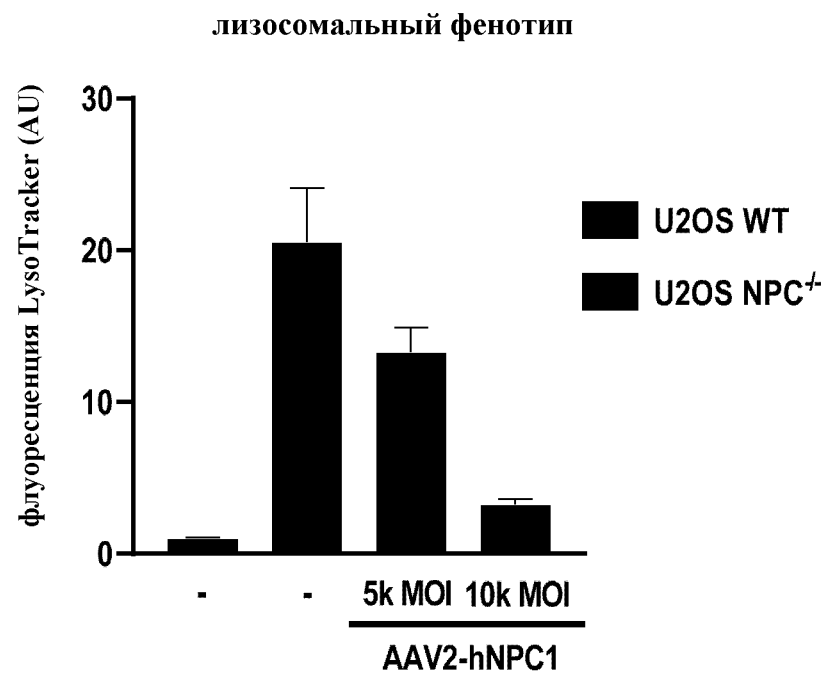
Фиг. 7



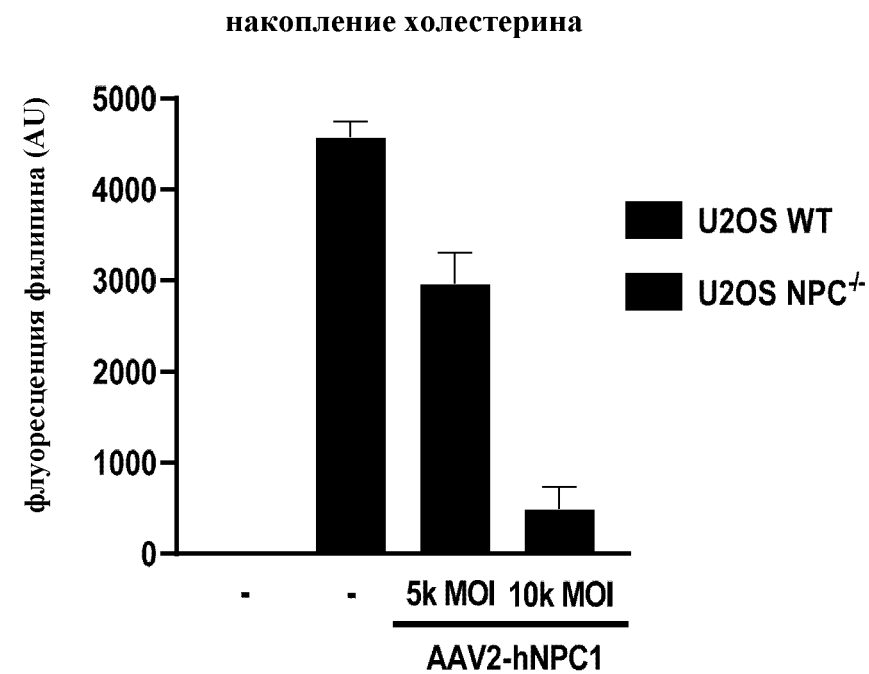
Фиг. 8



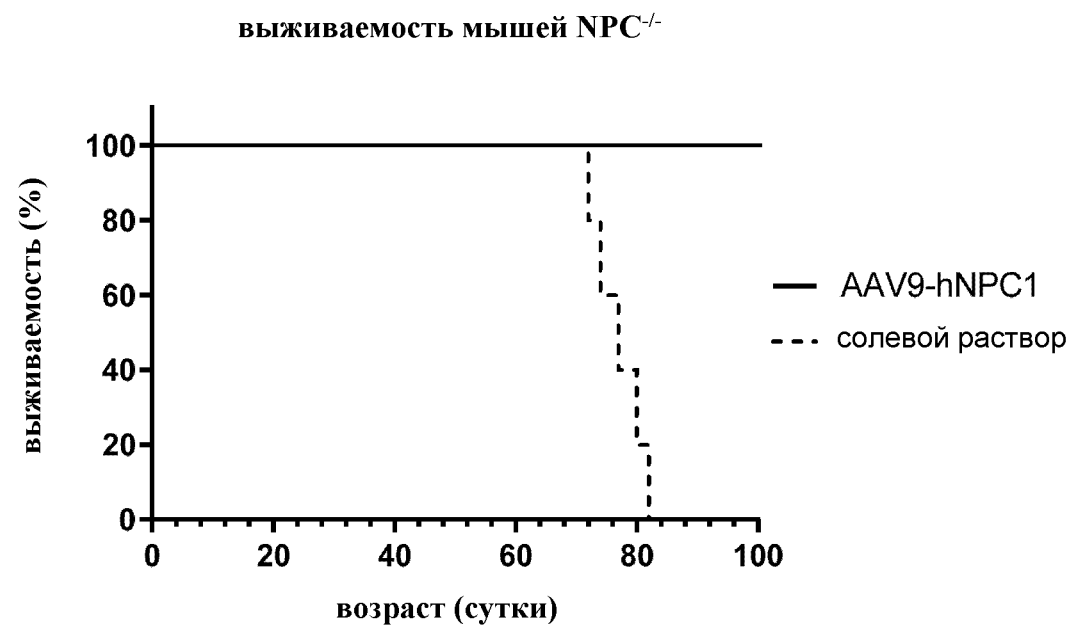
Фиг. 9



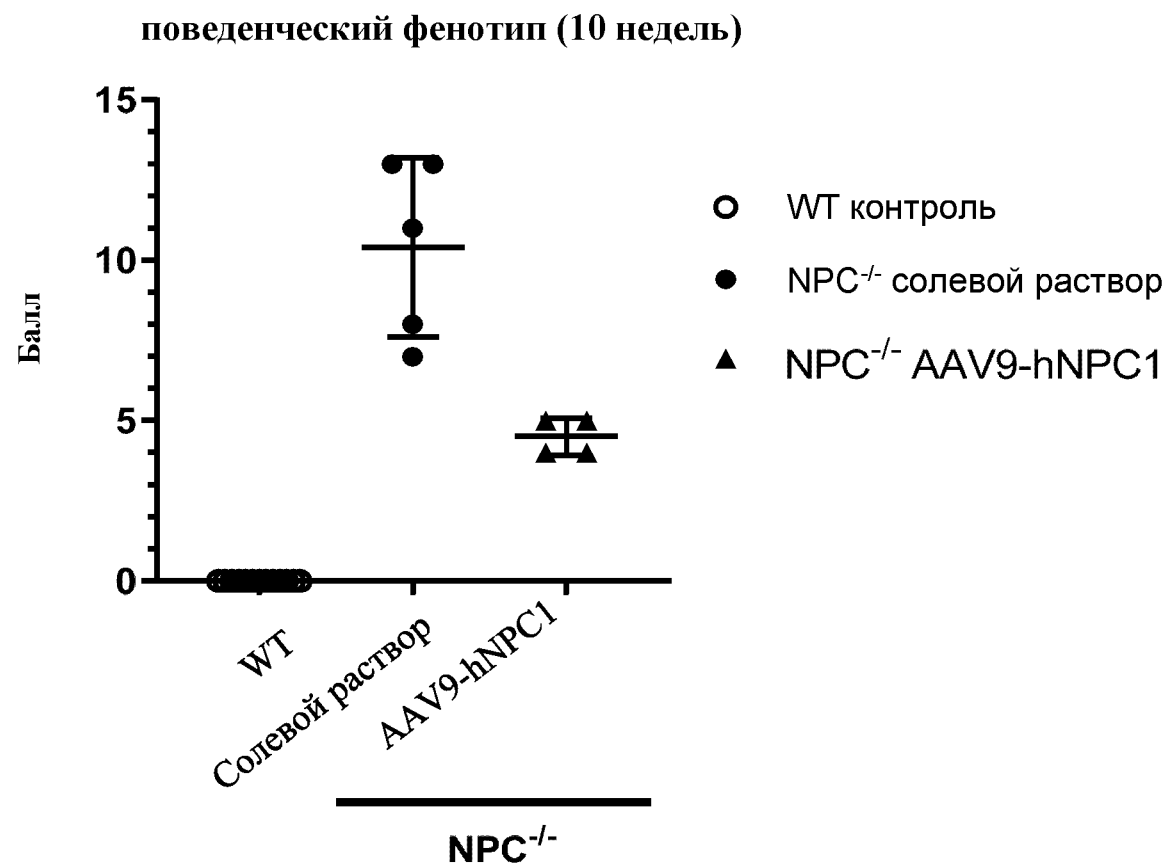
Фиг. 10А



Фиг. 10Б



Фиг. 11



Фиг. 12

