

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042452**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.02.15**

**(21)** Номер заявки  
**201990792**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.10.13**

**(51)** Int. Cl. **C12N 9/22** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

**(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ МЕГАНУКЛЕАЗЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ РАСПОЗНАВАНИЯ В ГЕНОМЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В**

**(31)** 62/408,356; 62/452,506; 62/527,159;  
62/527,196

**(32)** 2016.10.14; 2017.01.31; 2017.06.30;  
2017.06.30

**(33)** US

**(43)** 2019.11.29

**(86)** PCT/US2017/056638

**(87)** WO 2018/071849 2018.04.19

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ПРЕСИЖН БИОСАЙЕНСЕС, ИНК.**  
**(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Янтц Дерек, Смит Джеймс**  
**Джефферсон (US)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** WO-A2-2010136841

SU-RU LIN ET AL: "The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo", MOLECULAR THERAPY - NUCLEIC ACIDS, vol. 3, no. 8, 19 August 2014 (2014-08-19), page e186, XP055155697, ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1038/mtna.2014.38 abstract figure 1; table 1

KRISTIE BLOOM ET AL: "Inactivation of Hepatitis B Virus Replication in Cultured Cells and In Vivo with Engineered Transcription Activator-Like Effector Nucleases", MOLECULAR THERAPY, vol. 21, no. 10, 25 July 2013 (2013-07-25), pages 1889-1897, XP055155712, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2013.170 the whole document

NICHOLAS D. WEBER ET AL: "AAV-Mediated Delivery of Zinc Finger Nucleases Targeting Hepatitis B Virus Inhibits Active Replication", PLOS ONE, vol. 9, no. 5, 14 May 2014 (2014-05-14), page e97579, XP055155850, DOI: 10.1371/journal.pone.0097579 the whole document

**(57)** В объем настоящего изобретения входят сконструированные мегануклеазы, которые распознают и расщепляют последовательность распознавания внутри открытой рамки считывания (ОРС) генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В (ВГВ). В объем настоящего изобретения также входят способы применения таких сконструированных мегануклеаз в фармацевтической композиции и способы лечения или уменьшения симптомов инфекции ВГВ или лечения гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Кроме того, в объем настоящего изобретения входят фармацевтические композиции, содержащие белки сконструированных мегануклеаз, нуклеиновые кислоты, кодирующие сконструированные мегануклеазы, и применение таких композиций для лечения инфекции ВГВ или ГЦК.

**B1****042452****042452****B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к области онкологии, молекулярной биологии и технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот. В частности, в настоящем изобретении предложены сконструированные мегануклеазы, специфичные к последовательности распознавания в по меньшей мере двух генотипах генома вируса гепатита В. Такие сконструированные мегануклеазы полезны в способах лечения инфекции вирусом гепатита В и гепатоцеллюлярной карциномы, вызванной вирусом гепатита В.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в виде текстового файла через efs-web.

Данная заявка включает перечень последовательностей, который был подан в формате ASCII через EFS-Web и настоящим полностью включен посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 13 октября 2017 г., названа P109070018WO00-SEQ-MJT.txt, и ее размер составляет 169011 байт.

### Уровень техники

Вирус гепатита В (ВГВ) представляет собой основную проблему со здоровьем по всему миру, и более чем 350 миллионов людей являются хроническими носителями. Инфекция ВГВ представляет собой серьезную и распространенную инфекционную болезнь печени. Хроническая инфекция связана с повышенным риском развития тяжелой болезни печени, включая цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) - одну из наиболее распространенных форм рака человека. Оценочный риск ГЦК у хронических носителей ВГВ приблизительно в 100 раз выше, чем у неинфицированных индивидов. Приблизительно треть мировой популяции была инфицирована в какой-либо момент жизни, включая от 240 миллионов до 350 миллионов субъектов с хроническими инфекциями. Более 750000 людей ежегодно умирает от гепатита В. Приблизительно 300000 из них - от рака печени. У доступных на сегодняшний день лекарственных средств от ВГВ есть ограничения. Например, введение интерферона альфа связано с тяжелыми нежелательными реакциями. Аналоги нуклеозидов представляют собой вирусостатики и требуют длительного введения. Уровень генетической вариабельности генома ВГВ оценивают как  $1,4 - 3,2 \times 10^{-5}$  нуклеотидных замен на сайт в год. Большое количество вариантов вируса возникает в процессе репликации в результате ошибок включения нуклеотидов в отсутствие у вирусной полимеразы какой-либо способности устранять ошибки. Такая вариабельность привела к хорошо известным подтипам вируса. ВГВ классифицировали на четко выраженные генотипы на основании межгрупповой дивергенции, составляющей 8% или более, в полноразмерной геномной последовательности, у каждой из которых отдельное географическое распределение. Например, генотип А широко распространен в Африке к югу от Сахары, Северной Европе и Западной Африке; генотипы В и С часто встречаются в Азии; генотип С, главным образом, наблюдают в Юго-Восточной Азии; генотип D преобладает в Африке, Европе, Средиземноморских странах и Индии; генотип G описан во Франции, Германии и Соединенных Штатах; и генотип H обычно встречается в Центральной и Южной Америке. О генотипе I недавно сообщили во Вьетнаме и Лаосе. Новый обнаруженный генотип ВГВ - генотип J - был обнаружен на Архипелаге Рюкю в Японии.

ВГВ представляет собой оболочечный ДНК-вирус, который относится к семейству *Hepadnaviridae*. Он содержит геном из небольшой частично двухцепочечной (ДЦ) расслабленной кольцевой ДНК (ркДНК), которая реплицируется путем обратной транскрипции РНК-посредника - прегеномной РНК (пгРНК). Кольцевой ДНК-геном ВГВ необычен, так как его ДНК не полностью двухцепочечная. Один конец полноразмерной цепи связан с ДНК-полимеразой вируса. Геном имеет длину приблизительно 3020 - 3320 нуклеотидов (для полноразмерной цепи) и 1700 - 2800 нуклеотидов (для короткой цепи). Анти-смысловая (некодирующая) цепь комплементарна вирусной мРНК.

Известно четыре гена, кодируемых указанным геномом, которые обозначают С, Х, Р и S. Коровый белок кодируется геном С (НВсAg), и его иницирующему кодону предшествует расположенный против хода транскрипции в той же рамке считывания иницирующий кодон AUG, с которого продуцируется прекоровый белок. НВсAg образуется при протеолитическом процессинге прекорового белка. ДНК-полимераза кодируется геном Р. Ген S кодирует поверхностный антиген (НВsAg). Ген НВsAg представляет собой одну длинную открытую рамку считывания, но содержит три "иницирующих" (ATG) кодона в одной рамке считывания, которые делят ген на три участка: пре-S1, пре-S2 и S. Вследствие наличия нескольких иницирующих кодонов продуцируются полипептиды трех различных размеров, которые называют большим (в порядке от поверхности к внутренней части: пре-S1/пре-S2/S), средним (пре-S2/S) и малым (S). Функция белка, кодируемого геном Х, до конца не ясна, но он связан с развитием рака печени. Он стимулирует гены, которые вызывают рост клеток, и инактивирует молекулы, регулирующие рост.

Вирусную ДНК обнаруживают в ядре вскоре после инфицирования клетки. Частично двухцепочечная ДНК становится полностью двухцепочечной путем застраивания (+) смысловой цепи и удаления молекулы белка из (-) смысловой цепи и короткой последовательности РНК из (+) смысловой цепи. Некодирующие основания удаляются с концов (-) смысловой цепи и концы снова соединяются. Жизненный цикл ВГВ начинается, когда вирус прикрепляется к клетке-хозяину и проникает внутрь. В недавних исследованиях продемонстрировали, что котранспортирующий таурохолат натрия полипептид (NTCP) представляет собой функциональный рецептор при инфицировании ВГВ. Расслабленная кольцевая ДНК вириона (ркДНК) доставляется в ядро, где она подвергается репарации с образованием ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК). Эписомная кзкДНК служит в качестве матрицы для транскрипции пре-

геномной РНК (пгРНК) и других мРНК вируса РНК-полимеразой II хозяина. Образовавшиеся транскрипты затем экспортируются в цитоплазму, где происходит трансляция вирусных белков. Обратная транскриптаза (ОТ) связывается с пгРНК и запускает сборку коровых белков в незрелые РНК-содержащие нуклеокапсиды. Незрелые нуклеокапсиды затем подвергаются процессу созревания, посредством чего пгРНК обратно транскрибируется с помощью ОТ с образованием зрелой ркДНК. Уникальной особенностью обратной транскрипции гепаднавируса является примированное ОТ инициирование синтеза минус-цепи ДНК, которое приводит к ковалентному связыванию ОТ с 5'-концом минус-цепи ДНК. Зрелые содержащие ркДНК нуклеокапсиды затем заключаются в оболочку из поверхностных белков вируса и секретируются в виде вирионов (путь секреции) или, в качестве альтернативы, возвращаются обратно в ядро, чтобы дополнительно амплифицировать пул кзкДНК (путь рециркуляции). Сохранение кзкДНК в гепатоцитах играет ключевую роль в персистенции вируса, реактивации репликации вируса после отмены противовирусной терапии и устойчивости к терапии.

Хоуминг-эндонуклеазы представляют собой группу встречающихся в природе нуклеаз, которые распознают сайты расщепления из 15 - 40 пар оснований, обычно встречающиеся в геномах растений и грибов. Они часто связаны с паразитными элементами ДНК, такими как интроны с автономным сплайсингом группы 1 и интеины. Они обычно вызывают гомологичную рекомбинацию или встраивание гена в определенные положения в геноме хозяина, создавая двухцепочечный разрыв в хромосоме, который привлекает клеточный аппарат репарации ДНК (Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38: 49-95). Хоуминг-эндонуклеазы часто группируют в четыре семейства: семейство LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2), семейство GIY-YIG, семейство His-Cys бокса и семейство HNH. Данные семейства отличаются структурными мотивами, которые влияют на каталитическую активность и распознавание последовательностей. Например, представители семейства LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2) отличаются тем, что содержат либо одну, либо две копии консервативного мотива LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2) (см. Chevalier и др. (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774). Хоуминг-эндонуклеазы LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2) с одной копией мотива LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2) образуют гомодимеры, тогда как представители с двумя копиями мотива LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2) находятся в виде мономеров. Способы получения хоуминг-эндонуклеаз известны в данной области.

I-CreI (SEQ ID NO: 1) является представителем семейства хоуминг-эндонуклеаз LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2), который распознает и разрезает последовательность распознавания из 22 пар оснований в хромосоме хлоропласта водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*. Использовали методики генетической селекции, чтобы изменить предпочтение сайта расщепления I-CreI дикого типа (Sussman и др. (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Chames и др. (2005), Nucleic Acids Res. 33: e178; Seligman и др. (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9, Amould и др. (2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58). Были описаны способы рационального дизайна моно-LAGLIDADG (SEQ ID NO: 2) хоуминг-эндонуклеаз, которые способны всеобъемлюще изменить конструкцию I-CreI и других хоуминг-эндонуклеаз для нацеливания на совершенно разные сайты ДНК, включая сайты в геномах млекопитающих, дрожжей, растений, бактерий и вирусов (WO 2007/047859).

Как было впервые описано в WO 2009/059195, I-CreI и ее сконструированные производные обычно димерны, но их можно соединить в один полипептид, применяя короткий пептидный линкер, который соединяет С-конец первой субъединицы с N-концом второй субъединицы (Li и др. (2009), Nucleic Acids Res. 37:1650-62; Grizot и др. (2009), Nucleic Acids Res. 37:5405-19). Таким образом, функциональную "одноцепочечную" мегануклеазу можно экспрессировать с одного транскрипта.

Предложили применение сконструированных мегануклеаз для лечения инфекций ВГВ. Например, в WO2010/136841 предложили применение сконструированных мегануклеаз для расщепления генома не встраивающихся в геном вирусов. Такие мегануклеазы включают варианты I-CreI. В заявке '841 описано множество распознаваемых мегануклеазой последовательностей из 22 пар оснований, присутствующих в геноме одного штамма ВГВ. Тем не менее, в заявке '841 не идентифицировали какую-либо последовательность распознавания, которая присутствует во множестве генотипов генома ВГВ.

#### **Краткое описание изобретения**

В настоящем изобретении предложена, отчасти, разработка сайт-специфических, редко режущих эндонуклеаз, которые сконструированы, чтобы распознавать последовательности ДНК внутри по меньшей мере одной открытой рамки считывания (ОРС) генома ВГВ и в по меньшей мере двух различных генотипах генома ВГВ. Авторы настоящего изобретения обнаружили специфичные последовательности распознавания, консервативные среди генотипов, на которые можно нацелить рекомбинантные мегануклеазы, чтобы инактивировать множество генотипов вируса. Настоящее изобретение совершенствует известный уровень техники в нескольких аспектах. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что последовательности распознавания можно обнаружить внутри ОРС нескольких генотипов генома ВГВ. Путем нацеливания на несколько генотипов вируса, можно получить одну фармацевтическую композицию, которую можно применять против различных генотипов, присутствующих в определенных районах мира. Таким образом, способы и композиции, описанные в данной заявке, полезны для лечения или уменьшения пролиферации ВГВ у инфицированных индивидов по всему миру. Подавление или удержание репликации ВГВ в печени приводит к улучшению патологии печени и снижению прогресси-

вания в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному. Соответственно, настоящее изобретение удовлетворяет потребность в данной области в дополнительных генотерапевтических подходах к лечению инфекций ВГВ. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гепатоцеллюлярной карциномы путем предоставления средств нацеливания встраивания путем гомологичной рекомбинации "гена самоубийства" в геном ВГВ в клетке ГЦК. Указанный ген самоубийства может кодировать токсин или проапоптотический белок, который непосредственно уничтожает раковую клетку, или антиген клеточной поверхности или антигенный полипептид МНС I класса, который направляет собственную иммунную систему субъекта на уничтожение раковой клетки. Согласно настоящему изобретению предложены сконструированные мегануклеазы, полезные для лечения инфекции вирусом гепатита В (ВГВ). Указанные сконструированные мегануклеазы согласно настоящему изобретению распознают и расщепляют последовательность распознавания внутри открытой рамки считывания (ОРС) генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В. Расщепление в такой последовательности распознавания сконструированной мегануклеазой, описанной в данной заявке, может нарушить экспрессию одного или более вирусных белков вследствие негомологичного соединения концов (НГСК) в сайте расщепления. НГСК может привести к вставкам, делециям или привести к сдвигу рамки считывания, что может препятствовать экспрессии гена. Соответственно, нарушая нормальную экспрессию гена, можно уменьшить или устранить инфекцию и пролиферацию ВГВ, в соответствии со способами, описанными в данной заявке. Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции и способы лечения ВГВ, в которых используют сконструированную мегануклеазу, специфичную к последовательностям распознавания, расположенным внутри ОРС генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены способы доставки сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, субъекту, инфицированному ВГВ, чтобы снизить уровень ВГВ и/или уменьшить симптомы, связанные с инфекцией ВГВ.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предложена сконструированная мегануклеаза, которая распознает и расщепляет последовательность распознавания внутри открытой рамки считывания (ОРС) генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В. Сконструированная мегануклеаза содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, при этом указанная первая субъединица связывается с первым распознаваемым полусайтом последовательности распознавания и содержит первый гипервариабельный (HVR1) участок, и при этом вторая субъединица связывается со вторым распознаваемым полусайтом последовательности распознавания и содержит второй гипервариабельный (HVR2) участок.

В некоторых вариантах реализации последовательность распознавания обнаруживают внутри ОРС по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 генотипов вируса гепатита В. В одном таком варианте реализации последовательность распознавания находится внутри ОРС генотипа А (SEQ ID NO: 3) вируса гепатита В. Такой вариант реализации включает изоляты генотипа А вируса гепатита В, которые отличаются от SEQ ID NO: 3, но содержат одну или более распознаваемых мегануклеазой последовательностей ВГВ, описанных в данной заявке. В дополнительных таких вариантах реализации последовательность распознавания находится внутри ОРС генотипа А и одного или более из генотипов В, С, D, E, F и G (последовательности SEQ ID NO: 4-9, соответственно). Такие варианты реализации включают изоляты генотипа А, В, С, D, E, F и G вируса гепатита В, которые отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 3-9, но содержат одну или более распознаваемых мегануклеазой последовательностей ВГВ, описанных в данной заявке. В некоторых вариантах реализации последовательность распознавания находится внутри по меньшей мере одной ОРС, кодирующей белок, выбранный из группы, состоящей из: белка полимеразы (Р), большого поверхностного белка (preS1/preS2/S), среднего поверхностного белка (preS2/S) и малого поверхностного белка (S). В некоторых вариантах реализации последовательность распознавания может включать SEQ ID NO: 10 (т.е. последовательность распознавания ВГВ 1-2), SEQ ID NO: 12 (т.е. последовательность распознавания ВГВ 5-6), SEQ ID NO: 14 (т.е. последовательность распознавания ВГВ 7-8) или SEQ ID NO: 16 (т.е. последовательность распознавания ВГВ 11-12).

В некоторых вариантах реализации, в которых последовательность распознавания включает SEQ ID NO: 10, участок HVR1 может включать последовательность аминокислот, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или более идентичную последовательности аминокислот, соответствующей остаткам 24-79 в последовательности SEQ ID NO: 18 или 19 или остаткам 215-270 в последовательности SEQ ID NO: 20 или 21. В некоторых таких вариантах реализации участок HVR1 может включать остатки, соответствующие остаткам 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 и 77 в последовательности SEQ ID NO: 18 или 19, или остатки, соответствующие остаткам 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 и 268 в последовательности SEQ ID NO: 20 или 21. В конкретных вариантах реализации участок HVR1 может включать остатки 24-79 в последовательности SEQ ID NO: 18 или 19 или остатки 215-270 в последовательности SEQ ID NO: 20 или 21.

В некоторых таких вариантах реализации, в которых последовательность распознавания включает SEQ ID NO: 10, участок HVR2 может включать последовательность аминокислот, по меньшей мере на

В некоторых таких вариантах реализации, в которых последовательность распознавания включает SEQ ID NO: 10, сконструированная мегануклеаза может содержать линкер, при этом указанный линкер ковалентно соединяет первую субъединицу и вторую субъединицу. В конкретных вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может включать последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 18-21. В других вариантах реализации, в которых последовательность распознавания включает SEQ ID NO: 12, участок HVR1 может включать последовательность аминокислот, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или более идентичную последовательности аминокислот, соответствующей остаткам 215-270 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24 или остаткам 24-79 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28. В некоторых таких вариантах реализации участок HVR1 может включать остатки, соответствующие остаткам 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266, и 268 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24, или остатки, соответствующие остаткам 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75, и 77 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28. В конкретных вариантах реализации участок HVR1 может включать остатки 215-270 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24 или остатки 24-79 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28.

В некоторых таких вариантах реализации, в которых последовательность распознавания включает SEQ ID NO: 12, участок HVR2 может включать последовательность аминокислот, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или более идентичную последовательности аминокислот, соответствующей остаткам 24-79 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24 или остаткам 215-270 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28. В некоторых таких вариантах реализации участок HVR2 может включать остатки, соответствующие остаткам 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 и 77 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24, или остатки, соответствующие остаткам 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 и 268 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28. В конкретных вариантах реализации участок HVR2 может включать остатки 24-79 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24 или остатки 215-270 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28.

В некоторых таких вариантах реализации, в которых последовательность распознавания включает SEQ ID NO: 12, первая субъединица может включать последовательность аминокислот, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или более идентичную остаткам 198-344 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24 или остаткам 7-153 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28, и вторая субъединица может включать последовательность аминокислот, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или более идентичную остаткам 7-153 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24 или остаткам 198-344 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28. В некоторых вариантах реализации первая субъединица может включать остатки 198-344 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24 или остатки 7-153 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28. Аналогичным образом, в некоторых вариантах реализации вторая субъединица может включать остатки 7-153 любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-24 или остатки 198-344 любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-28.

В некоторых таких вариантах реализации, в которых последовательность распознавания включает SEQ ID NO: 12, сконструированная мегануклеаза может содержать линкер, при этом указанный линкер ковалентно соединяет первую субъединицу и вторую субъединицу. В конкретных вариантах реализации



тельных вариантах реализации мРНК может представлять собой полицистронную мРНК, кодирующую одну или более сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке. В некоторых вариантах реализации полицистронная мРНК согласно настоящему изобретению может представлять собой, без ограничения, бицистронную мРНК, кодирующую две сконструированные мегануклеазы, описанные в данной заявке, трицистронную мРНК, кодирующую три сконструированные мегануклеазы, описанные в данной заявке, или тетрацистронную мРНК, кодирующую четыре сконструированные мегануклеазы, описанные в данной заявке. В таких вариантах реализации, в которых две или более сконструированных мегануклеаз кодируются полицистронной мРНК, каждая кодируемая сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ. Кроме того, в таких вариантах реализации полицистронная мРНК согласно настоящему изобретению может кодировать любую комбинацию сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке. В некотором варианте реализации полицистронная мРНК может кодировать мегануклеазу ВГВ 1-2, мегануклеазу ВГВ 5-6, мегануклеазу ВГВ 7-8 и мегануклеазу ВГВ 11-12. В другом конкретном варианте реализации полицистронная мРНК может представлять собой бицистронную мРНК, кодирующую мегануклеазу ВГВ 5-6 и мегануклеазу ВГВ 11-12. В дополнительных вариантах реализации полицистронная мРНК согласно настоящему изобретению может кодировать одну или более сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, и один или более дополнительных белков, которые вызывают терапевтически полезный эффект в инфицированной ВГВ клетке и/или у инфицированного ВГВ субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена конструкция рекомбинантной ДНК, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует любую сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации указанная конструкция рекомбинантной ДНК содержит кассету, содержащую промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК содержит две или более кассет, при этом каждая кассета включает промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, и при этом каждая сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, описанной в данной заявке. В конкретных вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК может содержать две кассеты, три кассеты, четыре кассеты или более кассет.

В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК содержит кассету, содержащую промотор и полицистронную последовательность нуклеиновой кислоты, при этом указанный промотор запускает экспрессию в целевой клетке полицистронной последовательности нуклеиновой кислоты с образованием полицистронной мРНК, описанной в данной заявке.

В некотором варианте реализации конструкция рекомбинантной ДНК кодирует вирусный вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. В таком варианте реализации указанный вирусный вектор может представлять собой вектор на основе ретровируса, лентивируса, аденовируса или аденоассоциированного вируса (AAB). В некотором варианте реализации вирусный вектор может представлять собой рекомбинантный AAB-вектор.

В некоторых вариантах реализации вирусный вектор содержит кассету, содержащую промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. В других вариантах реализации вирусный вектор содержит две или более кассет, при этом каждая кассета включает промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, и при этом каждая сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, описанной в данной заявке. В других вариантах реализации вирусный вектор содержит одну кассету, содержащую промотор и полицистронную последовательность нуклеиновой кислоты, при этом указанный промотор запускает экспрессию в целевой клетке полицистронной последовательности нуклеиновой кислоты с образованием полицистронной мРНК, описанной в данной заявке.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен вирусный вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует любую сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации указанный вирусный вектор может представлять собой вектор на основе ретровируса, лентивируса, аденовируса или аденоассоциированного вируса (AAB). В некотором варианте реализации вирусный вектор может представлять собой рекомбинантный AAB-вектор. В некоторых вариантах реализации вирусный вектор содержит кассету, содержащую промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. В других вариантах реализации вирусный вектор содержит две или более кассет, при этом каждая кассета включает промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, и при этом каждая сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, описанной в данной заявке. В дополнительных вариантах реализации вирусный вектор содержит одну кассету, содержащую промотор и полицистронную последовательность нуклеиновой кислоты, при

этом указанный промотор запускает экспрессию в целевой клетке полицистронной последовательности нуклеиновой кислоты с образованием полицистронной мРНК, описанной в данной заявке.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения субъекта с вирусом гепатита В (ВГВ) или страдающего гепатоцеллюлярной карциномой, вызванной ВГВ, указанная фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель и: (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке; или (б) белок сконструированной мегануклеазы, описанный в данной заявке; при этом сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к последовательностям распознавания внутри открытой рамки считывания (ОРС) генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В. В некоторых вариантах реализации последовательность распознавания находится внутри ОРС по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6 генотипов вируса гепатита В. В одном таком варианте реализации последовательность распознавания находится внутри ОРС генотипа А ВГВ (SEQ ID NO: 3), или его изолятов, которые содержат последовательность распознавания, и по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6 других генотипов ВГВ. В различных вариантах реализации дополнительные генотипы ВГВ могут включать генотип В, С, D, E, F и/или G (последовательности SEQ ID NO: 4-9, соответственно), или их изоляты, которые содержат одну или более последовательностей распознавания ВГВ, описанных в данной заявке. В некоторых вариантах реализации сконструированная мегануклеаза из фармацевтической композиции, или кодируемая последовательность нуклеиновой кислоты из фармацевтической композиции, обладает специфичностью к последовательностям распознавания внутри по меньшей мере одной ОРС, кодирующей белок, выбранный из группы, состоящей из: белка полимеразы (Р), большого поверхностного белка (preS1/preS2/S), среднего поверхностного белка (preS2/S) и малого поверхностного белка (S). В некоторых вариантах реализации последовательность распознавания может включать SEQ ID NO: 10, 12, 14 или 16. В одном варианте реализации последовательность нуклеиновой кислоты из фармацевтической композиции, кодирующая сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, может представлять собой мРНК, описанную в данной заявке. В некоторых таких вариантах реализации мРНК может представлять собой полицистронную мРНК, описанную в данной заявке, так что две или более сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, экспрессируются в целевой клетке *in vivo*.

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит конструкцию рекомбинантной ДНК, описанную в данной заявке, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. В некоторых таких вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК содержит кассету, содержащую промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению. В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК из фармацевтической композиции содержит две или более кассет, при этом каждая кассета включает промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, и при этом каждая сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, описанной в данной заявке. В конкретных вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК из фармацевтической композиции может содержать две кассеты, три кассеты, четыре кассеты или более кассет.

В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК из фармацевтической композиции содержит кассету, содержащую промотор и полицистронную последовательность нуклеиновой кислоты, при этом указанный промотор запускает экспрессию полицистронной последовательности нуклеиновой кислоты с образованием полицистронной мРНК, описанной в данной заявке, в целевой клетке *in vivo*, так что две или более сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, экспрессируются в целевой клетке.

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит вирусный вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. В одном таком варианте реализации указанный вирусный вектор может представлять собой ретровирус, лентивирус, аденовирус или ААВ. В некотором варианте реализации вирусный вектор может представлять собой рекомбинантный ААВ-вектор. В некоторых таких вариантах реализации вирусный вектор содержит кассету, содержащую промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. В других вариантах реализации вирусный вектор содержит две или более кассет, при этом каждая кассета включает промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, и при этом каждая сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, описанной в данной заявке. В других таких вариантах реализации вирусный вектор содержит одну кассету, содержащую промотор и полицистронную последовательность нуклеиновой кислоты, при этом указанный промотор запускает экспрессию полицистронной последовательности нуклеиновой кислоты с образованием полицистронной мРНК, описанной в данной заявке, в целевой клетке *in vivo*, так что две или более сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, экспрессируются в целевой клетке.

В одном таком варианте реализации фармацевтическая композиция может содержать сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке (или кодирующую ее нуклеиновую кислоту), которая распознает и расщепляет SEQ ID NO: 10. В конкретных вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может включать последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 18-21.

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция может содержать сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке (или кодирующую ее нуклеиновую кислоту), которая распознает и расщепляет SEQ ID NO: 12. В конкретных вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может включать последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-28.

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция может содержать сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке (или кодирующую ее нуклеиновую кислоту), которая распознает и расщепляет SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может включать последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 29-32.

В другом варианте реализации фармацевтическая композиция может содержать сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке (или кодирующую ее нуклеиновую кислоту), которая распознает и расщепляет SEQ ID NO: 16. В конкретных вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может включать последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 33-39.

В различных вариантах реализации фармацевтическая композиция может содержать два или более белков сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, при этом указанные сконструированные мегануклеазы обладают специфичностью к различным последовательностям распознавания ВГВ, описанным в данной заявке. В других вариантах реализации фармацевтическая композиция может содержать две или более нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные мегануклеазы, описанные в данной заявке, при этом указанные сконструированные мегануклеазы обладают специфичностью к различным последовательностям распознавания ВГВ, описанным в данной заявке. В таких вариантах реализации указанные две или более нуклеиновых кислот могут быть включены в мРНК, описанные в данной заявке, в конструкции рекомбинантных ДНК, описанные в данной заявке, и/или в вирусные векторы, описанные в данной заявке. В других вариантах реализации фармацевтическая композиция может содержать один или более белков сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, и одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке (т.е. мРНК, конструкцию рекомбинантной ДНК или вирусный вектор), при этом указанные сконструированные мегануклеазы и кодируемые сконструированные мегануклеазы обладают специфичностью к различным последовательностям распознавания ВГВ, описанным в данной заявке. В дополнительных вариантах реализации фармацевтическая композиция может содержать комбинацию белков сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, комбинацию нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные мегануклеазы, описанные в данной заявке (т.е. молекулы мРНК, конструкции рекомбинантных ДНК, вирусные векторы), или комбинацию белков сконструированных мегануклеаз и нуклеиновых кислот, кодирующих белки сконструированных мегануклеаз, при этом указанная комбинация сконструированных мегануклеаз и/или кодируемых сконструированных мегануклеаз в фармацевтической композиции может распознавать и расщеплять последовательность распознавания в каждом из генотипов ВГВ А, В, С, D, E, F и G (последовательности SEQ ID NO: 3-9), и изолятах каждого генотипа, которые содержат последовательности распознавания ВГВ, описанные в данной заявке.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция может содержать одну или более мРНК, описанных в данной заявке, инкапсулированных внутри липидных наночастиц. В конкретных вариантах реализации указанные липидные наночастицы из фармацевтической композиции могут содержать две или более мРНК, описанных в данной заявке, каждая из которых кодирует сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, обладающую специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, описанной в данной заявке. В конкретных вариантах реализации указанные липидные наночастицы могут содержать две, три или четыре мРНК, описанных в данной заявке, каждая из которых кодирует сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, обладающую специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ. В других вариантах реализации указанные липидные наночастицы из фармацевтической композиции могут содержать одну или более полицистронных мРНК, описанных в данной заявке, при этом каждая полицистронная мРНК кодирует две или более сконструированных мегануклеаз согласно настоящему изобретению, обладающих специфичностью к различным последовательностям распознавания ВГВ, описанным в данной заявке. В конкретных вариантах реализации указанные липидные наночастицы могут содержать полицистронную мРНК, кодирующую две, три или четыре сконструированные мегануклеазы, описанные в данной заявке. В других конкретных вариантах реализации указанные липидные наночастицы могут содержать две или более полицистронных мРНК, описанных в данной заявке, каждая из которых кодирует две или более сконструированных мегануклеаз согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации

у указанных липидных наночастиц такой состав, который повышает доставку и всасывание в печени, и, в частности, внутри гепатоцитов.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего ВГВ. Аналогичным образом, в настоящей заявке предложен способ уменьшения уровня и/или пролиферации ВГВ, или уменьшения симптомов, связанных с ВГВ. Указанные способы включают доставку в целевую клетку субъекта: (а) нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированную мегануклеазу, при этом сконструированная мегануклеаза экспрессируется в целевой клетке *in vivo*; или (b) белка сконструированной мегануклеазы; при этом сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к последовательностям распознавания в ОРС генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В, и где сконструированная мегануклеаза распознает и расщепляет последовательность распознавания, таким образом расщепляя геном ВГВ в целевой клетке. Указанный способ может уменьшить или устранить инфекцию и/или пролиферацию ВГВ у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего ГЦК, вызванной ВГВ. Указанные способы включают доставку в целевую клетку субъекта: (1) (а) нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированную мегануклеазу, при этом сконструированная мегануклеаза экспрессируется в целевой клетке *in vivo*; или (b) белка сконструированной мегануклеазы; и (2) нуклеиновой кислоты, включающей полинуклеотидную последовательность, кодирующую ген самоубийства, и последовательности, гомологичные последовательностям, фланкирующим сайт расщепления мегануклеазы; при этом сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к последовательностям распознавания в ОРС генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В, при этом сконструированная мегануклеаза распознает и расщепляет последовательность распознавания, таким образом расщепляя геном ВГВ в целевой клетке; при этом ген самоубийства встраивается в расщепленный геном ВГВ путем гомологичной рекомбинации; и при этом экспрессия гена самоубийства уничтожает целевую клетку.

В некоторых вариантах реализации ген самоубийства напрямую летален для целевой клетки. В некоторых таких вариантах реализации напрямую летальный ген самоубийства кодирует токсичный полипептид или проапоптотический белок. В некоторых вариантах реализации ген самоубийства опосредованно летален для целевой клетки и направляет собственную иммунную систему субъекта на уничтожение целевой клетки. В некоторых таких вариантах реализации опосредованно летальный ген самоубийства кодирует белок поверхности клетки, который распознается как чужеродный иммунной системой субъекта и становится мишенью гуморального или клеточного иммунного ответа. В других таких вариантах реализации опосредованно летальный ген самоубийства кодирует полипептид, который представляется молекулой МНС I класса, распознается как чужеродный иммунной системой субъекта и становится мишенью цитотоксического иммунного ответа.

В некоторых вариантах реализации способов лечения инфекции ВГВ или ГЦК, последовательность распознавания обнаруживают внутри ОРС по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6 генотипов вируса гепатита В. В одном таком варианте реализации последовательность распознавания находится внутри ОРС генотипа А (SEQ ID NO: 3) вируса гепатита В. Такой вариант реализации включает изоляты генотипа А вируса гепатита В, которые отличаются от SEQ ID NO: 3, но содержат одну или более распознаваемых мегануклеазой последовательностей ВГВ, описанных в данной заявке. В дополнительных таких вариантах реализации последовательность распознавания находится внутри ОРС генотипа А и одного или более из генотипов В, С, D, E, F и G (последовательности SEQ ID NO: 4-9, соответственно). Такие варианты реализации включают изоляты генотипа А, В, С, D, E, F и G вируса гепатита В, которые отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 3-9, но содержат одну или более распознаваемых мегануклеазой последовательностей ВГВ, описанных в данной заявке.

В таких вариантах реализации способов лечения инфекции ВГВ или ГЦК, последовательность распознавания может находиться внутри по меньшей мере одной ОРС, кодирующей белок, выбранный из группы, состоящей из: белка полимеразы (Р), большого поверхностного белка (preS1/preS2/S), среднего поверхностного белка (preS2/S) и малого поверхностного белка (S). В некоторых вариантах реализации последовательность распознавания может включать SEQ ID NO: 10 (т.е. последовательность распознавания ВГВ 1-2), SEQ ID NO: 12 (т.е. последовательность распознавания ВГВ 5-6), SEQ ID NO: 14 (т.е. последовательность распознавания ВГВ 7-8) или SEQ ID NO: 16 (т.е. последовательность распознавания ВГВ 11-12). В конкретных вариантах реализации способов лечения инфекции ВГВ или ГЦК, белок сконструированной мегануклеазы, или кодируемая сконструированная мегануклеаза, представляет собой сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке.

В дополнительных вариантах реализации способы лечения инфекции ВГВ или ГЦК включают введение указанному субъекту любой фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, описанной в данной заявке, которая содержит, по меньшей мере, фармацевтически приемлемый носитель и (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, при этом сконструированная мегануклеаза экспрессируется в целевой клетке *in vivo*; или (b) белок сконструированной мегануклеазы, описанный в данной заявке. В некоторых вариантах реализации способов лечения инфекции ВГВ или ГЦК, сконструированную мегануклеазу или нуклеиновую кислоту, коди-

рующую сконструированную мегануклеазу, можно доставить в целевой гепатоцит. В конкретных вариантах реализации эффективное количество сконструированной мегануклеазы или нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированную мегануклеазу, можно доставить в целевой гепатоцит.

В конкретных вариантах реализации доставка в гепатоцит происходит *ex vivo*, при этом субъекту вводят эффективное количество гепатоцитов, в которые доставили сконструированную мегануклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированную мегануклеазу.

В некоторых вариантах реализации гепатотоксический белок, или нуклеиновую кислоту или ААВ, кодирующий гепатотоксический белок, вводят вместе с фармацевтическими композициями, описанными в данной заявке.

В конкретных вариантах реализации указанных способов, первая последовательность распознавания может включать SEQ ID NO: 10. В некоторых таких вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может представлять собой любую сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, которая распознает и расщепляет SEQ ID NO: 10. В конкретных вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может включать последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 18-21.

В другом варианте реализации указанных способов, первая последовательность распознавания может включать SEQ ID NO: 12. В некоторых таких вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может представлять собой любую сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, которая распознает и расщепляет SEQ ID NO: 12. В конкретных вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может включать последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-28.

В других вариантах реализации указанных способов, первая последовательность распознавания может включать SEQ ID NO: 14. В некоторых таких вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может представлять собой любую сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, которая распознает и расщепляет SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может включать последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 29 - 32.

В других вариантах реализации указанных способов, первая последовательность распознавания может включать SEQ ID NO: 16. В некоторых таких вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может представлять собой любую сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, которая распознает и расщепляет SEQ ID NO: 16. В конкретных вариантах реализации сконструированная мегануклеаза может включать последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 33-39. В конкретных вариантах реализации указанных способов, субъект может представлять собой млекопитающее, такое как человек.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена сконструированная мегануклеаза, описанная в данной заявке, для применения в качестве лекарственного средства. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение сконструированной мегануклеазы, описанной в данной заявке, для производства лекарственного средства для лечения ВГВ, уменьшения уровня или пролиферации ВГВ, уменьшения симптомов, связанных с ВГВ, или лечения ГЦК. В другом аспекте настоящего изобретения предложен выделенный полинуклеотид для применения в качестве лекарственного средства, отличающийся тем, что выделенный полинуклеотид включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение выделенного полинуклеотида для производства лекарственного средства для лечения ВГВ, уменьшения уровня или пролиферации ВГВ, уменьшения симптомов, связанных с ВГВ, или лечения ГЦК.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный ААВ-вектор для применения в качестве лекарственного средства, при этом указанный рекомбинантный ААВ-вектор содержит выделенный полинуклеотид, и при этом указанный выделенный полинуклеотид включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение рекомбинантного ААВ-вектора для производства лекарственного средства для лечения ВГВ, уменьшения уровня или пролиферации ВГВ, уменьшения симптомов, связанных с ВГВ, или лечения ГЦК, при этом указанный рекомбинантный ААВ-вектор содержит выделенный полинуклеотид, и при этом указанный выделенный полинуклеотид включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке.

Описанные выше и другие аспекты и варианты реализации настоящего изобретения можно более полно понять, ознакомившись со следующим подробным описанием и формулой изобретения. Некоторые свойства настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов реализации, также могут быть предложены в комбинации в одном варианте реализации. Все комбинации вариантов реализации в прямой форме входят в объем настоящего изобретения и описаны в данной заявке точно так же, как если бы все без исключения комбинации были отдельно и явно описаны. И наоборот, различные свойства настоящего изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного

варианта реализации, также могут быть предложены отдельно или в любой подходящей субкомбинации. Все субкомбинации свойств, перечисленных в вариантах реализации, также в прямой форме входят в объем настоящего изобретения и описаны в данной заявке точно так же, как если бы все без исключения такие субкомбинации были отдельно и явно описаны в данной заявке. Варианты реализации каждого аспекта настоящего изобретения, описанного в данной заявке, распространяются на каждый другой аспект настоящего изобретения с необходимыми изменениями.

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана геномная карта генома ВГВ и обозначены все ОРС.

У вирусных частиц частично двухцепочечный геном (обозначен пунктирной линией) с липким перекрыванием, которое соединяет 5'-участки каждой цепи и которое фланкировано последовательностями прямых повторов (DR1 и DR2). Ген S кодирует белок основного поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) и его гликозилированного партнера, которые представляют собой трансмембранные белки в оболочке вируса. Последовательности в той же рамке считывания, расположенные против хода транскрипции от гена S, кодируют пре-S домены, которые транслируются вместе с последовательностями S с образованием пре-S и S полипептидов (средний и большой белки), которые содержат рецептор вируса для инфицирования гепатоцитов. Ген С кодирует коровый антиген гепатита В (HBcAg), который образует нуклеокапсид вируса. Участок Р кодирует обратную транскриптазу вируса, которая также обладает активностью ДНК-зависимой ДНК-полимеразы и активностью РНКазы Н, необходимыми для репликации вируса. Хотя ВГВ представляет собой ДНК-вирус, он реплицируется через пре-геномного РНК-посредника. Наконец, ген Х кодирует малый регуляторный белок вируса - антиген х гепатита В (HBx). HBx представляет собой трансактивирующий белок, который стимулирует экспрессию и репликацию генов вируса, защищает инфицированные вирусом клетки от опосредованного иммунитетом разрушения и способствует развитию гепатоцеллюлярной карциномы.

Фиг. 2. Сконструированные последовательности распознавания мегануклеазы в геноме ВГВ. А) Каждая последовательность распознавания, на которую нацелена сконструированная мегануклеаза согласно настоящему изобретению, содержит два распознаваемых полусайта. Каждый распознаваемый полусайт содержит 9 пар оснований, разделенных центральной последовательностью из 4 пар оснований. Последовательность распознавания ВГВ 1-2 (SEQ ID NO: 10) содержит два распознаваемых полусайта, обозначенных ВГВ1 и ВГВ2. Последовательность распознавания ВГВ 5-6 (SEQ ID NO: 12) содержит два распознаваемых полусайта, обозначенных ВГВ5 и ВГВ6. Последовательность распознавания ВГВ 7-8 (SEQ ID NO: 14) содержит два распознаваемых полусайта, обозначенных ВГВ7 и ВГВ8. Последовательность распознавания ВГВ 11-12 (SEQ ID NO: 16) содержит два распознаваемых полусайта, обозначенных ВГВ11 и ВГВ12.

Фиг. 3. Иллюстрирование генома генотипа А ВГВ и расположение последовательностей распознавания ВГВ 1-2, ВГВ 5-6, ВГВ 7-8 и ВГВ 11-12 внутри генома. Обе последовательности распознавания ВГВ 1-2 и ВГВ 5-6 расположены внутри четырех ОРС генома ВГВ: Р, preS1/preS2/S, preS2/S и S. Каждая из последовательностей распознавания ВГВ 7-8 и ВГВ 11-12 расположена внутри ОРС, кодирующей полимеразу.

Фиг. 4. Выравнивание последовательностей распознавания ВГВ в генотипах ВГВ А-Г. Последовательности распознавания, на которые нацелено настоящее изобретение, консервативны среди множества генотипов ВГВ. Последовательность распознавания ВГВ 1-2 распространяется на остатки 185-206 генотипа А ВГВ, представленного в SEQ ID NO: 3, и данная последовательность распознавания полностью консервативна в генотипах В, С, Е, F и G. Генотип D содержит однонуклеотидное различие в виде замены G на Т в положении -4 первого полусайта. Последовательность распознавания ВГВ 5-6 распространяется на остатки 742-763 генотипа А ВГВ, представленного в SEQ ID NO: 3, и данная последовательность распознавания полностью консервативна в генотипах В, С, D, Е и G. Генотип F содержит однонуклеотидное различие в виде замены G на С в положении -3 первого полусайта. Последовательность распознавания ВГВ 7-8 распространяется на остатки 1183-1204 генотипа А ВГВ, представленного в SEQ ID NO: 3, и данная последовательность распознавания полностью консервативна в генотипах В, С, D, F и G. Генотип Е содержит однонуклеотидное различие в виде замены G на С в положении -1 первого полусайта. Последовательность распознавания ВГВ 11-12 распространяется на остатки 1259-1280 генотипа А ВГВ, представленного в SEQ ID NO: 3, и данная последовательность распознавания полностью консервативна в генотипах В, С, D, Е, F и G.

Фиг. 5. Указанные сконструированные мегануклеазы согласно настоящему изобретению содержат две субъединицы, при этом указанная первая субъединица, содержащая участок HVR1, связывается с первым распознаваемым полусайтом (например, ВГВ1, ВГВ5, ВГВ7 или ВГВ11) и вторая субъединица, содержащая участок HVR2, связывается со вторым распознаваемым полусайтом (например, ВГВ2, ВГВ6, ВГВ8 или ВГВ12). В вариантах реализации, в которых сконструированная мегануклеаза представляет собой одноцепочечную мегануклеазу, первую субъединицу, содержащую участок HVR1, можно расположить либо как N-концевую, либо как С-концевую субъединицу. Аналогичным образом, вторую субъединицу, содержащую участок HVR2, можно расположить либо как N-концевую, либо как С-концевую субъединицу.

Фиг. 6. Схематичное представление репортерного анализа в клетках СНО для оценки сконструированных мегануклеаз, нацеленных на ОРС генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В. Для указанных сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, получали линию клеток СНО, в которой репортерная кассета была стабильно встроена в геном клетки. Репортерная кассета содержала, в порядке от 5' к 3': ранний промотор SV40; 5' 2/3 гена GFP; последовательность распознавания для сконструированной мегануклеазы согласно настоящему изобретению (например, последовательность распознавания ВГВ 1-2); последовательность распознавания для мегануклеазы СНО-23/24 (WO/2012/167192); и 3' 2/3 гена GFP. Клетки, стабильно трансфицированные данной кассетой, не экспрессировали GFP в отсутствие вызывающего разрыв ДНК агента. Мегануклеазы внедряли путем трансдукции плазмидной ДНК или мРНК, кодирующей каждую мегануклеазу. Когда вызывали разрыв ДНК в любой из распознаваемых мегануклеазой последовательностей, дуплицированные участки гена GFP рекомбинировали друг с другом с образованием функционального гена GFP. Процент экспрессирующих GFP клеток затем можно было определить с помощью проточной цитометрии как косвенный показатель частоты расщепления генома мегануклеазами.

Фиг. 7. Эффективность распознавания и расщепления сконструированными мегануклеазами последовательностей распознавания в ОРС генома по меньшей мере двух генотипов гена вируса гепатита В в репортерном анализе в клетках СНО. Сконструированные мегануклеазы, представленные в последовательностях SEQ ID NO: 18-39, были сконструированы для нацеливания на последовательность распознавания ВГВ 1-2 (SEQ ID NO: 10), последовательность распознавания ВГВ 5-6 (SEQ ID NO: 12), последовательность распознавания ВГВ 7-8 (SEQ ID NO: 14) или последовательность распознавания ВГВ 11-12 (SEQ ID NO: 16), и проводили скрининг их эффективности в репортерном анализе в клетках СНО. В показанных результатах представлен процент экспрессирующих GFP клеток, наблюдаемый в каждом анализе, который соответствует эффективности расщепления каждой мегануклеазой целевой последовательности распознавания или последовательности распознавания СНО-23/24. Отрицательный контроль (bs) был дополнительно включен в каждый анализ. На фиг. 7А показаны мегануклеазы, нацеленные на последовательность распознавания ВГВ 1-2. На фиг. 7В показаны мегануклеазы, нацеленные на последовательность распознавания ВГВ 5-6. На фиг. 7С показаны мегануклеазы, нацеленные на последовательность распознавания ВГВ 7-8. На фиг. 7D показаны мегануклеазы, нацеленные на последовательность распознавания ВГВ 11-12.

Фиг. 8. Эффективность распознавания и расщепления сконструированными мегануклеазами последовательностей распознавания в ОРС генома по меньшей мере двух генотипов гена вируса гепатита В в репортерном анализе в клетках СНО. Сконструированные мегануклеазы, представленные в последовательностях SEQ ID NO: 18-39, были сконструированы для нацеливания на последовательность распознавания ВГВ 1-2 (SEQ ID NO: 10), последовательность распознавания ВГВ 5-6 (SEQ ID NO: 12), последовательность распознавания ВГВ 7-8 (SEQ ID NO: 14) или последовательность распознавания ВГВ 11-12 (SEQ ID NO: 16), и проводили скрининг их эффективности в репортерном анализе в клетках СНО в несколько моментов времени в течение 12 дней после нуклеофекции. В показанных результатах представлен процент экспрессирующих GFP клеток, наблюдаемый в каждом анализе в течение 12-дневного периода анализа, который соответствует эффективности расщепления каждой мегануклеазой целевой последовательности распознавания или последовательности распознавания СНО-23/24, как функция времени. На фиг. 8А показаны мегануклеазы, нацеленные на последовательность распознавания ВГВ 1-2. На фиг. 8В показаны мегануклеазы, нацеленные на последовательность распознавания ВГВ 5-6. На фиг. 8С показаны мегануклеазы, нацеленные на последовательность распознавания ВГВ 7-8. На фиг. 8D показаны мегануклеазы, нацеленные на последовательность распознавания ВГВ 11-12.

Фиг. 9. Оценка способности мегануклеаз ВГВ распознавать и расщеплять последовательности распознавания внутри эписомных ДНК-плазмид в репортерной системе *E. coli*. На фиг. 9А показана плазмида pARCUS и плазмида pHbVa. На фиг. 9В показано количество колоний, присутствующих на каждой чашке с селективной средой, представляющее доказательство способности мегануклеаз ВГВ расщеплять плазмиду pHbVa.

Фиг. 10. Оценка мегануклеаз ВГВ в клетках AD38. Клетки AD38, которые экспрессируют геном ВГВ и секретируют HBsAg, трансфицировали плазмидной ДНК, кодирующей мегануклеазы ВГВ 5-6х.33 или ВГВ 11-12х.26. Плазмидную ДНК, кодирующую красный флуоресцентный белок, использовали в данном эксперименте в качестве контроля. В дни 3 и 7 после трансфекции собирали супернатант клеток и анализировали присутствие в нем HBsAg с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Фиг. 11. Оценка мегануклеаз ВГВ в клетках AD38. Клетки AD38, которые экспрессируют геном ВГВ и секретируют HBsAg, трансдуцировали лентивирусом, кодирующим мегануклеазу ВГВ 5-6х.33 или мегануклеазу ВГВ 11-12х.26, или трансдуцировали комбинацией указанных мегануклеаз. Лентивирус, кодирующий красный флуоресцентный белок, использовали в данном эксперименте в качестве контроля. Исследовали множественности заражения (МЗ), равные 1, 2 и 4. В день 7 после трансдукции собирали супернатант клеток и анализировали присутствие в нем HBsAg с помощью ELISA.

Фиг. 12. Оценка мегануклеаз ВГВ в клетках AD38. Клетки AD38, которые экспрессируют геном ВГВ и секретируют HBsAg, трансдуцировали лентивирусом, кодирующим мегануклеазу ВГВ 5-6х.33 (LV224),

мегануклеазу ВГВ 11-12х.26 (LV225) или красный флуоресцентный белок (LV212). Исследовали МЗ, равную 4, и в день 7 после трансдукции собирали супернатант клеток и анализировали присутствие в нем HBsAg и число копий внеклеточной ДНК ВГВ. Кроме того, получали лизаты клеток в день 7 после трансдукции и анализировали в них число копий внутриклеточной кзкДНК ВГВ. На фиг. 12А показаны концентрации HBsAg в культуральной среде. На фиг. 12В показано число копий внеклеточной ДНК ВГВ в культуральной среде. На фиг. 12С показано число копий внутриклеточной кзкДНК ВГВ в лизатах клеток.

Фиг. 13. Оценка мегануклеаз ВГВ в инфицированных ВГВ первичных гепатоцитах человека. Получали лентивирусы, которые экспрессировали либо красный флуоресцентный белок (RFP), либо ВГВ 5-6х.33, либо ВГВ 11-12х.26, и инфицированные ВГВ первичные гепатоциты человека трансдуцировали, чтобы определить влияние мегануклеаз на продукцию HBsAg и HBeAg. Первичные гепатоциты человека высевали и через 24 часа инфицировали ВГВ. Через день после инфицирования клетки промывали и через 24 часа (день 2 после инфицирования) трансдуцировали либо лентивирусом, кодирующим RFP, ВГВ 5-6х.33, ВГВ 11-12х.26, либо смесью 1:1 лентивирусов, кодирующих мегануклеазы ВГВ. В качестве дополнительного контроля, инфицированные клетки обрабатывали ДМСО. Собирали супернатанты клеток и заменяли среду в дни 4, 8, 11 и 13 после трансдукции. В каждый момент времени измеряли HBsAg и HBeAg в супернатантах клеток с помощью ELISA. Также измеряли внеклеточную ДНК в супернатанте в день 13 после инфицирования. Для того чтобы определить, влияла ли, в целом, трансдукция лентивирусом на секрецию либо HBsAg, либо HBeAg, супернатанты клеток, трансдуцированных кодирующим RFP лентивирусом, сравнивали с клетками, обработанными ДМСО. На фиг. 13А показано, что трансдукция лентивирусом, кодирующим RFP, оказывала незначительное влияние на экспрессию HBsAg при МЗ, равной 1,25, 2,5 или 5. На фиг. 13В показано, что трансдукция лентивирусом, кодирующим RFP, оказывала незначительное влияние на экспрессию HBeAg при МЗ, равной 1,25, 2,5 или 5. На фиг. 13С показано, что трансдукция лентивирусом, кодирующим RFP, оказывала незначительное влияние на экспрессию ДНК ВГВ при МЗ, равной 1,25, 2,5 или 5.

Фиг. 14. Оценка мегануклеаз ВГВ в инфицированных ВГВ первичных гепатоцитах человека. Получали лентивирусы, которые экспрессировали либо RFP, либо ВГВ 5-6х.33, либо ВГВ 11-12х.26, и инфицированные ВГВ первичные гепатоциты человека трансдуцировали, чтобы определить влияние мегануклеаз на продукцию HBsAg и HBeAg. Первичные гепатоциты человека высевали и через 24 часа инфицировали ВГВ. Через 1 день после инфицирования клетки промывали и через 24 часа (день 2 после инфицирования) трансдуцировали либо лентивирусом, кодирующим RFP, ВГВ 5-6х.33, ВГВ 11-12х.26, либо смесью 1:1 лентивирусов, кодирующих мегануклеазы ВГВ. В качестве дополнительного контроля инфицированные клетки обрабатывали ДМСО. Собирали супернатанты клеток и заменяли среду в дни 4, 8, 11 и 13 после трансдукции. В каждый момент времени измеряли HBsAg и HBeAg в супернатантах клеток с помощью ELISA. На фиг. 14А показан HBsAg в культуральной среде после трансдукции при МЗ, равной 2,5. На фиг. 14В показан HBsAg в культуральной среде после трансдукции при МЗ, равной 1,25. На фиг. 14С показан HBeAg в культуральной среде после трансдукции при МЗ, равной 2,5. На фигуре 14D показан HBeAg в культуральной среде после трансдукции при МЗ, равной 1,25.

Фиг. 15. Доставка мРНК, заключенной в липидную наночастицу, в печень. Разработали сконструированную мегануклеазу, которая обладает специфичностью к последовательностям распознавания в гене гидролазы CMP-NeuAc (Cmah) мыши, который экспрессируется в печени мыши. Кэппированную ARCA мРНК, кодирующую мегануклеазу Cmah, заключали в три различных коммерчески доступных состава ЛНЧ. Заключенную в ЛНЧ мРНК вводили мышам CD-1 путем внутривенной (в/в) инъекции и собирали печени через 6 дней. Выделяли всю геномную ДНК (гДНК) печени и определяли частоту мутаций вставки/делеции (indel) в гене Cmah, применяя анализ с помощью эндонуклеазы I T7 (T7E) и глубокое секвенирование.

#### Краткое описание последовательностей

В SEQ ID NO: 1 представлена последовательность аминокислот мегануклеазы I-CreI дикого типа из *Chlamydomonas reinhardtii*.

В SEQ ID NO: 2 представлена последовательность аминокислот LAGLIDADG.

В SEQ ID NO: 3 представлена последовательность аминокислот генотипа А ВГВ.

В SEQ ID NO: 4 представлена последовательность аминокислот генотипа В ВГВ.

В SEQ ID NO: 5 представлена последовательность аминокислот генотипа С ВГВ.

В SEQ ID NO: 6 представлена последовательность аминокислот генотипа Б ВГВ.

В SEQ ID NO: 7 представлена последовательность аминокислот генотипа Е ВГВ.

В SEQ ID NO: 8 представлена последовательность аминокислот генотипа F ВГВ.

В SEQ ID NO: 9 представлена последовательность аминокислот генотипа G ВГВ.

В SEQ ID NO: 10 представлена последовательность аминокислот последовательности распознавания ВГВ 1-2 (смысловой).

В SEQ ID NO: 11 представлена последовательность аминокислот последовательности распознавания ВГВ 1-2 (антисмысловой).

В SEQ ID NO: 12 представлена последовательность аминокислот последовательности распознавания ВГВ 5-6 (смысловой).





познавания, присутствующей в генотипе F ВГВ, которая соответствует последовательности распознавания ВГВ 5-6 в генотипе А ВГВ с заменой G на C в положении -3 первого полусайта.

В SEQ ID NO: 86 представлена последовательность нуклеиновой кислоты последовательности распознавания, присутствующей в генотипе Е ВГВ, которая соответствует последовательности распознавания ВГВ 7-8 в генотипе А ВГВ с заменой С на Т в положении -1 первого полусайта.

### **Подробное описание изобретения**

#### **1.1. Противопоставленные материалы и определения.**

Патентная и научная литература, на которую ссылаются в данной заявке, показывает объем знаний, который доступен специалистам в данной области. Изданные патенты США, принятые заявки, опубликованные иностранные заявки и ссылки, включая последовательности из базы данных GenBank, которые цитируются в данной заявке, настоящим включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый материал был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки. Настоящее изобретение может быть реализовано в различных формах, и не должно истолковываться как ограниченное конкретными вариантами реализации, описанными в данной заявке. Скорее, данные варианты реализации предложены, чтобы настоящее описание было всесторонним и полным и полностью выражало объем настоящего изобретения для специалистов в данной области. Например, свойства, проиллюстрированные по отношению к одному варианту реализации, могут быть включены в другие варианты реализации, и свойства, проиллюстрированные по отношению к конкретному варианту реализации, могут быть удалены из этого варианта реализации. Кроме того, для специалистов в данной области будут очевидны множество изменений и дополнений к конкретным вариантам реализации, предложенным в данной заявке, в свете настоящего описания, которые не отклоняются от настоящего изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют те же значения, которые обычно понимает средний специалист в области, к которой относится настоящее изобретение. Терминология, которую применяют для описания настоящего изобретения в данной заявке, используется исключительно с целью описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения настоящего изобретения.

Все публикации, заявки на патент, патенты и другие противопоставленные материалы, упомянутые в данной заявке, полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

В данной заявке использование единственного числа может означать один или более чем один. Например, "клетка" может означать отдельную клетку или множество клеток.

В данной заявке, если конкретно не указано иное, термин "или" используют во включительном смысле "и/или", но не в исключительном смысле "либо/или".

В данной заявке термины "нуклеаза" и "эндонуклеаза" используют взаимозаменяемо по отношению к встречающимся в природе или сконструированным ферментам, которые расщепляют фосфодиэфирную связь внутри полинуклеотидной цепи.

В данной заявке термин "мегануклеаза" относится к эндонуклеазе, которая связывается с двухцепочечной ДНК в последовательности распознавания, которая больше, чем 12 пар оснований. Предпочтительно, указанная последовательность распознавания для мегануклеазы согласно настоящему изобретению состоит из 22 пар оснований. Мегануклеаза может представлять собой эндонуклеазу, которая получена из I-CreI, и может относиться к сконструированному варианту I-CreI, который был модифицирован по сравнению с природной I-CreI в отношении, например, специфичности связывания ДНК, активности расщепления ДНК, аффинности связывания ДНК или способности к димеризации. Способы получения таких модифицированных вариантов I-CreI известны в данной области (например, WO 2007/047859). Мегануклеаза, предложенная в данной заявке, связывается с двухцепочечной ДНК в виде гетеродимера. Мегануклеаза также может представлять собой "одноцепочечную мегануклеазу", в которой пара связывающих ДНК доменов соединена в один полипептид с помощью пептидного линкера. Термин "хоуминг-эндонуклеаза" синонимичен термину "мегануклеаза". Мегануклеазы согласно настоящему изобретению по существу нетоксичны, когда они экспрессируются в клетках, не оказывают отрицательного влияния на жизнеспособность клетки, и расщепляющая активность мегануклеазы существенно не снижается при измерении с применением способов, описанных в данной заявке.

В данной заявке термин "одноцепочечная мегануклеаза" относится к полипептиду, содержащему пару субъединиц нуклеазы, соединенных линкером. Одноцепочечная мегануклеаза может иметь следующую организацию: N-концевая субъединица - линкер - С-концевая субъединица. Две указанные субъединицы мегануклеазы, как правило, будут неидентичны по последовательности аминокислот и будут распознавать неидентичные последовательности ДНК. Таким образом, одноцепочечные мегануклеазы обычно расщепляют псевдопалиндромные или непалиндромные последовательности распознавания. Одноцепочечную мегануклеазу можно назвать "одноцепочечным гетеродимером" или "одноцепочечной гетеродимерной мегануклеазой", хотя фактически она не димерная. Для ясности, если не указано иное, термин "мегануклеаза" может относиться к димерной или одноцепочечной мегануклеазе.

В данной заявке термин "линкер" относится к экзогенной пептидной последовательности, которую используют для соединения двух субъединиц мегануклеазы в единый полипептид. Последовательность линкера может быть такой, которая встречается в природных белках, или может представлять собой ис-

кусственную последовательность, которая не встречается ни в одном природном белке. Линкер может быть гибким и не иметь вторичной структуры или может быть склонным к образованию определенной трехмерной структуры при физиологических условиях. Линкер может включать, без ограничения, линкеры, входящие в объем патента США № 8445251 и патента США № 9434931. В некоторых вариантах реализации последовательность аминокислот линкера может содержать остатки 154-195 любой из последовательностей SEQ ID NO: 18-39.

В данной заявке термин "рекомбинантный" или "сконструированный" по отношению к белку означает содержащий измененную последовательность аминокислот в результате применения методик генной инженерии к нуклеиновым кислотам, которые кодируют указанный белок, и к клеткам или организмам, которые экспрессируют указанный белок. По отношению к нуклеиновой кислоте, термин "рекомбинантный" или "сконструированный" означает содержащий измененную последовательность нуклеиновой кислоты в результате применения методик генной инженерии. Методики генной инженерии включают, но не ограничены перечисленными: технологии ПЦР и клонирования ДНК; трансфекцию, трансформацию и другие технологии переноса генов; гомологичную рекомбинацию; сайт-направленный мутагенез и слияние генов. В соответствии с данным определением, белок с последовательностью аминокислот, идентичной встречающемуся в природе белку, но полученный путем клонирования и экспрессии в гетерологичном хозяине, не считают рекомбинантным.

В данной заявке термин "дикий тип" относится к наиболее часто встречающемуся в природе аллелю (т.е. полинуклеотидной последовательности) в популяции аллелей одного типа генов, при этом полипептид, кодируемый аллелем дикого типа, обладает исходными функциями. Термин "дикий тип" также относится к полипептиду, кодируемому аллелем дикого типа. Аллели (т.е. полинуклеотиды) и полипептиды дикого типа можно отличить от мутантных или вариантных аллелей и полипептидов, которые содержат одну или более мутаций и/или замен по сравнению с последовательностью(-ями) дикого типа. Тогда как аллель или полипептид дикого типа могут придать организму нормальный фенотип, мутантный или вариантный аллель или полипептид могут, в некоторых случаях, придать измененный фенотип. Нуклеазы дикого типа можно отличить от рекомбинантных или не встречающихся в природе нуклеаз. Термин "дикий тип" также может относиться к клетке, организму и/или субъекту, у которого есть аллель дикого типа конкретного гена, или к клетке, организму и/или субъекту, используемым с целью сравнения.

В данной заявке термин "генетически модифицированный" относится к клетке или организму, в котором, или в предшественнике которого, геномная последовательность ДНК была намеренно модифицирована рекомбинантной технологией. В данной заявке в объем термина "генетически модифицированный" входит термин "трансгенный".

В данной заявке термин "модификация" по отношению к рекомбинантным белкам означает любую вставку, делецию или замену аминокислотного остатка в рекомбинантной последовательности относительно исходной последовательности (например, последовательности дикого типа или нативной последовательности).

В данной заявке термин "последовательность распознавания" относится к последовательности ДНК, которая связывается и расщепляется эндонуклеазой. В случае мегануклеазы, последовательность распознавания содержит пару инвертированных "полусайтов" из 9 пар оснований, которые разделены четырьмя парами оснований. В случае одноцепочечной мегануклеазы, N-концевой домен белка контактирует с первым полусайтом и C-концевой домен белка контактирует со вторым полусайтом. В результате расщепления мегануклеазой образуются 3'-"выступы" из четырех пар оснований. "Выступы" или "липкие концы" представляют собой короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, которые могут образоваться в результате расщепления двухцепочечной последовательности ДНК эндонуклеазой. В случае мегануклеаз и одноцепочечных мегануклеаз, полученных из I-CteI, выступ содержит основания 10-13 последовательности распознавания из 22 пар оснований. В данной заявке термин "целевой сайт" или "целевая последовательность" относится к участку хромосомной ДНК клетки, содержащему распознаваемую нуклеазой последовательность.

В данной заявке термин "аффинность связывания ДНК" или "аффинность связывания" означает склонность мегануклеазы к нековалентному соединению с исходной молекулой ДНК (например, последовательностью распознавания или случайной последовательностью). Аффинность связывания измеряют с использованием константы диссоциации  $K_d$ . В данной заявке нуклеаза обладает "измененной" аффинностью связывания, если  $K_d$  нуклеазы от исходной последовательности распознавания увеличивается или уменьшается на статистически значимую ( $p < 0,05$ ) величину по сравнению с исходной нуклеазой.

В данной заявке термин "специфичность" означает способность мегануклеазы распознавать и расщеплять молекулы двухцепочечной ДНК только по определенной последовательности пар оснований, которую называют последовательностью распознавания, или только по определенному набору последовательностей распознавания. У указанного набора последовательностей распознавания будут некоторые общие консервативные положения или мотивы последовательностей, но они могут быть вырождены в одном или более положениях. Высокоспецифичная мегануклеаза способна расщеплять только одну или лишь несколько последовательностей распознавания. Специфичность можно определить с помощью любого способа, известного в данной области. В данной заявке мегануклеаза обладает "измененной" специ-

фичностью, если она связывает и расщепляет последовательность распознавания, которую не связывает и не расщепляет исходная мегануклеаза (например, дикого типа) при физиологических условиях, или если скорость расщепления последовательности распознавания повышается или снижается на биологически значимую величину (например, по меньшей мере в 2 раза или в 2-10 раз) по сравнению с исходной мегануклеазой.

В данной заявке термин "гомологичная рекомбинация" или "ГР" относится к природному клеточному процессу, в котором разрыв двухцепочечной ДНК подвергается репарации с использованием гомологичной последовательности ДНК в качестве матрицы для репарации (см., например, Cahill и др. (2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976). Гомологичная последовательность ДНК может представлять собой эндогенную хромосомную последовательность или экзогенную нуклеиновую кислоту, которую доставили в клетку.

В данной заявке термин "негомологичное соединение концов" или "НГСК" относится к природному клеточному процессу, в котором разрыв двухцепочечной ДНК подвергается репарации путем непосредственного соединения двух негомологичных фрагментов ДНК (см., например, Cahill и др. (2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976). Репарация ДНК путем негомологичного соединения концов склонна к ошибкам и часто приводит к нематричной вставке или делеции последовательностей ДНК в сайте репарации. В некоторых случаях расщепление в целевой последовательности распознавания приводит к НГСК в целевом сайте распознавания. Вызванное нуклеазой расщепление целевого сайта в кодирующей последовательности гена с последующей репарацией ДНК посредством НГСК может ввести мутации в кодирующую последовательность, такие как мутации сдвига рамки считывания, которые нарушают функцию гена. Таким образом, сконструированные мегануклеазы можно применять для эффективного нокаута гена в популяции клеток. В данной заявке по отношению как к последовательности аминокислот, так и к последовательности нуклеиновых кислот, термины "процент идентичности", "идентичность последовательностей", "процент подобия", "подобие последовательностей" и тому подобные термины относятся к мере степени подобия двух последовательностей на основании выравнивания последовательностей, которое максимизирует подобие между выровненными аминокислотными остатками или нуклеотидами, которая представляет собой функцию количества идентичных или сходных остатков или нуклеотидов, суммарного количества остатков или нуклеотидов и присутствия и длины гэпов в выравнивании последовательностей. Доступны различные алгоритмы и компьютерные программы для определения подобия последовательностей с использованием стандартных параметров. В данной заявке подобие последовательностей измеряют, применяя программу BLASTp для последовательностей аминокислот и программу BLASTn для последовательностей нуклеиновых кислот, обе из которых доступны на ресурсе National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) и описаны, например, в Altschul и др. (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Gish и States (1993), *Nature Genet.* 3:266-272; Madden и др. (1996), *Meth. Enzymol.* 266:131-141; Altschul и др. (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:33 89-3402; Zhang и др. (2000), *J. Comput. Biol.* 7(1-2):203-14. В данной заявке процент подобия двух последовательностей аминокислот представляет собой балльный показатель, основанный на следующих параметрах алгоритма BLASTp: длина слова=3; штраф за открытие гэпа=-11; штраф за продление гэпа=-1; и матрица весов=BLOSUM62. В данной заявке процент подобия двух последовательностей нуклеиновых кислот представляет собой балльный показатель, основанный на следующих параметрах алгоритма BLASTn: длина слова=11; штраф за открытие гэпа=-5; штраф за продление гэпа=-2; награда за совпадение=1; и штраф за несовпадение=-3. В данной заявке термин "соответствующий" в отношении модификаций двух белков или последовательностей аминокислот используют для обозначения того, что определенная модификация в первом белке представляет собой замену того же аминокислотного остатка, что и в модификации во втором белке, и что положение аминокислоты, модифицированной в первом белке, соответствует или выравнивается с положением аминокислоты, модифицированной во втором белке, когда два указанных белка подвергают стандартному выравниванию последовательностей (например, применяя программу BLASTp). Таким образом, модификация остатка "X" на аминокислоту "A" в первом белке будет соответствовать модификации остатка "Y" на аминокислоту "A" во втором белке, если остатки X и Y соответствуют друг другу в выравнивании последовательностей и несмотря на тот факт, что X и Y могут представлять собой различные числа.

В данной заявке термин "распознаваемый полусайт", "полусайт последовательности распознавания" или просто "полусайт" означает последовательность нуклеиновой кислоты в двухцепочечной молекуле ДНК, которая распознается мономером гомодимерной или гетеродимерной мегануклеазы или одной субъединицей одноцепочечной мегануклеазы.

В данной заявке термин "гипервариабельный участок" относится к локализованной последовательности внутри мономера или субъединицы мегануклеазы, которая содержит аминокислоты с относительно высокой вариабельностью. Гипервариабельный участок может содержать приблизительно 50-60 смежных остатков, приблизительно 53-57 смежных остатков или предпочтительно приблизительно 56 остатков. В некоторых вариантах реализации остатки гипервариабельного участка могут соответствовать положениям 24-79 или положениям 215-270 любой из последовательностей SEQ ID NO: 18-39. Гипервариабельный участок может содержать один или более остатков, которые контактируют с основаниями

ДНК в последовательности распознавания, и его можно модифицировать, чтобы изменить предпочтения указанным мономером или субъединицей. Гипервариабельный участок также может содержать один или более остатков, которые связываются с остовом ДНК, когда мегануклеаза соединяется с распознаваемой последовательностью в двухцепочечной ДНК. Такие остатки можно модифицировать, чтобы изменить аффинность связывания мегануклеазы с остовом ДНК и с целевой последовательностью распознавания. В различных вариантах реализации настоящего изобретения гипервариабельный участок может содержать 1-20 остатков, которые проявляют вариабельность и которые можно модифицировать, чтобы повлиять на предпочтение оснований и/или аффинность связывания ДНК. В некоторых вариантах реализации вариабельные остатки внутри гипервариабельного участка соответствуют одному или более положениям 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 49, 50, 54, 64, 68, 70, 75 и 77 любой из последовательностей SEQ ID NO: 18-39. В других вариантах реализации вариабельные остатки внутри гипервариабельного участка соответствуют одному или более положениям 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 240, 241, 245, 255, 259, 261, 266 и 268 любой из последовательностей SEQ ID NO: 18-39. Термины "конструкция рекомбинантной ДНК", "рекомбинантная конструкция", "кассета экспрессии", "экспрессионная конструкция", "химерная конструкция", "конструкция" и "фрагмент рекомбинантной ДНК" в данной заявке используют взаимозаменяемо, и они описывают фрагменты нуклеиновых кислот. Рекомбинантная конструкция содержит искусственную комбинацию фрагментов нуклеиновых кислот, включая, без ограничения, регуляторные и кодирующие последовательности, которые не встречаются вместе в природе. Например, конструкция рекомбинантной ДНК может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые получены из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из того же источника, но и расположенные таким образом, который отличен от встречающегося в природе. Такую конструкцию можно использовать саму по себе или можно использовать в сочетании с вектором.

В данной заявке "вектор" или "рекомбинантный ДНК-вектор" может представлять собой конструкцию, которая содержит систему репликации и последовательности, которые способны транскрибировать и транслировать кодирующую полипептид последовательность в данной клетке-хозяине. Если используют вектор, то выбор вектора зависит от способа, который будут использовать для трансформации клеток-хозяев, что хорошо известно специалистам в данной области. Векторы могут включать, без ограничения, плазмидные векторы и рекомбинантные ААВ-векторы, или любой другой вектор, известный в данной области, подходящий для доставки гена, кодирующего мегануклеазу согласно настоящему изобретению, в целевую клетку. Квалифицированный специалист хорошо осведомлен о генетических элементах, которые должны присутствовать в векторе, чтобы успешно трансформировать, осуществить селекцию и размножить клетки-хозяева, содержащие любой из изолированных нуклеотидов или последовательностей нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению.

В данной заявке "вектор" также может относиться к вирусному вектору.

Вирусные векторы могут включать, без ограничения, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированного вируса (ААВ).

В данной заявке "полицистронная" мРНК относится к отдельной информационной РНК, которая содержит две или более кодирующих последовательностей (т.е. цистронов) и кодирует более чем один белок. Полицистронная мРНК может содержать любой элемент, известный в данной области, позволяющий трансляцию двух или более генов с одной и той же молекулы мРНК, включая, но не ограничиваясь перечисленными: элемент IRES, элемент T2A, элемент P2A, элемент E2A и элемент F2A.

В данной заявке "контроль" или "контрольная клетка" относится к клетке, которая является ориентиром для измерения изменений в генотипе или фенотипе генетически модифицированной клетки. Контрольная клетка может включать, например: (а) клетку дикого типа, т.е. клетку такого же генотипа, как и у исходного материала для генетического изменения, которое приводит к получению генетически модифицированной клетки; (b) клетку такого же генотипа, что и генетически модифицированная клетка, но которую трансформировали пустой конструкцией (т.е. конструкцией, которая не оказывает известного влияния на интересующий признак); или (с) клетку, генетически идентичную генетически модифицированной клетке, но которую не подвергали условиям, или стимулам, или дополнительным генетическим модификациям, которые бы вызвали экспрессию измененного генотипа или фенотипа. В данной заявке термин "соответствующий" в отношении модификаций двух белков или последовательностей аминокислот используют для обозначения того, что определенная модификация в первом белке представляет собой замену того же аминокислотного остатка, что и в модификации во втором белке, и что положение аминокислоты, модифицированной в первом белке, соответствует или выравнивается с положением аминокислоты, модифицированной во втором белке, когда два указанных белка подвергают стандартному выравниванию последовательностей (например, применяя программу BLASTp). Таким образом, модификация остатка "X" на аминокислоту "A" в первом белке будет соответствовать модификации остатка "Y" на аминокислоту "A" во втором белке, если остатки X и Y соответствуют друг другу в выравнивании последовательностей и несмотря на тот факт, что X и Y могут представлять собой различные числа.

В данной заявке термины "лечение" или "лечение субъекта" относятся к введению сконструированной мегануклеазы согласно настоящему изобретению или нуклеиновой кислоты, кодирующей сконст-

руированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, субъекту, инфицированному ВГВ, с целью замедления скорости или прекращения пролиферации вируса ВГВ путем расщепления генома по меньшей мере одной частицы ВГВ. Такое лечение снижает или предотвращает трансфекцию и репликацию ВГВ у субъекта и либо частично, либо полностью облегчает один или более симптомов ВГВ у субъекта. Средства оценки ослабления симптомов инфекции ВГВ могут включать измерение функций печени путем определения уровней фермента аланинаминотрансферазы (АЛТ) или путем измерения конверсии сыворотки, а именно, исчезновения HBeAg. Кроме того, ослабление или уменьшение симптомов ВГВ можно определить путем исследования биоптатов печени и измерения уровня фиброза ткани с помощью способов, хорошо известных в данной области. Количество циркулирующих вирусных частиц можно определить, например, путем измерения уровней ДНК ВГВ, применяя ПЦР, или путем детектирования уровней HBsAg в крови. Термины "лечение" или "лечение субъекта" могут дополнительно относиться к введению клетки (например, гепатоцита), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированную мегануклеазу, при этом указанную клетку доставляют в целевую ткань (например, печень), где она продуцирует сконструированную мегануклеазу в количестве, достаточном для лечения инфекции ВГВ у субъекта, тем самым приводя либо к частично, либо к полному облегчению одного или более симптомов ВГВ. В некоторых аспектах сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, кодирующую ее нуклеиновую кислоту или генетически модифицированную клетку согласно настоящему изобретению вводят в процессе лечения в виде фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Термин "инфекция вирусом гепатита В" относится к любому состоянию, связанному или возникшему в результате инфекции вирусом гепатита В, такому как хронические болезни/расстройства печени, воспаления, фиброзные состояния и пролиферативные расстройства, такие как виды рака печени. Хроническая устойчивая инфекция ВГВ может вызывать утомляемость, повреждение печени, цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному - первичный рак печени.

Термин "пролиферирующий" и "пролиферация" в данной заявке относятся к клеткам ВГВ, которые активно делятся и инфицируют клетки человека. Таким образом, уменьшение пролиферации относится к любому снижению пролиферации ВГВ, включая снижение по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100%, по сравнению с подходящим контролем, в который не вводили указанную сконструированную мегануклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. Во всей данной заявке термин "пролиферативное расстройство" относится к любому заболеванию/расстройству, для которого характерна нежелательная или aberrантная пролиферация ткани. В данной заявке термин "пролиферативное расстройство" также относится к состояниям, при которых неконтролируемый и/или аномальный рост клеток может приводить к развитию нежелательного состояния или заболевания, которое может быть раковым или нераковым.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, достаточному, чтобы привести к полезному или желательному биологическому и/или клиническому результатам. Терапевтически эффективное количество будет изменяться в зависимости от состава или композиции мегануклеазы, конкретного заболевания и его тяжести и возраста, массы тела, физического состояния и восприимчивости к лечению субъекта, которого лечат. В конкретных вариантах реализации эффективное количество сконструированной мегануклеазы или фармацевтических композиций, описанных в данной заявке, снижает уровень или пролиферацию ВГВ или уменьшает по меньшей мере один симптом ВГВ у субъекта с инфекцией ВГВ.

Термин "липидная наночастица" относится к липидной композиции, обычно обладающей сферической структурой со средним диаметром от 10 до 1000 нанометров. В некоторых составах липидные наночастицы могут содержать по меньшей мере один катионный липид, по меньшей мере один некаатионный липид и по меньшей мере один конъюгированный липид. Липидные наночастицы, известные в данной области, которые подходят для инкапсулирования нуклеиновых кислот, таких как мРНК, предложены для применения в настоящем изобретении.

В данной заявке предполагается, что перечисление числового диапазона для переменной выражает, что настоящее изобретение можно осуществить с переменной, равной любому из значений внутри данного диапазона. Таким образом, для переменной, которая по существу дискретна, указанная переменная может быть равна любому целому значению внутри указанного числового диапазона, включая конечные точки диапазона. Аналогично, для переменной, которая по существу непрерывна, указанная переменная может быть равна любому вещественному значению внутри указанного числового диапазона, включая конечные точки диапазона. В качестве примера, и без ограничения, переменная, которая описана как имеющая значения между 0 и 2, может принимать значения 0, 1 или 2, если указанная переменная по существу дискретна, и может принимать значения 0,0, 0,1, 0,01, 0,001 или любые другие вещественные значения

$$\geq 0 \text{ и } \leq 2$$

если указанная переменная по существу непрерывна.

## 2.1. Принцип настоящего изобретения.

Настоящее изобретение, отчасти, основано на гипотезе, что сконструированные мегануклеазы мож-

но применять для снижения уровня ВГВ или замедления пролиферации ВГВ путем расщепления ОРС внутри генома ВГВ. В частности, мегануклеазы можно сконструировать таким образом, чтобы они распознавали и расщепляли последовательность распознавания, присутствующую внутри генома множества генотипов ВГВ. Таким образом, одну сконструированную мегануклеазу можно применять для снижения уровня или пролиферации ВГВ, или уменьшения симптомов инфекции ВГВ, множества генотипов вируса гепатита В. Таким образом, в объем настоящего изобретения входят сконструированные мегануклеазы, которые распознают и расщепляют последовательность распознавания внутри ОРС по меньшей мере 2 генотипов генома ВГВ. В объем настоящего изобретения также входят способы применения таких сконструированных мегануклеаз в фармацевтической композиции и в способах лечения инфекции ВГВ. Кроме того, в объем настоящего изобретения входят фармацевтические композиции, содержащие белки сконструированных мегануклеаз, или нуклеиновые кислоты, кодирующие сконструированные мегануклеазы, и применение таких композиций для лечения инфекции ВГВ.

2.2. Мегануклеазы для распознавания и расщепления последовательностей распознавания внутри генома ВГВ.

В данной области известно, что сайт-специфическую нуклеазу можно использовать для создания разрыва ДНК в геноме вируса и что такой разрыв ДНК может привести к постоянной модификации генома посредством НГСК, такой что вирион ВГВ больше не сможет делиться или инфицировать клетки человека. Таким образом, в одном варианте реализации настоящее изобретение можно осуществить, применяя сконструированные рекомбинантные мегануклеазы.

В предпочтительных вариантах реализации нуклеазы, применяемые для осуществления настоящего изобретения, представляют собой одноцепочечные мегануклеазы. Одноцепочечная мегануклеаза содержит N-концевую субъединицу и C-концевую субъединицу, соединенные линкерным пептидом. Каждый из двух указанных доменов распознает половину последовательности распознавания (т.е. распознаваемый полусайт), и сайт расщепления ДНК находится посередине последовательности распознавания рядом с границей между двумя субъединицами. Разрывы цепей ДНК смещены на четыре пары оснований, так что в результате расщепления ДНК мегануклеазой образуется пара 3'-одноцепочечных выступов из четырех оснований. В некоторых примерах сконструированные мегануклеазы согласно настоящему изобретению были сконструированы, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 1-2 (SEQ ID NO: 10). Последовательность распознавания ВГВ 1-2 расположена внутри ОРС белка Р, S, preS2/S и preS1/preS2 множества генотипов ВГВ. Последовательность распознавания ВГВ 1-2 можно найти по меньшей мере в геноме множества генотипов ВГВ, включая генотип А, В, С, Е, F и G (например, последовательности SEQ ID NO: 3-5 и 7-9, соответственно). Такие сконструированные мегануклеазы в данной заявке в совокупности называют "мегануклеазами ВГВ 1-2". Примеры мегануклеаз ВГВ 1-2 предложены в последовательностях SEQ ID NO: 18-21.

В дополнительных примерах сконструированные мегануклеазы согласно настоящему изобретению были сконструированы, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 5-6 (SEQ ID NO: 12). Последовательность распознавания ВГВ 5-6 расположена внутри ОРС белка Р, S, preS2/S и preS1/preS2 множества генотипов ВГВ. Последовательность распознавания ВГВ 5-6 можно найти по меньшей мере в геноме множества генотипов ВГВ, включая генотип А, В, С, D, Е и G (например, последовательности SEQ ID NO: 3-7 и 9, соответственно). Такие сконструированные мегануклеазы в данной заявке в совокупности называют "мегануклеазами ВГВ 5-6". Примеры мегануклеаз ВГВ 5-6 предложены в последовательностях SEQ ID NO: 22-28.

В дополнительных примерах сконструированные мегануклеазы согласно настоящему изобретению были сконструированы, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 7-8 (SEQ ID NO: 14). Последовательность распознавания ВГВ 7-8 расположена внутри белка Р ОРС множества генотипов ВГВ. Последовательность распознавания ВГВ 7-8 можно найти по меньшей мере в геноме множества генотипов ВГВ, включая генотип А, В, С, D, F и G (например, последовательности SEQ ID NO: 3-6, 8 и 9, соответственно). Такие сконструированные мегануклеазы в данной заявке в совокупности называют "мегануклеазами ВГВ 7-8". Примеры мегануклеаз ВГВ 7-8 предложены в последовательностях SEQ ID NO: 29-32. В дополнительных примерах сконструированные мегануклеазы согласно настоящему изобретению были сконструированы, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 11-12 (SEQ ID NO: 16). Последовательность распознавания ВГВ 11-12 расположена внутри белка Р ОРС множества генотипов ВГВ. Последовательность распознавания ВГВ 11-12 можно найти по меньшей мере в геноме множества генотипов ВГВ, включая генотип А, В, С, D, Е, F и G (например, последовательности SEQ ID NO: 3-9, соответственно). Такие сконструированные мегануклеазы в данной заявке в совокупности называют "мегануклеазами ВГВ 11-12". Примеры мегануклеаз ВГВ 11-12 предложены в последовательностях SEQ ID NO: 34-40.

Сконструированные мегануклеазы согласно настоящему изобретению содержат первую субъединицу, содержащую первый гипервариабельный (HVR1) участок, и вторую субъединицу, содержащую второй гипервариабельный (HVR2) участок. Кроме того, первая субъединица связывается с первым распознаваемым полусайтом в последовательности распознавания (например, полусайтом ВГВ1, ВГВ5, ВГВ7 или ВГВ11), и вторая субъединица, связывается со вторым распознаваемым полусайтом в после-

довательности распознавания (например, полусайтом ВГВ2, ВГВ6, ВГВ8 или ВГВ12). В вариантах реализации, в которых сконструированная мегануклеаза представляет собой одноцепочечную мегануклеазу, первую и вторую субъединицы можно сориентировать таким образом, что первая субъединица, которая содержит участок HVR1 и связывает первый полусайт, расположена как N-концевая субъединица, и вторая субъединица, которая содержит участок HVR2 и связывает второй полусайт, расположена как С-концевая субъединица. В альтернативных вариантах реализации первую и вторую субъединицы можно сориентировать таким образом, что первая субъединица, которая содержит участок HVR1 и связывает первый полусайт, расположена как С-концевая субъединица, и вторая субъединица, которая содержит участок HVR2 и связывает второй полусайт, расположена как N-концевая субъединица. Примеры мегануклеаз ВГВ 1-2 согласно настоящему изобретению предложены в табл. 1. Примеры мегануклеаз ВГВ 5-6 согласно настоящему изобретению предложены в табл. 2. Примеры мегануклеаз ВГВ 7-8 согласно настоящему изобретению предложены в табл. 3. Примеры мегануклеаз ВГВ 11-12 согласно настоящему изобретению предложены в табл. 4.

Таблица 1. Примеры сконструированных мегануклеаз, которые сконструированы, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 1-2 (SEQ ID NO: 10)

| Мегануклеаза  | AK<br>SEQ<br>ID | Остатки<br>субъединицы<br>ВГВ1 | SEQ ID<br>субъединицы<br>ВГВ1 | %<br>субъединицы<br>ВГВ1 | Остатки<br>субъединицы<br>ВГВ2 | SEQ ID<br>субъединицы<br>ВГВ2 | %<br>субъединицы<br>ВГВ2 |
|---------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| ВГВ 1 - 2х.2  | 18              | 7 - 153                        | 40                            | 100                      | 198 - 344                      | 44                            | 100                      |
| ВГВ 1 - 2х.14 | 19              | 7 - 153                        | 41                            | 93,2                     | 198 - 344                      | 45                            | 91,16                    |
| ВГВ 1 - 2х.68 | 20              | 198 - 344                      | 42                            | 93,2                     | 7 - 153                        | 46                            | 91,16                    |
| ВГВ 1 - 2х.93 | 21              | 198 - 344                      | 43                            | 100                      | 7 - 153                        | 47                            | 95,92                    |

\* "% субъединицы ВГВ1" и "% субъединицы ВГВ2" означают идентичность последовательностей аминокислот между участками субъединицы, связывающими ВГВ1 и связывающими ВГВ2, каждой мегануклеазы и участками субъединицы, связывающими ВГВ1 и связывающими ВГВ2, соответственно, мегануклеазы ВГВ 1-2х.2.

Таблица 2. Примеры сконструированных мегануклеаз, которые сконструированы, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 5-6 (SEQ ID NO: 12)

| Мегануклеаза  | AK<br>SEQ<br>ID | Остатки<br>субъединицы<br>ВГВ5 | SEQ ID<br>субъединицы<br>ВГВ5 | %<br>субъединицы<br>ВГВ5 | Остатки<br>субъединицы<br>ВГВ6 | SEQ ID<br>субъединицы<br>ВГВ6 | %<br>субъединицы<br>ВГВ6 |
|---------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| ВГВ 5 - 6х.33 | 22              | 198 - 344                      | 48                            | 100                      | 7 - 153                        | 55                            | 100                      |
| ВГВ 5 - 6х.84 | 23              | 198 - 344                      | 49                            | 93,2                     | 7 - 153                        | 56                            | 92,52                    |
| ВГВ 5 - 6х.90 | 24              | 198 - 344                      | 50                            | 91,84                    | 7 - 153                        | 57                            | 93,2                     |
| ВГВ 5 - 6х.4  | 25              | 7 - 153                        | 51                            | 92,52                    | 198 - 344                      | 58                            | 95,92                    |
| ВГВ 5 - 6х.5  | 26              | 7 - 153                        | 52                            | 92,52                    | 198 - 344                      | 59                            | 93,88                    |
| ВГВ 5 - 6х.68 | 27              | 7 - 153                        | 53                            | 91,16                    | 198 - 344                      | 60                            | 93,88                    |
| ВГВ 5 - 6х.79 | 28              | 7 - 153                        | 54                            | 93,2                     | 198 - 344                      | 61                            | 93,88                    |

\* "% субъединицы ВГВ5" и "% субъединицы ВГВ6" означают идентичность последовательностей аминокислот между участками субъединицы, связывающими ВГВ 5 и связывающими ВГВ6, каждой мегануклеазы и участками субъединицы, связывающими ВГВ5 и связывающими ВГВ6, соответственно, мегануклеазы ВГВ 5-6х.33.

Таблица 3. Примеры сконструированных мегануклеаз, которые сконструированы, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 7-8 (SEQ ID NO: 14)

| Мегануклеаза  | AK<br>SEQ<br>ID | Остатки<br>субъединицы<br>ВГВ7 | SEQ ID<br>субъединицы<br>ВГВ7 | %<br>субъединицы<br>ВГВ7 | Остатки<br>субъединицы<br>ВГВ8 | SEQ ID<br>субъединицы<br>ВГВ8 | %<br>субъединицы<br>ВГВ8 |
|---------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| ВГВ 7 - 8х.2  | 29              | 198 - 344                      | 62                            | 100                      | 7 - 153                        | 66                            | 100                      |
| ВГВ 7 - 8х.9  | 30              | 198 - 344                      | 63                            | 98,64                    | 7 - 153                        | 67                            | 99,32                    |
| ВГВ 7 - 8х.17 | 31              | 198 - 344                      | 64                            | 98,64                    | 7 - 153                        | 68                            | 99,32                    |
| ВГВ 7 - 8х.44 | 32              | 198 - 344                      | 65                            | 96,6                     | 7 - 153                        | 69                            | 99,32                    |

\* "% субъединицы ВГВ7" и "% субъединицы ВГВ8" означают идентичность последовательностей аминокислот между участками субъединицы, связывающими ВГВ7 и связывающими ВГВ8, каждой мегануклеазы и участками субъединицы, связывающими ВГВ7 и связывающими ВГВ8, соответственно, мегануклеазы ВГВ 7-8х.2.

Таблица 4. Примеры сконструированных мегануклеаз, которые сконструированы, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 11-12 (SEQ ID NO: 16)

| Мегануклеаза    | AK SEQ ID | Остатки субъединицы ВГВ11 | SEQ ID субъединицы ВГВ11 | % субъединицы ВГВ11 | Остатки субъединицы ВГВ12 | SEQ ID субъединицы ВГВ12 | % субъединицы ВГВ12 |
|-----------------|-----------|---------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------|
| ВГВ 11 - 12х.26 | 33        | 198 - 344                 | 70                       | 100                 | 7 - 153                   | 77                       | 100                 |
| ВГВ 11 - 12х.9  | 34        | 198 - 344                 | 71                       | 93,2                | 7 - 153                   | 78                       | 93,88               |
| ВГВ 11 - 12х.13 | 35        | 198 - 344                 | 72                       | 93,88               | 7 - 153                   | 79                       | 93,88               |
| ВГВ 11 - 12х.16 | 36        | 198 - 344                 | 73                       | 95,92               | 7 - 153                   | 80                       | 95,92               |
| ВГВ 11 - 12х.27 | 37        | 198 - 344                 | 74                       | 100                 | 7 - 153                   | 81                       | 93,2                |
| ВГВ 11 - 12х.41 | 38        | 198 - 344                 | 75                       | 95,92               | 7 - 153                   | 82                       | 93,2                |
| ВГВ 11 - 12х.48 | 39        | 198 - 344                 | 76                       | 93,88               | 7 - 153                   | 83                       | 93,2                |

\* "% субъединицы ВГВ11" и "% субъединицы ВГВ12" означают идентичность последовательностей аминокислот между участками субъединицы, связывающими ВГВ11 и связывающими ВГВ12, каждой мегануклеазы и участками субъединицы, связывающими ВГВ11 и связывающими ВГВ12, соответственно, мегануклеазы ВГВ 11-12х.26.

### 2.3. Способы доставки и экспрессии эндонуклеаз.

В данной заявке описаны способы лечения инфекции ВГВ или ГЦК у субъекта. Аналогичным образом, предложены способы уменьшения симптомов инфекции ВГВ и уменьшения количества ВГВ, уменьшения скорости пролиферации ВГВ или лечения ГЦК у субъекта, включающие введение фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке (или нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированную мегануклеазу). В способах согласно настоящему изобретению сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке можно доставить и/или экспрессировать с ДНК/РНК в клетках-мишенях, что позволяет снабдить сконструированной мегануклеазой геном ВГВ. Сконструированные мегануклеазы, описанные в данной, заявке можно доставить в клетку в виде белка или, предпочтительно, в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированную мегануклеазу. Такая нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК (например, кольцевую или линейаризованную плазмидную ДНК или продукты ПЦР) или РНК (например, мРНК). В вариантах реализации, в которых последовательность, кодирующую сконструированную мегануклеазу, доставляют в виде ДНК, она должна быть функционально связана с промотором, чтобы вызвать транскрипцию гена нуклеазы. Промоторы млекопитающих, подходящие для настоящего изобретения, включают конститутивные промоторы, такие как ранний промотор цитомегаловируса (ЦМВ) (Thomsen и др. (1984), Proc Natl Acad Sci USA. 81(3):659-63) или ранний промотор SV40 (Benoist и Chambon (1981), Nature. 290(5804):304-10), а также индуцируемые промоторы, такие как индуцируемый тетрациклином промотор (Dingermann и др. (1992), Mol Cell Biol. 12(9):4038-45). Сконструированная мегануклеаза согласно настоящему изобретению также может быть функционально связана с синтетическим промотором. Синтетические промоторы могут включать, без ограничения, промотор JeT (WO 2002/012514). В конкретных вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, может быть функционально связана со специфичным для печени промотором. Примеры специфичных для печени промоторов включают, без ограничения, промотор альфа-1-антитрипсина человека и промотор аполипопротеина А-II.

В конкретных вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну сконструированную мегануклеазу, доставляют в составе конструкции рекомбинантной ДНК или кассеты экспрессии. Например, конструкция рекомбинантной ДНК может содержать кассету экспрессии (т.е. "кассету"), содержащую промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК содержит две или более кассет, при этом каждая кассета содержит промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, и при этом каждая сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, описанной в данной заявке. В конкретных вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК может содержать две кассеты, три кассеты, четыре кассеты или более кассет. Например, кассета или комбинация кассет может кодировать любое количество или любую комбинацию мегануклеазы ВГВ 1-2, мегануклеазы ВГВ 5-6, мегануклеазы ВГВ 7-8 и мегануклеазы ВГВ 11-12. В некоторых вариантах реализации одна кассета может кодировать мегануклеазу ВГВ 1-2, мегануклеазу ВГВ 5-6, мегануклеазу ВГВ 7-8 и мегануклеазу ВГВ 11-12. В другом конкретном варианте реализации кассета или комбинация кассет может кодировать мегануклеазу ВГВ 5-6 и мегануклеазу ВГВ 11-12. В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной ДНК содержит кассету, содержащую промотор и полицистронную последовательность нуклеиновой кислоты, при этом указанный промотор запускает экспрессию в целевой клетке полицистронной последовательности нуклеиновой кислоты с образованием полицистронной мРНК, описанной в данной заявке.

В некоторых вариантах реализации в клетку доставляют мРНК, кодирующую сконструированную мегануклеазу, так как это снижает вероятность того, что ген, кодирующий сконструированную меганук-

леазу, встроится в геном клетки. Такую мРНК, кодирующую сконструированную мегануклеазу, можно получить, применяя способы, известные в данной области, такие как транскрипция *in vitro*. В некоторых вариантах реализации мРНК экспрессирована с применением 7-метилгуанозина. В некоторых вариантах реализации мРНК может быть полиаденилирована. В конкретных вариантах реализации мРНК, кодирующая сконструированную нуклеазу согласно настоящему изобретению, может представлять собой полицистронную мРНК, кодирующую две или более нуклеаз, которые одновременно экспрессируются в клетке. В некоторых вариантах реализации полицистронная мРНК может кодировать две или более мегануклеаз, описанных в данной заявке, которые нацелены на различные последовательности распознавания в геноме ВГВ, так что геном ВГВ разрезается во множестве сайтов. В некоторых вариантах реализации полицистронная мРНК может кодировать две или более мегануклеаз, описанных в данной заявке, и по меньшей мере один дополнительный белок, который вызывает терапевтически полезный эффект в клетке. Полицистронная мРНК согласно настоящему изобретению может содержать любой элемент, известный в данной области как позволяющий трансляцию двух или более генов с одной и той же молекулы мРНК, включая, но не ограничиваясь перечисленными: элемент IRES, элемент T2A, элемент P2A, элемент E2A и элемент F2A. В конкретных вариантах реализации полицистронная мРНК представляет собой бицистронную мРНК, кодирующую две мегануклеазы, описанные в данной заявке, трицистронную мРНК, кодирующую три мегануклеазы, описанные в данной заявке, или тетрацистронную мРНК, кодирующую четыре мегануклеазы, описанные в данной заявке, при этом нуклеазы, кодируемые каждой мРНК, обладают специфичностью к различным последовательностям распознавания в геноме ВГВ. Например, полицистронная мРНК может кодировать любое количество или комбинацию мегануклеазы ВГВ 1-2, мегануклеазы ВГВ 5-6, мегануклеазы ВГВ 7 - 8 и мегануклеазы ВГВ 11-12. В некоторых вариантах реализации полицистронная мРНК может кодировать мегануклеазу ВГВ 1-2, мегануклеазу ВГВ 5-6, мегануклеазу ВГВ 7-8 и мегануклеазу ВГВ 11-12. В другом конкретном варианте реализации полицистронная мРНК может представлять собой бицистронную мРНК, кодирующую мегануклеазу ВГВ 5-6 и мегануклеазу ВГВ 11-12.

В другом конкретном варианте реализации нуклеиновую кислоту, кодирующую эндонуклеазу согласно настоящему изобретению, можно внедрить в клетку, применяя матрицу из одноцепочечной ДНК. Указанная одноцепочечная ДНК может дополнительно содержать 5' и/или 3' инвертированный концевой повтор (ITR) ААВ против хода транскрипции и/или по ходу транскрипции от последовательности, кодирующей сконструированную мегануклеазу. В других вариантах реализации одноцепочечная ДНК может дополнительно содержать 5' и/или 3' плечо гомологии против хода транскрипции и/или по ходу транскрипции от последовательности, кодирующей сконструированную мегануклеазу.

В другом конкретном варианте реализации гены, кодирующие эндонуклеазу согласно настоящему изобретению, можно внедрить в клетку, применяя матрицу из линейаризованной ДНК. В некоторых примерах плазмидную ДНК, кодирующую эндонуклеазу, можно расщепить с помощью одного или более ферментов рестрикции, так что кольцевая плазмидная ДНК линейаризуется перед внедрением в клетку.

Очищенные белки нуклеазы можно доставить в клетки для расщепления геномной ДНК с помощью множества разнообразных механизмов, известных в данной области, включая механизмы, дополнительно подробно описанные ниже в данной заявке.

Целевая(-ые) ткань(-и) для доставки сконструированных мегануклеаз согласно настоящему изобретению включает(-ют), без ограничения: клетки печени, такие как гепатоцит или предпочтительно первичный гепатоцит, более предпочтительно гепатоцит человека или первичный гепатоцит человека, клетку HepG2.2.15 или HepG2-hNTCP. Как уже обсуждалось, мегануклеазы согласно настоящему изобретению можно доставить в виде очищенного белка или в виде РНК или ДНК, кодирующей мегануклеазу. В одном варианте реализации белки мегануклеазы, или мРНК- или ДНК-векторы, кодирующие эндонуклеазы, доставляют в клетки-мишени (например, в клетки печени) путем инъекции непосредственно в целевую ткань. В качестве альтернативы, белок, мРНК или ДНК эндонуклеазы можно доставить системно через кровоток. В некоторых вариантах реализации белки эндонуклеазы, или ДНК/мРНК, кодирующие эндонуклеазы, находятся в составе для системного введения или введения в целевые ткани в фармацевтически приемлемом носителе в соответствии с известными методиками. См., например, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* (21-е изд., 2005). При производстве фармацевтического состава согласно настоящему изобретению, белки/РНК/мРНК обычно смешивают с фармацевтически приемлемым носителем. Носитель, конечно, должен быть приемлемым в смысле совместимости со всеми остальными ингредиентами состава и должен быть не вредным для пациента. Носитель может быть твердым или жидким, или твердым и жидким, и может вместе с указанным соединением входить в однократный состав.

В некоторых вариантах реализации белки эндонуклеазы или ДНК/мРНК, кодирующую эндонуклеазу, соединяют с проникающим в клетку пептидом или нацеливающим лигандом, чтобы способствовать поглощению клеткой. Примеры проникающих в клетку пептидов, известных в данной области, включают полиаргинин (Jearawiriyaipaisarn, и др. (2008) *Mol Ther.* 16:1624-9), пептид ТАТ из вируса ВИЧ (Hudecz и др. (2005), *Med. Res. Rev.* 25:679-736), MPG (Simeoni, и др. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2717-2724), Pep-1 (Deshayes и др. (2004) *Biochemistry* 43:7698-7706) и HSV-1 VP-22 (Deshayes и др. (2005) *Cell*

Mol Life Sci. 62:1839-49). В альтернативном варианте реализации белки эндонуклеазы, или ДНК/мРНК, кодирующую эндонуклеазу, соединяют ковалентно или нековалентно с антителом, которое распознает специфичный рецептор клеточной поверхности, экспрессированный на клетках-мишенях, так что белок/ДНК/мРНК эндонуклеазы связывается с ним и проникает внутрь клеток-мишеней. В качестве альтернативы, белок/ДНК/мРНК эндонуклеазы можно соединить ковалентно или нековалентно с природным лигандом (или частью природного лиганда) для такого рецептора клеточной поверхности. (McCall, и др. (2014) *Tissue Barriers*. 2(4):e944449; Dinda, и др. (2013) *Curr Pharm Biotechnol*. 14:1264-74; Kang, и др. (2014) *Curr Pharm Biotechnol*. 15(3):220-30; Qian и др. (2014) *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 10(11):1491-508).

В некоторых вариантах реализации белки эндонуклеазы, или ДНК/мРНК, кодирующие эндонуклеазы, заключают (инкапсулируют) в биоразлагаемые гидрогели для инъекции или имплантации внутрь желательной области печени (например, вблизи от эндотелиальных клеток синусоидных капилляров печени или гематопозитических эндотелиальных клеток, или клеток-предшественников, которые дифференцируются в них). Гидрогели могут обеспечить продолжительное и регулируемое высвобождение терапевтической нагрузки в желательную область целевой ткани без необходимости частых инъекций, и чувствительные к стимулам материалы (например, чувствительные к температуре и pH гидрогели) можно разработать таким образом, чтобы они высвобождали нагрузку в ответ на сигналы окружающей среды или действующие извне сигналы (Kang Derwent и др. (2008) *Trans Am Ophthalmol Soc*. 106:206-214). В некоторых вариантах реализации белки эндонуклеазы, или ДНК/мРНК, кодирующие эндонуклеазы, соединяют ковалентно или, предпочтительно, нековалентно с наночастицей или инкапсулируют внутри такой наночастицы, применяя способы, известные в данной области (Sharma, и др. (2014) *Biomed Res Int*. 2014). Наночастица представляет собой наноразмерную систему доставки, линейный масштаб которой составляет <1 мкм, предпочтительно <100 нм. Такие наночастицы можно разработать, используя сердцевину, состоящую из металла, липида, полимера или биологической макромолекулы, и множество копий белков, мРНК или ДНК эндонуклеазы можно присоединить или инкапсулировать в указанную сердцевину наночастицы. Это увеличивает число копий белка/мРНК/ДНК, которые доставляют в каждую клетку и, следовательно, увеличивает внутриклеточную экспрессию каждой эндонуклеазы, чтобы максимизировать вероятность того, что целевые последовательности распознавания будут разрезаны. Поверхность такой наночастицы можно дополнительно модифицировать полимерами или липидами (например, хитозаном, катионными полимерами или катионными липидами) с получением наночастицы с сердцевиной и оболочкой, поверхность которой содержит дополнительные функциональные группы для улучшения доставки в клетку и поглощения нагрузки (Jian и др. (2012) *Biomaterials*. 33(30):7621-30). Наночастицы можно дополнительно успешно соединить с нацеливающими молекулами, чтобы направить наночастицу на подходящий тип клеток и/или повысить вероятность поглощения клеткой. Примеры таких нацеливающих молекул включают антитела, специфичные к рецепторам на поверхности клеток, и природные лиганды (или части природных лигандов) для рецепторов на поверхности клеток.

В некоторых вариантах реализации белки эндонуклеазы или ДНК/мРНК, кодирующие эндонуклеазы, инкапсулированы в липосомы или находятся в комплексе с катионными липидами (например, с реагентом для трансфекции липофектаминоном, Life Technologies Corp., Карлсбад, Калифорния; Zuris и др. (2015) *Nat Biotechnol*. 33:73-80; Mishra и др. (2011) *J Drug Deliv*. 2011:863734). Липосома и липоплексные составы могут защитить нагрузку от разрушения, увеличить накопление и задерживание в целевой области и способствовать поглощению клетками и эффективности доставки посредством слияния с клеточными мембранами и/или разрыва клеточных мембран клеток-мишеней.

В некоторых вариантах реализации белки эндонуклеазы, или ДНК/мРНК, кодирующие эндонуклеазы, инкапсулированы в полимерные каркасы (например, сополимер молочной и гликолевой кислот (ПЛГА)) или образуют комплексы с катионными полимерами (например, полиэтиленимином (ПЭИ), поли-L-лизинном (ПЛИ)) (Tamboli и др. (2011) *Ther Deliv*. 2(4):523-536). Полимерные носители могут быть разработаны таким образом, чтобы они позволяли регулируемые скорости высвобождения лекарственных средств посредством контроля разрушения полимера и диффузии лекарственного средства, и высокие эффективности инкапсулирования лекарственного средства могут обеспечить защиту терапевтической нагрузки до момента внутриклеточной доставки в желательную популяцию целевых клеток. В некоторых вариантах реализации белки эндонуклеазы, или ДНК/мРНК, кодирующие сконструированные мегануклеазы, комбинируют с амфифильными молекулами, которые самособираются в мицеллы (Tong и др. (2007) *J Gene Med*. 9(11):956-66). Полимерные мицеллы могут содержать мицеллярную оболочку, образованную вместе с гидрофильным полимером (например, полиэтиленгликолем), который может предотвратить агрегацию, экранировать зарядовые взаимодействия и уменьшить неспецифические взаимодействия.

В некоторых вариантах реализации белки эндонуклеазы, или ДНК/мРНК, кодирующие эндонуклеазу, находятся в форме эмульсии или наноэмульсии (т.е. со средним диаметром частиц <1 нм) для введения и/или доставки в целевую клетку. Термин "эмульсия" относится, без ограничения, к любым дисперсиям или каплям типа масло в воде, типа вода в масле, типа вода в масле или типа масло в воде в масле, содержащим липидные структуры, которые могут образоваться под действием гидрофобных сил,

которые уводят неполярные остатки (например, длинные углеводородные цепи) от воды, а полярные головки - к воде, когда несмешиваемую с водой фазу смешивают с водной фазой. Данные другие липидные структуры включают, но не ограничиваются перечисленными: моноламеллярные, олиголамеллярные и мультиламеллярные липидные везикулы, мицеллы и ламеллярные фазы. Эмульсии состоят из водной фазы и липофильной фазы (обычно содержащей масло и органический растворитель). Эмульсии также часто содержат одно или более поверхностно-активных веществ. Наноэмульсионные составы хорошо известны, например, описанные в заявках на патент США № 2002/0045667 и 2004/0043041 и патентах США № 6015832, 6506803, 6635676 и 6559189, каждый из которых полностью включен в данную заявку посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации белки эндонуклеазы, или ДНК/мРНК, кодирующие эндонуклеазы, ковалентно присоединены или нековалентно связаны с многофункциональными полимерными конъюгатами, дендримерами ДНК и полимерными дендримерами (Mastorakos и др. (2015) *Nanoscale*. 7(9):3845-56; Cheng и др. (2008) *J Pharm Sci*. 97(1):123-43). Образование дендримера может контролировать емкость и размер нагрузки и может обеспечить высокую емкость нагрузки лекарственного средства. Более того, можно воздействовать на выставление множества поверхностных групп для повышения стабильности, уменьшения неспецифических взаимодействий и повышения специфического нацеливания на клетку и высвобождения лекарственного средства.

В некоторых вариантах реализации гены, кодирующие эндонуклеазу, доставляют, применяя вирусный вектор. Такие векторы известны в данной области и включают ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированного вируса (ААВ) (рассмотренные в Vannucci, и др. (2013) *New Microbiol*. 36:1-22). В некоторых вариантах реализации вирусные векторы вводят путем инъекции непосредственно в целевые ткани (например, в ткань печени). В альтернативных вариантах реализации вирусные векторы доставляют системно через кровоток. В данной области известно, что различные ААВ-векторы имеют тенденцию к локализации в различных тканях. В целевых тканях печени была показана эффективная трансдукция гепатоцитов, например, вирусом ААВ серотипов 2, 8 и 9 (Sands (2011) *Methods Mol. Biol*. 807:141-157). ААВ-векторы также могут быть самокомплементарны, так что для них не требуется синтез второй цепи ДНК в клетке-хозяине (McCarty, и др. (2001) *Gene Ther*. 8:1248-54).

В одном варианте реализации вирусный вектор, который применяют для доставки гена эндонуклеазы, представляет собой самоограничивающийся вирусный вектор. У самоограничивающегося вирусного вектора может быть ограниченное время сохранения в клетке или организме благодаря присутствию последовательности распознавания для сконструированной мегануклеазы внутри вектора. Таким образом, можно сконструировать самоограничивающийся вирусный вектор, чтобы он кодировал промотор, эндонуклеазу, описанную в данной заявке, и сайт распознавания эндонуклеазой внутри ITR. Самоограничивающийся вирусный вектор доставляет ген эндонуклеазы в клетку, ткань или организм, так что эндонуклеаза экспрессируется и способна разрезать геном клетки в эндогенной последовательности распознавания внутри генома. Доставленная эндонуклеаза также найдет целевой сайт внутри самого самоограничивающегося вирусного вектора и разрежет вектор в целевом сайте. После разреза 5'- и 3'-концы вирусного генома будут обнажены и разрушатся экзонуклеазами, таким образом уничтожив вирус и прекратив продукцию эндонуклеазы. Если гены эндонуклеазы доставляют в виде ДНК (например, плазмиды) и/или посредством вирусного вектора (например, ААВ), то они должны быть функционально связаны с промотором. В некоторых вариантах реализации это может быть вирусный промотор, такой как эндогенные промоторы из вирусного вектора (например, LTR из лентивирусного вектора) или хорошо известные ранние промоторы цитомегаловируса или вируса SV40. В предпочтительном варианте реализации гены мегануклеаз функционально связаны с промотором, который запускает экспрессию генов преимущественно в клетках-мишенях. Примеры специфичных для печени промоторов включают, без ограничения, промотор альфа-1-антитрипсина человека и промотор аполипопротеина А-II.

В конкретных вариантах реализации вирусный вектор содержит кассету, содержащую промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке. Указанный вирусный вектор также может содержать две или более кассет, при этом каждая кассета содержит промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, и при этом каждая сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, описанной в данной заявке. В некоторых вариантах реализации вирусный вектор содержит одну кассету, содержащую промотор и полицистронную последовательность нуклеиновой кислоты, при этом указанный промотор запускает экспрессию полицистронной последовательности нуклеиновой кислоты с образованием полицистронной мРНК, такой как полицистронная мРНК, кодирующая сконструированную мегануклеазу, описанную в данной заявке, в целевой клетке.

Предложены способы и композиции для доставки мегануклеазы, описанной в данной заявке, в печень субъекта, инфицированного ВГВ. В одном варианте реализации нативные гепатоциты, которые были удалены из млекопитающего, можно трансдуцировать вектором, который кодирует сконструированную мегануклеазу. В качестве альтернативы, нативные гепатоциты из инфицированного ВГВ субъекта

можно трансдуцировать *ex vivo* аденовирусным вектором, который кодирует сконструированную мегануклеазу и/или молекулу, которая стимулирует регенерацию печени, такую как гепатотоксин. Предпочтительно гепатотоксин представляет собой активатор плазминогена урокиназного типа (uPA), и его модифицировали, чтобы ингибировать его секрецию из гепатоцита после экспрессии вирусным вектором. В другом варианте реализации указанный вектор кодирует активатор плазминогена тканевого типа (tPA), который может стимулировать регенерацию гепатоцитов *de novo*. Трансдуцированные гепатоциты, которые были удалены из млекопитающего, затем можно возвратить в млекопитающего, в котором созданы условия, которые благоприятны для экспрессии сконструированной мегануклеазы. Как правило, трансдуцированные гепатоциты можно возвратить в пациента путем инфузии через селезенку или портальную сосудистую сеть, и можно осуществить однократное или многократное введение в течение периода от 1 до 5 или более дней. В *in vivo* аспекте способов согласно настоящему изобретению конструируют ретровирусный, псевдотипный или ассоциированный с аденовирусом вектор, который кодирует сконструированную мегануклеазу, и вводят его субъекту. Введение вектора, кодирующего сконструированную мегануклеазу, можно осуществлять вместе с введением аденовирусного вектора, который кодирует не способный к секреции гепатотоксин или кодирует tPA, который стимулирует регенерацию гепатоцитов, не действуя как гепатотоксин.

Подходящие дозы будут зависеть, среди прочих факторов, от особенностей каждого выбранного ААВ-вектора (например, серотипа и т.д.), от пути введения, от субъекта, которого лечат (т.е. возраста, массы тела, пола и общего состояния субъекта), и способа введения. Таким образом, подходящая дозировка может изменяться от пациента к пациенту. Подходящее эффективное количество может легко определить специалист в данной области. Режим введения доз может представлять собой график введения одной дозы или график введения множества доз. Более того, субъекту можно вводить так много доз, сколько необходимо. Специалист в данной области может легко определить подходящее количество доз. Может потребоваться изменить дозировку, чтобы учесть альтернативный путь введения или уравновесить терапевтическую пользу и какие-либо побочные действия.

#### 2.4. Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах реализации согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, или фармацевтически приемлемый носитель и выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению. В других вариантах реализации согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и клетку согласно настоящему изобретению, которую можно доставить в целевую ткань, где указанная клетка экспрессирует сконструированную мегануклеазу, как описано в данной заявке. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть полезны для лечения субъекта, страдающего ВГВ, снижения уровня или пролиферации ВГВ, уменьшения по меньшей мере одного симптома ВГВ или лечения ГЦК.

Фармацевтические композиции можно разработать или выбрать в соответствии с генотипом целевого штамма ВГВ. Как было подробно описано в данной заявке, мегануклеазы согласно настоящему изобретению были сконструированы, чтобы распознавать и расщеплять последовательности распознавания в конкретных генотипах ВГВ. Например, мегануклеазы ВГВ 1-2 (например, последовательности SEQ ID NO: 18 - 21), распознают и расщепляют последовательность распознавания ВГВ 1-2, которая находится в геноме по меньшей мере генотипов ВГВ А, В, С, Е, F и G (например, последовательности SEQ ID NO: 3-5 и 7-9, соответственно). Кроме того, последовательности распознавания указанных сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, можно найти в изолятах генотипов ВГВ А, В, С, D, Е, F и G, которые не идентичны на 100% последовательностям соответствующих примеров генотипов, представленных в последовательностях SEQ ID NO: 3-9. В данной заявке последовательности "изолятов" ВГВ могут быть по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или более идентичны соответствующему примеру генотипа, представленному в любой из последовательностей SEQ ID NO: 3-9. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции, описанные в данной заявке, можно вводить субъекту, содержащему любой генотип ВГВ, содержащий последовательность распознавания, представленную в SEQ ID NO: 10, 12, 14 или 16.

Такие фармацевтические композиции можно получить в соответствии с известными методиками. См., например, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* (21-е изд., 2005). При производстве фармацевтического состава согласно настоящему изобретению полипептиды эндонуклеаз (или ДНК/РНК, кодирующие их) обычно смешивают с фармацевтически приемлемым носителем и полученную в результате этого композицию вводят субъекту. Носитель, разумеется, должен быть приемлемым в смысле совместимости с любыми другими ингредиентами в составе и должен быть не вреден субъекту. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать один или более дополнительных агентов или биологических молекул, полезных для лечения заболевания у субъекта. Аналогичным образом, дополнительный(-е) агент(ы) и/или биоло-

гическую(-ие) молекулу(-ы) можно вводить совместно в виде отдельной композиции.

В конкретных вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать комбинации указанных сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке (или нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные мегануклеазы), при этом каждая сконструированная мегануклеаза обладает специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, так что одна фармацевтическая композиция полезна для лечения широкого спектра генотипов и/или изолятов генотипов ВГВ у субъекта. Аналогичным образом, в других вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать полицистронные мРНК (или конструкции рекомбинантных ДНК, или вирусные векторы, содержащие кассеты, которые, когда они экспрессируются, продуцируют полицистронные мРНК), которые кодируют множество сконструированных мегануклеаз, описанных в данной заявке, обладающих специфичностью к различным последовательностям распознавания ВГВ. Такие фармацевтические композиции также полезны для лечения широкого спектра генотипов и/или изолятов генотипов ВГВ у субъекта. В любом случае, такие фармацевтические композиции могут быть полезны в качестве монотерапии, когда конкретный генотип или изолят ВГВ у субъекта известен или неизвестен.

Например, фармацевтические композиции, содержащие множество различных рекомбинантных мегануклеаз, описанных в данной заявке, или содержащие нуклеиновые молекулы, кодирующие множество различных рекомбинантных мегануклеаз, описанных в данной заявке, можно вводить пациенту, инфицированному множеством генотипов ВГВ или инфицированному неизвестными генотипами ВГВ. Соответственно, предоставление фармацевтических композиций с множеством различных рекомбинантных мегануклеаз или содержащих нуклеиновые молекулы, кодирующие множество различных рекомбинантных мегануклеаз, дает возможность гибкого выбора для лечения и контроля инфекции ВГВ, когда ресурсы не позволяют точное генотипирование ВГВ и когда желательны быстрые способы лечения широкого спектра.

В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция может содержать одну или более мРНК, описанных в данной заявке, инкапсулированных внутри липидных наночастиц, которые описаны в других местах в данной заявке. В конкретных вариантах реализации липидные наночастицы могут содержать две или более мРНК, описанных в данной заявке, каждая из которых кодирует сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, обладающую специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ, описанной в данной заявке. В конкретных вариантах реализации липидные наночастицы могут содержать две, три или четыре мРНК, описанных в данной заявке, каждая из которых кодирует сконструированную мегануклеазу согласно настоящему изобретению, обладающую специфичностью к отличной последовательности распознавания ВГВ. В других вариантах реализации липидные наночастицы могут содержать одну или более полицистронных мРНК, описанных в данной заявке, при этом каждая полицистронная мРНК кодирует две или более сконструированных мегануклеаз согласно настоящему изобретению, обладающих специфичностью к различным последовательностям распознавания ВГВ, описанным в данной заявке. В конкретных вариантах реализации липидные наночастицы могут содержать полицистронную мРНК, кодирующую две, три или четыре сконструированные мегануклеазы, описанные в данной заявке. В других конкретных вариантах реализации липидные наночастицы могут содержать две или более полицистронных мРНК, описанных в данной заявке, каждая из которых кодирует две или более сконструированных мегануклеаз согласно настоящему изобретению. Некоторые липидные наночастицы, предназначенные для применения в настоящем изобретении, содержат по меньшей мере один катионный липид, по меньшей мере один некатионный липид и по меньшей мере один конъюгированный липид. В более конкретных примерах липидные наночастицы могут содержать от приблизительно 50 мольных % до приблизительно 85 мольных % катионного липида, от приблизительно 13 мольных % до приблизительно 49,5 мольных % некатионного липида и от приблизительно 0,5 мольных % до приблизительно 10 мольных % липидного конъюгата и быть получены таким образом, чтобы у них была неламеллярная (т.е. небислойная) структура. В других конкретных примерах липидные наночастицы могут содержать от приблизительно 40 мольных % до приблизительно 85 мольных % катионного липида, от приблизительно 13 мольных % до приблизительно 49,5 мольных % некатионного липида и от приблизительно 0,5 мольных % до приблизительно 10 мольных % липидного конъюгата и быть получены таким образом, чтобы у них была неламеллярная (т.е. небислойная) структура.

Катионные липиды могут включать, например, один или более из следующих: пальмитоил-олеоил-нораргинин (PONA), MPDACA, GUADACA, (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-гептатриаконта-6, 9, 28, 31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), LenMC3, CP-LenMC3,  $\gamma$ -LenMC3, CP- $\gamma$ -LenMC3, MC3MC, MC2MC, эфир MC3, эфир MC4, амид MC3, Pan-MC3, Rap-MC4 и Rap-MC5, 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA), 2,2-дилинолеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксолан (DLin-K-C2-DMA; "ХТC2"), 2,2-дилинолеил-4-(3-диметиламинопропил)-[1,3]-диоксолан (DLin-K-C3-DMA), 2,2-дилинолеил-4-(4-диметиламинобутил)-[1,3]-диоксолан (DLin-K-C4-DMA), 2,2-дилинолеил-5-диметиламинометил-[1,3]-диоксан (DLin-K6-DMA), 2,2-дилинолеил-4-N-метилпепиразино-[1,3]-диоксолан (DLin-K-MPZ), 2,2-дилинолеил-4-

диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлористую соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропан (DLin-TMA.Cl), хлористую соль 1,2-дилинолеил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ), 3-(М,М-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), N,N-диолеил-N,N-диметилхлорид аммония (DODAC), 1,2-диолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DODMA), 1,2-дистеарилокси-N,N-диметиламинопропан (DSDMA), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид (DOTMA), N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония бромид (DDAB), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид (DOTAP), 3-(N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил)холестерин (DC-Choi), N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксэтиламмония бромид (DMRIE), 2,3-диолеилокси-N-[2(спермин-карбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаммония трифторацетат (DOSPA), диоктадециламидоглицерил спермин (DOGS), 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис,цис-9,12-октадекадиенокси)пропан (CLinDMA), 2-[5'-(холест-5-ен-3-бета-окси)-3'-осапентокси]-3-диметил-1-(цис,цис-9', 1-2'-октадекадиенокси)пропан (CpLinDMA), N,N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин (DMOBA), 1,2-N,N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан (DLincarbDAP) или их смеси. Катионный липид также может представлять собой DLinDMA, DLin-K-C2-DMA ("XTC2"), MC3, LenMC3, CP-LenMC3,  $\gamma$ -LenMC3, CP- $\gamma$ -LenMC3, MC3MC, MC2MC, эфир MC3, эфир MC4, амид MC3, Pan-MC3, Pan-MC4, Pan MC5 или их смеси.

В различных вариантах реализации катионный липид может составлять от приблизительно 50 мольных % до приблизительно 90 мольных %, от приблизительно 50 мольных % до приблизительно 85 мольных %, от приблизительно 50 мольных % до приблизительно 80 мольных %, от приблизительно 50 мольных % до приблизительно 75 мольных %, от приблизительно 50 мольных % до приблизительно 70 мольных %, от приблизительно 50 мольных % до приблизительно 65 мольных % или от приблизительно 50 мольных % до приблизительно 60 мольных % общего количества липидов, присутствующих в указанной частице.

В других вариантах реализации катионный липид может составлять от приблизительно 40 мольных % до приблизительно 90 мольных %, от приблизительно 40 мольных % до приблизительно 85 мольных %, от приблизительно 40 мольных % до приблизительно 80 мольных %, от приблизительно 40 мольных % до приблизительно 75 мольных %, от приблизительно 40 мольных % до приблизительно 70 мольных %, от приблизительно 40 мольных % до приблизительно 65 мольных % или от приблизительно 40 мольных % до приблизительно 60 мольных % общего количества липидов, присутствующих в указанной частице.

Некатионный липид может включать, например, один или более анионных липидов и/или нейтральных липидов. В предпочтительных вариантах реализации некатионный липид включает один из следующих нейтральных липидных компонентов: (1) холестерин или его производное; (2) фосфолипид или (3) смесь фосфолипида и холестерина, или их производное. Примеры производных холестерина включают, но не ограничены перечисленными: холестеранол, холестеранон, холестеренон, копростанол, холестерил-2'-гидроксэтиловый эфир, холестерил-4'-гидроксibuтиловый эфир и их смеси. Фосфолипид может представлять собой нейтральный липид включая, но не ограничиваясь перечисленными: дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеилфосфатидилэтанолламин (POPE), пальмитоилолеилфосфатидилглицерин (POPG), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), монометилфосфатидилэтанолламин, диметилфосфатидилэтанолламин, диэлаидоил-фосфатидилэтанолламин (DEPE), стеароилолеилфосфатидилэтанолламин (SOPE), яичный фосфатидилхолин (EPC) и их смеси. В некоторых предпочтительных вариантах реализации фосфолипид представляет собой DPPC, DSPC или их смеси. В некоторых вариантах реализации некатионный липид (например, один или более из фосфолипидов и/или холестерина) может составлять от приблизительно 10 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 15 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 20 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 25 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 30 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 10 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 15 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 20 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 25 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 30 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 13 мольных % до приблизительно 50 мольных %, от приблизительно 15 мольных % до приблизительно 50 мольных % или от приблизительно 20 мольных % до приблизительно

50 мольных % общего количества липидов, присутствующих в указанной частице. Если некатионный липид представляет собой смесь фосфолипида и холестерина или производного холестерина, то указанная смесь может содержать до приблизительно 40, 50 или 60 мольных % общего количества липидов, присутствующих в указанной частице.

Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц, может включать, например, один или более из следующих липидов: конъюгат полиэтиленгликоль (ПЭГ)-липид, конъюгат полиамид-(АТТА)-липид, конъюгаты катионный полимер-липид (КПЛ) или их смеси. В одном предпочтительном варианте реализации частицы нуклеиновая кислота-липид включают либо конъюгат ПЭГ-липид, либо конъюгат АТТА-липид. В некоторых вариантах реализации конъюгат ПЭГ-липид или конъюгат АТТА-липид применяют вместе с КПЛ. Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц, может включать ПЭГ-липид, включая, например, ПЭГ-диацилглицерин (ДАТ), ПЭГ-диалкилоксипропил (DAA), ПЭГ-фосфолипид, ПЭГ-церамид (Цер) или их смеси. Конъюгат ПЭГ-DAA может представлять собой ПЭГ-дилаурилоксипропил (C12), ПЭГ-димиристилоксипропил (C14), ПЭГ-дипальмитилоксипропил (C16), ПЭГ-дистеарилоксипропил (C18) или их смеси.

Дополнительные конъюгаты ПЭГ-липиды, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются м-ПЭГ-2000-1,2-ди-О-алкил-sn3-карбомоилглицеридом (ПЭГ-C-DOMG). Синтез ПЭГ-C-DOMG описан в заявке РСТ № РСТ/US08/88676. Еще дополнительные конъюгаты ПЭГ-липид, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают, без ограничения: 1-[8'-(1,2-димиристоил-3-пропанокси)-карбоксамидо-3',6'-диоксоактанол]карбамоил-ω-метил-полиэтиленгликоль (2KPEG-DMG). Синтез 2KPEG-DMG описан в патенте США номер 7404969.

В некоторых случаях конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц (например, конъюгат ПЭГ-липид), может составлять от приблизительно 0,1 мольных % до приблизительно 2 мольных %, от приблизительно 0,5 мольных % до приблизительно 2 мольных %, от приблизительно 1 мольных % до приблизительно 2 мольных %, от приблизительно 0,6 мольных % до приблизительно 1,9 мольных %, от приблизительно 0,7 мольных % до приблизительно 1,8 мольных %, от приблизительно 0,8 мольных % до приблизительно 1,7 мольных %, от приблизительно 1 мольных % до приблизительно 1,8 мольных %, от приблизительно 1,2 мольных % до приблизительно 1,8 мольных %, от приблизительно 1,2 мольных % до приблизительно 1,7 мольных %, от приблизительно 1,3 мольных % до приблизительно 1,6 мольных %, от приблизительно 1,4 мольных % до приблизительно 1,5 мольных % или приблизительно 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 мольных % (или любую их дробную часть или диапазон) от общего количества липидов, присутствующих в указанной частице. Обычно, в таких случаях средняя молекулярная масса молекулы ПЭГ составляет приблизительно 2000 дальтон. В других случаях конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц (например, конъюгат ПЭГ-липид), может составлять от приблизительно 5,0 мольных % до приблизительно 10 мольных %, от приблизительно 5 мольных % до приблизительно 9 мольных %, от приблизительно 5 мольных % до приблизительно 8 мольных %, от приблизительно 6 мольных % до приблизительно 9 мольных %, от приблизительно 6 мольных % до приблизительно 8 мольных % или приблизительно 5 мольных %, 6 мольных %, 7 мольных %, 8 мольных %, 9 мольных % или 10 мольных % (или любую их дробную часть или диапазон) от общего количества липидов, присутствующих в указанной частице. Обычно, в таких случаях средняя молекулярная масса молекулы ПЭГ составляет приблизительно 750 дальтон.

В других вариантах реализации композиция может содержать амфотерные липосомы, которые содержат по меньшей мере один носитель с положительным зарядом и по меньшей мере один носитель с отрицательным зарядом, который отличается от носителя с положительным зарядом, изоэлектрическая точка указанных липосом находится между 4 и 8. Данная цель достигается благодаря тому факту, что липосомы получены с pH-зависимым, изменяющимся зарядом.

Липосомальные структуры с желательными свойствами образуются, например, когда количество образующих мембрану или основанных на мембранах носителей с катионным зарядом превышает количество носителей с анионным зарядом при низком pH, и данное соотношение меняется на противоположное при более высоком pH. Это происходит всегда, когда значение pKa ионизируемых компонентов составляет от 4 до 9. По мере того как pH среды уменьшается, все носители с катионным зарядом становятся более заряженными и все носители с анионным зарядом теряют свой заряд. Катионные соединения, пригодные для амфотерных липосом, включают такие катионные соединения, которые были описаны выше в данной заявке. Без ограничения, сильно катионные соединения могут включать, например: DC-Choi 3-P-[N-(N',N'-диметилметан)карбамоил]холестерин, TC-Chol 3-P-[N-(N',N',N'-триметиламиноэтан)карбамоил]холестерин, BGSC бис-гуанидиний-спермидин-холестерин, BGTC (бис-гуанидиний-тренин-холестерин), DOTAP (1,2-диолеилоксипропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид, DOSPER (1,3-диолеилокси-2-(6-карбоксиспермил)-пропиламид, DOTMA (1,2-диолеилоксипропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид) (Липофектин®), DORIE ((1,2-диолеилоксипропил)-3-диметилгидроксиэтиламмония бромид), DOSC (1,2-диолеоил-3-сукцинил-sn-глицерилхолиновый сложный эфир), DOGSDSO (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-сукцинил-2-гидроксиэтилдисульфидорнитин), DDAB (диметилдиоктадециламмония бромид), DOGS ((C18)2GlySper3+) N,N-диоктадециламидогликоль-

спермин (Трансфектам®) (C18)2Gly+ (N,N-диоктадециламидоглицин), СТАВ (цетилтриметиламмония бромид), СруС (цетилпиридиния хлорид), DOEPC (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин) или другие О-алкилфосфатидилхолин или этаноламины, амиды из лизина, аргинина или орнитина и фосфатидилэтаноламин.

Примеры слабокатионных соединений включают, без ограничения: His-Chol (гистаминилхолестерина гемисукцинат), Mo-Chol (морфолин-N-этиламинохолестерина гемисукцинат) или гистидинил-PE.

Примеры нейтральных соединений включают, без ограничения: холестерин, церамиды, фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, тетраэфирные липиды или диацилглицерины.

Анионные соединения, пригодные для амфотерных липосом, включают такие некатионные соединения, которые были ранее описаны в данной заявке. Без ограничения, примеры слабоанионных соединений могут включать: CHEMS (холестерина гемисукцинат), алкилкарбоновые кислоты с 8-25 атомами углерода или диацилглицерина гемисукцинат. Дополнительные слабоанионные соединения могут включать амиды аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты и PE, а также PS и его амиды с глицином, аланином, глутамином, аспарагином, серином, цистеином, треонином, тирозином, глутаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой или другими аминокислотами или аминокислотными кислотами. Согласно тому же принципу, эфиры гидроксикарбоновых кислот или гидроксидикарбоновых кислот и PS также представляют собой слабоанионные соединения.

В некоторых вариантах реализации амфотерные липосомы могут содержать конъюгированный липид, такой как описанные выше в данной заявке. Конкретные примеры полезных конъюгированных липидов включают, без ограничения, модифицированные ПЭГ фосфатидилэтаноламин и фосфатидную кислоту, конъюгаты ПЭГ-церамид (например, ПЭГ-CerC14 или ПЭГ-CerC20), модифицированные ПЭГ диалкиламины и модифицированные ПЭГ 1,2-диацилоксипропан-3-амины. Особенно предпочтительны модифицированные ПЭГ диацилглицерины и диалкилглицерины. В некоторых вариантах реализации нейтральные липиды могут составлять от приблизительно 10 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 15 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 20 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 25 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 30 мольных % до приблизительно 60 мольных %, от приблизительно 10 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 15 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 20 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 25 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 30 мольных % до приблизительно 55 мольных %, от приблизительно 13 мольных % до приблизительно 50 мольных %, от приблизительно 15 мольных % до приблизительно 50 мольных % или от приблизительно 20 мольных % до приблизительно 50 мольных % от общего количества липидов, присутствующих в указанной частице.

В некоторых случаях конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц (например, конъюгат ПЭГ-липид), может составлять от приблизительно 0,1 мольных % до приблизительно 2 мольных %, от приблизительно 0,5 мольных % до приблизительно 2 мольных %, от приблизительно 1 мольных % до приблизительно 2 мольных %, от приблизительно 0,6 мольных % до приблизительно 1,9 мольных %, от приблизительно 0,7 мольных % до приблизительно 1,8 мольных %, от приблизительно 0,8 мольных % до приблизительно 1,7 мольных %, от приблизительно 1 мольных % до приблизительно 1,8 мольных %, от приблизительно 1,2 мольных % до приблизительно 1,8 мольных %, от приблизительно 1,2 мольных % до приблизительно 1,7 мольных %, от приблизительно 1,3 мольных % до приблизительно 1,6 мольных %, от приблизительно 1,4 мольных % до приблизительно 1,5 мольных % или приблизительно 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 мольных % (или любую их дробную часть или диапазон) от общего количества липидов, присутствующих в указанной частице. Обычно, в таких случаях средняя молекулярная масса молекулы ПЭГ составляет приблизительно 2000 дальтон. В других случаях конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц (например, конъюгат ПЭГ-липид), может составлять от приблизительно 5,0 мольных % до приблизительно 10 мольных %, от приблизительно 5 мольных % до приблизительно 9 мольных %, от приблизительно 5 мольных % до приблизительно 8 мольных %, от приблизительно 6 мольных % до приблизительно 9 мольных %, от приблизительно 6 мольных % до приблизительно 8 мольных % или приблизительно 5 мольных %, 6 мольных %, 7 мольных %, 8 мольных %, 9 мольных % или 10 мольных % (или любую их дробную часть или диапазон) от общего количества липидов, присутствующих в указанной частице. Обычно, в таких случаях средняя молекулярная масса молекулы ПЭГ составляет приблизительно 750 дальтон.

Учитывая общее количество нейтральных и конъюгированных липидов, оставшийся баланс амфотерной липосомы может составлять смесь катионных соединений и анионных соединений, составленную в различных соотношениях. Соотношение катионных к анионным липидам можно выбрать, чтобы добиться желательных свойств инкапсулирования нуклеиновой кислоты, дзета-потенциала, рКа или другого физико-химического свойства, которое по меньшей мере отчасти зависит от присутствия заряженных липидных компонентов.

В некоторых вариантах реализации у указанных липидных наночастиц такой состав, который специфично повышает доставку и всасывание в печени и, в частности, внутри гепатоцитов.

## 2.5. Способы получения рекомбинантных ААВ-векторов.

В некоторых вариантах реализации согласно настоящему изобретению предложены рекомбинантные ААВ-векторы для применения в способах согласно настоящему изобретению. Рекомбинантные ААВ-векторы обычно получают в линиях клеток млекопитающих, таких как НЕК-293. Так как гены вируса сар и гер удаляют из указанного вектора, чтобы предотвратить его саморепликацию и чтобы освободить место для терапевтического гена(-ов), который(-е) необходимо доставить (например, гена эндонуклеазы), необходимо это сделать *in trans* в пакующей линии клеток. Кроме того, необходимо предоставить "вспомогательные" (например, аденовирусные) компоненты, необходимые для поддержания репликации (Cots D, Bosch A, Chillon M (2013) *Curr. Gene Ther.* 13(5): 370-81). Часто рекомбинантные ААВ-векторы получают, применяя тройную трансфекцию, при которой линию клеток трансфицируют первой плазмидой, кодирующей "вспомогательные" компоненты, второй плазмидой, содержащей гены сар и гер, и третьей плазмидой, содержащей вирусные ITR, между которыми находится последовательность ДНК, которую нужно упаковать в вирус. Вирусные частицы, содержащие геном (ITR и находящийся(-еся) между ними интересующий(-е) ген(ы)), заключенный в капсид, затем выделяют из клеток с помощью циклов замораживания-размораживания, обработки ультразвуком, детергентом или других средств, известных в данной области. Частицы затем очищают, применяя центрифугирование в градиенте плотности хлорида цезия или аффинную хроматографию, а затем доставляют интересующий(-е) ген(ы) в клетки, ткани или организм, такой как пациент-человек.

Так как рекомбинантные частицы ААВ обычно получают (производят) в клетках, необходимо предпринять меры предосторожности при осуществлении настоящего изобретения, чтобы удостовериться в том, что сайт-специфическая эндонуклеаза не экспрессируется в пакующих клетках. Так как вирусные геномы согласно настоящему изобретению содержат распознаваемую эндонуклеазой последовательность, любая эндонуклеаза, экспрессированная в линии пакующих клеток, будет способна расщепить вирусный геном до того, как он может быть упакован в вирусные частицы. Это приведет к снижению эффективности упаковки и/или к упаковке фрагментированных геномов. Можно использовать несколько подходов для предотвращения экспрессии эндонуклеазы в пакующих клетках, включая описанные далее.

Эндонуклеазу можно поместить под контроль тканеспецифического промотора, который неактивен в пакующих клетках. Например, если вирусный вектор разработанный для доставки гена(-ов) эндонуклеазы в мышечную ткань, то можно применять специфический для мышц промотор. Примеры специфических для мышц промоторов включают C5-12 (Liu, и др. (2004) *Hum Gene Ther.* 15:783-92), специфический для мышц промотор креатинкиназы (МСК) (Yuasa, и др. (2002) *Gene Ther.* 9:1576-88) или промотор гладких мышц 22 (SM22) (Haase, и др. (2013) *BMC Biotechnol.* 13:49-54). Примеры специфических для ЦНС (нейронов) промоторов включают промоторы NSE, синапсина и MeCP2 (Lentz, и др. (2012) *Neurobiol Dis.* 48:179-88). Примеры специфических для печени промоторов включают промоторы альбумина (такие как Palb),  $\alpha$ 1-антитрипсина человека (такой как Pal AT) и гемопексина (такой как Phpx) (Kramer, MG и др., (2003) *Mol. Therapy* 7:375-85). Примеры специфических для глаз промоторов включают промотор опсина и промотор K12, специфический для эпителия роговицы (Martin KRG, Klein RL, и Quigley HA (2002) *Methods* (28): 267-75) (Tong Y, и др., (2007) *J Gene Med*, 9:956-66). Данные промоторы или другие тканеспецифические промоторы, известные в данной области, не являются высокоактивными в клетках НЕК-293 и, следовательно, не будут ожидать, что они дадут значительные уровни экспрессии гена эндонуклеазы в пакующих клетках, когда их встраивают в вирусные векторы согласно настоящему изобретению. Аналогично, предполагается использование других линий клеток с вирусными векторами согласно настоящему изобретению с применением несовместимых тканеспецифических промоторов (т.е. хорошо известной линии клеток HeLa (эпителиальных клеток человек) и использование специфического для печени промотора гемопексина). Другие примеры тканеспецифических промоторов включают промоторы: синовиальных сарком PDZD4 (мозжечок), C6 (печень), ASB5 (мышца), PPP1R12B (сердце), SLC5A12 (почка), регуляции холестерина APOM (печень), ADPRHL1 (сердце) и моногенных синдромов врожденных пороков TP73L (мышца). (Jasch E, и др., (2010) *PLoS One*, том 5(8):e12274). В качестве альтернативы вектор можно упаковать в клетках из отличного вида, в которых эндонуклеаза маловероятно может экспрессироваться. Например, вирусные частицы можно получить в клетках микробов, насекомых или растений, применяя промоторы млекопитающих, такие как хорошо известные ранние промоторы цитомегаловируса или вируса SV40, которые неактивны в не относящихся к млекопитающим пакующих клетках. В предпочтительном варианте реализации вирусные частицы получают в клетках насекомого, применяя бакуловирусную систему, как описано у Gao, и др. (Gao, H., и др. (2007) *J. Biotechnol.* 131 (2): 138-43). Эндонуклеаза под контролем промотора млекопитающего маловероятно будет экспрессироваться в данных клетках (Aigenne, KJ, и др. (2013) *Mol. Ther.* 21(4):739-49). Более того, клетки насекомого используют отличные мотивы сплайсинга мРНК от таковых в клетках млекопитающих. Следовательно, в кодирующую последовательность эндонуклеазы можно включить интрон млекопитающего, такой как интрон гормона роста человека (HGH) или интрон большого Т-антигена SV40. Так как данные интроны не способны эффективно сплайсироваться из транскриптов пре-мРНК в клетках насекомого, клетки насекомого не будут экспрессировать функциональную эндонуклеазу и будут упаковывать полноразмерный геном. Напротив, клетки млекопитающих, в которые доставят полученные рекомбинантные частицы ААВ, будут правильно сплайсировать пре-мРНК и будут экспрессировать функциональный белок эндонуклеазы.

Haifeng Chen описал применение интронов HGH и большого Т-антигена SV40 для уменьшения экспрессии токсичных белков барназы и фрагмента А дифтерийного токсина в пакующих клетках насекомого, позволяя получение рекомбинантных AAB-векторов, несущих гены данных токсинов (Chen, H (2012) *Mol Ther Nucleic Acids*. 1(11): e57). Ген эндонуклеазы может быть так функционально связан с индуцируемым промотором, что для экспрессии эндонуклеазы будет необходим низкомолекулярный индуктор. Примеры индуцируемых промоторов включают систему Tet-On (Clontech; Chen H., и др., (2015) *BMC Biotechnol*. 15(1):4) и систему RheoSwitch (Intrexon; Sowa G., и др., (2011) *Spine*, 36(10): E623-8). В обеих системах, а также аналогичных системах, известных в данной области, используют индуцируемые лигандом факторы транскрипции (варианты репрессора Tet и рецепторы экдизона, соответственно), которые активируют транскрипцию в ответ на низкомолекулярный активатор (доксидиклин или экдизон, соответственно). Реализация настоящего изобретения с применением таких индуцируемых лигандом активаторов транскрипции включает: 1) помещение гена эндонуклеазы под контроль промотора, который реагирует на соответствующий фактор транскрипции, указанный ген эндонуклеазы содержит сайт(ы) связывания для указанного фактора транскрипции; и 2) включение гена, кодирующего указанный фактор транскрипции, в упакованный вирусный геном. Последний этап необходим, так как эндонуклеаза не будет экспрессироваться в целевых клетках или тканях после доставки рекомбинантного AAB, если в те же клетки также не ввести активатор транскрипции. Активатор транскрипции затем вызывает экспрессию гена эндонуклеазы только в клетках или тканях, которые обработали соответствующим низкомолекулярным активатором. Данный подход предпочтителен, так как он позволяет регулировать экспрессию гена эндонуклеазы пространственно-временным образом путем выбора, когда и в какие ткани доставить низкомолекулярный индуктор. Тем не менее, необходимость включить индуктор в вирусный геном, у которого значительно ограничена емкость, составляет недостаток данного подхода.

В другом предпочтительном варианте реализации рекомбинантные частицы AAB получают в линии клеток млекопитающего, которая экспрессирует репрессор транскрипции, который предотвращает экспрессию эндонуклеазы. Репрессоры транскрипции известны в данной области и включают репрессор Tet, репрессор Lac, репрессор Cro и репрессор Lambda. Многие ядерные рецепторы гормонов, такие как рецепторы экдизона, также действуют как репрессоры транскрипции в отсутствие распознаваемого лиганда-гормона. Для реализации настоящего изобретения пакующие клетки трансфицируют/трансдуцируют вектором, кодирующим репрессор транскрипции, и ген эндонуклеазы в вирусном геноме (пакующем векторе) функционально связан с промотором, который модифицирован таким образом, чтобы он содержал сайты связывания с репрессором, так чтобы репрессор выключал промотор. Ген, кодирующий репрессор транскрипции, можно поместить в различные положения. Его можно кодировать на отдельном векторе; его можно включить в пакующий вектор снаружи от последовательностей ITR; его можно включить в вектор cap/ter или в аденовирусный вспомогательный вектор; или, в наиболее предпочтительном случае, его можно стабильно встроить в геном пакующей клетки, так чтобы он конститутивно экспрессировался. Способы модификации широко распространенных промоторов млекопитающих таким образом, чтобы они содержали сайты для репрессора транскрипции, известны в данной области. Например, Chang и Roninson модифицировали сильные конститутивные промоторы ЦМВ и RSV таким образом, чтобы они содержали операторы для репрессора Lac, и показали, что экспрессия гена с модифицированных промоторов была сильно снижена в клетках, экспрессирующих репрессор (Chang BD, и Roninson IB (1996) *Gene* 183:137-42). Применение не относящегося к человеку репрессора транскрипции позволяет гарантировать то, что транскрипция гена эндонуклеазы будет репрессирована только в пакующих клетках, экспрессирующих репрессор, но не в целевых клетках или тканях, трансдуцированных полученным в результате этого рекомбинантным AAB-вектором.

#### 2.6. Варианты сконструированных мегануклеаз.

В варианты реализации настоящего изобретения входят сконструированные мегануклеазы, описанные в данной заявке, и их варианты. В дополнительные варианты реализации настоящего изобретения входят выделенные полинуклеотиды, включающие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую эндонуклеазы, описанные в данной заявке, и варианты таких полинуклеотидов.

В данной заявке подразумевают, что термин "варианты" означает по существу сходные последовательности. Подразумевают, что "вариант" полипептида означает полипептид, полученный из "нативного" полипептида путем делеции или вставки одной или более аминокислот в один или более внутренних сайтов в нативном белке и/или замены одной или более аминокислот в одном или более сайтах в нативном полипептиде. В данной заявке "нативный" полинуклеотид или полипептид включает исходную последовательность, из которой получены указанные варианты. Варианты полипептид, входящие в варианты реализации, являются биологически активными. То есть, они продолжают обладать желательной биологической активностью нативного белка; т.е. способностью распознавать и расщеплять последовательность распознавания внутри ОРС генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В, например, последовательность распознавания BГВ 1-2 (SEQ ID NO: 10), последовательность распознавания BГВ 5-6 (SEQ ID NO: 12), последовательность распознавания BГВ 7-8 (SEQ ID NO: 14) или последовательность распознавания BГВ 11-12 (SEQ ID NO: 16). Такие варианты можно получить в результате, например, проведенной человеком обработки. Последовательности биологически активных вариантов нативного

полипептида согласно вариантам реализации (например, последовательности SEQ ID NO: 18-39) или биологически активных вариантов субъединиц, связывающих распознаваемый полусайт, описанных в данной заявке, будут по меньшей мере приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99% идентичны последовательности аминокислот нативного полипептида или нативной субъединицы, что можно определить с помощью программ и параметров для выравнивания последовательностей, описанных в других местах в данной заявке. Биологически активный вариант полипептида или субъединицы согласно вариантам реализации могут отличаться от указанного полипептида или субъединицы всего лишь приблизительно 1-40 аминокислотными остатками, всего лишь приблизительно 1-20, всего лишь приблизительно 1-10, всего лишь приблизительно 5, всего лишь 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотным остатком.

Полипептиды согласно вариантам реализации можно изменить различными способами, включая замены, делеции, укорачивания и вставки аминокислот. Способы таких манипуляций в целом известны в данной области. Например, варианты последовательности аминокислот можно получить путем мутирования ДНК. Способы мутагенеза и изменений полинуклеотидов хорошо известны в данной области. См., например, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel и др. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; патент США номер 4873192; Walker и Gaastra, ред. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Нью-Йорк) и ссылки, цитированные в указанных противопоставленных материалах. Руководство по подходящим заменам аминокислот, которые не влияют на биологическую активность интересующего белка, можно найти в модели Dayhoff и др. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Вашингтон, округ Колумбия), включенной в данную заявку посредством ссылки. Консервативные замены, такие как замена одной аминокислоты на другую, обладающую сходными свойствами, могут быть оптимальными.

В некоторых вариантах реализации сконструированные мегануклеазы согласно настоящему изобретению могут содержать варианты участков HVR1 и HVR2, описанных в данной заявке. Исходные участки HVR могут включать, например, остатки 24-79 или остатки 215-270 приведенных в качестве примера сконструированных мегануклеаз. Таким образом, варианты HVR могут включать последовательность аминокислот, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или более идентичную последовательности аминокислот, соответствующей остаткам 24-79 или остаткам 215-270 указанных сконструированных мегануклеаз, приведенных в качестве примера в данной заявке, так что указанные варианты участков HVR сохраняют биологическую активность сконструированной мегануклеазы (т.е. связывание и расщепление последовательности распознавания). Кроме того, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения вариант участка HVR1 или вариант участка HVR2 может включать остатки, соответствующие аминокислотным остаткам, находящимся в определенных положениях внутри исходного HVR. В данном контексте "соответствующий" означает, что аминокислотный остаток в варианте HVR представляет собой тот же аминокислотный остаток (т.е. отдельный идентичный остаток), который присутствует в исходной последовательности HVR в том же относительном положении (т.е. относительно остальных аминокислот в исходной последовательности). В качестве примера, если исходная последовательность HVR содержит остаток серина в положении 26, то вариант HVR, который "содержит остаток, соответствующий" остатку 26, будет также содержать серин в положении, которое сравнивают с исходным положением 26. Ранее было идентифицировано значительное количество модификаций аминокислот в домене распознавания ДНК мегануклеазы I-CreI дикого типа (например, патент США 8021867), которые, отдельно или в комбинации, приводят к получению сконструированных мегануклеаз со специфичностями, измененными в отдельных основаниях внутри полусайта последовательности распознавания ДНК, так что у полученных путем рационального дизайна мегануклеаз специфичности полусайтов отличны от таковых у фермента дикого типа. В табл. 5 представлены потенциальные замены, которые можно осуществить в сконструированном мономере или субъединице мегануклеазы, чтобы повысить специфичность на основе основания, присутствующего в каждом положении (с -1 по -9) полусайта распознавания.

Таблица 5

| Предпочтительное основание в смысловой цепи |                                                     |                                                     |                                     |                                                                    |                            |             |             |                    |     |       |                           |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------|-------------|--------------------|-----|-------|---------------------------|
| Полож.                                      | A                                                   | C                                                   | G                                   | T                                                                  | A/T                        | A/C         | A/G         | C/T                | G/T | A/G/T | A/C/G/T                   |
| -1                                          | Y75<br>L75*<br>C75*<br>Y139*<br>C46*<br>A46*        | <b>R70*</b><br>H75*<br>R75*<br>H46*<br>K46*<br>R46* | K70<br>E70*<br>E75*<br>E46*<br>D46* | Q70*<br>C70<br>L70<br>Y75*<br>Q75*<br>H75*<br>H139<br>Q46*<br>H46* |                            |             |             | <b>T46*</b>        |     |       | G70<br>A70<br>S70<br>G46* |
| -2                                          | Q70<br>T44*<br>A44*<br>V44*<br>I44*<br>L44*<br>N44* | E70<br>D70<br>K44*<br>R44*                          | H70<br>D44*<br>E44*                 | <b>Q44*</b>                                                        | C44*                       |             |             |                    |     |       |                           |
| -3                                          | Q68<br>C24*<br><b>I24*</b>                          | E68<br>F68<br>K24*<br>R24*                          | <b>R68</b>                          | M68<br>C68<br>L68<br>F68                                           |                            | H68         |             | Y68                | K68 |       |                           |
| -4                                          | A26*<br>Q77                                         | E77<br>K26*                                         | R77<br>E26*                         |                                                                    |                            |             |             | S77<br><b>Q26*</b> |     |       | S26*                      |
| -5                                          |                                                     | E42                                                 | R42                                 |                                                                    |                            | <b>K28*</b> | C28*<br>Q42 |                    |     |       | M66<br>K66                |
| -6                                          | Q40<br>C28*                                         | E40<br>R28*                                         | R40                                 | C40<br>I40<br>V40<br>C79<br>I79<br>V79<br>Q28*                     | A40<br>A79<br>A28*<br>H28* |             |             |                    |     |       | <b>S40</b><br>S28*        |
| -7                                          | <b>N30*</b><br><b>Q38</b>                           | E38<br>K30*<br>R30*                                 | K38<br>R38<br>E30*                  | I38<br>L38                                                         |                            |             | C38         |                    |     |       | H38<br>N38<br>Q30*        |
| -8                                          | F33<br><b>Y33</b>                                   | E33<br>D33                                          | F33<br>H33                          | L33<br>V33<br>I33<br>F33<br>C33                                    |                            | R32*        | R33         |                    |     |       |                           |
| -9                                          |                                                     | E32                                                 | R32<br>K32                          | L32<br>V32                                                         |                            |             |             | D32<br>I32         |     |       | <b>S32</b><br>N32         |
| Предпочтительное основание в смысловой цепи |                                                     |                                                     |                                     |                                                                    |                            |             |             |                    |     |       |                           |
|                                             |                                                     |                                                     |                                     | A32<br>C32                                                         |                            |             |             |                    |     |       | H32<br>Q32<br>T32         |

Выделенные жирным шрифтом остатки представляют собой контактирующие остатки дикого типа и не являются "модификациями", описанными в данной заявке. Звездочка указывает на то, что остаток контактирует с основанием на антисмысловой цепи.

Для полинуклеотидов, "вариант" включает делецию и/или вставку одного или более нуклеотидов один или более сайтов внутри нативного полинуклеотида. Специалисту в данной области будет известно, что варианты нуклеиновых кислот согласно вариантам реализации будут сконструированы так, чтобы сохранить открытую рамку считывания. Для полинуклеотидов, консервативные варианты включают такие последовательности, которые, вследствие вырожденности генетического кода, кодируют последовательность аминокислот одного из полипептидов согласно вариантам реализации. Варианты полинуклеотидов включают полученные синтетическим путем полинуклеотиды, такие как полученные, например, с применением сайт-направленного мутагенеза, но которые еще кодируют сконструированную мегануклеазу согласно вариантам реализации. Как правило, последовательности вариантов конкретного полинуклеотида согласно вариантам реализации будут по меньшей мере приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более идентичны данному конкретному полинуклеотиду, что определяют с помощью программ и параметров для выравнивания последовательностей, описанных в других местах в данной заявке. Варианты конкретного полинуклеотида согласно вариантам реализации (т.е. исходного полинуклеотида) также можно оценить путем сравнения процента идентичности последовательностей между полипептидом, кодируемым вариантом полинуклеотида, и полипептидом, кодируемым исходным полинуклеотидом. Не ожидается, что делеции, вставки и замены белковых последовательностей, входящих в объем настоящего описания, вызывают радикальные изменения в свойствах указанного полипептида. Тем не менее, в случаях, когда сложно заранее спрогнозировать точный эффект замены, делеции или вставки, для специалиста в данной области будет очевидно, что данный эффект будут оценивать путем скрининга способности полипептида предпочтительно распознавать и расщеплять последовательность распознавания внутри ОРС генома по меньшей мере двух генотипов вируса гепатита В.

### Примеры

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны истолковываться как ограничивающие. Специалисты в данной области идентифицируют или смогут установить, используя не более чем проведение обычного исследования, множество эквивалентов конкретным веществам и процедурам, описанным в данной заявке. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем формулы изобретения, которая приведена ниже после примеров.

#### Пример 1.

Характеристики мегануклеаз, которые распознают и расщепляют последовательности распознавания ВГВ.

Мегануклеазы, которые распознают и расщепляют последовательность распознавания ВГВ 1-2.

Сконструированные мегануклеазы (последовательности SEQ ID NO: 18-21), совокупно названные в данной заявке "мегануклеазами ВГВ 1-2", сконструировали, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 1-2 (SEQ ID NO: 10), которая расположена внутри ОРС белка Р, S, preS2/S и preS1/preS2 множества генотипов ВГВ, включая генотип А, В, С, Е, F и G (например, последовательности SEQ ID NO: 3-5 и 7-9, соответственно). Каждая сконструированная мегануклеаза ВГВ 1-2 содержит N-концевой сигнал локализации нуклеазы, полученный из SV40, первую субъединицу мегануклеазы, линкерную последовательность и вторую субъединицу мегануклеазы. Первая субъединица в каждой мегануклеазе ВГВ 1-2 связывается с распознаваемым полусайтом ВГВ1 с последовательностью SEQ ID NO: 10, тогда как вторая субъединица связывается с распознаваемым полусайтом ВГВ2 (см. фиг. 2).

Каждая из связывающих ВГВ1 субъединиц и связывающих ВГВ2 субъединиц содержит гипервариабельный участок из 56 пар оснований, обозначенный HVR1 и HVR2, соответственно. Связывающие ВГВ1 субъединицы высоко консервативны за пределами участка HVR1. Аналогично, связывающие ВГВ2 субъединицы также высоко консервативны за пределами участка HVR2. Связывающие ВГВ1 участки с последовательностями SEQ ID NO: 18-21 представлены в последовательностях SEQ ID NO: 40 - 43, соответственно. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 40-43 по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 40, которая представляет собой связывающий ВГВ1 участок мегануклеазы ВГВ 1-2х.2 (SEQ ID NO: 18). Связывающие ВГВ2 участки с последовательностями SEQ ID NO: 18-21 представлены в последовательностях SEQ ID NO: 44-47, соответственно. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 44-47 по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 44, которая представляет собой связывающий ВГВ2 участок мегануклеазы ВГВ 1-2х.2 (SEQ ID NO: 18).

Мегануклеазы, которые распознают и расщепляют последовательность распознавания ВГВ 5-6.

Сконструированные мегануклеазы (последовательности SEQ ID NO: 22-28), совокупно названные в данной заявке "мегануклеазами ВГВ 5-6", сконструировали, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 5-6 (SEQ ID NO: 12), которая расположена внутри ОРС белка Р, S, preS2/S и preS1/preS2 множества генотипов ВГВ, включая генотип А, В, С, D, Е и G (например, последо-

вательности SEQ ID NO: 3-7 и 9, соответственно). Каждая сконструированная мегануклеаза ВГВ 5-6 содержит N-концевой сигнал локализации нуклеазы, полученный из SV40, первую субъединицу мегануклеазы, линкерную последовательность и вторую субъединицу мегануклеазы. Первая субъединица в каждой мегануклеазе ВГВ 5-6 связывается с распознаваемым полусайтом ВГВ 5 с последовательностью SEQ ID NO: 12, тогда как вторая субъединица связывается с распознаваемым полусайтом ВГВ6 (см. фиг. 2).

Каждая из связывающих ВГВ5 субъединиц и связывающих ВГВ6 субъединиц содержит гипервариабельный участок из 56 пар оснований, обозначенный HVR1 и HVR2, соответственно. Связывающие ВГВ5 субъединицы высоко консервативны за пределами участка HVR1. Аналогично, связывающие ВГВ6 субъединицы также высоко консервативны за пределами участка HVR2. Связывающие ВГВ5 участки с последовательностями SEQ ID NO: 22-28 представлены в последовательностях SEQ ID NO: 48-54, соответственно. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 48-54 по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 49, которая представляет собой связывающий ВГВ5 участок мегануклеазы ВГВ 5-6х.33 (SEQ ID NO: 22). Связывающие ВГВ6 участки с последовательностями SEQ ID NO: 22-28 представлены в последовательностях SEQ ID NO: 55-61, соответственно. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 55-61 по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 55, которая представляет собой связывающий ВГВ5 участок мегануклеазы ВГВ 5-6х.33 (SEQ ID NO: 22).

Мегануклеазы, которые распознают и расщепляют последовательность распознавания ВГВ 7-8.

Сконструированные мегануклеазы (последовательности SEQ ID NO: 29-32), совокупно названные в данной заявке "мегануклеазами ВГВ 7-8", сконструировали, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 7-8 (SEQ ID NO: 14), которая расположена внутри ОРС белка Р множества генотипов ВГВ, включая генотип А, В, С, D, F и G (например, последовательности SEQ ID NO: 3-6, 8, и 9, соответственно). Каждая сконструированная мегануклеаза ВГВ 7-8 содержит N-концевой сигнал локализации нуклеазы, полученный из SV40, первую субъединицу мегануклеазы, линкерную последовательность и вторую субъединицу мегануклеазы. Первая субъединица в каждой мегануклеазе ВГВ 7-8 связывается с распознаваемым полусайтом ВГВ7 с последовательностью SEQ ID NO: 14, тогда как вторая субъединица связывается с распознаваемым полусайтом ВГВ8 (см. фиг. 2). Каждая из связывающих ВГВ7 субъединиц и связывающих ВГВ8 субъединиц содержит гипервариабельный участок из 56 пар оснований, обозначенный HVR1 и HVR2, соответственно. Связывающие ВГВ7 субъединицы высоко консервативны за пределами участка HVR1. Аналогично, связывающие ВГВ8 субъединицы также высоко консервативны за пределами участка HVR2. Связывающие ВГВ7 участки с последовательностями SEQ ID NO: 29-32 представлены в последовательностях SEQ ID NO: 62-65, соответственно. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 62-65 по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 62, которая представляет собой связывающий ВГВ7 участок мегануклеазы ВГВ 7 - 8х.2 (SEQ ID NO: 29). Связывающие ВГВ8 участки с последовательностями SEQ ID NO: 29-32 представлены в последовательностях SEQ ID NO: 66-69, соответственно. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 66-69 по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 66, которая представляет собой связывающий ВГВ8 участок мегануклеазы ВГВ 7-8х.2 (SEQ ID NO: 29).

Мегануклеазы, которые распознают и расщепляют последовательность распознавания ВГВ 11-12.

Сконструированные мегануклеазы (последовательности SEQ ID NO: 33-39), совокупно названные в данной заявке "мегануклеазами ВГВ 11-12", сконструировали, чтобы распознавать и расщеплять последовательность распознавания ВГВ 11-12 (SEQ ID NO: 16), которая расположена внутри ОРС белка Р множества генотипов ВГВ, включая генотип А, В, С, D, E, F и G (например, последовательности SEQ ID NO: 3-9, соответственно). Каждая сконструированная мегануклеаза ВГВ 11-12 содержит N-концевой сигнал локализации нуклеазы, полученный из SV40, первую субъединицу мегануклеазы, линкерную последовательность и вторую субъединицу мегануклеазы. Первая субъединица в каждой мегануклеазе ВГВ 11-12 связывается с распознаваемым полусайтом ВГВ11 с последовательностью SEQ ID NO: 16, тогда как вторая субъединица связывается с распознаваемым полусайтом ВГВ 12 (см. фиг. 2). Каждая из связывающих ВГВ 11 субъединиц и связывающих ВГВ 12 субъединиц содержит гипервариабельный участок из 56 пар оснований, обозначенный HVR1 и HVR2, соответственно. Связывающие ВГВ 11 субъединицы высоко консервативны за пределами участка HVR1. Аналогично, связывающие ВГВ 12 субъединицы также высоко консервативны за пределами участка HVR2. Связывающие ВГВ 11 участки с последовательностями SEQ ID NO: 33-39 представлены в последовательностях SEQ ID NO: 70-76, соответственно. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 70-76 по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 70, которая представляет собой связывающий ВГВ11 участок мегануклеазы ВГВ 11-12х.26 (SEQ ID NO: 33). Связывающие ВГВ 12 участки с последовательностями SEQ ID NO: 33-39 представлены в последовательностях SEQ ID NO: 77-83, соответственно. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 77-83 по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 77, которая представляет собой связывающий ВГВ 12 участок мегануклеазы ВГВ 11-12х.26 (SEQ ID NO:33).

Расщепление последовательностей распознавания ВГВ в репортерном анализе в клетках CHO.

Для того чтобы определить, могут ли мегануклеазы ВГВ 1-2, ВГВ 5-6, ВГВ 7-8 и ВГВ 11-12 распознавать и расщеплять соответствующие последовательности распознавания (последовательности SEQ ID NO: 10, 12, 14 и 16, соответственно), каждую сконструированную мегануклеазу оценивали, применяя

репортерный анализ в клетках СНО, описанный ранее (см. WO/2012/167192 и фиг. 6). Для проведения данных анализов получали линии репортерных клеток СНО, которые несли нефункциональную кассету экспрессии гена зеленого флуоресцентного белка (GFP), встроенную в геном указанных клеток. Ген GFP в каждой линии клеток прерывался парой последовательностей распознавания так, что внутриклеточное расщепление обеих последовательностей распознавания мегануклеазой будет стимулировать событие гомологичной рекомбинации, приводящее к продукции функционального гена GFP. В репортерных линиях клеток СНО, разработанных для данного исследования, одна последовательность распознавания, встроенная в ген GFP, представляла собой последовательность распознавания ВГВ 1-2 (SEQ ID NO: 10), последовательность распознавания ВГВ 5-6 (SEQ ID NO: 12), последовательность распознавания ВГВ 7-8 (SEQ ID NO: 12) и последовательность распознавания ВГВ11 - 12 (SEQ ID NO: 16). Вторая последовательность распознавания, встроенная в ген GFP, представляла собой последовательность распознавания СНО-23/24, которая распознается и расщепляется контрольной мегануклеазой, названной "СНО-23/24". Репортерные клетки СНО, содержащие последовательность распознавания ВГВ 1-2 и последовательность распознавания СНО-23/24, называют "клетками ВГВ 1-2". Репортерные клетки СНО, содержащие последовательность распознавания ВГВ 5-6 и последовательность распознавания СНО-23/24, называют "клетками ВГВ 5-6". Репортерные клетки СНО, содержащие последовательность распознавания ВГВ 7-8 и последовательность распознавания СНО-23/24, называют "клетками ВГВ 7-8". Репортерные клетки СНО, содержащие последовательность распознавания ВГВ 11-12 и последовательность распознавания СНО-23/24, называют "клетками ВГВ 11-12". Репортерные клетки СНО трансфицировали плазмидной ДНК, кодирующей соответствующие сконструированные мегануклеазы (например, клетки ВГВ 1-2 трансфицировали плазмидной ДНК, кодирующей мегануклеазу ВГВ 1-2) или кодирующей мегануклеазу СНО-23/24. В каждом анализе  $4 \times 10^5$  репортерных клеток СНО трансфицировали 50 нг плазмидной ДНК в 96-луночной планшете, применяя Липофектамин 2000 (ThermoFisher), согласно инструкциям производителя. Через 48 часов после трансфекции клетки оценивали с помощью проточной цитометрии, чтобы определить процент GFP-положительных клеток по сравнению с нетрансфицированным отрицательным контролем (ВГВ bs). Как показано на фигурах 7A-7D, было обнаружено, что все мегануклеазы ВГВ вызывают образование GFP-положительных клеток в линиях клеток, содержащих соответствующую последовательность распознавания, и их встречаемость значительно превышает таковую в отрицательном контроле.

Эффективность мегануклеаз ВГВ 1-2, ВГВ 5-6, ВГВ 7-8 и ВГВ 11-12 также определяли зависимым от времени образом через 2, 5, 7, 9 и 12 дней после внедрения мегануклеаз в репортерные клетки СНО. В данном исследовании клетки ВГВ 1-2, ВГВ 5-6, ВГВ 7-8 или ВГВ 11-12 ( $1 \times 10^6$ ) подвергали электропорации  $1 \times 10^6$  копиями мРНК мегануклеазы на клетку, применяя а BioRad Gene Pulser Xcell, следуя инструкциям производителя. В указанные моменты времени после трансфекции клетки оценивали с помощью проточной цитометрии, чтобы определить процент GFP-положительных клеток. Мегануклеазу СНО-23/24 также включали в качестве положительного контроля в каждый момент времени.

На фигурах 8A-8D показано, что %GFP, полученный с помощью различных мегануклеаз ВГВ, изменялся с течением времени. Мегануклеазы ВГВ 5-6 и ВГВ 11-12 были по существу постоянны в течение 12-дневного периода анализа (Фигуры 8B и 8D), тогда как мегануклеазы ВГВ 1-2 и ВГВ 7-8 вызывали образование высокого уровня GFP-положительных клеток в более ранние моменты времени, который снижался с течением времени в ходе эксперимента.

#### Выводы.

Данные исследования демонстрируют, что мегануклеазы ВГВ, входящие в объем настоящего изобретения, могут эффективно нацеливаться и расщеплять соответствующие последовательности распознавания в клетках, и что данный эффект может быть либо постоянным, либо меняться с течением времени.

#### Пример 2.

ВГВ-специфичные нуклеазы уничтожают плазмидную ДНК в *E. coli*.

Бактериальная репортерная система, использующая эписомную ДНК.

Цель данного эксперимента состояла в оценке способности мегануклеаз ВГВ согласно настоящему изобретению распознавать и расщеплять последовательности распознавания внутри эписомных ДНК-плазмид в репортерной системе *E. coli*. Плазмиду, названную "pARCUS", получали, чтобы вести индуцируемую экспрессию нуклеазы ARCUS (фиг. 9A). В pARCUS нуклеазу ARCUS (здесь либо ВГВ 5-6х.33, либо ВГВ 11-12х) помещали под контроль индуцируемого IPTG промотора. Кроме того, чтобы позволить селекцию трансформированных бактерий, pARCUS кодирует ген устойчивости к ампициллину. pARCUS представляет собой низкокопийную плазмиду, так что индуцированная экспрессия нуклеазы ARCUS не приводит к сверхэкспрессии.

Получали дополнительную плазмиду, названную "pHBVa" (фиг. 9A).

pHBVa несет большой фрагмент генома ВГВ, включая последовательности распознавания ВГВ 5-6 и ВГВ 11-12. Указанная плазида также кодирует ген устойчивости к канамицину и ген SacB. Ген устойчивости к канамицину позволяет селекцию трансформированных бактерий, и ген SacB представляет со-

бой токсин, который активен в присутствии сахарозы. Таким образом, бактерии, трансформированные pHBVa, выживут в присутствии канамицина в среде, но не выживут в присутствии канамицина и сахарозы. pHBVa была разработана как высококопийная плазмида в попытке повторить инфицированную BГВ клетку, в которой может находиться множество копий генома BГВ. Важно отметить, что pHBVa использует точку начала репликации, отличную от таковой в pARCUS, что позволяет совместную трансформацию бактерий обеими плазмидами.

Когда бактерии совместно трансформируют данными плазмидами и растут в среде, содержащей различные комбинации селективного давления (ампициллина, канамицина или сахарозы), это приводит к нескольким возможным результатам. Бактерии, которые трансформировали pARCUS и растили в присутствии ампициллина, будут нести плазмиду pARCUS, но не будут экспрессировать кодируемую нуклеазу, если ростовую среду не дополнить IPTG. После индукции IPTG кодируемая нуклеаза будет экспрессироваться. Бактерии, трансформированные pHBVa, будут расти в присутствии канамицина, но не в присутствии канамицина и сахарозы. Бактерии, совместно трансформированные с pARCUS и pHBVa, в присутствии ампициллина и/или канамицина будут чувствительны к сахарозе. Спрогнозировали, что в бактериях, совместно трансформированных pARCUS и pHBV, индукция нуклеазы ARCUS IPTG будет приводить к экспрессии нуклеазы, которая затем сможет расщепить целевой сайт, который кодируется pHBVa. Ожидали, что расщепление в данном сайте будет приводить к линеаризации плазмиды pHBVa, которая затем должна быстро разрушиться бактериальными нуклеазами. Деградация плазмиды pHBV будет приводить к двум результатам: бактерии утратят устойчивость к канамицину, но будут способны выживать в присутствии сахарозы.

Для того чтобы проверить результаты совместной трансформации, бактерии совместно трансформировали (путем электропорации) плазмидами pARCUS и pHBVa и культивировали в присутствии ампициллина в течение 3 часов перед посевом. В параллельных культурах совместно трансформированные клетки обрабатывали IPTG (3 часа), чтобы вызвать экспрессию нуклеазы и позволить расщепление pHBVa. Клетки затем высевали на чашки с агаром в присутствии ампициллина, ампициллина и сахарозы или ампициллина и канамицина. Чашки инкубировали в течение ночи и подсчитывали колонии, чтобы оценить выживаемость бактерий.

#### Результаты.

Количество колоний, присутствующих на каждой чашке с селективной средой, явилось существенным доказательством способности нуклеаз ARCUS расщеплять плазмиду pHBVa. На контрольных чашках с ампициллином количество колоний как из неиндуцированных, так и из индуцированных IPTG культур было равным для клеток, совместно трансформированных pHBVa и любой плазмидой pARCUS (Фиг. 9B). Наблюдалось различие в количестве колоний между бактериями, совместно трансформированными pARCUS, кодирующей BГВ 5-6х.33, и бактериями, совместно трансформированными pARCUS, кодирующей BГВ 11-12х.26, но это вероятно отражает эффективность трансформации.

Наоборот, количество колоний в не индуцированных IPTG культурах на чашках, содержащих как ампициллин, так и сахарозу, сильно уменьшалось, указывая на то, что ген SacB позволял эффективно уничтожать клетки, когда сахароза была доступна (Фиг. 9B). Тем не менее, культуры, которые индуцировали IPTG, росли достаточно хорошо на чашках, содержащих как ампициллин, так и сахарозу, что свидетельствовало об элиминировании гена SacB. Количества колоний бактерий, совместно трансформированных (но не индуцированных IPTG) pHBVa и pARCUS, кодирующей BГВ 11-12х.26, были такими же, как на контрольных чашках с ампициллином, и количества колоний бактерий, совместно трансформированных pARCUS 5-6х.33, были лишь слегка меньше по сравнению с контрольными чашками.

Неиндуцированные IPTG культуры были способны расти на чашках, содержащих как ампициллин, так и канамицин (фиг. 9B). Количества колоний бактерий, совместно трансформированных pARCUS, кодирующими BГВ 11-12х.26, были приблизительно равны таковым на контрольных чашках, содержащих только ампициллин, и количества клеток, совместно трансформированных pARCUS BГВ 5-6х.33, было лишь слегка ниже по сравнению с контрольными. Тем не менее, когда индуцированные IPTG клетки растили на чашках, содержащих ампициллин и канамицин, количества колоний были близки к нулю, свидетельствуя об элиминировании плазмид, несущих ген устойчивости к канамицину (фиг. 9B).

#### Выводы.

Данные результаты явно демонстрируют, что мегануклеазы BГВ согласно настоящему изобретению, распознающие сайты в геноме BГВ, способны разрезать плазмиду pHBVa, приводя к удалению плазмиды pHBVa. В индуцированных IPTG культурах клетки росли в присутствии сахарозы, свидетельствуя об эффективном удалении содержащей SacB плазмиды. Аналогично, в индуцированных IPTG культурах клетки погибали в присутствии канамицина, также решительно свидетельствуя о разрушении плазмиды pHBVa. Возможно, что аналогичные результаты можно получить в инфицированных BГВ клетках млекопитающих, применяя мегануклеазы BГВ согласно настоящему изобретению для расщепления кзкДНК BГВ. В бактериях линейная ДНК быстро уничтожалась. Можно предположить, что линеаризованная кзкДНК в клетках млекопитающих также будет расщепляться клеточными нуклеазами. Даже если расщепление не приводит к линеаризации и элиминированию кзкДНК, вероятно, что мутации инсерций/делеций, вызванные нуклеазой ARCUS BГВ, будут нарушать кодирующие области и делать

кзкДНК неспособной продуцировать функциональные белки ВГВ. Таким образом, мегануклеазы согласно настоящему изобретению, нацеленные на сайты в геноме ВГВ, должны представлять собой эффективный способ уничтожения или инактивации кзкДНК ВГВ.

#### Пример 3.

Нацеливание на вирусные геномы ВГВ в клетках.

Лечение клеток AD38, экспрессирующих геном ВГВ.

Основной целью данных примеров была оценка того, способны ли мегануклеазы согласно настоящему изобретению инактивировать и/или устранить геномы ВГВ из инфицированных ВГВ клеток млекопитающих.

В первом исследовании эффективность мегануклеазы оценивали в линии клеток AD38, которая стабильно экспрессирует геном ВГВ под контролем промотора Tet. Данная линия клеток AD38 не продуцирует активные вирусные частицы, но продуцирует S антиген ВГВ (HBsAg), который можно обнаружить в кондиционированной клетками среде. В данном исследовании клетки трансфицировали плазмидой ДНК, кодирующей либо ВГВ 5-6х.33, либо ВГВ 11-12х.26. Обе данные сконструированные мегануклеазы нацелены на последовательность внутри перекрывающихся рамок считывания S (ген HBsAg) и Р (ген полимеразы) и ВГВ 11-12х.26 нацелена на ген Р. В качестве контроля, клетки AD38 трансфицировали с плазмидой, кодирующей ген красного флуоресцентного белка (RFP). Клетки высевали и через 24 часа трансфицировали плазмидами, применяя протокол трансфекции на основе липосом. Через 24 часа после трансфекции клетки AD38 промывали, чтобы удалить оставшиеся комплексы липосом. В дни 3 и 7 после трансфекции собирали супернатант клеток и анализировали присутствие в нем HBsAg с помощью ELISA.

#### Результаты.

Результаты ELISA нормировали на количество HBsAg, присутствующее в супернатанте трансфицированных RFP клеток AD38 в день 3 и день 7 после трансфекции. В день 3 после трансфекции для клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей ВГВ 11-12х.26, выявили приблизительно на 25% меньше HBsAg в супернатанте по сравнению с трансфицированными RFP клетками (фиг. 10). В то же момент времени для клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей ВГВ 5-6х.33, выявили приблизительно на 50% меньше HBsAg в супернатанте по сравнению с трансфицированными RFP клетками (фиг. 10). Нетрансфицированные контрольные клетки были по существу такими же, как и трансфицированные RFP клетки. Снижение уровня HBsAg было даже более явным в день 7 после трансфекции. Для клеток AD38, трансфицированных ВГВ 11-12х.26, выявили уровни HBsAg, приблизительно на 50% меньшие чем для клеток, трансфицированных с RFP, и у клеток, трансфицированных ВГВ 5-6х.33, уровни были приблизительно на 75% ниже чем в контроле RFP (фиг. 10). В день 7 после трансфекции у клеток, трансфицированных RFP, было значительно меньше HBsAg в супернатанте по сравнению с нетрансфицированными клетками, позволяя предложить, что процесс трансфекции оказывал отрицательное влияние на способность указанных клеток продуцировать HBsAg. Тем не менее, влияние было гораздо более явным в клетках, трансфицированных плазмидами, кодирующими мегануклеазы ВГВ, позволяя решительно предложить, что снижение уровней HBsAg в супернатанте происходило вследствие активности мегануклеазы.

#### Выводы.

Данные результаты демонстрируют, что для клеток AD38, трансфицированных плазмидами, кодирующими либо ВГВ 5-6х.33, либо ВГВ 11-12х.26, наблюдают значительное снижение уровней HBsAg в супернатанте по сравнению либо с нетрансфицированными клетками, либо с клетками, трансфицированными репортерным геном RFP. Снижение уровней HBsAg в супернатанте, кондиционированном клетками, трансфицированными любой из мегануклеаз ВГВ, дает веские основания полагать, что указанное снижение происходит вследствие активности мегануклеазы против генома ВГВ в клетках AD38.

#### Пример 4.

Нацеливание на вирусные геномы ВГВ в клетках.

Лечение клеток AD38, экспрессирующих геном ВГВ.

Исследования в примере 3 выше демонстрируют эффективность мегануклеазы в отношении снижения секреции HBsAg из экспрессирующих геном ВГВ линии клеток AD38. Для того чтобы определить, можно ли добиться большого снижения секреции HBsAg, применяя лентивирусную доставку вместо трансфекции плазмидой, данное исследование повторяли с лентивирусной доставкой, применяя мегануклеазы ВГВ 11-12х.26 и ВГВ 5-6х.33 отдельно или в комбинации.

Получали лентивирусы, которые экспрессировали либо RFP, ВГВ 5-6х.33, либо ВГВ 11-12х.26, и клетки AD38 трансдуцировали, чтобы определить влияние мегануклеаз на продукцию HBsAg. Клетки AD38 высевали и через 24 часа трансдуцировали либо лентивирусом, кодирующим RFP, ВГВ 5-6х.33, ВГВ 11-12х.26, либо смесью 1:1 лентивирусов, кодирующих мегануклеазы ВГВ. Клетки трансдуцировали отдельными лентивирусами с МЗ, равной 1, 2 или 4. Клетки, которые трансдуцировали смесью 1:1 кодирующих мегануклеазу ВГВ лентивирусов, трансдуцировали при МЗ, равной 2 и 4. Среды трансдуцированных клеток заменяли в день 1 и день 3 после трансдукции. В день 7 после трансдукции собирали супернатанты клеток и анализировали присутствие в них HBsAg с помощью ELISA.

### Результаты.

Результаты ELISA нормировали на количество HBsAg, присутствующее в супернатанте трансдуцированных RFP клеток AD38 в день 7 после трансфекции. При МЗ, равной 1, для клеток AD38, трансдуцированных ВГВ 5-6х.33, выявили приблизительно на 60% меньше HBsAg в супернатанте, чем для клеток AD38, трансдуцированных экспрессирующим RFP лентивирусом (фиг. 11). Также при МЗ, равной 1, для ВГВ 11-12х.26 выявили приблизительно на 40% меньше HBsAg, чем для RFP. При более высокой МЗ действие мегануклеаз ВГВ было более ярко выраженным. При МЗ, равной 2, для клеток, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим ВГВ 5-6х.33, выявили снижение HBsAg приблизительно на 80% по сравнению с трансдуцированными RFP клетками и при МЗ, равной 4, снижение было приблизительно на 90% по сравнению с трансдуцированными RFP клетками. Аналогично, при МЗ, равной 2, для клеток, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим ВГВ 11-12х.26, выявили приблизительно на 70% меньше HBsAg, чем для трансдуцированных RFP клеток и при МЗ, равной 4, уровни HBsAg были ниже приблизительно на 80%. Наконец, для клеток, трансдуцированных смесью 1:1 лентивирусов, кодирующих мегануклеазы ВГВ, также выявили резкое снижение уровней HBsAg в супернатанте по сравнению с трансдуцированными RFP клетками (фиг. 11). При общей МЗ, равной 2, экспрессирующие ВГВ лентивирусы снижали экспрессию HBsAg приблизительно на 80%, и при общей МЗ, равной 4, экспрессия снижалась приблизительно на 90%.

### Выводы.

Данные результаты демонстрируют, что для клеток AD38, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими либо ВГВ 5-6х.33, либо ВГВ 11-12х.26, либо комбинацию обоих, выявили резкое снижение уровней HBsAg в супернатанте по сравнению с клетками, трансдуцированными лентивирусом, экспрессирующим RFP. Снижение уровней HBsAg в супернатанте клеток, трансдуцированных лентивирусами, экспрессирующими любую или обе мегануклеазы ВГВ, дает веские основания полагать, что указанное снижение происходит вследствие активности мегануклеазы против генома ВГВ в клетках AD38. Кроме того, полученные результаты демонстрируют, что совместная экспрессия мегануклеаз ВГВ эффективно снижает экспрессию HBsAg, что дает веские основания полагать, что совместно экспрессированные мегануклеазы могут эффективно разрушать геном ВГВ.

### Пример 5.

Нацеливание на геномы вируса ВГВ в клетках.

Лечение клеток AD38, экспрессирующих геном ВГВ.

В дополнительном исследовании клетки AD38 трансдуцировали лентивирусами, кодирующими мегануклеазы ВГВ 5-6х.33 или ВГВ 11-12х.26, чтобы наблюдать влияние обработки мегануклеазами на секрецию HBsAg, копии ДНК ВГВ, присутствующие в культуральной среде, и копии внутриклеточной кзкДНК ВГВ. Аналогично примеру 4 выше, получали лентивирусы, которые экспрессировали либо RFP (LV212), либо ВГВ 5-6х.33 (LV224), либо ВГВ 11-12х.26 (LV225), и трансдуцировали клетки AD38, чтобы определить влияние мегануклеаз на каждый экспериментальный результат. Клетки AD38 высевали в присутствии тетрациклина и через 24 часа трансдуцировали лентивирусом, кодирующим RFP, ВГВ 5-6х.33 или ВГВ 11-12х.26 при МЗ, равной 4. Среды трансдуцированных клеток заменяли через 24 часа после трансдукции. В день 7 после трансдукции собирали супернатанты клеток и анализировали присутствие в них HBsAg с помощью ELISA. Копии внеклеточной ДНК ВГВ на 5 мкл культуры клеток определяли с помощью количественной ПЦР. Получали лизаты клеток и определяли число копий внутриклеточной кзкДНК ВГВ на 5 мкл клеточного лизата с помощью количественной ПНР.

### Результаты.

При МЗ, равной 4, для клеток AD38, трансдуцированных ВГВ 5-6х.33 и ВГВ 11-12х.26, выявили приблизительно на 58 и 25% меньше HBsAg в культуральной среде, соответственно, через 7 дней после трансдукции, чем для клеток AD38, трансдуцированных экспрессирующим RFP лентивирусом (Фиг. 12А). Число копий внеклеточной ДНК ВГВ после трансдукции мегануклеазами ВГВ 5-6х.33 и ВГВ 11-12х.26 также снижалось приблизительно на 28 и 50%, соответственно, по сравнению с трансдукцией экспрессирующим RFP лентивирусом (фиг. 12В). Наконец, число копий внутриклеточной кзкДНК ВГВ также снижалось после трансдукции мегануклеазами ВГВ 5-6х.33 и ВГВ 11-12х.26 приблизительно на 71 и 60%, соответственно, по сравнению с трансдукцией экспрессирующим RFP лентивирусом (фиг. 12С).

### Выводы.

Данные результаты дополнительно демонстрируют, что для клеток AD38, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими любую из мегануклеаз ВГВ 5-6х.33 или ВГВ 11-12х.26, выявили резкое снижение уровней HBsAg в супернатанте по сравнению с клетками, трансдуцированными лентивирусом, экспрессирующим RFP. Кроме того, полученные результаты демонстрируют, что мегануклеазы ВГВ согласно настоящему изобретению также снижали число копий внеклеточной ДНК ВГВ и, что важно, значительно снижали число копий внутриклеточной кзкДНК ВГВ.

### Пример 6.

Лечение инфицированных ВГВ первичных гепатоцитов человека.

Исследования в примерах выше демонстрируют эффективность мегануклеазы в отношении уменьшения секреции HBsAg из экспрессирующей геном ВГВ линии клеток AD38. Исследования, описанные в

настоящем примере, проводили, чтобы определить эффективность мегануклеаз ВГВ согласно настоящему изобретению в инфицированных ВГВ первичных гепатоцитах человека.

Получали лентивирусы, которые экспрессировали либо RFP, либо ВГВ 5-6х.33, либо ВГВ 11-12х.26, и инфицированные ВГВ первичные гепатоциты человека трансдуцировали, чтобы определить влияние мегануклеаз на продукцию HBsAg и HBeAg. Вкратце, первичные гепатоциты человека высевали и через 24 часа инфицировали ВГВ. В день 1 после инфицирования клетки промывали и через 24 часа (день 2 после инфицирования) трансдуцировали либо лентивирусом, кодирующим RFP, ВГВ 5-6х.33, ВГВ 11-12х.26, либо смесью 1:1 лентивирусов, кодирующих мегануклеазы ВГВ. В качестве дополнительного контроля инфицированные клетки обрабатывали ДМСО. Собирали супернатанты клеток и заменяли среду в дни 4, 8, 11 и 13 после трансдукции. В каждый момент времени измеряли HBsAg и HBeAg в супернатантах клеток с помощью ELISA. Также измеряли внеклеточную ДНК в супернатанте в день 13 после инфицирования.

#### Результаты.

Для того чтобы определить, влияла ли в целом трансдукция лентивирусом на секрецию либо HBsAg, либо HBeAg, супернатанты клеток, трансдуцированных кодирующим RFP лентивирусом, сравнивали с супернатантами клеток, обработанных ДМСО (фиг. 13). Трансдукция инфицированных ВГВ первичных гепатоцитов человека лентивирусом, кодирующим RFP, оказывала незначительное влияние, если вообще оказывала, на секрецию HBsAg или HBeAg (фиг. 13A и 13B). При МЗ, равной 5 или 2,5, уровни HBsAg были идентичны таковым в клетках, обработанных ДМСО, и при МЗ, равной 1,25, наблюдали лишь умеренное их снижение (фиг. 13A). Аналогично, показали лишь умеренное снижение уровней HBeAg в супернатантах клеток, трансдуцированных лентивирусом RFP, при МЗ, равной 1,25, 2,5 или 5, по сравнению с обработанными ДМСО клетками (фиг. 13B). Кроме того, выявили незначительное различие между количеством внеклеточного ВГВ, обнаруженного в супернатанте инфицированных ВГВ первичных гепатоцитов человека, обработанных ДМСО клеток и клеток, трансдуцированных кодирующим RFP лентивирусом (фиг. 13C).

Показав, что трансдукция лентивирусом в общем не влияла на функцию.

ВГВ в инфицированных первичных гепатоцитах человека, лентивирусы, кодирующие мегануклеазы ВГВ, сравнивали с лентивирусом RFP. Результаты ELISA для HBsAg нормировали на количество HBsAg, присутствующее в супернатанте трансдуцированных RFP инфицированных ВГВ первичных гепатоцитов человека через дней 3, 8, 11 и 13 после трансдукции (фиг. 14). При обеих МЗ, равных 2,5 и 1,25, для клеток, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим ВГВ 5-6х.33, выявили равномерное снижение уровней HBsAg за время проведения эксперимента: незначительно сниженные уровни в день 3, снижение приблизительно на 50-60% к дню 8 и снижение приблизительно на 90% к дням 11 и 13 по сравнению с контролем RFP (фиг. 14A и 14B). Для инфицированных клеток, трансдуцированных ВГВ 11-12х.26, выявили сходный паттерн при обеих МЗ, равных 2,5 и 1,25, при этом более заметное снижение наблюдали в момент времени день 3 (снижение приблизительно на 50%), и снижение также достигало приблизительно 90% к дням 11 и 13 после трансдукции (фиг. 14A и 14B). Когда инфицированные клетки трансдуцировали смесью 1:1 лентивирусов, кодирующих мегануклеазы ВГВ, наблюдали аналогичное снижение уровней HBsAg с течением времени. При МЗ, равной 2,5, уровни снижались приблизительно на 50% в день 3 после трансдукции, и снижение продолжалось, достигая 90% к дням 11 и 13 после трансдукции (фиг. 14A и 14B).

Результаты ELISA HBeAg также нормировали на количество HBeAg, присутствующего в супернатанте трансдуцированных RFP инфицированных ВГВ первичных гепатоцитов человека в дни 3, 8, 11 и 13 после трансдукции (фиг. 14). При обеих МЗ, равных 2,5 и 1,25, для клеток, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим ВГВ 5-6х.33, выявили равномерное снижение уровня HBeAg за время проведения эксперимента: уровни снижались приблизительно на 25% в день 3, снижались приблизительно на 50% к дню 8 и снижались приблизительно на 90% к дням 11 и 13 по сравнению с контролем RFP (фиг. 14C и 14D). Для инфицированных клеток, трансдуцированных ВГВ 11-12х.26, выявили сходный паттерн при обеих МЗ, равных 2,5 и 1,25, с аналогичным снижением в момент времени день 3 (снижение приблизительно на 30%), и снижение уровней HBeAg также достигало приблизительно 90% к дням 11 и 13 после трансдукции (фиг. 14C и 14D). Когда инфицированные клетки трансдуцировали смесью 1:1 лентивирусов, кодирующих мегануклеазы ВГВ, наблюдали аналогичное снижение уровней HBeAg с течением времени. При МЗ, равной 2,5 и 1,25, уровни снижались приблизительно на 50% в день 3 после трансдукции, и снижение продолжалось, достигая 90% к дням 11 и 13 после трансдукции (фиг. 14C и 14D).

#### Выводы.

Данные результаты демонстрируют, что для инфицированных ВГВ первичных гепатоцитов человека, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими либо ВГВ 5-6х.33, либо ВГВ 11-12х.26, либо комбинацию обоих, выявили резкое снижение уровней HBsAg и HBeAg в супернатанте по сравнению с клетками, трансдуцированными лентивирусом, экспрессирующим RFP. Снижение уровней HBsAg и HBeAg в супернатанте инфицированных клеток, трансдуцированных лентивирусами, экспрессирующими любую или обе мегануклеазы ВГВ, дает веские основания полагать, что указанно снижение происходит благодаря активности мегануклеаз против инфекционного вируса.

## Пример 7.

Доставка инкапсулированной в ЛНЧ мРНК нуклеазы в печень.

Инкапсулирование мРНК в липидные наночастицы и доставка мышам.

Цель данного исследования состояла в демонстрации того, что можно получить инкапсулированную в липидную наночастицу (ЛНЧ) мРНК, кодирующую сконструированную мегануклеазу, и ввести ее *in vivo*, и что происходит и может наблюдаться редактирование гена в печени.

Разработали сконструированную мегануклеазу, которая обладает специфичностью к последовательностям распознавания в гене гидролазы CMP-NeuAc (Cmah) мыши, который экспрессируется в печени мыши. Кэпированную ARCA мРНК, кодирующую мегануклеазу Cmah, получали в TriLink Bio-Technologies LLC (Сан-Диего, Калифорния) и инкапсулировали в три различных коммерчески доступных состава ЛНЧ, каждый из которых содержал различные соотношения ионизируемого катионного липида, липида ПЭГ и холестерина. Заключенную в ЛНЧ мРНК вводили мышам CD-1 путем в/в инъекции в дозе 1,0 мг/кг. Печени собирали через 6 дней после введения. Перед сбором органа животных подвергали перфузии солевым раствором. Выделяли всю геномную ДНК (гДНК) печени и определяли частоту мутаций вставок/делеций (indel) в гене Cmah, применяя анализ эндонуклеазой IT7 (T7E) и глубокое секвенирование. В анализе T7E, участок генома, содержащий последовательность распознавания Cmah, амплифицировали с помощью ПНР, получая гетерогенную смесь амплифицированных аллелей дикого типа и мутантных аллелей. Продукт ПЦР денатурировали и позволяли ему снова медленно гибридизоваться, что позволило образование гетеродуплексов между аллелями дикого типа и мутантными аллелями.

Такие гетеродуплексы чувствительны к расщеплению эндонуклеазой IT7, которая разрезает несоответствия. Когда расщепленные T7E продукты визуализировали в геле, присутствовало множество полос вследствие расщепления гетеродуплексов T7E, тогда как в образцах дикого типа присутствовала одна полоса. Отношение расщепленного к нерасщепленному продукту представляет собой меру уровня активности расщепления нуклеазой.

## Результаты.

Результаты данного исследования представлены на фиг. 15. На дорожках 1 и 2 показано, что не выявили признаков расщепления в последовательности распознавания Cmah гДНК, полученной из контрольных мышей, в которых вводили инкапсулированную в ЛНЧ мРНК, кодирующую люциферазу. Отношение расщепленной:нерасщепленной гДНК, наблюдаемое у животных, которым вводили мРНК люциферазы, сравнивали с отношением, наблюдаемым у животных, которым не вводили мРНК (дорожка 8). Напротив, каждая из дорожек 3-7 и 9-18 демонстрирует модификацию в последовательности распознавания Cmah, когда животным вводили инкапсулированную в ЛНЧ мРНК, кодирующую мегануклеазу Cmah, о чем свидетельствовало присутствие множество полос на каждой дорожке. Также проводили глубокое секвенирование гДНК, полученной из каждой печени, чтобы подтвердить и определить процент модификации гена в последовательности распознавания Cmah. Проценты, полученные в результате глубокого секвенирования, показаны на фиг. 15 под каждой дорожкой как % нокаута (% NA). На дорожках 3-7 показаны модификации в диапазоне от 3,41 до 21,49% у дублирующихся животных, которым вводили состав № 1 ЛНЧ. На дорожках 9-13 показаны модификации в диапазоне от 18,4 до 23,2% у дублирующихся животных, которым вводили состав № 2 ЛНЧ. На дорожках 14-18 показаны модификации в диапазоне от 51,1 до 64,8% у дублирующихся животных, которым вводили состав № 3 ЛНЧ.

## Выводы.

Данное исследование явно демонстрирует, что мРНК, кодирующую сконструированную мегануклеазу, такую как специфичные к ВГВ мегануклеазы согласно настоящему изобретению, можно инкапсулировать в ЛНЧ, доставить в целевые клетки печени (т.е. гепатоциты) *in vivo*, и она может вызвать редактирование гена в целевой последовательности распознавания в геноме.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированная мегануклеаза, которая распознает и расщепляет последовательность распознавания, состоящую из SEQ ID NO: 16, при этом указанная сконструированная мегануклеаза содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, при этом указанная первая субъединица связывается с первым распознаваемым полусайтом указанной последовательности распознавания и содержит первый гипервариабельный (HVR1) участок и при этом указанная вторая субъединица связывается со вторым распознаваемым полусайтом указанной последовательности распознавания и содержит второй гипервариабельный (HVR2) участок, и при этом указанная сконструированная мегануклеаза содержит последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 96% идентична SEQ ID NO: 33.

2. Сконструированная мегануклеаза по п.1, отличающаяся тем, что указанная первая субъединица включает последовательность аминокислот, по меньшей мере на 96% идентичную остаткам 198-344 последовательности SEQ ID NO: 33, и при этом указанная вторая субъединица включает последовательность аминокислот, по меньшей мере на 96% идентичную остаткам 7-153 последовательности SEQ ID NO: 33.

3. Сконструированная мегануклеаза по любому из пп.1 или 2, отличающаяся тем, что указанная первая субъединица включает остатки 198-344 последовательности SEQ ID NO: 33.

4. Сконструированная мегануклеаза по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что указанная вторая субъединица включает остатки 7-153 последовательности SEQ ID NO: 33.

5. Сконструированная мегануклеаза по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что указанная сконструированная мегануклеаза включает последовательность аминокислот, представленную в последовательности SEQ ID NO: 33.

6. Полинуклеотид для экспрессии сконструированной мегануклеазы по любому из пп.1-5, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанную сконструированную мегануклеазу по любому из пп.1-5.

7. Полинуклеотид по п.6, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид представляет собой мРНК.

8. Конструкция рекомбинантной ДНК для экспрессии сконструированной мегануклеазы по любому из пп.1-5, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанную сконструированную мегануклеазу по любому из пп.1-5.

9. Вирусный вектор для экспрессии сконструированной мегануклеазы по любому из пп.1-5, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанную сконструированную мегануклеазу по любому из пп.1-5.

10. Вирусный вектор по п.9, отличающийся тем, что указанный вирусный вектор представляет собой рекомбинантный ААВ-вектор.

11. Фармацевтическая композиция для лечения субъекта с вирусом гепатита В (ВГВ) или гепатоцеллюлярной карциномой, вызванной ВГВ, указанная фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель и эффективное количество:

(а) нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную сконструированную мегануклеазу по любому из пп.1-5; или

(b) указанной сконструированной мегануклеазы по любому из пп.1-5.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота, кодирующая указанную сконструированную мегануклеазу, представляет собой указанную мРНК по п.7.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что указанная мРНК инкапсулирована в липидные наночастицы.

14. Фармацевтическая композиция по п.11, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция содержит указанный вирусный вектор по п.9 или 10.

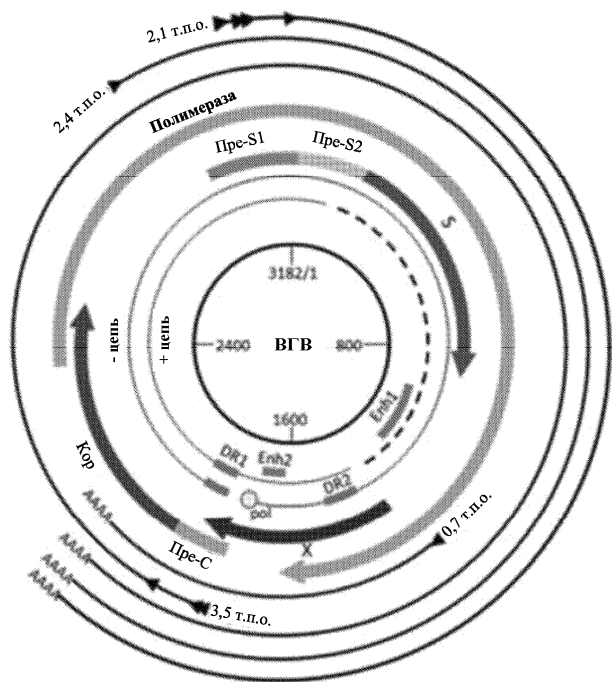
15. Применение сконструированной мегануклеазы по любому из пп.1-5 или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную сконструированную мегануклеазу по любому из пп.1-5, для лечения субъекта с вирусом гепатита В (ВГВ) или гепатоцеллюлярной карциномой, вызванной ВГВ.

16. Способ лечения субъекта с вирусом гепатита В (ВГВ) или гепатоцеллюлярной карциномой, вызванной ВГВ, включающий доставку в целевую клетку субъекта:

(а) нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированную мегануклеазу по любому из пп.1-5, при этом указанная сконструированная мегануклеаза экспрессируется в указанной целевой клетке *in vivo*; или

(b) сконструированной мегануклеазы по любому из пп.1-5.

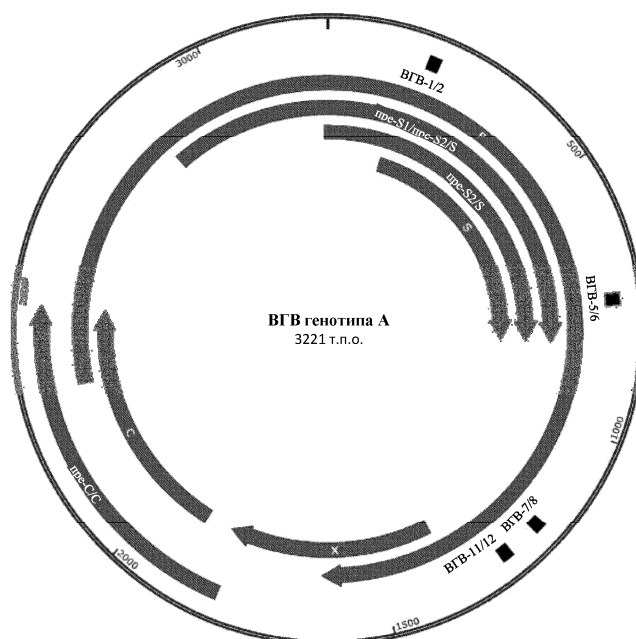
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанная целевая клетка представляет собой гепатоцит.



Фиг. 1

|                                                  |                        |                        |                              |
|--------------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|
|                                                  | Полусайт<br>ВГВ1       | Полусайт<br>ВГВ2       |                              |
| Распознаваемая<br>последовательность ВГВ 1 - 2   | CCCCTGCTC<br>GGGGACGAG | TACAGGCGG<br>ATGTCCGCC | SEQ ID NO:10<br>SEQ ID NO:11 |
|                                                  | Полусайт<br>ВГВ5       | Полусайт<br>ВГВ6       |                              |
| Распознаваемая<br>последовательность ВГВ 5 - 6   | GATGATGTG<br>CTACTACAC | TGGGGGCCA<br>ACCCCGGT  | SEQ ID NO:12<br>SEQ ID NO:13 |
|                                                  | Полусайт<br>ВГВ7       | Полусайт<br>ВГВ8       |                              |
| Распознаваемая<br>последовательность ВГВ 7 - 8   | TTTGCTGAC<br>AAACGACTG | CCCCACTG<br>GGGGGTGAC  | SEQ ID NO:14<br>SEQ ID NO:15 |
|                                                  | Полусайт<br>ВГВ11      | Полусайт<br>ВГВ12      |                              |
| Распознаваемая<br>последовательность ВГВ 11 - 12 | TGCCGATCC<br>ACGGCTAGG | TGCGGAAC<br>ACGCCTTGA  | SEQ ID NO:16<br>SEQ ID NO:17 |

Фиг. 2



Фиг. 3

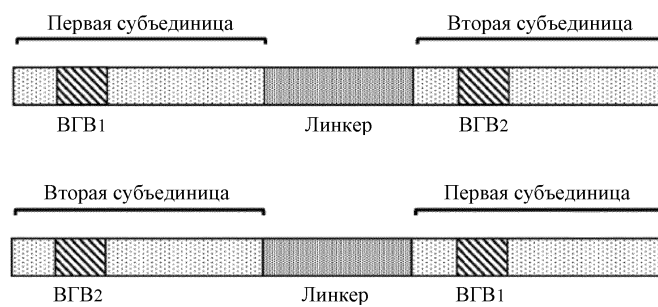
| ВГВ 1 - 2 | 185-206 из SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: |
|-----------|-------------------------|------------|
| Генотип А | CCCCTGCTCGTGTACAGGCGG   | 10         |
| Генотип В | CCCCTGCTCGTGTACAGGCGG   | 10         |
| Генотип С | CCCCTGCTCGTGTACAGGCGG   | 10         |
| Генотип D | CCCCTGCTCGTGTACAGGCGG   | 84         |
| Генотип Е | CCCCTGCTCGTGTACAGGCGG   | 10         |
| Генотип F | CCCCTGCTCGTGTACAGGCGG   | 10         |
| Генотип G | CCCCTGCTCGTGTACAGGCGG   | 10         |

| ВГВ 5 - 6 | 742-763 из SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: |
|-----------|-------------------------|------------|
| Генотип А | GATGATGTGGTATTGGGGGCCA  | 12         |
| Генотип В | GATGATGTGGTATTGGGGGCCA  | 12         |
| Генотип С | GATGATGTGGTATTGGGGGCCA  | 12         |
| Генотип D | GATGATGTGGTATTGGGGGCCA  | 12         |
| Генотип Е | GATGATGTGGTATTGGGGGCCA  | 12         |
| Генотип F | GATGATGTGGTATTGGGGGCCA  | 85         |
| Генотип G | GATGATGTGGTATTGGGGGCCA  | 12         |

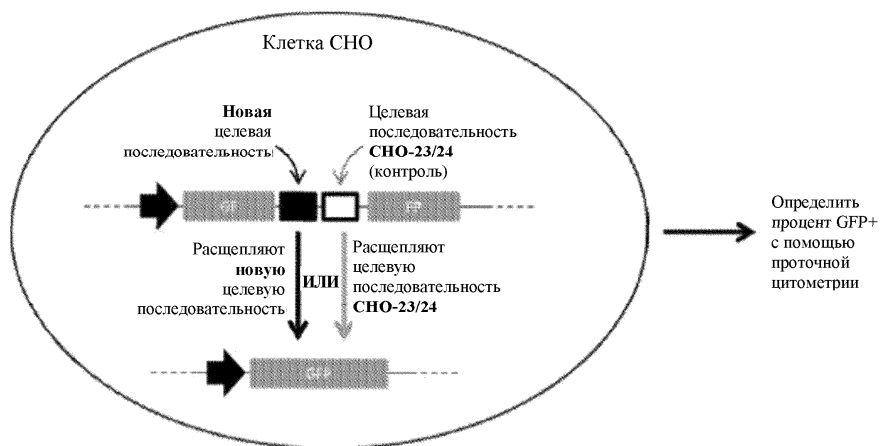
| ВГВ 7 - 8 | 1183-1204 из SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: |
|-----------|---------------------------|------------|
| Генотип А | TTTGCTGACGCAACCCCACTG     | 14         |
| Генотип В | TTTGCTGACGCAACCCCACTG     | 14         |
| Генотип С | TTTGCTGACGCAACCCCACTG     | 14         |
| Генотип D | TTTGCTGACGCAACCCCACTG     | 14         |
| Генотип E | TTTGCTGATGCAACCCCACTG     | 86         |
| Генотип F | TTTGCTGACGCAACCCCACTG     | 14         |
| Генотип G | TTTGCTGACGCAACCCCACTG     | 14         |

| ВГВ 11 - 12 | 1259-1280 из SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: |
|-------------|---------------------------|------------|
| Генотип А   | TGCCGATCCATACTGCGGAACT    | 16         |
| Генотип В   | TGCCGATCCATACTGCGGAACT    | 16         |
| Генотип С   | TGCCGATCCATACTGCGGAACT    | 16         |
| Генотип D   | TGCCGATCCATACTGCGGAACT    | 16         |
| Генотип Е   | TGCCGATCCATACTGCGGAACT    | 16         |
| Генотип F   | TGCCGATCCATACTGCGGAACT    | 16         |
| Генотип G   | TGCCGATCCATACTGCGGAACT    | 16         |

Фиг. 4

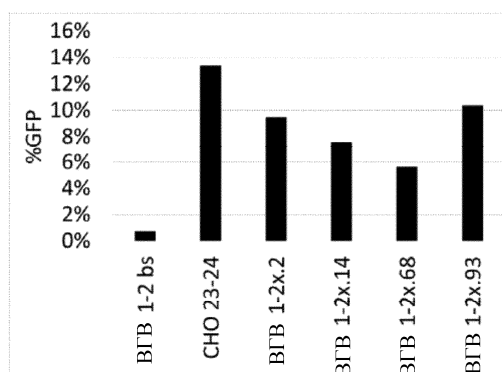


Фиг. 5

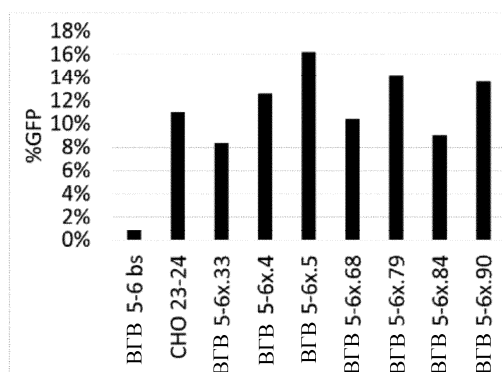


Фиг. 6

А.

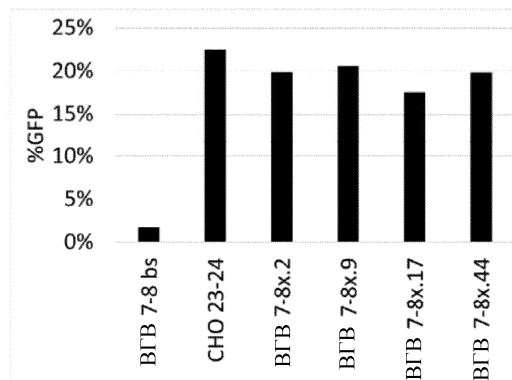


В.

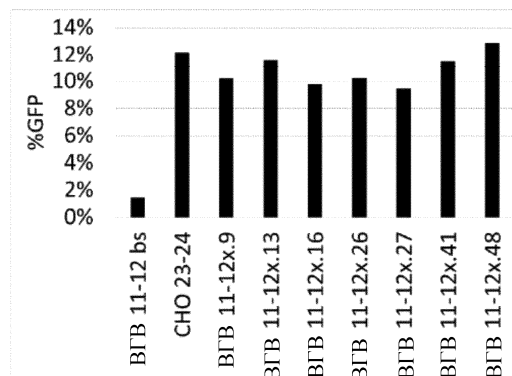


Фиг. 7А, В

C.

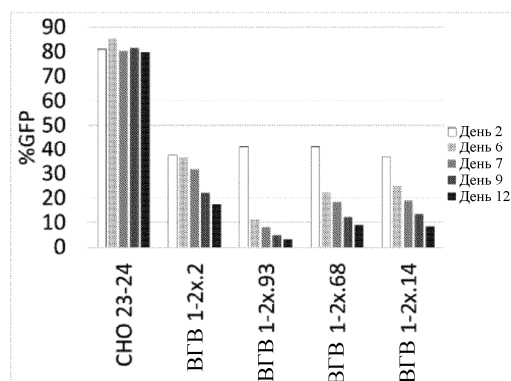


D.

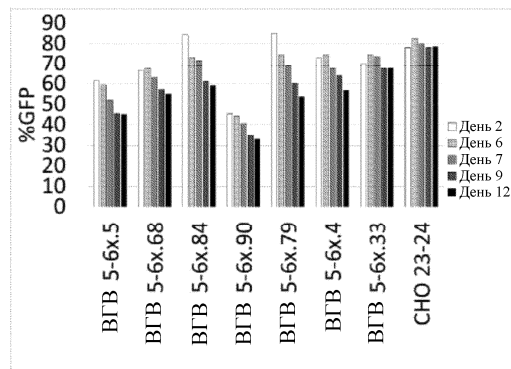


Фиг. 7C, D

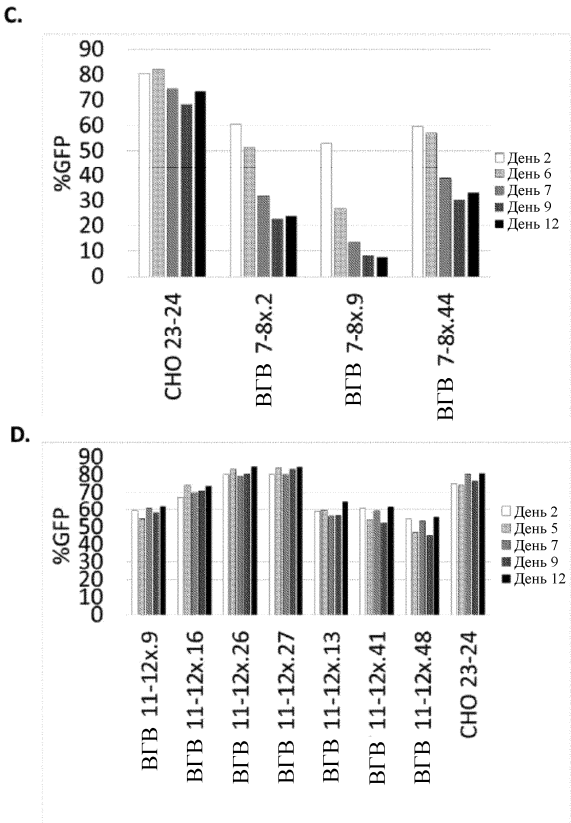
A.



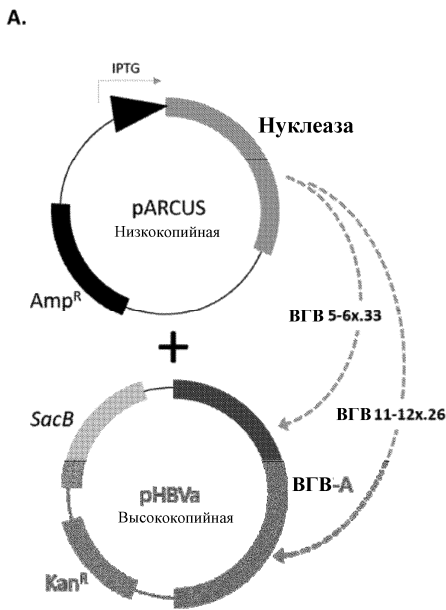
B.



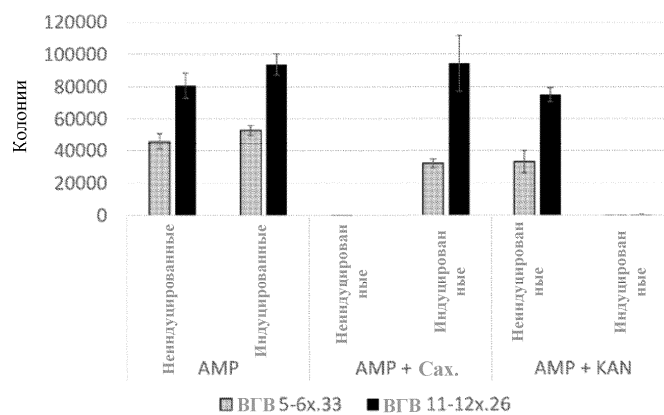
Фиг. 8A, B



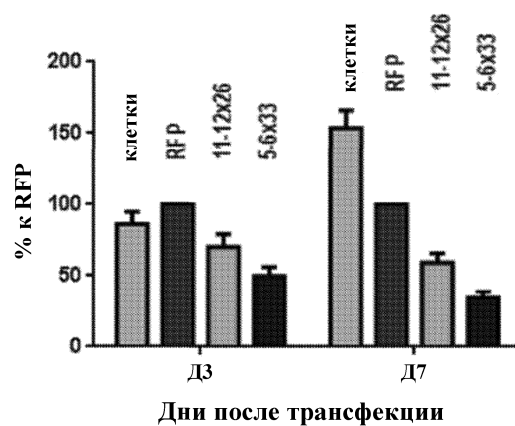
Фиг. 8C, D



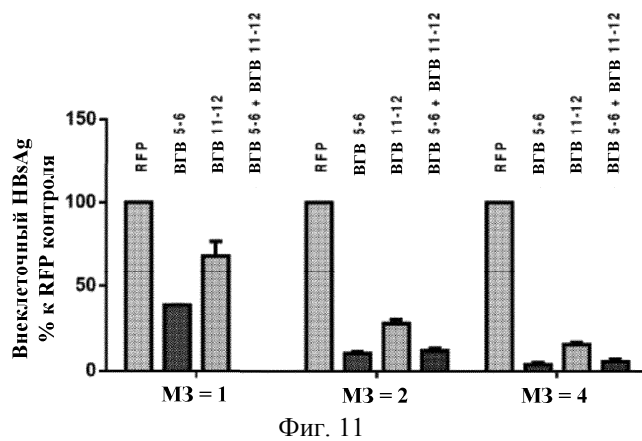
Фиг. 9А



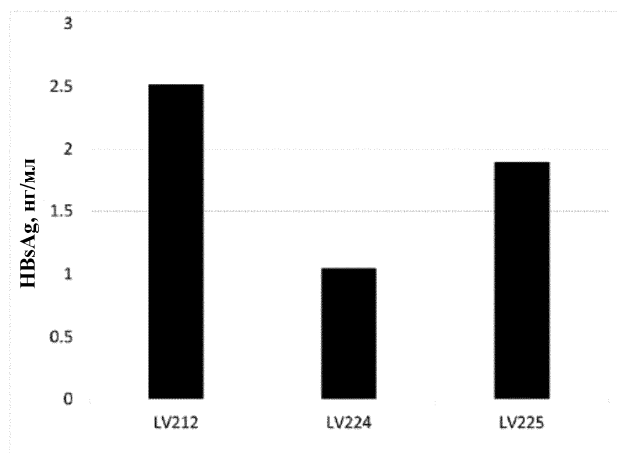
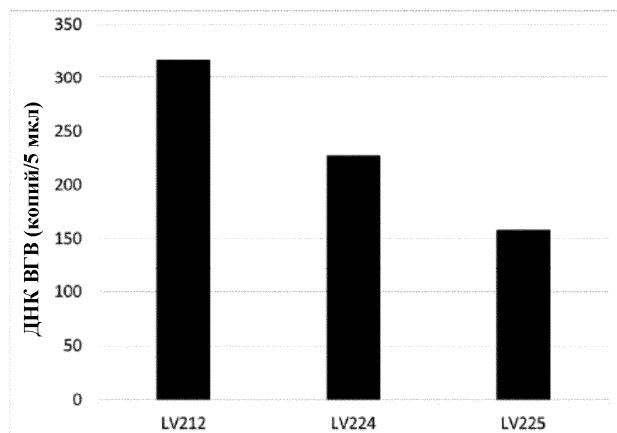
Фиг. 9В



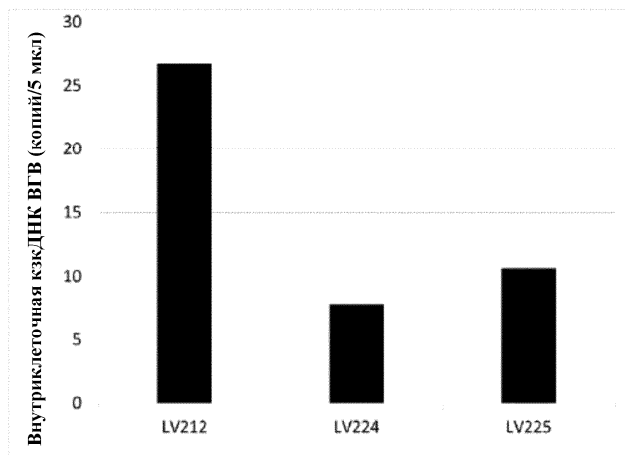
Фиг. 10



Фиг. 11

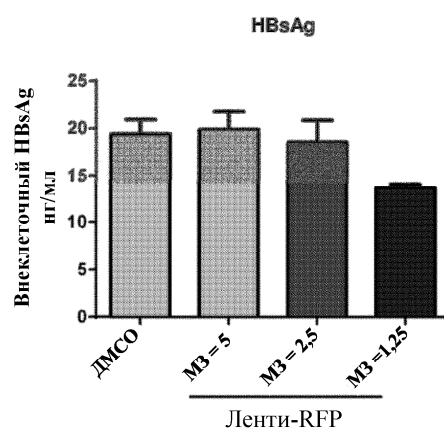
**A.****B.**

Фиг. 12А, В

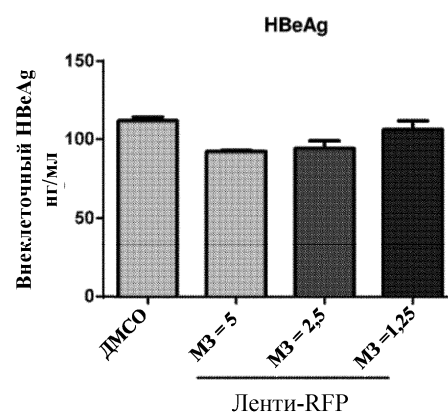
**С.**

Фиг. 12С

A.

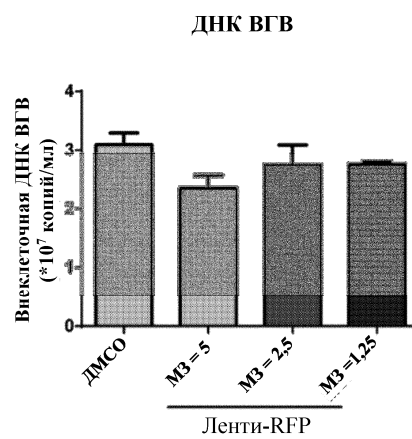


B.

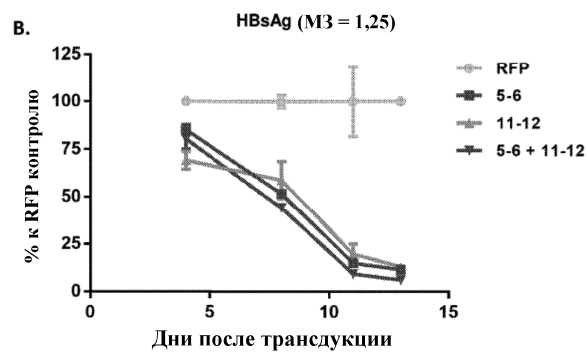
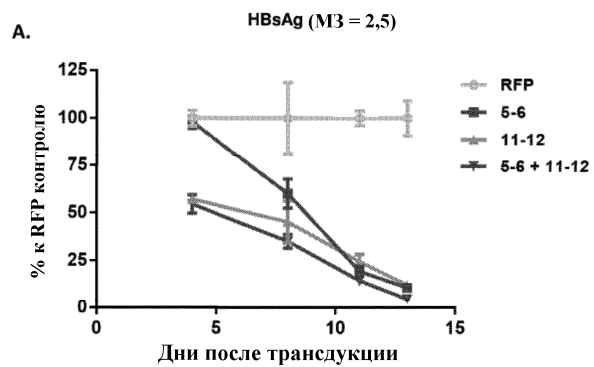


Фиг. 13А, В

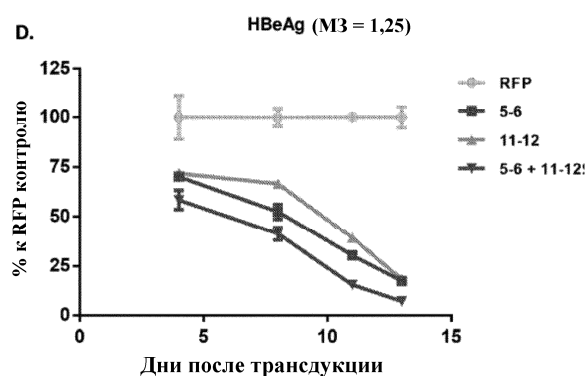
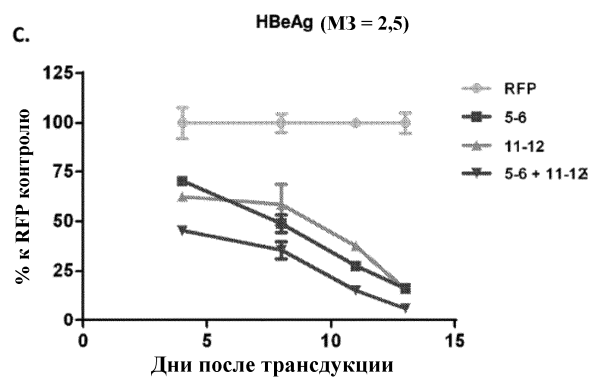
C.



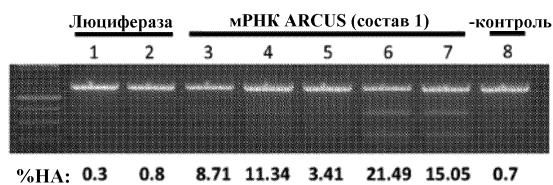
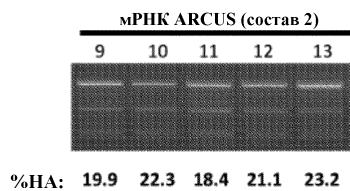
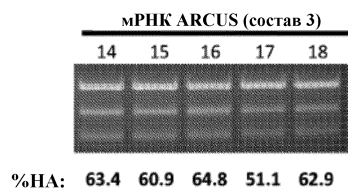
Фиг. 13С



Фиг. 14А, В



Фиг. 14С, D

*in vivo* (цельная печень)*in vivo* (цельная печень)*in vivo* (цельная печень)

Фиг. 15

