

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042960**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.10

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)

(21) Номер заявки
201691809

(22) Дата подачи заявки
2015.03.10

(54) МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОНСТРУКЦИЯ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КЛЕТКА НАСЕКОМОГО И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ AAV В КЛЕТКЕ НАСЕКОМОГО

(31) **14158610.7**

(32) **2014.03.10**

(33) **EP**

(43) **2017.01.30**

(86) **PCT/NL2015/050149**

(87) **WO 2015/137802 2015.09.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮниКьюре АйПи Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Лубельский Яцек, Босма Себастиан
Менно, Петри Харальд Петер
Альберт, Херменс Вильгельмус
Теодорус Йоханнес Мария Кристиан
(NL)**

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

(56) WO-A2-2007046703
WO-A2-03042361

URABE MASASHI ET AL.: "Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 80, no. 4, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 1874-1885, XP002429140, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.80.4.1874-1885.2006, cited in the application abstract; figure 2

URABE M ET AL.: "Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors", HUMAN GENE THERAPY, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 13, no. 16, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 1935-1943, XP002394454, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/10430340260355347, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к продуцированию аденоассоциированных вирусных векторов в клетках насекомого. В частности, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит модифицированную открытую рамку считывания, кодирующую капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанная рамка считывания в порядке от 5' к 3' содержит первый кодон, который представляет собой субоптимальный кодон инициации трансляции, выбранный из CTG, ACG, TTG и GTG; второй кодон, который кодирует аминокислотный остаток, выбранный из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; последовательность, которая кодирует капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), причем данная последовательность не содержит только кодон инициации трансляции VP1 и начинается с кодона второго аминокислотного остатка капсидного белка VP1. Изобретение также относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей указанную молекулу нуклеиновой кислоты, клетке насекомого, содержащей указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, вириону AAV, содержащему в своем геноме капсидные белки AAV, кодируемые указанной молекулой нуклеиновой кислоты, и способу получения AAV в клетке насекомого.

B1**042960****042960****B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к продуцированию аденоассоциированного вируса в клетках насекомого и к аденоассоциированному вирусу, который обеспечивает усовершенствованную инфекционность.

Предпосылки изобретения

Аденоассоциированный вирус (AAV) можно рассматривать в качестве одного из наиболее перспективных вирусных векторов для генной терапии человека. AAV обладает способностью эффективно инфицировать делящиеся, а также неделящиеся клетки человека, AAV вирусный геном встраивается в один хромосомный участок в геноме клетки-хозяина и, что наиболее важно, даже несмотря на то, что AAV присутствует у многих людей, он никогда не был связан с каким-либо заболеванием. Ввиду этих преимуществ рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) оценивают в клинических исследованиях генной терапии гемофилии В, злокачественной меланомы, кистозного фиброза и других заболеваний. Многие клинические исследования и недавнее одобрение первого генно-терапевтического лекарственного средства в Европе, Alipogene tiparvovec (Glybera®, uniQure), подтверждают перспективу AAV стать основной опорой в клинической практике.

В целом, существует два основных типа систем продуцирования для рекомбинантного AAV. С одной стороны, существуют стандартные системы продуцирования в клетках млекопитающих определенных типов (таких как клетки 293, клетки COS, клетки HeLa, KB-клетки) и, с другой стороны, совсем недавно разработаны системы продуцирования с использованием клеток насекомого.

Млекопитающая система продуцирования страдает несколькими недостатками, из которых наиболее важным для терапевтического использования является ограниченное число частиц rAAV, генерируемых одной клеткой (порядка 10^4 частиц (рассмотрено в Clark, 2002, Kidney Int. 61 (Suppl. 1) : 9-15). Для клинических исследований может требоваться больше чем 10^{15} частиц rAAV. Чтобы продуцировать это число частиц rAAV, потребуются трансфекция и культивирование с использованием приблизительно 10^{11} культивируемых клеток 293 человека, эквивалента 5000 колб по 175 см^2 с клетками, что обозначает трансфицирование вплоть до 10^{11} клеток 293. Следовательно, уже доказана проблематичность крупномасштабного продуцирования rAAV с использованием систем культивирования клеток млекопитающего для того, чтобы получать материал для клинических исследований, продуцирование в коммерческом масштабе может даже не быть возможным. Кроме того, всегда существует риск того, что вектор для клинического использования, который продуцируют в культуре клеток млекопитающего, будет контаминирован нежелательным, возможно патогенным, материалом, присутствующим в клетке-хозяине млекопитающего.

Чтобы преодолеть эти проблемы млекопитающих систем продуцирования, разработана система продуцирования AAV с использованием клеток насекомого (Urabe et al., 2002, Hum. Gene Ther. 13: 1935-1943; US 20030148506 и US 20040197895). Для продуцирования AAV в клетках насекомого необходимы некоторые модификации, чтобы достигать правильной стехиометрии трех капсидных белков AAV (VP1, VP2 и VP3), которая основана на комбинации чередующегося использования двух акцепторных сайтов сплайсинга и субоптимального использования иницирующего кодона ACG для VP2, который не точно воспроизводится клетками насекомого. Для имитации правильной стехиометрии капсидных белков в клетках насекомого Urabe et al. (2002, выше) используют конструкцию, которую транскрибируют в единую полицистронную матричную РНК, которая способна экспрессировать все три белка VP без необходимости сплайсинга и в которой иницирующий кодон, расположенный выше всего по направлению считывания, заменяют на субоптимальный иницирующий кодон ACG.

В WO 2007/046703 раскрыто дополнительное усовершенствование инфекционности продуцирования, основанного на векторах rAAV, продуцируемых бакуловирусами, посредством оптимизации стехиометрии капсидных белков AAV в клетках насекомого.

Kohlbrenner et al. (2005, Mol. Ther. 12: 1217-25) сообщали, что бакуловирусная конструкция для экспрессии двух белков Rep, которую использовали Urabe et al., страдает неотъемлемой нестабильностью. Посредством расщепления палиндромной ориентации двух генов Rep в исходном векторе Urabe и конструирования двух отдельных бакуловирусных векторов для экспрессии Rep52 и Rep78, Kohlbrenner et al. (2005, выше) увеличивали стабильность пассирования вектора. Однако, несмотря на последовательную экспрессию Rep78 и Rep52 с двух независимых бакуловирусных конструкций Rep в клетках насекомого в течение по меньшей мере 5 переносов, урожай вектора rAAV в 5-10 раз ниже по сравнению с исходной бакуловирусной конструкцией Rep, разработанной Urabe et al. (2002, выше).

В WO 2009/014445 предоставлена альтернатива для усовершенствования стабильности во время продуцирования вектора rAAV на основе бакуловируса с использованием повторных кодирующих последовательностей с дифференциальными сдвигами кодонов.

Urabe et al. (J. Virol., 2006, 80 (4):1874-1885) сообщают о том, что частицы AAV5, продуцируемые в бакуловирусной системе с использованием ACG в качестве иницирующего кодона капсидного белка VP1, имеют плохую инфекционность и что, в отличие от AAV2 с VP1, экспрессированным с иницирующего кодона ACG, мутация +4 положения до остатка G в кодирующей последовательности VP1 AAV5 не улучшает инфекционность. Urabe et al. решали эту проблему посредством конструирования

химерных белков VP1 AAV2/5, в которых N-концевую часть из по меньшей мере 49 аминокислот из VP1 AAV5 заменяли на соответствующую часть VP1 AAV2 для того, чтобы усовершенствовать инфекционность вирионов. Таким образом, в данной области все еще сохраняется потребность в VP1 AAV5, экспрессируемом с иницирующего кодона ACG, который сохраняет инфекционность без обширных модификаций.

Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что векторы AAV, в частности векторы AAV5, такие как нехимерные векторы AAV5, модифицированные в соответствии с Urabe (Urabe et al., 2002, Hum. Gene Ther. 13: 1935-1943), WO 2007/046703 или WO 2009/014445, которые продуцировали в бакуловирусной системе, демонстрируют сниженную инфекционность в исследованиях *in vitro* и *in vivo* на мышах, например, по сравнению с соответствующими векторами AAV, продуцируемыми стандартными клетками 293 млекопитающего. Таким образом, все еще сохраняется потребность в системе продуцирования на основе бакуловируса для векторов gAAV с усовершенствованной инфекционностью.

Описание изобретения

Краткое описание изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая имеет нуклеотидную последовательность, содержащую открытую рамку считывания, в которой рамка считывания в порядке от 5' к 3' содержит:

- (i) первый кодон, который представляет собой субоптимальный кодон инициации трансляции, выбранный из группы, состоящей из CTG, ACG, TTG и GTG;
- (ii) второй кодон, который кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты;
- (iii) последовательность, которая кодирует капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), причем данная последовательность не содержит только кодон инициации трансляции VP1 и начинается с кодона второго аминокислотного остатка капсидного белка VP1.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению дополнительно содержит один или более кодонов, которые кодируют аминокислотные остатки, которые располагаются за вторым кодоном (ii) и перед аминокислотной последовательностью капсидного белка VP1 AAV (iii).

В предпочтительном варианте осуществления капсидные белки AAV представляют собой капсидные белки AAV серотипа 5, AAV серотипа 8 или AAV серотипа 9, более предпочтительно капсидные белки AAV имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 22, 28, 30, 71 и 73.

Альтернативно или в комбинации с какими-либо предыдущими вариантами осуществления, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления второй кодон кодирует аланин.

Альтернативно или в комбинации с какими-либо предыдущими вариантами осуществления, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления второй кодон выбирают из группы, состоящей из GCT, GCC, GCA, GCG и GGU, в которой предпочтительно кодон представляет собой GCT.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, в которой нуклеотидная последовательность модифицированной открытой рамки считывания, кодирующей капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), функционально связана с последовательностями, управляющими экспрессией в клетке насекомого.

Альтернативно или в комбинации с какими-либо предыдущими вариантами осуществления, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность рамки считывания функционально связана с промотором, выбранным из группы, состоящей из: полиэдрального промотора, промотора p10, 4xHsp27 EcRE+ минимального промотора Hsp70, промотора deltaE1, промотора E1. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, конструкция представляет собой вектор, подходящий для клеток насекомых, предпочтительно бакуловирусный вектор.

Альтернативно или в комбинации с какими-либо предыдущими вариантами осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит модифицированную открытую рамку считывания, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51, 69, 42, 47, 48 и 50, предпочтительно SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 69, более предпочтительно SEQ ID NO: 51.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к клетке насекомого, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением.

Альтернативно или в комбинации с какими-либо предыдущими вариантами осуществления, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления клетка насекомого дополнительно содержит: (a) вторую нуклеотидную последовательность, которая содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность инвертированного концевой повтора AAV (ITR); (b) третью нуклеотидную последовательность, которая содержит кодирующую последовательность Rep78 или Rep68, функционально связанную с последовательностями, управляющими экспрессией в клетке насекомого; (c) необязательно, четвертую нуклеотидную последовательность, которая содержит кодирующую последовательность Rep52 или Rep40, функционально связанную с последовательностями, управляющими экспрессией в

клетке насекомого.

Альтернативно или в комбинации с какими-либо предыдущими вариантами осуществления, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления клетка насекомого содержит: (а) первую конструкцию нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, в соответствии с чем первая конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит третью и четвертую нуклеотидные последовательности, как определено выше; и (b) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, которая содержит вторую нуклеотидную последовательность как определено выше, в которой вторая конструкция нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет собой вектор, совместимый с клеткой насекомого, более предпочтительно бакуловирусный вектор.

Альтернативно или в комбинации с какими-либо предыдущими вариантами осуществления, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления вторая нуклеотидная последовательность дополнительно содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес (для экспрессии в клетке млекопитающего), и в соответствии с чем по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес, становится встроенной в геном AAV серотипа 5, продуцируемого в клетке насекомого.

Альтернативно или в комбинации с какими-либо предыдущими вариантами осуществления, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления вторая нуклеотидная последовательность содержит две нуклеотидные последовательности ITR AAV, между которыми расположена указанная по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес.

Альтернативно или в комбинации с какими-либо предыдущими вариантами осуществления, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления первую нуклеотидную последовательность, вторую нуклеотидную последовательность, третью нуклеотидную последовательность и необязательно четвертую нуклеотидную последовательность стабильно встраивают в геном клетки насекомого.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к вириону AAV, содержащему в своем геноме капсидные белки AAV, кодируемые молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению, и по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую продукт гена, представляющего интерес.

Предпочтительно, вирион AAV в соответствии с изобретением содержит ген, представляющего интерес, который кодирует белок фактора IX или фактора VIII.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения AAV в клетке насекомого, включающему культивирование клетки насекомого по изобретению в условиях, подходящих для продуцирования AAV.

Определения

Как используют в настоящем документе, термин "функционально связан" относится к связи полинуклеотидных (или полипептидных) элементов в функциональном взаимоотношении. Нуклеиновая кислота "функционально связана", когда ее помещают в функциональное взаимоотношение с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, последовательность регуляции транскрипции функционально связана с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. Функционально связанный обозначает, что связанные последовательности ДНК типично являются смежными и, при необходимости, соединяют две кодирующие области белков, смежных и находящихся в рамке считывания.

"Управляющая экспрессией последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию нуклеотидной последовательности, с которой она функционально связана. Управляющая экспрессией последовательность "функционально связана" с нуклеотидной последовательностью, когда управляющая экспрессией последовательность контролирует и регулирует транскрипцию и/или трансляцию нуклеотидной последовательности. Таким образом, управляющая экспрессией последовательность может включать промоторы, энхансеры, внутренние участки связывания рибосомы (IRES), терминаторы транскрипции, иницирующий кодон перед кодирующим белком геном, сигнал сплайсинга для интронов и терминирующие кодоны. Термин "управляющая экспрессией последовательность" предназначен включать как минимум последовательность, присутствие которой запланировано для того, чтобы влиять на экспрессию, и также может включать дополнительные благоприятные компоненты. Например, лидерные последовательности и последовательности партнеров слияния представляют собой управляющие экспрессией последовательности. Термин также может включать такую конструкцию последовательности нуклеиновой кислоты, что из последовательности удаляют нежелательные потенциальные иницирующие кодоны в рамке считывания и вне ее. Также он может включать такую конструкцию последовательности нуклеиновой кислоты, что удаляют нежелательные потенциальные участки сплайсинга. Это включает последовательности или последовательности полиаденилирования (pA), которые управляют добавлением хвоста полиА, т.е. цепочки остатков аденина, на 3'-конец мРНК, последовательностей, обозначаемых как последовательности полиА. Также это можно конструировать для того, чтобы увеличивать стабильность мРНК. Управляющие экспрессией последовательности, которые влияют на стабильность транскрипции и трансляции, например, промоторы, а также последовательности, которые вызывают трансляцию, например, последовательности Козак, известны в клетках

насекомого. Управляющие экспрессией последовательности могут иметь такие свойства, чтобы модулировать нуклеотидную последовательность, с которой она функционально связана, так что достигают более низких уровней экспрессии или более высоких уровней экспрессии.

Как используют в настоящем документе, термин "промотор" или "последовательность регуляции транскрипции" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который выполняет функцию управления транскрипцией одной или нескольких кодирующих последовательностей, и расположен выше по направлению транскрипции по отношению к участку инициации транскрипции кодирующей последовательности и структурно идентифицирован присутствием сайта связывания ДНК-зависимой РНК полимeразы, участков инициации транскрипции и каких-либо других последовательностей ДНК, включая в качестве неограничивающих примеров сайты связывания факторов транскрипции, сайты связывания репрессоров и активаторов белков и какие-либо другие последовательности нуклеотидов, которые, как известно специалисту в данной области, действуют непосредственно или опосредованно для того, чтобы регулировать количество транскрипции для промотора. "Конститутивный" промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве тканей в большинстве физиологических условий и состояний развития. "Индукцибельный" промотор представляет собой промотор, который регулируется физиологически или развитием, например, посредством применения химического индуктора.

"Тканеспецифический" промотор активен только в тканях или клетках конкретных типов.

Термины "по существу идентичный", "существенная идентичность" или "по существу схожий" или "существенное сходство" обозначает, что два пептида или две нуклеотидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию, имеют по меньшей мере определенную процентную долю идентичности последовательностей, как определено в другом месте в настоящем документе. В GAP используют алгоритм глобального выравнивания Needleman и Wunsch для того, чтобы выравнивать две последовательности по всей их длине, максимизируя число совпадений и минимизируя число пропусков. В целом, в GAP используют параметры по умолчанию, со штрафом за создание пропуска=50 (нуклеотиды)/8 (белки) и штрафом за продолжение пропуска=3 (нуклеотиды)/2 (белки). Для нуклеотидов используемой матрицей замен по умолчанию является nwsgapdna и для белков матрицей замен по умолчанию является Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Ясно, что когда последовательности РНК являются так сказать по существу схожими или имеют определенную степень идентичности последовательностей с последовательностями ДНК, тимин (Т) в последовательности ДНК считают равным урацилу (U) в последовательности РНК. Выравнивания последовательностей и оценки для процентной доли идентичности последовательностей можно определять с использованием компьютерных программ, таких как пакет GCG Wisconsin, версия 10.3, который доступен в Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA, или программное обеспечение с открытым исходным кодом Emboss для Windows (текущая версия 2.7.1-07). Альтернативно процент сходства или идентичность можно определять с помощью поиска в базах данных, таких как FASTA, BLAST и т.д.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие парвовирусные белки Rep по изобретению, также можно определять по их способности гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 соответственно, при умеренных или предпочтительно при строгих условиях гибридизации. Строгие условия гибридизации в настоящем документе определяют как условия, которые делают возможной для последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере приблизительно 25, предпочтительно приблизительно 50 нуклеотидов, 75 или 100 и наиболее предпочтительно приблизительно 200 или больше нуклеотидов гибридизацию при температуре приблизительно 65°C в растворе, содержащем приблизительно 1 М соли, предпочтительно 6×SSC, или каком-либо другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу, и промывание при 65°C в растворе, содержащем приблизительно 0,1 М соли или меньше, предпочтительно 0,2×SSC, или каком-либо другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу. Предпочтительно, гибридизацию осуществляют в течение ночи, т.е. по меньшей мере в течение 10 ч и предпочтительно промывание осуществляют в течение по меньшей мере 1 ч по меньшей мере с двумя сменами промывающего раствора. Эти условия обычно делают возможной специфичную гибридизацию последовательностей, обладающих идентичностью последовательностей приблизительно 90% или больше.

Умеренные условия в настоящем документе определяют как условия, которые делают возможной для последовательностей нуклеиновой кислоты по меньшей мере 50 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно 200 или больше нуклеотидов гибридизацию при температуре приблизительно 45°C в растворе, содержащем приблизительно 1 М соли, предпочтительно 6×SSC, или каком-либо другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу, и промывание при комнатной температуре в растворе, содержащем приблизительно 1 М соли, предпочтительно 6×SSC, или каком-либо другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу.

Предпочтительно, гибридизацию осуществляют в течение ночи, т.е. по меньшей мере в течение 10 ч, и предпочтительно промывание осуществляют в течение по меньшей мере 1 ч по меньшей мере с двумя сменами промывающего раствора. Эти условия обычно делают возможной специфичную гибридизацию последовательностей, обладающих идентичностью последовательностей вплоть до 50%. Спе-

циалист в данной области способен модифицировать эти условия гибридизации для того, чтобы специфично идентифицировать последовательности с варьирующей идентичностью между 50% и 90%.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к использованию парвовирусов животных, в частности, депендовиров, таких как инфекционный AAV человека или обезьян, и их компонентов (например, генома парвовирусов животных) для применения в качестве векторов для введения и/или экспрессии нуклеиновых кислот в клетках млекопитающих. В частности, изобретение относится к усовершенствованию инфекционности таких парвовирусных векторов при продуцировании в клетках насекомого. Вирусы семейства Parvoviridae представляют собой небольшие ДНК-вирусы животных. Parvoviridae можно подразделить на два подсемейства: Parvovirinae, которые инфицируют позвоночных, и Densovirinae, которые инфицируют насекомых. Члены подсемейства Parvovirinae в настоящем документе обозначают как парвовирусы и они включают род депендовиров. Как можно заключить из названия их рода, члены Dependovirus уникальны тем, что им обычно требуется совместная инфекция с вирусом-помощником, таким как аденовирус или вирус герпеса, для продуктивной инфекции в клеточной культуре. Род Dependovirus включает AAV, который обычно инфицирует человека (например, серотипы 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) или приматов (например, серотипы 1 и 4), и родственные вирусы, которые инфицируют других теплокровных животных (например, аденоассоциированные вирусы коров, собак, лошадей и овец). Дополнительная информация о парвовирусах и других членах Parvoviridae изложена в Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication", глава 69 в Fields Virology (3-е издание, 1996). Для удобства настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано и описано в настоящем документе с помощью отсылки к AAV. Однако понятно, что изобретение не ограничено AAV, и в равной мере может быть применено к другим парвовирусам.

Геномная организация всех известных серотипов AAV очень схожа. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, которая меньше приблизительно 5000 нуклеотидов (н.) в длину. Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности для неструктурных белков репликации (Rep) и структурных белков (VP). Белки VP (VP1, 2 и 3) образуют капсид. Концевые 145 н.

Являются самокомплементарными и организованы так, чтобы можно было формировать энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильку. Эти шпильчатые структуры выполняют функцию точки начала репликации вирусной ДНК, служащей в качестве праймеров для комплекса клеточной ДНК полимеразы. После инфекции клеток млекопитающих с использованием wtAAV, происходит экспрессия генов Rep (т.е. Rep78 и Rep52) с промотора P5 и промотора P19, соответственно, и оба белка Rep имеют функцию в репликации вирусного генома. Событие сплайсинга в ORF Rep ведет к экспрессии фактически четырех белков Rep (т.е. Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Однако показано, что несплайсированные мРНК, кодирующие белки Rep78 и Rep52 в клетках млекопитающих, достаточны для продуцирования вектора AAV. Также в клетках насекомого белков Rep78 и Rep52 достаточно для продуцирования вектора AAV. Экспрессия трех капсидных белков VP1, VP2 и VP3 происходит с одной рамки считывания VP с промотора p40. Инфекция wtAAV в клетках млекопитающих для продуцирования капсидных белков основана на комбинации чередующегося использования двух акцепторных сайтов сплайсинга и субоптимального использования иницирующего кодона ACG для VP2. Однако это не воспроизводится точно в клетках насекомого, что, таким образом, требует дополнительных признаков для достижения правильной стехиометрии капсидных белков AAV.

В первом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая имеет нуклеотидную последовательность, которая содержит открытую рамку считывания, кодирующую капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV). Предпочтительно, модифицируют рамку считывания, кодирующую капсидные белки, по сравнению с открытой рамкой считывания дикого типа, кодирующей капсидные белки AAV, посредством по меньшей мере: (i) замены иницирующего кодона ATG на субоптимальный кодон инициации трансляции, выбранный из группы, состоящей из CTG, ACG, TTG и GTG; и (ii) инсерции кодонов для одного или нескольких аминокислотных остатков, вставляемых между субоптимальным кодоном инициации трансляции и кодоном, который кодирует аминокислотный остаток, который соответствует аминокислотному остатку в положении 2 аминокислотной последовательности капсидного белка, предпочтительно аминокислотному остатку в положении 2 аминокислотной последовательности капсидного белка (дикого типа) предпочтительно относится к положению 2 аминокислотной последовательности капсидного белка (дикого типа) VP1 AAV. Предпочтительно, за субоптимальным кодоном инициации трансляции непосредственно следует на его 3'-конце кодон для аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты.

Альтернативно в этом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая имеет нуклеотидную последовательность, которая содержит открытую рамку считывания, в которой открытая рамка считывания в порядке от 5' к 3' содержит, или состоит из:

- (i) первого кодона, который представляет собой субоптимальный кодон инициации трансляции,

выбранный из группы, состоящей из CTG, ACG, TTG и GTG;

(ii) второго кодона, выбранного из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты;

(iii) необязательно, одного или нескольких кодонов для дополнительных аминокислотных остатков, следующих за вторым кодоном; и,

(iv) последовательности, которая кодирует капсидные белки AAV, в соответствии с чем последовательность не содержит кодон инициации трансляции VP1, предпочтительно в соответствии с чем последовательность не содержит только кодон инициации трансляции VP1 или, говоря иначе, в соответствии с чем последовательность не содержит не больше чем кодон инициации трансляции VP1.

Таким образом, в (iv) последовательность предпочтительно содержит, или состоит из: остаточной части открытой рамки считывания, кодирующей капсидные белки AAV, в соответствии с чем остаточная часть начинается в положении, соответствующем второму аминокислотному положению в открытой рамке считывания дикого типа, кодирующей капсидные белки.

В настоящем документе понимают, что молекула нуклеиновой кислоты, имеющая нуклеотидную последовательность, которая содержит открытую рамку считывания, кодирующую капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), содержит нуклеотидные последовательности, которая кодирует предпочтительно все три капсидных белка VP1, VP2 и VP3 парвовирусов животных.

В настоящем документе понимают, что фраза "начинается с субоптимального кодона инициации трансляции, выбранного из группы, состоящей из CTG, ACG, TTG и GTG" или "первый кодон, который представляет собой субоптимальный кодон инициации трансляции, выбранный из группы, состоящей из CTG, ACG, TTG и GTG" обозначает, что иницирующий кодон открытой рамки считывания, кодирующей капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), в положении, кодирующем аминоконец капсидного белка VP1, представляет собой субоптимальный кодон инициации трансляции, выбранный из группы, состоящей из CTG, ACG, TTG и GTG.

В настоящем документе понимают, что субоптимальный обозначает, что кодон менее эффективен при инициации трансляции в контексте, в остальном идентичном, по сравнению с нормальным кодоном ATG. Предпочтительно иницирующий кодон для трансляции капсидного белка VP1 AAV выбирают из ACG, TTG, GTG и CTG, более предпочтительно иницирующий кодон для трансляции капсидного белка VP1 AAV выбирают из CTG и ACG и наиболее предпочтительно иницирующий кодон для трансляции капсидного белка VP1 AAV представляет собой CTG. Парвовирус животных предпочтительно представляет собой депендовироз, более предпочтительно аденоассоциированный вирус (AAV) человека или обезьяны.

В особенно предпочтительном варианте осуществления субоптимальный иницирующий кодон VP1 представляет собой CTG, один дополнительный кодон вводят непосредственно смежно с субоптимальным иницирующим кодоном на его 3'-конце, дополнительный кодон кодирует аланин. Предпочтительно капсидные белки представляют собой капсидные белки AAV5. Это ведет к усовершенствованной потенции вирионов AAV5. Термин "потенция" в настоящем документе используют для обозначения способности вектора управлять экспрессией его генетического материала.

Открытая рамка считывания дополнительно содержит второй кодон, который кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты, предпочтительно кодирует аланин. Более предпочтительно, второй кодон выбирают из группы, состоящей из GCT, GCC, GCA, GCG и GGU, в которой кодон предпочтительно представляет собой GCT. Открытая рамка считывания необязательно содержит один или несколько кодонов, которые кодируют другие дополнительные аминокислотные остатки, идущие за вторым кодоном, например, кодоны для 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительных аминокислот, но предпочтительно меньше чем 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15 или 14 дополнительных аминокислотных остатков. Как легко понять, кодоны, которые кодируют дополнительные аминокислотные остатки, должны совпадать с открытой рамкой считывания капсидных белков.

В одном из вариантов осуществления, если открытую рамку считывания сравнивают с капсидным белком дикого типа, открытая рамка считывания, кодирующая капсидные белки, дополнительно содержит кодоны, кодирующие один или несколько аминокислотных остатков, которые вставлены между субоптимальным кодоном инициации трансляции VP1 и кодоном, который кодирует аминокислотный остаток непосредственно смежно с иницирующим кодоном на его 3'-конце в соответствующем капсидном белке дикого типа. Например, открытая рамка считывания содержит кодоны для 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительных аминокислотных остатков по сравнению с соответствующим капсидным белком дикого типа. Предпочтительно, открытая рамка считывания содержит кодоны для меньше чем 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15 или 14 дополнительных аминокислотных остатков по сравнению с соответствующим капсидным белком дикого типа. Как легко понять, кодоны, которые кодируют дополнительные аминокислотные остатки, должны совпадать с открытой рамкой считывания капсидных белков. Среди этих кодонов, которые кодируют дополнительные аминокислотные остатки по сравнению с соответствующими капсидными белками дикого типа, первый кодон, т.е. кодон, который непосредственно смежен с субоптимальным кодоном инициации трансляции на его 3'-конце, кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, вали-

на, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Таким образом, если имеет место только один дополнительный кодон между кодоном инициации трансляции и кодоном, который кодирует аминокислотный остаток, который соответствует остатку 2 последовательности дикого типа, этот дополнительный кодон кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Если имеет место больше чем один дополнительный кодон между кодоном инициации трансляции и кодоном, который кодирует аминокислотный остаток 2 последовательности дикого типа, то кодон, следующий непосредственно за кодоном инициации трансляции, кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Предпочтительно, дополнительный аминокислотный остаток, следующий непосредственно за субоптимальным кодоном инициации трансляции (т.е. на его 3'-конце), представляет собой аланин, глицин или валин, более предпочтительно аланин. Другими словами, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, кодон, следующий непосредственно за субоптимальным кодоном инициации трансляции, кодирует аланин.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения кодон, следующий непосредственно за субоптимальным кодоном инициации трансляции, т.е. второй кодон, выбирают из группы, состоящей из GCT, GCC, GCA, GCG, GGU, GGC, GGA, GGG, GUU, GUC, GUA, GUG, GAU, GAC, GAA и GAG, предпочтительно из группы, состоящей из GCT, GCC, GCA, GCG и GGU, даже более предпочтительно кодон представляет собой GCT.

Последовательность, которая кодирует капсидные белки AAV на стадии (iv), может представлять собой капсидную последовательность, как находят в природе, например, такую как в AAV1-AAV13, нуклеотидные и аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 13-38 и SEQ ID NO: 70-73. Таким образом, последовательность, которая кодирует капсидные белки AAV на стадии (iv), например, может представлять собой капсидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 и AAV13. Альтернативно, последовательность является искусственной, например, последовательность может представлять собой гибридную форму или может содержать оптимизированные кодоны, например, в соответствии с использованием кодонов в *AcmNPv* или *Spodoptera frugiperda*. Например, капсидная последовательность может состоять из последовательностей VP2 и VP3 AAV1, тогда как остаточная часть последовательности VP1 происходит из AAV5. Предпочтительным капсидным белком является AAV5, предпочтительно как предоставлено в SEQ ID NO: 22, AAV8, предпочтительно как предоставлено в SEQ ID NO: 28 или AAV9, предпочтительно как предоставлено в SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 73. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления капсидные белки AAV представляют собой капсидные белки AAV серотипа 5, AAV серотипа 8 или AAV серотипа 9, которые модифицированы в соответствии с изобретением. Если капсидный белок относится к AAV9, предпочтительно, чтобы капсидный белок имел такую последовательность, например, как раскрыто в WO 03/052052 или WO 05/033321 или как предоставлено в SEQ ID NO: 29, 30, 70, 71, 72, 73 или 74. Более предпочтительно, если капсидный белок относится к AAV9, капсидный белок имеет последовательность как предоставлено в SEQ ID NO: 72 и 73. Более предпочтительно, капсидные белки AAV представляют собой капсидные белки AAV серотипа 5, которые модифицированы в соответствии с изобретением. Понятно, что точные молекулярные массы капсидных белков, а также точные положения кодонов инициации трансляции могут различаться между различными парвовирусами. Однако специалист знает, как идентифицировать соответствующее положение в нуклеотидных последовательностях других парвовирусов, нежели AAV-5. Альтернативно, последовательность, которая кодирует капсидные белки AAV, представляет собой искусственную последовательность, например, являющуюся результатом экспериментов по направленной эволюции. Это может включать создание капсидных библиотек через перетасовку ДНК, допускающую ошибки ПЦР, биоинформационное рациональное конструирование, сайт-насыщающий мутагенез. Получаемые капсиды основаны на существующих серотипах, но содержат различные изменения аминокислот или нуклеотидов, которые усвершенствуют признаки таких капсидов. Получаемые капсиды могут представлять собой комбинацию различных частей существующих серотипов, "перетасованные капсиды" или содержать полностью новые изменения, т.е. добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот или нуклеотидов, организованных в группы или рассеянных по всей длине гена или белка. См. например, Schaffer and Maheshri; Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS San Francisco, CA, USA; September 1-5, 2004, страницы 3520-3523; Asuri et al. (2012) Molecular Therapy 20(2):329-3389; Lisowski et al. (2014) Nature 506(7488):382-386, включенные в настоящий документ посредством ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, открытая рамка считывания, кодирующая капсидный белок VP3, начинается с неканонического кодона инициации трансляции, выбранного из группы, состоящей из: ACG, ATT, ATA, AGA, AGG, AAA, CTG, CTT, CTC, CTA, CGA, CGC, TTG, TAG и GTG. Предпочтительно неканонический кодон инициации трансляции выбирают из группы, состоящей из GTG, CTG, ACG, TTG, более предпочтительно неканонический кодон инициации трансляции представляет собой CTG.

Предпочтительная нуклеотидная последовательность по изобретению для экспрессии капсидных

белков AAV представляет собой нуклеотидную последовательность, которая содержит управляющую экспрессией последовательность, содержащую контекст инициатора VP2. В настоящем документе понимают, что контекст инициатора VP2 обозначает определенное число нуклеотидов, предшествующих неканонической имитации начала трансляции VP2. В предпочтительном варианте осуществления контекст инициатора VP представляет собой девятинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или нуклеотидную последовательность, по существу гомологичную SEQ ID NO: 3, расположенную выше по направлению считывания от субоптимального кодона инициации трансляции нуклеотидной последовательности, которая кодирует капсидный белок VP1 AAV, предпочтительно непосредственно выше по направлению считывания от субоптимального кодона инициации трансляции, т.е. непосредственно смежно с субоптимальным кодоном инициации трансляции на его 5'-конце.

Последовательность с существенной идентичностью с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3, которая будет помогать увеличивать экспрессию VP1, представляет собой, например, последовательность, которая обладает по меньшей мере 60%, 70%, 80% или 90% идентичностью, предпочтительно 100% идентичностью, с девятинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3.

Дополнительная предпочтительная нуклеотидная последовательность по изобретению для экспрессии капсидных белков AAV представляет собой нуклеотидную последовательность, которая содержит управляющую экспрессией последовательность, которая содержит консенсусную последовательность Козак около иницирующего кодона нуклеотидной последовательности, которая кодирует капсидный белок VP1 AAV. Консенсусная последовательность Козак в настоящем документе определена как GCCGCC(NNN)G (SEQ ID NO: 4), в которой R представляет собой пурин (т.е. А или G) и в которой (NNN) обозначает какой-либо из субоптимальных иницирующих кодонов, как определено в настоящем документе выше. Предпочтительно, в консенсусной последовательности Козак в нуклеотидной последовательности по изобретению R представляет собой G. Нуклеотидную последовательность по изобретению для экспрессии капсидных белков AAV, которая содержит консенсусную последовательность Козак, таким образом предпочтительно выбирают из GCCACC(ACG)G (SEQ ID NO: 5), GCCGCC(ACG)G (SEQ ID NO: 6), GCCACC(TTG)G (SEQ ID NO: 7), GCCGCC (TTG)G (SEQ ID NO: 8), GCCACC(GTG)G (SEQ ID NO: 9), GCCGCC(GTG)G (SEQ ID NO: 10), GCCACC(CTG)G (SEQ ID NO: 11) и GCCGCC(CTG)G (SEQ ID NO: 12), более предпочтительно нуклеотидную последовательность, которая содержит консенсусную последовательность Козак, выбирают из GCCACC(CTG)G (SEQ ID NO: 11) и GCCGCC(CTG)G (SEQ ID NO: 12), наиболее предпочтительно нуклеотидная последовательность, которая содержит консенсусную последовательность Козак, представляет собой GCCGCC(CTG)G (SEQ ID NO: 12). Нуклеотиды в скобках в настоящем документе указывают положение иницирующего кодона белка VP1.

Нуклеотидная последовательность по изобретению для экспрессии капсидных белков AAV дополнительно предпочтительно содержит по меньшей мере одну модификацию нуклеотидной последовательности, которая кодирует капсидный белок VP1 AAV, выбранную из G в нуклеотидном положении 12, А в нуклеотидном положении 21 и С в нуклеотидном положении 24, в которой нуклеотидные положения соответствуют нуклеотидным положениям в нуклеотидных последовательностях дикого типа, например, как показано в SEQ ID NO: 21. "Потенциальный/возможный ложный участок инициации" или "потенциальный/возможный ложный кодон инициации трансляции" в настоящем документе понимают как обозначение кодон ATG с сохранением рамки считывания, расположенный в кодирующей последовательности капсидного белка(белков). Устранение возможных ложных участков инициации для трансляции VP1 других серотипов хорошо известно специалисту в данной области, как и устранение предполагаемых участков сплайсинга, которые могут быть распознаны в клетках насекомого. Например, модификация нуклеотида в положении 12 не необходима для рекомбинантного AAV5, поскольку нуклеотид Т не дает начала ложному кодону ATG. Например, дополнительная модификация нуклеотидной последовательности для AAV5 может представлять собой то, что представлено SEQ ID NO: 39. Различные модификации последовательностей AAV дикого типа для надлежащей экспрессии в клетках насекомого получают посредством применения таких общеизвестных способов генетической инженерии, как описано, например, в Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-е издание), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Специалисту в данной области известны различные дополнительные модификации кодирующих областей VP, которые будут или увеличивать урожай VP и вириона или иметь другие желаемые эффекты, такие как измененный тропизм, или снижать антигенность вириона. Эти модификации входят в объем настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из открытой рамки считывания, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51, 69, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50 и 52, более предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из открытой рамки считывания, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51, 69, 42, 43, 47, 48 и 50, и даже более предпочтительно она содержит или состоит из SEQ ID NO: 69 или 51, и еще более предпочтительно она содержит или состоит из SEQ ID NO: 51.

Предпочтительно нуклеотидная последовательность по изобретению, кодирующая капсидные бел-

ки AAV, функционально связана с управляющими экспрессией последовательностями для экспрессии в клетке насекомого. Таким образом, во втором аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, в которой нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания, кодирующей капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), функционально связана с управляющими экспрессией последовательностями для экспрессии в клетке насекомого. Эти управляющие экспрессией последовательности по меньшей мере содержат промотор, который активен в клетках насекомого. Способы, известные специалисту в данной области для экспрессии чужеродных генов в клетках-хозяевах насекомого, можно использовать для практической реализации изобретения. Способы для молекулярного конструирования и экспрессии полипептидов в клетках насекомого описаны, например, в Summers and Smith. 1986. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Texas Agricultural Experimental Station Bull. № 7555, College Station, Tex.; Luckow. 1991. B Prokop et al., Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications, 97-152; King, L. A. and R. D. Possee, 1992, The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York; W. H. Freeman and Richardson, C. D., 1995, Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, volume 39; US 4,745,051; US2003148506; и WO 03/074714. В частности, подходящим промотором для транскрипции нуклеотидной последовательности по изобретению, кодирующей капсидные белки AAV, является например, полиэдральный промотор (polH), такой как промотор polH, предоставленный в SEQ ID NO: 53, и короткий промотор polH, предоставленный в SEQ ID NO: 54. Однако в данной области известны другие промоторы, которые активны в клетках насекомого, например, промотор полиэдрина (polH), промотор p10, промотор p35, 4xHsp27 EcRE+минимальный Hsp70 промотор, промотор deltaE1, промотор E1 или промотор IE-1 и дополнительные промоторы описаны в приведенных выше источниках.

Предпочтительно конструкция нуклеиновой кислоты для экспрессии капсидных белков AAV в клетках насекомого представляет собой вектор, совместимый с клеткой насекомого. "Вектор, совместимый с клеткой насекомого" или "вектор" понимают как молекулу нуклеиновой кислоты, которая способна к продуктивному трансформированию или трансфекции насекомого или клетки насекомого. Образцовые биологические векторы включают плазмиды, линейные молекулы нуклеиновой кислоты и рекомбинантные вирусы. Можно использовать любой вектор до тех пор, пока он совместим с клеткой насекомого. Вектор может встраиваться в геном клеток насекомого, но присутствие вектора в клетке насекомого не обязательно является перманентным, и также включены временные эпизодические векторы. Векторы можно вводить с помощью любого известного средства, например, с помощью химической обработки клеток, электропорации или инфекции. В предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой бакуловирус, вирусный вектор или плазмиду. В более предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой бакуловирус, т.е. конструкция представляет собой бакуловирусный вектор. Бакуловирусные векторы и способы их использования описаны в цитированных выше источниках по молекулярному конструированию клеток насекомого.

В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, содержащаяся в конструкции нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, содержит или состоит из открытой рамки считывания, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 51, 69, 42, 43, 47, 48 и 50, более предпочтительно она содержит или состоит из SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 69, даже более предпочтительно она содержит или состоит из SEQ ID NO: 51.

В третьем аспекте изобретение относится к клетке насекомого, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению, как определено выше. Любую клетку насекомого, которая делает возможной репликацию AAV и которую можно поддерживать в культуре, можно использовать в соответствии с настоящим изобретением. Например, используемая клеточная линия может быть из *Spodoptera frugiperda*, клеточных линий дрозофилы или клеточных линий москитов, например, получена из клеточных линий *Aedes albopictus*. Предпочтительные клетки насекомого или клеточные линии представляют собой клетки от видов насекомых, которые восприимчивы к бакуловирусной инфекции, включая, например, expresSF+®, клетки *Drosophila Schneider 2* (S2), Se301, SeIZD2109, SeUCRI, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, Ha2302, Hz2E5 и High Five из Invitrogen.

Предпочтительная клетка насекомого в соответствии с изобретением дополнительно содержит: (a) вторую нуклеотидную последовательность, которая содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность инвертированного концевой повтора AAV (ITR); (b) третью нуклеотидную последовательность, которая содержит кодирующую последовательность Rep52 или Rep40, функционально связанную с управляющими экспрессией последовательностями для экспрессии в клетке насекомого; и (c) четвертую нуклеотидную последовательность, которая содержит кодирующую последовательность Rep78 или Rep68, функционально связанную с управляющими экспрессией последовательностями для экспрессии в клетке насекомого.

В контексте изобретения "по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность ITR AAV" понимают как обозначение палиндромной последовательности, которая содержит главным образом ком-

плементарные, симметрично расположенные последовательности, также обозначаемые как области "А", "В" и "С". ITR выполняет функцию участка начала репликации, участка, играющего "цис" роль в репликации, т.е. являющегося участком распознавания для транс-действующих белков репликации (например, Rep 78 или Rep68), которые распознают палиндром и специфичные последовательности внутри палиндрома. Единственным исключением для симметрии последовательности ITR является область "D" в ITR. Она является уникальной (не имеет комплемента внутри одного ITR). Разрыв одноцепочечной ДНК возникает в соединении между областями А и D. Это представляет собой область, где происходит инициация синтеза новой ДНК. Область D обычно расположена по одну сторону от палиндрома и обеспечивает направленность стадии репликации нуклеиновой кислоты. AAV, реплицирующийся в клетке млекопитающего, типично имеет две последовательности ITR. Однако возможно конструировать ITR с тем, чтобы симметрично располагать сайты связывания на обоих нитях областей А и областей D, по одному на каждой стороне от палиндрома. Тогда на двунитевой круглой ДНК матрице (например, плазмиде) репликация нуклеиновой кислоты с помощью Rep78 или Rep68 протекает в обоих направлениях и одного ITR достаточной AAV репликации круглого вектора. Таким образом, в контексте настоящего изобретения можно использовать одну нуклеотидную последовательность ITR. Однако предпочтительно используют два или другое четное число правильных ITR. Наиболее предпочтительно используют две последовательности ITR. Ввиду безопасности вирусных векторов может быть желательно конструировать вирусный вектор, который неспособен дополнительно размножаться после начального введения в клетку. Такой механизм безопасности для ограничения нежелательного размножения вектора в реципиенте можно обеспечивать посредством использования gAAV с химерным ITR, как описано в US2003148506. В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, которая кодирует парвовирусные капсидные белки VP1, VP2 и VP3, содержит по меньшей мере одну инсерцию последовательности с сохранением рамки считывания, которая кодирует повтор иммунного уклонения, такой как описано в WO 2009/154452. Это ведет к формированию так называемого самокомплементарного или мономерного дуплексного парвовирусного вириона, который обладает таким преимуществом, что он вызывает сниженный иммунный ответ. В предпочтительном варианте осуществления последовательность, которая кодирует парвовирусные капсидные белки VP1, VP2 и VP3, содержит мономерный дуплекс или самокомплементарный геном. Для получения мономерного дуплексного вектора AAV, белки Rep AAV и капсидные белки AAV экспрессируют в клетках насекомого в соответствии с настоящим изобретением и в присутствии генома вектора, содержащего по меньшей мере один ITR AAV, в котором экспрессию белка Rep52 и/или Rep40 увеличивают относительно экспрессии белка Rep78 и/или Rep68. Мономерные дуплексные векторы AAV также можно получать посредством экспрессии в клетках насекомого белков Rep AAV и белков Cap AAV в присутствии векторной геномной конструкции, фланкированной посредством по меньшей мере одним ITR AAV, в которой активность образования одонитевых разрывов у Rep78 и/или Rep 60 снижают относительно хеликазной/капсидирующей активности у Rep52 и/или Rep 40, например, как описано в WO 2011/122950.

Число используемых векторов или конструкций нуклеиновой кислоты не является ограничивающим в изобретении. Например, один, два, три, четыре, пять, шесть или больше векторов можно использовать для того, чтобы продуцировать AAV в клетках насекомого в соответствии с настоящим изобретением. Если используют шесть векторов, один вектор кодирует VP1 AAV, другой вектор кодирует VP2 AAV, еще один другой вектор кодирует VP3 AAV, еще один другой вектор кодирует Rep52 или Rep40, тогда как Rep78 или Rep 68 кодируется другим вектором и последний вектор содержит по меньшей мере один ITR AAV. Дополнительные векторы можно использовать для того, чтобы экспрессировать, например, Rep52 и Rep40, а также Rep78 и Rep 68. Если используют меньше чем шесть векторов, векторы могут содержать различные комбинации по меньшей мере одного ITR AAV и кодирующих последовательностей VP1, VP2, VP3, Rep52/Rep40 и Rep78/Rep68. Предпочтительно используют два вектора или три вектора, причем два вектора более предпочтительны, как описано выше. Если используют два вектора, предпочтительно клетка насекомого содержит: (а) первую конструкцию нуклеиновой кислоты для экспрессии капсидных белков AAV, как определено выше, эта конструкция дополнительно содержит третью и четвертую нуклеотидные последовательности, как определено в (b) и (c) выше, третья нуклеотидная последовательность содержит кодирующую последовательность Rep52 или Rep40, функционально связанную по меньшей мере с одной управляющей экспрессией последовательностью для экспрессии в клетке насекомого, и четвертая нуклеотидная последовательность содержит кодирующую последовательность Rep78 или Rep68, функционально связанную по меньшей мере с одной управляющей экспрессией последовательностью для экспрессии в клетке насекомого; и (b) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, которая содержит вторую нуклеотидную последовательность, как определено в (а) выше, которая содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность ITR AAV. Если используют три вектора, предпочтительно используют ту же конфигурацию, которую используют для двух векторов, за исключением того, что отдельные векторы используют для экспрессии капсидных белков и для экспрессии белков Rep52, Rep40, Rep78 и Rep68. Последовательности в каждом векторе могут быть в любом порядке относительно друг друга. Например, если один вектор содержит ITR и ORF содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие капсидные белки VP, ORF VP можно располагать в векторе

так, что при репликации ДНК между последовательностями ITR, репликация ORF VP происходит или не происходит. В качестве другого примера, кодирующие последовательности и/или ORF Rep, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие капсидные белки VP, могут быть в любом порядке в векторе. Понятно, что также вторую, третью и дополнительные конструкции нуклеиновой кислоты предпочтительно представляют собой векторы, совместимые с клеткой насекомого, предпочтительно бакуловирусные векторы, как описано выше. Альтернативно в клетке насекомого по изобретению одну или несколько из первой нуклеотидной последовательности, второй нуклеотидной последовательности, третьей нуклеотидной последовательности и четвертой нуклеотидной последовательности и необязательных дополнительных нуклеотидных последовательностей можно стабильно встраивать в геном клетки насекомого. Специалист в данной области знает как стабильно ввести нуклеотидную последовательность в геном насекомого и как идентифицировать клетку, имеющую такую нуклеотидную последовательность в геноме. Встраиванию в геном можно способствовать, например, путем использования вектора, который содержит нуклеотидные последовательности, высоко гомологичные с областями генома насекомого. Использование конкретных последовательностей, таких как транспозоны, представляет собой другой путь для того, чтобы вводить нуклеотидную последовательность в геном.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления клетка насекомого в соответствии с изобретением содержит: (а) первую конструкцию нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, в соответствии с чем первая конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит третью и четвертую нуклеотидные последовательности, как определено выше; и (b) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, которая содержит вторую нуклеотидную последовательность, как определено выше, где вторая конструкция нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет собой вектор, совместимый с клеткой насекомого, более предпочтительно бакуловирусный вектор.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения вторая нуклеотидная последовательность присутствует в клетках насекомого по изобретению, т.е. последовательность, которая содержит по меньшей мере один ITR AAV, дополнительно содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес (предпочтительно для экспрессии в клетке млекопитающего), в соответствии с чем предпочтительно по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес, становится встроенной в геном AAV, продуцируемого в клетке насекомого. Предпочтительно по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес, представляет собой последовательность для экспрессии в клетке млекопитающего. Предпочтительно вторая нуклеотидная последовательность содержит две нуклеотидные последовательности ITR AAV и где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес, расположена между двумя нуклеотидными последовательностями ITR AAV. Предпочтительно, нуклеотидная последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес (для экспрессии в клетке млекопитающего), должна быть встроена в геном AAV, продуцируемого в клетке насекомого, если ее располагают между двумя правильными ITR или располагают на любой стороне от ITR, сконструированного с двумя областями D. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения относится к клетке насекомого в соответствии с изобретением, в которой вторая нуклеотидная последовательность содержит две нуклеотидные последовательности ITR AAV и где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес, расположена между двумя нуклеотидными последовательностями ITR AAV.

Типично, продукт гена, представляющего интерес, включая ITR, составляет в длину 5000 нуклеотидов (н.) или меньше. В другом варианте осуществления ДНК увеличенного размера, т.е. больше чем 5000 н. в длину, можно экспрессировать *in vitro* или *in vivo* с использованием вектора AAV, описанного в настоящем изобретении. ДНК увеличенного размера здесь понимают как ДНК, которая превышает верхний предел упаковки AAV в 5 т.п.о. Следовательно, также возможно создание векторов, AAV способных продуцировать рекомбинантные белки, которые обычно кодируются более крупными геномами, чем 5,0 т.п.н. Например, авторы настоящего изобретения создавали векторы gAAV5, содержащие частично однонаправленно упакованные фрагменты hFVIII, в клетках насекомого. Полный размер векторного генома, охватывающий по меньшей мере 5,6 т. о. упаковывали в две популяции частиц AAV5, содержащих фрагмент FVIII. Показано, что эти варианты AAV5-FVIII векторов активно секретируют FVIII. Это подтверждали *in vitro*, где вектор AAV, содержащий продукт гена, представляющего интерес, кодирующий фактор VIII, после инфекции клеток Huh7 приводил к продуцированию активного белка FVIII. Аналогичным образом, доставка gAAV.FVIII в хвостовую вену мышей приводила к продуцированию активного белка FVIII. Молекулярный анализ продуктов капсидирования недвусмысленно показывал, что экспрессирующая FVIII кассета 5,6 т.п.о. не полностью инкапсулирована в частицу AAV. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, авторы изобретения предполагают, что +и - нити ДНК капсидированных молекул обнаруживали недостающие 5'-концы. Это находится в соответствии с ранее описанным однонаправленным (начиная на 3'-конце) механизмом упаковки, действующим в соответствии с принципом "голова целиком" с пределом 4,7-4,9 т.п.о. (см., например, Wu et al. [2010] *Molecular Therapy* 18 (1) :80-86; Dong et al. [2010] *Molecular Therapy* 18 (1):87-92; Kapranov et al. [2012] *Human Gene Therapy* 23:46-55;

и в особенности Lai et al. [2010] *Molecular Therapy* 18(1):75-79.

Несмотря на то, что капсидировано только приблизительно 5 т.п.н. от целого векторного генома 5,6 т.п.н., вектор активен и ведет к экспрессии активного FVIII. Авторы изобретения показали, что сборка правильной матрицы для продуцирования FVIII в целевой клетке на основании частичной комплементации+и-нитей ДНК, после чего следовал синтез второй нити.

Вторая нуклеотидная последовательность, которая определена выше в настоящем документе, таким образом, может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует по меньшей мере один "продукт гена, представляющего интерес" для экспрессии в клетке млекопитающего, которая расположена так, что она будет встроена в геном AAV, реплицированный в клетке насекомого. Любую нуклеотидную последовательность можно встраивать для последующей экспрессии в клетке млекопитающего, трансфицированной AAV, продуцированным в соответствии с настоящим изобретением, до тех пор пока конструкция остается в пределах упаковочной вместительности вириона AAV. Нуклеотидная последовательность, например, может кодировать белок, она может экспрессировать RNAi агент, т.е. молекулу РНК, которая способна к РНК-интерференции, такой как, например, shRNA (РНК с короткой шпилькой) или миРНК (короткая интерферирующая РНК). "миРНК" обозначает малую интерферирующую РНК, которая представляет собой двухцепочечную РНК небольшой длины, которая не токсична в клетках млекопитающих (Elbashir et al., 2001, *Nature* 411: 494-98; Caplen et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9742-47). В предпочтительном варианте осуществления вторая нуклеотидная последовательность может содержать две нуклеотидные последовательности, каждая кодирует один продукт гена, представляющего интерес, для экспрессии в клетке млекопитающего. Каждую из двух нуклеотидных последовательностей, кодирующих продукт, представляющий интерес, располагают так, что она будет встроена в геном гAAV, реплицированный в клетке насекомого.

Продукт, представляющий интерес, для экспрессии в клетке млекопитающего может представлять собой продукт терапевтического гена. Продукт терапевтического гена может представлять собой полипептид или молекулу РНК (миРНК) или другой продукт гена, который при экспрессии в целевой клетке обеспечивает желаемый терапевтический эффект, например, такой как абляция нежелательной активности, например, абляция инфицированной клетки, или комплементация генетического дефекта, например, вызывающего недостаточность ферментативной активности. Примеры терапевтических полипептидных продуктов генов включают CFTR, фактор IX, липопропротеин-липазу (LPL, предпочтительно LPL S447X; см. WO 01/00220), аполипопротеин A1, уридиндифосфат глюкуронозилтрансферазу (UGT), белок, взаимодействующий с регулятором ГТФазы при пигментной дистрофии сетчатки (RP-GRIP), цитокины или интерлейкины, например, такие как IL-10, дистрофии, PBGD, NaGLU, Treg167, Treg289, EPO, IGF, IFN, GDNF, FOXP3, фактор VIII, VEGF, AGXT и инсулин. Альтернативно или вдобавок в качестве продукта второго гена вторая нуклеотидная последовательность, которая определена выше в настоящем документе, может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, который служит в качестве маркерных белков для того, чтобы оценивать трансформирование клетки и экспрессию. Подходящие маркерные белки для этой цели представляют собой, например, флуоресцентный белок GFP и гены селективных маркеров HSV тимидинкиназы (для отбора в среде HAT), бактериальную гигромицин В фосфотрансферазу (для отбора на гигромицине В), Tn5 аминокликозидфосфотрансферазу (для отбора на G418) и дигидрофолатредуктазу (DHFR) (для отбора на метотрексате), CD20, ген низкоаффинного фактора роста нервов. Источники для получения этих маркерных генов и способы их использования предоставлены в Sambrook and Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (3-е издание), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Кроме того, вторая нуклеотидная последовательность, которая определена выше в настоящем документе, может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, который может служить в качестве безопасного механизма, который делает возможным излечение от клеток, трансдуцированных с использованием гAAV по изобретению, если это полагают необходимым. Такая нуклеотидная последовательность, часто обозначаемая как ген самоубийства, кодирует белок, который способен превращать пролекарственное средство в токсичное вещество, которое способно уничтожать трансгенные клетки, в которых экспрессируют белок. Подходящие примеры таких генов самоубийства включают, например, ген цитозиндезаминазы *E. coli* или один из генов тимидинкиназы из вируса простого герпеса, цитомегаловируса и вируса ветряной оспы, в случае которых можно использовать ганцикловир в качестве пролекарственного средства для того, чтобы уничтожать трансгенные клетки у субъекта (см. например Clair et al., 1987, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 844-849).

В другом варианте осуществления продукт гена, представляющего интерес, может представлять собой белок AAV. В частности, белок Rep, такой как Rep78 или Rep68, или его функциональный фрагмент. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует Rep78 и/или Rep68, если присутствует в геноме гAAV по изобретению и экспрессируется в клетке млекопитающего, трансдуцированного с использованием гAAV по изобретению, делает возможным встраивание гAAV в геном трансдуцированной клетки млекопитающего. Экспрессия Rep78 и/или Rep68 в клетке млекопитающего, трансдуцированной или трансфицированной с использованием гAAV, может обеспечивать преимущество при определенном использовании гAAV, делая возможной длительную или перманентную экспрессию какого-либо другого

продукта гена, представляющего интерес, введенного в клетку с помощью гAAV.

В векторах гAAV по изобретению по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, кодирующая продукт гена, представляющего интерес, для экспрессии в клетке млекопитающего, предпочтительно функционально связана по меньшей мере с одной управляющей экспрессией последовательностью, совместимой с клеткой млекопитающего, например, с промотором. Многие такие промоторы известны в данной области (см. Sambrook and Russel, 2001, выше). Можно использовать конститутивные промоторы, которые повсеместно экспрессируются в клетках многих типов, такие как промотор CMV. Однако, более предпочтительны промоторы, которые являются индуцибельными, тканеспецифическими, специфичными к типу клеток или специфичными к клеточному циклу. Например, для специфичной экспрессии в печени промотор можно отбирать из промотора $\alpha 1$ -антитрипсина, промотора глобулина, связывающего тиреоидный гормон, промотора альбумина, промотора LPS (глобулин, связывающий тироксин), промотора гибрида HCR-ApoCII, промотора гибрида HCR-hAAT и промотора аполипопротеина E, LP1, HLP, минимального промотора TTR, промотора FVIII, энхансера hyperon, ealb-hAAT. Другие примеры включают промотор E2F для избирательной экспрессии в опухоли и, в частности, для избирательной экспрессии в опухоли неврологических клеток (Pag et al., 1997, Nat. Med. 3:1145-9) или IL-2 промотор для использования в мононуклеарных клетках крови (Hagenbaugh et al., 1997, J Exp Med; 185: 2101-10).

AAV способен инфицировать множество клеток млекопитающих. См., например, Tratschin et al., Mol. Cell Biol., 5(11):3251-3260 (1985) и Grimm et al., Hum. Gene Ther., 10 (15) : 2445-2450 (1999). Однако AAV трансдукция синовиальных фибробластов человека значительно более эффективна, чем в схожих мышечных клетках, Jennings et al., Arthritis Res, 3:1 (2001), а клеточный тропизм у AAV различается среди серотипов. См., например, Davidson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 (7) : 3428-3432 (2000) (обсуждение различий среди AAV2, AAV4, и AAV5 в отношении тропизма к клеткам ЦНС млекопитающих и эффективности трансдукции).

Последовательности AAV, которые можно использовать в настоящем изобретении для продуцирования AAV в клетках насекомого, можно получать из генома AAV любого серотипа. В целом, серотипы AAV имеют геномные последовательности со значительной гомологией на уровне аминокислот и нуклеиновых кислот, обеспечивают идентичный набор генетических функций, продуцируют вирионы, которые по существу физически и функционально эквиваленты, и реплицируются и собираются посредством практически идентичных механизмов. Геномную последовательность AAV различных серотипов и обзор геномного сходства см., например, по номеру доступа Genbank U89790; номеру доступа Genbank J01901; номеру доступа Genbank AF043303; номеру доступа Genbank AF085716; в Chlorini et al. (1997, J. Vir. 71: 6823-33); Srivastava et al. (1983, J. Vir. 45:555-64); Chlorini et al. (1999, J. Vir. 73:1309-1319); Rutledge et al. (1998, J. Vir. 72:309-319); и Wu et al. (2000, J. Vir. 74: 8635-47). Серотипы аденоассоциированного вируса (AAV) человека или обезьян представляют собой предпочтительные источники нуклеотидных последовательностей AAV для использования в контексте настоящего изобретения, более предпочтительно серотипы AAV, которые обычно инфицируют человека (например, серотипы 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13) или приматов (например, серотипы 1 и 4).

Предпочтительно последовательности ITR AAV для использования в контексте настоящего изобретения получают из AAV1, AAV2, AAV5 и/или AAV4. Аналогичным образом, кодирующие последовательности Rep52, Rep40, Rep78 и/или Rep68 предпочтительно получают из AAV1, AAV2 и/или AAV4. Последовательности, кодирующие капсидные белки VP1, VP2 и VP3, для использования в контексте настоящего изобретения можно брать из любого из известных 42 серотипов, более предпочтительно из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9 или вновь разработанных AAV-подобных частиц, полученных, например, с помощью способов перетасовки капсида и библиотек капсида AAV. В предпочтительном варианте осуществления последовательности, кодирующие капсидные белки VP1, VP2 и VP3, происходят из AAV5 или AAV8, более предпочтительно из AAV5.

Последовательности Rep и ITR AAV особенно консервативны среди большинства серотипов. Белки Rep78 AAV различных серотипов, например, больше чем на 89% идентичны и идентичность полной нуклеотидной последовательности на уровне генома между AAV2, AAV3A, AAV3B и AAV6 составляет приблизительно 82% (Bantel-Schaal et al., 1999, J. Virol., 73 (2):939-947). Кроме того, известно, что последовательности Rep и ITR из AAV многих серотипов эффективно перекрестно дополняют (т.е., функционально заменяют) соответствующие последовательности из других серотипов при продуцировании частиц AAV в клетках млекопитающих. В US2003148506 сообщается, что последовательности Rep и ITR AAV также эффективно перекрестно дополняют другие последовательности Rep и ITR AAV в клетках насекомого.

Известно, что белки VP AAV определяют клеточный тропизм вириона AAV. Кодирующие белки VP последовательности значительно менее консервативны, чем белки и гены Rep среди AAV различных серотипов. Способность последовательностей Rep и ITR перекрестно дополнять соответствующие последовательности других серотипов делает возможным продуцирование псевдотипов частиц AAV, которые содержат капсидные белки определенного серотипа (например, AAV3) и последовательности Rep и/или ITR из AAV другого серотипа (например, AAV2). Такие псевдотипы частиц AAV представляют собой часть настоящего изобретения.

Модифицированные последовательности "AAV" также можно использовать в контексте настоящего изобретения, например, для продуцирования векторов gAAV в клетках насекомого. Такие модифицированные последовательности, например, включают последовательности, которые обладают по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или большей идентичностью нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей (например, последовательность, которая обладает идентичностью нуклеотидных последовательностей приблизительно 75-99%) с AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9 ITR, Rep, или VP можно использовать вместо последовательностей ITR, Rep или VP из AAV дикого типа.

Несмотря на то, что во многих отношениях схожий с AAV других серотипов, AAV5 отличается от других серотипов AAV человека и обезьяны больше, чем другие известные серотипы человека и обезьяны. Ввиду этого, продуцирование AAV5 может отличаться от продуцирования других серотипов в клетках насекомого. Когда способы по изобретению используют для того, чтобы продуцировать gAAV5, предпочтительно, чтобы один или несколько векторов содержали, в совокупности, в случае больше чем одного вектора, нуклеотидную последовательность, которая содержит ITR AAV5, нуклеотидную последовательность, которая содержит кодирующую последовательность Rep52 и/или Rep40 AAV5, и нуклеотидную последовательность, которая содержит кодирующую последовательность Rep78 и/или Rep68 AAV5. Такие последовательности ITR и Rep можно модифицировать по желанию для того, чтобы достигать эффективного продуцирования gAAV5 или псевдотипов векторов gAAV5 в клетках насекомого. Например, можно модифицировать иницирующий кодон из последовательностей Rep.

В предпочтительном варианте осуществления первую нуклеотидную последовательность, вторую нуклеотидную последовательность, третью нуклеотидную последовательность и необязательно четвертую нуклеотидную последовательность стабильно встраивают в геном клетки насекомого.

В дополнительном аспекте изобретение относится к вирусу AAV. Предпочтительно вирус AAV содержит в своем геноме по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес, в соответствии с чем по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность предпочтительно не является нативной нуклеотидной последовательностью AAV, и где капсидный белок VP1 AAV содержит или состоит из, от N-конца к С-концу:

(i) первого аминокислотного остатка, который кодирует кодон инициации трансляции, предпочтительно с помощью субоптимального кодона инициации трансляции, выбранного из группы, состоящей из CTG, ACG, TTG и GTG;

(ii) второго аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты;

(iii) необязательно, одного или нескольких дополнительных аминокислотных остатков, следующих за вторым аминокислотным остатком; и

(iv) аминокислотной последовательности капсидного белка VP1 AAV, в соответствии с чем последовательность не содержит аминокислотный остаток, который кодирует кодон инициации трансляции VP1. Предпочтительно в соответствии с этим последовательность не содержит только аминокислотный остаток, кодируемый кодоном инициации трансляции VP1 или, говоря иначе, в соответствии с этим последовательность не содержит не больше чем аминокислотный остаток, кодируемый кодоном инициации трансляции VP1.

Предпочтительно аминокислотная последовательность капсидного белка VP1 AAV, не содержащая только аминокислотный остаток, кодируемый кодоном инициации трансляции VP1, представляет собой встречающуюся в природе аминокислотную последовательность капсидного белка VP1 AAV, не содержащую только аминокислотный остаток, кодируемый встречающимся в природе кодоном инициации трансляции VP1. Первый аминокислотный остаток, который кодирует субоптимальный кодон инициации трансляции, типично представляет собой остаток метионина.

Альтернативно в этом аспекте изобретение относится к вирусу AAV, где вирус AAV содержит в своем геноме по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес, в соответствии с чем по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность предпочтительно не является нативной нуклеотидной последовательностью AAV и где капсид VP1 AAV имеет один или несколько дополнительных аминокислотных остатков, вставленных между иницирующим кодоном и аминокислотным остатком, который соответствует аминокислотному остатку в положении 2 капсидного белка дикого типа, где дополнительный аминокислотный остаток, следующий непосредственно за иницирующим кодоном, выбирают из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты.

Предпочтительно в вирусе в соответствии с изобретением стехиометрия капсидных белков VP1, VP2 и VP3 AAV представляет собой следующее; количество VP1:

(a) составляет по меньшей мере 100, 105, 110, 120, 150, 200 или 400% от количества VP2; или

(b) составляет по меньшей мере 8, 10, 10.5, 11, 12, 15, 20 или 40% от количества VP3; или (c) составляет по меньшей мере как определено в обоих (a) и (b). Предпочтительно количество VP1, VP2 и VP3 определяют с использованием антитела, распознающего эпипептид, который является обычным

для каждого из VP1, VP2 и VP3. В данной области доступны различные иммуноанализы, которые позволяют определять относительные количества VP1, VP2 и/или VP3 (см., например, Using Antibodies, E. Harlow and D. Lane, 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Подходящее антитело, распознающее эпитоп, который является обычным для каждого из трех капсидных белков, например, представляет собой антитело мыши против Сар В1 (которое коммерчески доступно в Progen, Germany).

Предпочтительный AAV в соответствии с изобретением представляет собой вирион, который содержит в своем геноме по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес, в соответствии с чем по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность предпочтительно не является нативной нуклеотидной последовательностью AAV и в соответствии с чем вирион AAV содержит капсидный белок VP1, который содержит метионин, треонин, лейцин или валин в аминокислотном положении 1. Более предпочтительный вирион AAV в соответствии с изобретением имеет соотношение капсидных белков как определено выше и содержит капсидный белок VP1, который содержит лейцин или валин в аминокислотном положении 1. Еще более предпочтительным является вирион AAV, который можно получать из клетки насекомого, как определено выше, например, в способе, как определено в настоящем документе далее. Еще более предпочтительным является вирион AAV, который содержит треонин или лейцин в положении 1 капсидного белка VP1, даже более предпочтительно остаток треонина.

Преимущество вирионов AAV по изобретению состоит в их усовершенствованной инфекционности. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, в частности, что инфекционность возрастет с увеличением количества белка VP1 в капсиде по отношению к количествам VP2 и/или VP3 в капсиде. Инфекционность вириона AAV в настоящем документе понимают как обозначение эффективности трансдукции трансгеном, содержащемся в вирионе, о чем можно заключить по величине экспрессии трансгена и количеству или активности продукта, экспрессируемого с трансгена.

Предпочтительно вирион AAV по изобретению содержит продукт гена, представляющего интерес, который кодирует полипептидный продукт гена, выбранный из группы, состоящей из: CFTR, фактора IX, липопропротеин-липазы (LPL, предпочтительно LPL S447X; см. WO 01/00220), аполипипропротеина A1, уридиндифосфат глюкокурозилтрансферазы (UGT), белка, взаимодействующего с регулятором ГТФазы при пигментной дистрофии сетчатки (RP-GRIP), цитокинов или интерлейкинов, например, таких IL-10, дистрофина, PBGD, NaGLU, Treg167, Treg289, EPO, IGF, IFN, GDNF, FOXP3, фактора VIII, VEGF, AGXT и инсулина. Более предпочтительно продукт гена, представляющего интерес, кодирует белок фактора IX или фактора VIII.

В другом аспекте изобретение, таким образом, относится к способу получения AAV в клетке насекомого. Предпочтительно способ включает стадии: (а) культивирование клетки насекомого, как определено выше в настоящем документе, в таких условиях, что продуцируют AAV; и, необязательно, (б) извлечение AAV. Условия роста для клеток насекомого в культуре и продуцирования гетерологичных продуктов в клетках насекомого в культуре хорошо известны в данной области и описаны, например, в цитированных выше источниках по молекулярному конструированию клеток насекомых.

Предпочтительно способ дополнительно включает стадию аффинной очистки AAV с использованием антитела против AAV, предпочтительно иммобилизованного антитела. Антитело против AAV предпочтительно представляет собой моноклональное антитело. В частности, подходящее антитело представляет собой одноцепочечное антитело верблюдовых или его фрагмент, например, которое можно получать у верблюдов или лам (см., например, Muyltermans, 2001, Biotechnol. 74: 277-302). Антитело для аффинной очистки AAV предпочтительно представляет собой антитело, которое специфично связывает эпитоп на капсидном белке AAV, в соответствии с чем предпочтительно эпитоп представляет собой эпитоп, который присутствует на капсидном белке больше чем одного серотипа AAV. Например, антитело можно индуцировать или отбирать на основании специфического связывания с капсидом AAV2, но одновременно также оно также может специфично связываться с капсидами AAV1, AAV3 и AAV5.

В этом документе и в формуле изобретения глагол "содержать" и его спряжения используют в его неограничивающем смысле для того, чтобы обозначать, что включены элементы, следующие за этим словом, но элементы, конкретно не указанные, не исключены. Кроме того, форма единственного числа не исключает возможности множественного числа, пока контекст явно не требует, чтобы имело место только единственное число. Таким образом, единственное число обычно подразумевает "по меньшей мере один".

Все патентные и литературные источники, цитированные в настоящем описании, включены, таким образом, посредством ссылки в полном объеме.

Следующие примеры предложены только в целях иллюстрации и не предназначены для того, чтобы ограничивать объем настоящего изобретения каким-либо образом.

Описание фигур

Фиг. 1 - различные мутантные капсиды, несущие репортерный трансген SEAP, очищали и разрешали на геле NuPage. Представлены три капсидных белка, VP1 (87 кДа), VP2 (72 кДа) и VP3 (62 кДа).

Фиг. 2 - анализ потенции *in vitro* с различными AAV5 капсидными мутантами, несущими экспрессирующую кассету sear в клетках Hela. Активность репортерного гена измеряют опосредованно в виде ис-

пускания света и выражают в RLU (относительных световых единицах). NTC=отрицательный контроль.

Фиг. 3 - анализ потенции *in vitro* с различными AAV5 капсидными мутантами, несущими экспрессирующую кассету *sear*, в клетках Huh7. Активность репортерного гена измеряют опосредованно в виде испускания света и выражают в RLU (относительных световых единицах). NTC=отрицательный контроль.

Фиг. 4 - анализ потенции *in vivo* различных капсидных мутантов, несущих экспрессирующую кассету *sear*, у мышей C57BL/6. Активность репортерного гена измеряют опосредованно в виде испускания света и выражают в RLU (относительных световых единицах).

Фиг. 5 - анализ потенции *in vivo* различных AAV5 капсидных мутантов, несущих экспрессирующую кассету FIX, у мышей C57BL/6. Осуществляли мониторинг экспрессии FIX у мышей после введения двух различных векторов, т.е. капсидного варианта 160 и 765. Оба капсида несут экспрессирующую кассету FIX. FIX измеряют в плазме в неделю 1, 2 и 4 после инъекций с помощью специфичного ELISA. IU/мл представляет международные единицы белка FIX, обнаруженного в 1 мл плазмы. PBS=фосфатно-солевой буфер.

Фиг. 6 - мутантные капсиды, несущие репортерный трансген SEAP, очищали и разрешали на геле NuPage, чтобы показать три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Представлены три клона конструкции 43.

Фиг. 7 - анализ потенции *in vitro* с использованием различных AAV5 капсидных мутантов, несущих экспрессирующую кассету *sear*, в клетках HeLa (A) и в клетках Huh7 (B). Активность репортерного гена измеряют опосредованно в виде испускания света и выражают в RLU (относительных световых единицах) (a.u.: произвольные единицы).

Примеры

1. Введение.

Исходная бакуловирусная система для продуцирования гAAV описана у Urabe et al [2002] Human Gene Therapy 13(16):1935-1943) и состоит из трех бакуловирусов, а именно *Bac-Rep*, *Bac-sar* и *Bac-vec*, совместная инфекция которыми клеток насекомого, например, SF9, ведет к образованию гAAV. Свойства такого продуцированного гAAV, т.е. физические и молекулярные характеристики, в том числе потенция, не отличаются значительно от гAAV, образуемого в клетках млекопитающих (Urabe [2002], выше). Для того чтобы выполнять эффективное образование векторов гAAV в клетках насекомого, белки AAV, необходимые для этого процесса, следует экспрессировать на подходящих уровнях. Это требует определенного числа адаптации оперонов, кодирующих белки *Rep* и *Cap*. AAV дикого типа экспрессирует от большого *Rep78* до маленького *Rep52* с двух отдельных промоторов *p5* и *p19*, соответственно, и сплайсинг двух матричных РНК ведет к образованию вариантов *Rep68* и *Rep52*. Эта организация оперона ведет к ограниченной экспрессии *Rep78* и относительно высокой экспрессии *Rep52*. Для того чтобы имитировать низкое соотношение 78 и 52, Urabe и коллеги конструировали ДНК кассету, в которой экспрессией *Rep78* управлял частично удаленный промотор для предраннего гена 1 (*AIE-1*), тогда как экспрессией *Rep52* управлял сильный промотор полиэдрина (*polh*). Сплайсированные варианты больших и маленьких *Rep* не наблюдали в клетках насекомого, что вероятно связано с различиями в процессах сплайсинга между клетками млекопитающего и насекомого. Другая техническая проблема, требующая решения, связана с экспрессией трех основных вирусных белков (*VP*). AAV дикого типа экспрессирует *VP1*, 2 и 3 с промотора *p40*. Образованная информационная РНК сплайсирована на два типа: один отвечает за экспрессию *VP1*, тогда как второй экспрессирует как *VP2*, так и *VP3*, через "механизм ослабленного рибосомного сканирования", где инициация белка происходит с неканонического старта, т.е. ACG, который иногда пропускает рибосомный комплекс, который затем движется дальше до тех пор, пока он не найдет канонический старт для *VP3*. Из-за различий в механизме сплайсинга между клетками позвоночных и насекомых, описанный выше механизм не ведет к образованию надлежащих капсидов в клетках насекомого. Urabe et al. решили вводить модификации в старт трансляции *VP1*, который был схож с теми, что найдены в *VP2*, таким образом, что старт трансляции *VP1* меняли на ACG и контекст инициации, который состоит из 9 нуклеотидов, предшествующих *VP1*, меняли на тот, который предшествует *VP2*. Эти генетические изменения вели к экспрессии трех *VP* с правильной стехиометрией, которые могут должным образом собираться в капсиды, с одной полицистронной мРНК. С другой стороны, трансгенная кассета схожа с тем, что описано ранее для систем на основе млекопитающих и фланкировано с использованием ITR, как только необходимые элементы "в транс" для репликации и упаковки.

При растущем числе вновь обнаруженных серотипов AAV, которые обладают различными желаемыми свойствами, существует необходимость в создании этих капсидов в BEV системе. Несмотря на то, что продемонстрировано успешное продуцирование AAV2 в клетках насекомого, не все серотипы в равной мере достаточно эффективны в системе, адаптированной для AAV2. По-видимому, адаптация нового серотипа для оптимального продуцирования и потенции не является тривиальной задачей и потребует специализированного подхода. Предыдущие попытки адаптировать последовательность гAAV5 для продуцирования с помощью BEVS в клетках насекомого дали ограниченный успех, что ведет к низкому встраиванию *VP1* в капсид (Kohlbrener et al. (2005) Molecular Therapy 12 (6) :1217-1225; Urabe et al. (2006) Journal of Virology 80 (4) : 1874-1885). Чтобы обойти эту проблему, Urabe et al. создавали вирус химерного типа 2/5, который содержит 136 N-концевых аминокислотных остатков из AAV типа 2 и остальную последовательность из AAV серотипа 5. Сообщалось, что такой вирус хорошо продуцируется и

проявляет схожую потенцию с таковой у AAV5 дикого типа (Urabe et al. (2006) выше). Однако, получаемый вирион представлял собой химеру и он не представляет "истинный" серотип гAAV5.

Для того чтобы создавать подлинный гAAV5 в клетках насекомого с усовершенствованной инфекционностью и/или потенцией, авторы изобретения конструировали несколько мутантов капсидного белка 5. Для инфекционности выглядит важным то, что стехиометрия трех вирусных белков сбалансирована. Например, как сообщалось ранее, авторы изобретения заметили, что отсутствие синтеза VP1 существенно влияет на потенцию вектора. Кроме того, авторы изобретения наблюдали, что потенция векторов отрицательно коррелировала с высоким встраиванием VP3 по сравнению с VP1 и VP2. Вирусные препараты с чрезмерным количеством VP3 плохо трансдуцировали клетки *in vitro* и *in vivo*. Наконец, авторы изобретения конструировали подлинный (или "истинный") капсид гAAV5, который демонстрирует превосходящую потенцию по сравнению с химерным гAAV5, созданным Urabe et al (2006, выше). Обнаружено, что этот новый капсид имеет сбалансированную стехиометрию VP и схожую или превосходящую потенцию по сравнению с химерным AAV2/5.

2. Способы.

2.1. Создание векторов гAAV5.

Партии гAAV5 создавали посредством совместной инфекции клеточной линии насекомого expresSF+® (Protein Sciences Corporation) с использованием трех различных бакуловирусов, которые содержали экспрессирующие кассеты для капсида (библиотека вариантов гAAV5), репликазы и трансгена (Seap или фактор IX) под управлением промотора CMV и LP1, соответственно. Экспрессирующие капсид кассеты были под управлением полиэдрального промотора. Экспрессирующие Rep кассеты описаны в WO 2009/14445 (BAC.VD183) и находятся под управлением deltaE1 и полиэдрального промотора, управляющих экспрессией Rep78 и Rep52, соответственно. Клетки expresSF+® инфицировали в объемном соотношении 5:1:1 (Rep:Cap:трансген) с использованием недавно амплифицированных бакуловирусных стоков. После 72 ч инкубации при 28°C, клетки лизировали в 10х лизирующем буфере (1,5 М NaCl, 0,5 М Трис-HCl, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, pH=8,5) в течение 1 ч при 28°C. Геномную ДНК расщепляли посредством обработки бензоной в течение 1 ч при 37°C. Клеточный детрит удаляли посредством центрифугирования в течение 15 мин при 1900×g, после чего супернатант, содержащий частицы гAAV5, хранили при 4°C. Титры вектора определяли в этом так называемом неочищенном клеточном лизате с использованием специфичной количественной ПЦР, направленной против промоторной области трансгена. В кратком изложении, векторы после аффинной очистки анализировали с помощью количественной ПЦР. AAV обрабатывали ДНКазой при 37°C для того, чтобы разрушать экстрагенную ДНК. Затем ДНК AAV высвобождали из частиц посредством обработки в 1М NaOH. После короткой тепловой обработки (30 минут при 37°C) щелочную среду нейтрализовали равным объемом 1М HCl. Нейтрализованные образцы, содержавшие ДНК AAV, затем использовали в количественной ПЦР Taqman. Количественную ПЦР осуществляли в соответствии со стандартными процедурами, используя праймеры и зонды, перечисленные ниже в таблице 1.

2.2. Очистка векторов гAAV5.

Частицы гAAV5 очищали от неочищенных лизатов по протоколу связывания для партий с использованием сефарозы AVB (аффинная смола, GE healthcare). Неочищенные клеточные лизаты гAAV5 добавляли к промытой (в буфере 0,2 М HPO₄ pH=7,5) смоле. Впоследствии, образцы инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при аккуратном перемешивании. После инкубации смолу промывали в буфере 0,2 М HPO₄ pH=7,5 и связанные векторы элюировали посредством добавления 0,2 М глицина pH=2,5. pH элюируемых векторов немедленно нейтрализовали посредством добавления 0,5 М Трис-HCl pH=8,5. Очищенные партии гAAV5 хранили при -20°C. Очищенные векторы титровали с помощью специфичной количественной ПЦР.

Для того чтобы создавать более высокие количества векторов для исследования, использовали модифицированный протокол очистки *in vivo*. В кратком изложении, после сбора, осветленный лизат пропускали через 0,22 мкм фильтр (Millipak 60, 0,22 мкм). Затем векторные частицы подвергали аффинной очистке на 8 мл колонке с сефарозой AVB (GE Healthcare) на АКТА explorer (хроматографическая система для FPLC, GE healthcare). Связанные частицы гAAV5 элюировали из колонки с использованием 0,2 М глицина pH=2,5. Элюат немедленно нейтрализовали с использованием 60 mM Трис HCl pH=7,5. Буфер нейтрализованных элюатов заменяли на PBS с 5% сахарозой с помощью 100 КДа фильтра для ультрафильтрации (Millipore). Затем конечный продукт фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Millex GP), разделяли на аликвоты и хранили при -20°C до последующего использования. После очистки титры вирусов определяли с помощью специфичной количественной ПЦР.

Таблица 1

Праймеры для количественной ПЦР TAQMAN

Праймеры, используемые для обнаружения трансгена Seap		Описание	SEQ ID NO:
pr59	AATGGGCGGTAGGCGTGTA	Прямой для промотора CMV	55
pr60	AGGCGATCTGACGGTTCACТАА	Обратный для промотора CMV	56
pb12	TGGGAGGTCTATATAAGCAG	Зонд Fam-MGB для промотора CMV	57
Праймеры, используемые для обнаружения трансгена фактора IX			
pr1103	CAAGTATGGCATCTACACCAAAGTCT	Прямой для FIX	58
pr1104	GCAATAGCATCACAAATTTCACAAA	Обратный для FIX	59
pb25	TGTGAACTGGATCAAGGAGAAGACCAAGC	Зонд Fam-Tamra для FIX	60

2.3. Композиция белков VP у вариантов гAAV5.

Композицию белков VP у очищенных вариантов гAAV5 определяли на полиакриламидных гелях бис-трис (Nupage, Life Technologies). Окрашенных Sypro Ruby. В кратком изложении, 15 мкл очищенного гAAV5 смешивали с 5 мкл 4× загрузочного буфера LDS (Life Technologies) и загружали на бис-трис полиакриламидный гель. Образцы электрофоретически разделяли в течение 2 ч на 100 В. После электрофореза белки фиксировали в течение 30 минут с использованием 10% NaAc/7% EtOH и окрашивали Sypro Ruby (Life Technologies) в течение 2 ч. Затем белки VP визуализировали под УФ светом в системе ImageQuant (GE Healthcare).

2.4. Потенция in vitro.

Чтобы исследовать потенцию in vitro у различных капсидных вариантов серотипа 5, использовали две непрерывные клеточные линии. Здесь 1×10^5 Hela и Huh7 инфицировали вариантами гAAV5 при различной кратности инфекции. Эксперименты осуществляли в 24-луночном планшете приблизительно с 80% конfluence по 1×10^5 клеток/луночка. В обоих экспериментах аденовирус дикого типа использовали при кратности инфекции 30. Это добавление аденовируса дикого типа применяли только в тестах потенции in vitro, чтобы ускорять процесс синтеза второй нити до приблизительно 24 ч, тем самым делая возможным осуществление анализа за относительно короткий период времени и избегая необходимости переноса клеток. Через 48 ч после начала инфекции, экспрессию Seap измеряли в супернатанте с использованием аналитического набора для репортера Seap (Roche). Люминесценцию измеряли на люминометре Spectramax L (Molecular Devices) при 470 нм со временем интегрирования 1 с.

2.5. Потенция in vivo.

Чтобы исследовать потенцию in vivo у различных капсидных вариантов серотипа 5, осуществляли два различных эксперимента. В кратком изложении, потенцию конструкций векторов гAAV5 159-164, несущих репортерный ген Seap, изучали у мышей C57BL/6. Различные векторы инъецировали мышам внутримышечно в дозе 5×10^{12} копий генома на килограмм. Группы состояли из 5 мышей в каждой, всего 7 групп, включая группу PBS. Плазму мышей получали на 2, 4 и 6 неделях после инъекции, после чего мышей умерщвляли. Активность Seap измеряли в плазме с использованием аналитического набора для репортера Seap из Roche. Люминесценцию измеряли на люминометре Spectramax L (Molecular Devices) при 470 нм со временем интегрирования 1 с.

Затем потенцию in vivo у варианта AAV5(765) сравнивали с таковой у AAV5(160) и AAV5(92). AAV5(92) любезно предоставлен лабораторией доктора Kotin (Urabe et al, 2006) мышам C57BL/6 инъецировали внутривенно в дозах 2×10^{12} копий генома на килограмм и 2×10^{13} копий генома на килограмм с 765 или 160, оба несут FIX в качестве репортерного гена. Всего инъекции выполняли семи группам по пять мышей в каждой, включая группу PBS. Плазму брали на 1, 2 и 4 неделях после инъекции, после чего мышей умерщвляли. Белок фактора IX, присутствующий в плазме, измеряли с использованием ELISA, специфичного к фактору IX (VisuLize FIX antigen kit, Kordia). Оптическую плотность измеряли при 450 нм на считывателе планшетов Versamax ELISA (Molecular Devices).

3. Результаты 3.1.

Создание гAAV5 в BEVS AAV представляет собой вирус млекопитающих, который использует ме-

ханизмы своего хозяина для того, чтобы экспрессировать свои гены, среди которых ген *cap*. Механизм, с помощью которого достигают правильной стехиометрии VP1:VP2:VP3 в организме-хозяине млекопитающего, отсутствуют или не оптимальны в клетках насекомого. Следовательно, Urabe et al. разработали стратегию генетических корректировок в организации полицистронной мРНК *cap*, которая привела к продуцированию трех VP AAV2 в клетках насекомого с правильной стехиометрией (Urabe et al. (2002) выше). Попытки создать схожие способы для того, чтобы продуцировать гAAV5 в BEVS показали отсутствие успеха в получении достаточных инфекционных частиц. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, похоже, это обусловлено низким встраиванием VP1 в капсиды (Urabe et al. (2006), выше). Тем самым, Urabe et al., основываясь на предыдущем успехе с серотипом типа 2, заменяли N-концевую часть VP1 типа 5 на таковую из типа 2, чтобы продуцировать инфекционные частицы AAV5 (Urabe et al. (2006) выше). Несмотря на успех, химерный AAV2/5 химерный капсид не содержит *bona fide* частицы типа 5 и по существу может иметь измененные свойства по сравнению с AAV5, который может представлять комбинацию двух капсидов вместо того, чтобы представлять это от типа 5.

Для того чтобы сделать возможным продуцирование вирионов AAV5 в клетках насекомого с усовершенствованной инфекционностью и потенцией, в настоящем изобретении выполнена серия генетических изменений в экспрессирующей кассете *cap5* из AAV5 (Табл. 2). Как отмечено ранее (Urabe et al. (2006), выше), ген *cap5* дикого типа (здесь клон номер 763) не поддерживает образование гAAV. Отсутствие распознавания нативных сигналов сплайсинга AAV в клетках насекомого наиболее вероятно ведет к низкой экспрессии отдельных VP и отсутствию продуцирования вектора. Из-за того факта, что эукариотические рибосомы считывают мРНК однонаправлено от 5' к 3', первый старт инициации трансляции (здесь VP1) полицистронной мРНК *cap5* вредоносен для экспрессии всех трех белков. Старт инициации дикого типа состоит из ATG, так называемого сильного кодона инициации трансляции, который не допускает рибосомного проскальзывания через него и тем самым блокирует экспрессию двух других VP, что ведет к отсутствию продуцирования гAAV. Из-за того факта, что AAV дикого типа использует рибосомное проскальзывание для того, чтобы экспрессировать VP2 (неканонический старт инициации трансляции, ACG) и VP3 (ATG), авторы изобретения пришли к исследованию старта трансляции для VP1 и его непосредственного окружения для того, чтобы измерять экспрессию и/или сборку трех VP.

Ранее сообщалось, что нуклеотидный контекст старта трансляции оказывает влияние на силу инициации трансляции (Kozak (1987) *Nucleic Acid Research* 15 (20):8125-8148; WO 2007/046703). Предпочтительными нуклеотидами, вероятно, является А в положении (-3) и Г в положении (+4) при номерах AUG +1, +2 и +3 соответственно (Kozak выше; WO 2007/046703). В табл. 2 подробно изложены конкретные изменения, которые вводили в старт инициации трансляции, его контекст, лежащий выше и ниже по направлению считывания, чтобы настраивать экспрессию трех VP. Авторы изобретения исследовали контекст инициации, лежащий выше по направлению считывания, который исходно окружает старт трансляции VP2; различные неканонические иницирующие кодоны (ACG, CTG, TTG, GTG), различные мутагенные изменения в +2 триплета дикого типа и инсерцию между +1 триплета инициации и +2 триплета дикого типа. Экспрессирующие кассеты, охватывающие комбинации этих признаков, использовали для создания гAAV.

Таблица 2

Описание капсидных вариантов AAV5

Создавали множество различных мутаций, окружающих старт трансляции VP1 для того, чтобы усовершенствовать стехиометрию трех VP, экспрессируемых в клетках насекомого. Нуклеотиды и аминокислоты, измененные по сравнению с капсидной последовательностью серотипа 5 дикого типа, выделены полужирным.

№ Вас. VD	Контекст инициатора VP2 – выше по направлению считывания	Иницирующий кодон	Добавление аминокислоты (аминокислот)	5' часть капсидной последовательности	SEQ ID NO:
AAV5 дикого типа	–	ATG	–	TCT TTT GTT GAT CAC CCT CCA GAT TGG T..... S F V D H P P D W	39
Изменения, окружающие старт инициации трансляции VP1					
159	CCTGTTAAG	ACG	–	TCT TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... S F V D H P P D W	41
160	CCTGTTAAG	ACG	<u>GCT</u> <u>A</u>	TCT TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... S F V D H P P D W	42
161	CCTGTTAAG	ACG	–	<u>GCT</u> TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... <u>A</u> F V D H P P D W	43
162	CCTGTTAAG	CTG	–	<u>ACT</u> TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... <u>T</u> F V D H P P D W	44
163	CCTGTTAAG	CTG	<u>ACT</u>	<u>AGC</u> TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT	45
			<u>T</u>	TGG T..... S F V D H P P D W	
164	CCTGTTAAG	CTG	–	<u>AGT</u> TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... S F V D H P P D W	46
761	CCTGTTAAG	ACG	<u>GCT</u> <u>A</u>	TCT TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... S F V D H P P D W	47
762	–	ACG	<u>GCT</u> <u>A</u>	TCT TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... S F V D H P P D W	48
763 (AAV5 дикого типа)	–	ATG	–	TCT TTT GTT GAT CAC CCT CCA GAT TGG T..... S F V D H P P D W	49
764	–	TTG	<u>GCT</u> <u>A</u>	TCT TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... S F V D H P P D W	50
765	–	CTG	<u>GCT</u> <u>A</u>	TCT TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... S F V D H P P D W	51
766	–	GTG	<u>GCT</u> <u>A</u>	TCT TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT TGG T..... S F V D H P P D W	52
43	CCTGTTAAG	CTG	<u>GCT</u>	TCT TTT GTT GAT CAC CCA CCC GAT	69
			<u>A</u>	TGG T..... S F V D H P P D W	

Вас. VD №№ 159-164 и 43 функционально связаны с промотором polH (SEQ ID NO: 53)

Вас. VD №№ 761-766 функционально связаны с коротким промотором polH (SEQ ID NO: 54)

3.2. Мелкие нуклеотидные изменения, окружающие старт инициации трансляции VP1, оказывают сильные эффекты на потенцию вектора.

Успешно создавали бакуловирусные конструкции, несущие все варианты экспрессирующих кассеты cap5, перечисленные в таблице 2. Впоследствии эти бакуловирусные конструкции в комбинации с бакуловирусами, несущими Rep и трансген (репортерный ген, например, SEAP или FIX), использовали для создания rAAV. Некоторые из протестированных конструкций, независимо от множества попыток, не поддерживают создание продуцирования rAAV. Это включает AAV5 дикого типа (конструкция 763) и некоторые из конструкций, несущих неканонические старты, TTG (конструкция 764), GTG (конструкция

766). Все другие конструкции, перечисленные в табл. 2, вели к успешному созданию гAAV.

Выделяли три вирусных белка (VP) успешно полученных вариантов гAAV типа 5. Стехиометрию трех VP изучали посредством электрофоретического разделения (SDS-PAGE) очищенных векторов (фиг. 1 и 6). Похоже, что небольшие модификации, введенные в экспрессирующую кассету гена *cap5*, имеют сильное влияние на экспрессию и/или сборку трех белков VP, что находит отражение в композиции капсидов. Авторы изобретения заметили, что адаптация капсида серотипа 5 к клеткам насекомого посредством введения неканонического иницирующего кодона (ACG) и контекста выше по направлению считывания из девяти нуклеотидов CCTGTTAAG, о котором сообщали Urabe et al., в качестве модификации, делающее возможным продуцирование серотипа 2 в клетках насекомого, приводило к низкому встраиванию VP1 (низкое соотношение VP1/VP2) и встраиванию чрезмерных уровней VP3 в капсид (высокое соотношение VP3/VP1), что ведет к aberrантной стехиометрии трех VP (фиг. 1, конструкция 159). Аналогичным образом, модификация нуклеотида +4, чтобы создавать G и больше походить на каноническую последовательность Козак, что вело к замене серина в положении +2 на аланин (конструкция 161), вело к низкому встраиванию VP1 и высокому встраиванию VP3 (низкое VP1/VP2 высокое VP3/VP1). Использование другого неканонического кодона CTG в комбинации с лежащей выше по направлению считывания CCTGTTAAG и модификацией ниже по направлению считывания, т.е. замена +4 нуклеотида на A (конструкция 162), или +4-5 на AG (конструкция 164) или инсерция ACT в качестве второго триплета с модификацией исходного +2 триплета до AGC (конструкция 163) не усовершенствует встраивание VP1 в капсид, что ведет к низкому VP1/VP2 высокому VP3/VP1. Одна из конструкций, которые демонстрировали соотношение VP1/VP2, близкое к 1, представляла собой конструкцию 160, которая охватывает прямую инсерцию CCTGTTAAG выше по направлению считывания, неканонический ACG и инсерцию дополнительного аланина в положении +2, кодируемого с помощью GCT, по сравнению с последовательностью дикого типа, хотя встраивание VP3 все еще происходило в избытке (равное VP1/VP2 высокое VP2/VP1). Впоследствии в последовательность промотора в конструкции 160 вводили такие мутации, что он более точно походил на промотор полиэдрина дикого типа. Так создавали мутант 761. Контекст инициации VP2 удаляли, создавая мутант 762. В обоих случаях (761 и 762) имело место небольшое отрицательное влияние на стехиометрию вируса (более низкое встраивание VP1) по сравнению с конструкцией 160 (фиг. 1). Затем стартовый участок инициации трансляции VP1 в конструкции 160 (чтобы сохранять полезный GCT непосредственно ниже по направлению считывания от кодона инициации трансляции) изменяли на ATG дикого типа (мутант 763), TTG (мутант 764), CTG (мутант 765), GTG (мутант 766). Все, кроме мутанта 765, вели к недостатку поддающегося обнаружению продуцирования гAAV. Что интересно, комбинация CTG в качестве неканонического старта инициации VP1 и добавление триплета GCT (кодирующего дополнительный аланин) непосредственно после старта трансляции (765) вело к более высокому встраиванию VP1, чем VP2 и сильному уменьшению VP3, что в конечном итоге вело к сбалансированной стехиометрии VP, похожей на AAV дикого типа (высокое VP1/VP2 умеренное VP3/VP1). Наконец, конструкция 43, которая похожа на конструкцию 160 с CTG в качестве иницирующего кодона VP1 взамен ACG, вело к продуцированию VP1 с почти нативным соотношением VP (фиг. 6).

3.3. Обильная экспрессия VP3 отвечает за низкую потенцию мутантов истинных AAV типа 5 в BEVS.

Для того чтобы изучать потенцию библиотеки капсидов серотипа 5, т.е. способность вектора управлять экспрессией его генетического материала, который обладает отличающейся стехиометрией VP, проводили исследования *in vitro* и *in vivo*. Использовали две различные непрерывные клеточные линии, т.е. Hela (фиг. 2 и фиг. 7A) и Huh7 (фиг. 3 и фиг. 7B). В обоих случаях набор мутантов, которые демонстрировали встраивание VP1 ниже такового у VP2 и чрезмерное встраивание VP3 (конструкции 159, 161-164), демонстрировал сильно сниженную потенцию (фиг. 2, 3). Потенцию вектора значительно усовершенствовали с помощью балансирования встраивания VP1 и VP2 (конструкция 160). Укорочение промотора (конструкция 761) и удаление инициаторных конструкций (конструкция 762) оказывало отрицательный эффект на потенцию вектора. Наиболее потентный вектор, конструкция 765 (фиг. 2-3), демонстрировал соотношение VP1 и VP2 в пользу первого и значительно снижал встраивание VP3. Наконец, промотор *polH* (не укороченный) в комбинации с инициаторной конструкцией, иницирующий кодон CTG и дополнительный триплет GCT (кодирующий дополнительный аланин) (конструкция 43) демонстрировали хорошую потенцию, хотя и несколько меньше, чем потенция конструкции 765 (фиг. 7A и B).

Потенцию поднабора мутантов (конструкции 159-164) тестировали *in vivo* (мыши C57BL/6). Векторы несли репортерный ген SEAP. Мышам инъектировали варианты капсида 5 в дозе 5e12 копий генома на килограмм и осуществляли мониторинг во времени. Наряду с наблюдением *in vitro*, вариант, который демонстрировал наилучшую потенцию из протестированного набора (160), также имел VP1/VP2 в эквивалентных количествах (фиг. 4).

3.4. Продуцируемый клетками насекомого подлинный AAV5 (765) проявляет свойства, превосходящие химерный мутант типа 2/5, *in vivo*.

Для того чтобы исследовать потенцию AAV5 (765) *in vivo*, получали три партии векторов. Они включали химерный тип 2/5 (92) (Urabe et al. (2006) выше), подлинный тип AAV5, который содержит чрезмерные количества VP3 (160), и подлинный AAV типа 5 с наилучшими свойствами *in vitro* со сте-

хиометрией VP дикого типа (765). Все партии получали в одних и тех же условиях, используя бакуловирусные конструкции, несущие белки Rep и экспрессирующую кассету FIX (как описано в WO 2006/36502). Для того чтобы сравнивать потенцию трех препаратов векторов, шести черным мышам инъецировали векторы в двух различных дозах, т.е. в низкой дозе 2×10^2 копий генома на килограмм и в высокой дозе 2×10^3 копий генома на килограмм. В эксперимент включали всего семь групп, включая группу наполнителя, состоящие из 5 животных каждая. После начала эксперимента кровь брали на неделе 1, 2 и 4. Осуществляли мониторинг экспрессии FIX в крови с помощью специфичного ELISA. Результаты подтверждали предыдущие наблюдения *in vitro*, где вновь созданный мутант 765 демонстрировал значительно усовершенствованную потенцию относительно конструкции 160. Что интересно, конструкция 765 также была значительно лучше, чем химера типа 2/5 (конструкция 92), опубликованная Urabe et al. (2006) (выше) (фиг. 5). Критерий Стьюдента для одной выборки использовали для исследования различий между 765 и 160, а также 765 и 92. Во всех случаях т.е. неделя 1, 2 и 4, имело место статистически значимое различие с p -значением $<0,05$.

4. Обсуждение.

Создание гAAV в клетках насекомого требует множества корректировок генетической организации гена сар. В клетках млекопитающих AAV экспрессирует свои белки VP с одной открытой рамки считывания, используя альтернативный сплайсинг и плохо используемый старт инициации ACG для VP2. Это ведет к стехиометрии VP1:VP2:VP3 1:1:10. В клетке насекомого эти механизмы не способны продуцировать векторы AAV с правильной стехиометрией VP (Urabe et al. (2002) выше). Это является известной проблемой, которую ранее обошли Urabe et al., чтобы создавать серотип гAAV2 посредством изменения инициаторного триплета VP1 на ACG и посредством мутирования 9 нуклеотидов выше по направлению считывания от стартового участка инициации трансляции. Эти изменения вели к продуцированию всех трех VP гAAV2 с правильной стехиометрией. Схожее генетическое изменение в экспрессирующей кассете гAAV5 вело к низкому продуцированию VP1 и низкой потенции продуцируемого вируса. На основании успеха в генетической адаптации для гAAV2, Urabe et al. решили создать серию из шести мутантов с замещением доменов, где гAAV5 получал N-концевую часть VP1 различной длины из AAV2 (в диапазоне от 7 аминокислот до 136 аминокислот). Этот подход приводил к продуцированию химерного гAAV5, который демонстрировал правильную стехиометрию VP. Кроме того, мутанты с замещением доменов вели к потенции, которая была схожа или превосходила таковую у гAAV5, полученного в клетках 293T (Urabe et al. (2006) выше). Несмотря на то, что Urabe et al. демонстрировали, что химерный гAAV5 можно создавать в клетках насекомого, полученный вектор не содержит *bona fide* частицы AAV5 и по существу может отличаться в различных аспектах, таких как восприимчивость к уже существующим нейтрализующим антителам, внутриклеточная направленная миграция, биораспределение и/или направленное воздействие от истинного серотипа AAV5. Одновременно Urabe et al. сообщали, что попытки продуцировать инфекционный подлинный гAAV5 не удалось из-за низкого синтеза полипептида VP1 (Urabe et al. (2006) выше).

Здесь авторы изобретения конструировали библиотеку мутантов сар5, сосредоточившись на понимании решающих факторов, лежащих в основе низкой потенции подлинного гAAV5, продуцируемого в клетках насекомого. Во-первых, авторы изобретения исследовали мутант (159), который содержал множество адаптации, которые ранее использовали для успешного создания гAAV2 в клетках насекомого (Urabe et al. (2002) выше). Этот мутант содержит 9 нуклеотидный контекст инициатора VP2 выше по направлению считывания, расположенный выше по направлению считывания от старта трансляции VP1 и неканонический старт инициации трансляции ACG. Эти 9 нуклеотидов ранее использовали Urabe et al. для того, чтобы экспрессировать ген серотипа 2 в клетках насекомого (Urabe et al. (2002) выше). Эта конкретная последовательность естественно фланкирует неканонический иницирующий кодон (ACG) VP2. Затем меняли ATG дикого типа на ACG или CTG и вводили различные мутации для того, чтобы обеспечивать оптимальный контекст ниже по направлению считывания от иницирующего кодона. Большинство мутантов демонстрировали aberrантную стехиометрию VP с низким встраиванием VP1 и чрезмерным присутствием VP3 (низкое соотношение VP1/VP2 и высокое соотношение VP3/VP1). Соотношение VP1/VP2 значительно усовершенствовали в генетической конструкции 160, которая однако все еще демонстрировала чрезмерное встраивание VP3 в векторные частицы. Наконец, одна из генетических конструкций, т.е. 765, демонстрировала высокое встраивание VP1 (высокое соотношение VP1/VP2) и пониженное встраивание VP3 по сравнению с другими тестируемыми вариантами (сбалансированное соотношение VP3/VP2).

Ранее постулировали, что низкое соотношение белков VP1/VP2 отвечает за низкую потенцию вектора (Hermonat et al. (1984) Journal of Virology 51 (2):329-339; Tratschin et al. (1984) Journal of Virology 51 (3):611-619). Уникальная часть VP1 из AAV погружена внутрь капсида и становится обнаженной во время внутриклеточной направленной миграции вируса к ядру. Сначала она становится обнаженной в качестве реакции на снижение pH в просвете эндосомы. Свободная N-концевая часть VP1 содержит фосфолипидный домен, который при обнажении снаружи капсида становится доступным для того, чтобы специфично гидролизовать связь сложного 2-ацилового эфира (sn-2) в фосфолипидных субстратах, что ведет к высвобождению лизофосфолипидов и свободных жирных кислот, что в свою очередь делает воз-

можным эндосомальное высвобождение AAV. Уникальная часть VP1 содержит сигналы ядерной локализации (кластеры основных аминокислот) и подразумевает направленность AAV в ядро. Наконец, некоторые авторы предполагают, что уникальная часть VP1 может играть роль в декапсидации вируса в ядре. Низкое соотношение VP1/VP2 и чрезмерное встраивание VP3 в вирусные частицы (высокое соотношение VP3/VP1) может вести к 1) снижению встраиванию VP1 в собранные частицы в среднем или 2) созданию двух популяций частиц А) правильно собранных частиц (имеющих стехиометрию, близкую к дикому типу 1:1:10, т.е. 5 молекул VP1 на векторную частицу) В) только частицы VP3/VP2. В обеих ситуациях (1 и 2) такой препарат вектора может иметь измененную потенцию. Чрезмерные количества белка VP3 (по сравнению с VP1 или VP2), присутствующие в препарате вектора, вероятно ведут к ослабленной направленной миграции вектора в ядро из-за нарушенного эндосомального высвобождения. Для того чтобы тестировать гипотезу о том, что стехиометрия VP может вредить потенции вектора, и создавать более мощный вектор, библиотеку мутантов капсида серотипа 5 тестировали *in vitro* и *in vivo*.

По-видимому, стехиометрия VP хорошо коррелировала с потенцией вектора. Как показано ранее (Hermonat et al. (1984) выше; Tratschin et al. (1984) выше; WO 2007046703A2), низкое соотношение VP1/VP2 оказывает сильное влияние на потенцию вируса. Мутанты 159, 161-164 демонстрировали низкое соотношение VP1/VP2n и существенно сниженную потенцию. Усовершенствованное соотношение между VP1/VP2 имело значительное влияние на потенцию вектора (160). Что интересно, дополнительно усовершенствование соотношения VP1/VP2 и снижение встраивания VP3 в векторные частицы (снижение соотношения VP3/VP1) вело к созданию усовершенствованного вектора 43 и наиболее мощного вектора (конструкция 765) среди протестированного набора. Эти данные ясно указывают на то, что молекулярный состав векторной частицы вредоносен для ее потенции. Усовершенствование встраивания VP1 и одновременно снижение его для VP3, похоже, дает наилучший результат в отношении потенции вектора. Ранее сообщалось, что низкое соотношение VP1/VP2 у частиц, создаваемых в BEVS, оказывает отрицательное влияние на потенцию вектора. До сих пор соотношение VP2/VP3 не рассматривали, преимущественно из-за того факта, что его генетическая конструкция для продуцирования в BEVS является такой же, как в вирусе AAV дикого типа. Тем самым, не ожидали, что это ведет к измененному соотношению VP2/VP3. Однако, для всех, кроме одного мутанта, представленного здесь, авторы изобретения наблюдали чрезмерное встраивание VP3 в векторные частицы (высокое соотношение VP3/VP1), что указывает на то, что изменение окружения старта трансляции VP1 оказывает сильный эффект на экспрессию VP2 и VP3. Только мутант 765 демонстрировал сбалансированную стехиометрию с высоким соотношением VP1/VP2 и сниженным встраиванием VP3, что вело к повышенной потенции по сравнению с другими тестированными вариантами. Кроме того, потенцию 765 вариант сравнивали *in vivo* (мыши) с AAV5-подобным вектором, введенным в BEVS (конструкция 92). Конструкция 92 представляет собой химеру AAV серотипа 5 с N-концевой частью из 136 аминокислот от серотипа 2 (Urabe et al. (2006) выше). Несмотря на то, что конструкция 92 не содержит истинный AAV5, она представляет собой единственную альтернативу, доступную в настоящее время для создания AAV5-подобных частиц в BEVS. Конструкция 765 демонстрировала статистически значимое превосходство над конструкцией 92.

Авторы изобретения предполагают, что сильное влияние на экспрессию VP2 и VP3 ниже по направлению считывания с помощью мутагенных изменений трансляционных причин VP1 связано с самим процессом трансляции. Трансляция является односторонней у эукариот и начинается с мРНК 5'. Рибосомы, после вхождения в контакт с мРНК, продвигаются до тех пор, пока они не найдут старт трансляции ATG в подходящем контексте, чтобы инициировать синтез белка. Иногда слабые старты инициации, например ACG или CTG, если окружены подходящим нуклеотидным контекстом, могут инициировать синтез белка неканоническим образом. Этот механизм называют ослабленным рибосомным сканированием. Сила ослабленного рибосомного сканирования на VP1 определяет ту часть рибосом, которые переходят к VP2 и VP3, и силу экспрессии белка с последних двух. В свою очередь экспрессия всех трех компонентов определяет их присутствие в конечном собранном капсиде.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая нуклеотидную последовательность, которая содержит модифицированную открытую рамку считывания, кодирующую капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанная рамка считывания в порядке от 5' к 3' содержит:

- (i) первый кодон, который представляет собой субоптимальный кодон инициации трансляции, выбранный из CTG и ACG;
- (ii) второй кодон после первого кодона, который кодирует аланин;
- (iii) последовательность, следующая сразу за вторым кодоном, которая кодирует капсидные белки аденоассоциированного вируса серотипа 5 (AAV5), причем данная последовательность кодирует капсидный белок VP1 AAV5 дикого типа, начиная с положения 2 белка, и не содержит только кодон инициации трансляции ATG VP1.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, дополнительно содержащая один или более кодонов, которые кодируют аминокислотные остатки, которые располагаются за вторым кодоном (ii) и перед ами-

нокислотной последовательностью капсидного белка VP1 AAV (iii).

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой капсидные белки имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3, в которой второй кодон выбирают из GCT, GCC, GCA и GCG.

5. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4, в которой нуклеотидная последовательность модифицированной открытой рамки считывания функционально связана с последовательностями, управляющими экспрессией в клетке насекомого.

6. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, в которой нуклеотидная последовательность модифицированной открытой рамки считывания функционально связана с промотором, выбранным из полиэдрального промотора, промотора p10, 4xHsp27 EcRE+минимального промотора Hsp70, промотора deltaE1 и промотора E1.

7. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5 или 6, представляющая собой вектор, подходящий для клеток насекомых.

8. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.7, в которой указанный вектор представляет собой бакуловирусный вектор.

9. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп.5-8, в которой молекула нуклеиновой кислоты содержит модифицированную открытую рамку считывания, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 51, 69, 42, 47 и 48.

10. Клетка насекомого, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп.5-9.

11. Клетка насекомого по п.10, дополнительно содержащая:

(а) вторую нуклеотидную последовательность, которая содержит по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора AAV (ITR);

(б) третью нуклеотидную последовательность, которая содержит кодирующую последовательность Rep78 или Rep68, функционально связанную с последовательностями, управляющими экспрессией в клетке насекомого.

12. Клетка насекомого по п.11, дополнительно содержащая четвертую нуклеотидную последовательность, которая содержит кодирующую последовательность Rep52 или Rep40, функционально связанную с последовательностями, управляющими экспрессией в клетке насекомого.

13. Клетка насекомого по п.11 или 12, содержащая:

(а) первую конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп.5-8, которая дополнительно содержит третью и четвертую нуклеотидные последовательности, охарактеризованные в п.11(б) и п.12; и

(б) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, которая содержит вторую нуклеотидную последовательность, охарактеризованную в п.11(а).

14. Клетка насекомого по п.13, в которой вторая конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой вектор, подходящий для клеток насекомых.

15. Клетка насекомого по п.14, в которой указанный вектор представляет собой бакуловирусный вектор.

16. Клетка насекомого по любому из пп.10-15, в которой вторая нуклеотидная последовательность дополнительно содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес, который предназначен для экспрессии в клетке млекопитающего, и в соответствии с чем указанная нуклеотидная последовательность становится встроенной в геном AAV серотипа 5, продуцируемого в клетке насекомого.

17. Клетка насекомого по п.16, в которой вторая нуклеотидная последовательность содержит две нуклеотидные последовательности ITR AAV, между которыми расположена указанная по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, которая кодирует продукт гена, представляющего интерес.

18. Клетка насекомого по п.11, в которой первая, вторая и третья нуклеотидные последовательности стабильно встроены в геном клетки насекомого.

19. Клетка насекомого по п.12, в которой первая, вторая, третья и четвертая нуклеотидные последовательности стабильно встроены в геном клетки насекомого.

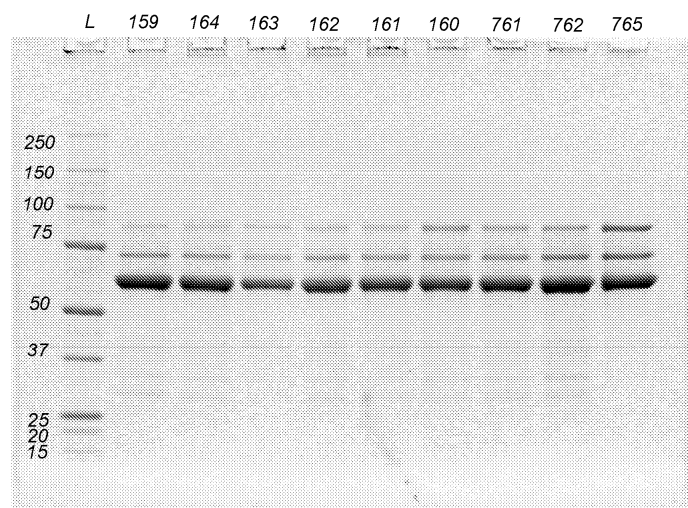
20. Вирион AAV5, содержащий в своем геноме капсидные белки AAV5, кодируемые молекулой нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, и по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую продукт гена, представляющего интерес.

21. Вирион AAV5 по п.20, в котором ген, представляющий интерес, кодирует белок фактора IX или фактора VIII.

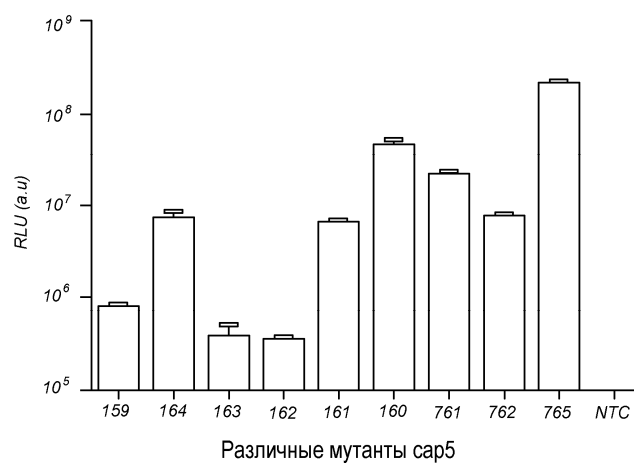
22. Способ получения AAV5 в клетке насекомого, включающий культивирование клетки насекомого по любому из пп. 10-19 в условиях, подходящих для продуцирования AAV5.

23. Способ по п.22, дополнительно включающий извлечение AAV5.

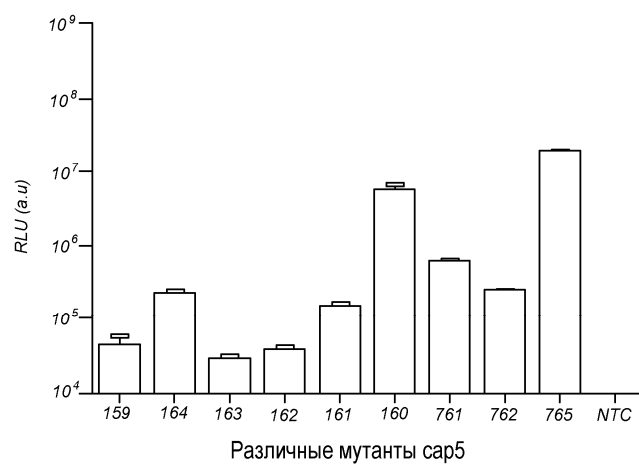
042960



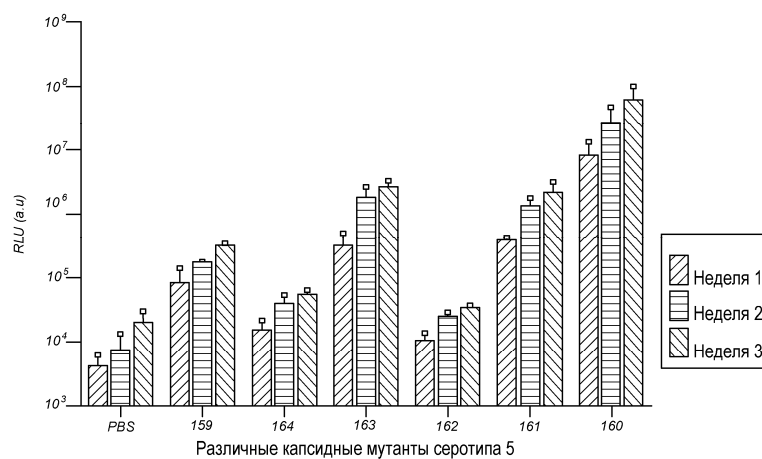
Фиг. 1



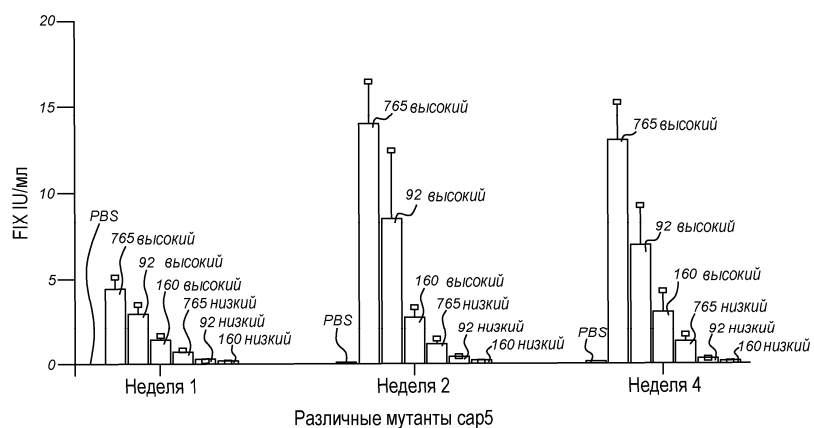
Фиг. 2



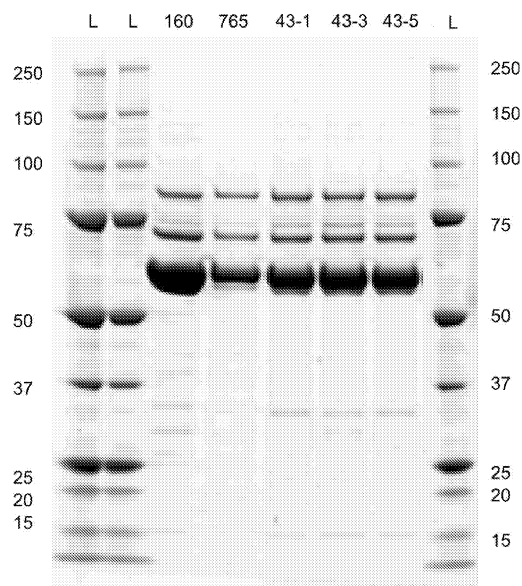
Фиг. 3



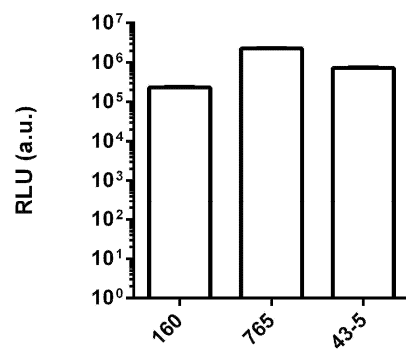
Фиг. 4



Фиг. 5

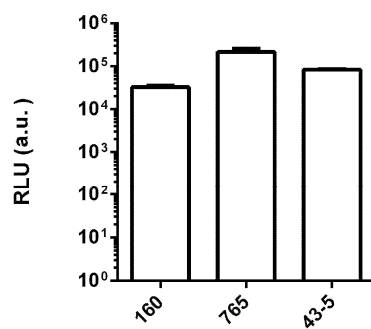


Фиг. 6



КАПСИДНЫЕ МУТАНТЫ AVV5

Фиг. 7A



КАПСИДНЫЕ МУТАНТЫ AVV5

Фиг. 7B



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2