

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292845 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.15

(51) Int. Cl. C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.19

(54) АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЙ ВИРУС СО СКОНСТРУИРОВАННЫМ КАПСИДОМ

(31) 63/012,703

(72) Изобретатель:

(32) 2020.04.20

Рейд Кристофер А., Чэн Цзе (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2021/027979

(87) WO 2021/216456 2021.10.28

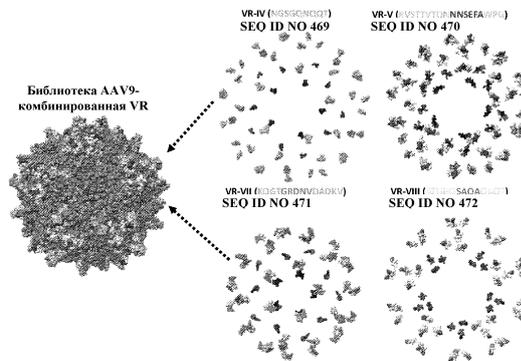
(88) 2021.12.02

(71) Заявитель:

ТЕНАЯ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены вирионы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) со сконструированным капсидным белком. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены вирионы AAV9 со сконструированным капсидом AAV9, химерным капсидом AAV5/9 или комбинированным капсидом, который обеспечивает повышение эффективности трансдукции в клетках сердца, повышение селективности в отношении типа клеток и/или другие требуемые свойства.



A1

202292845

202292845

A1

АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЙ ВИРУС СО СКОНСТРУИРОВАННЫМ КАПСИДОМ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США с регистрационным номером 63/012703, поданной 20 апреля 2020 года, содержание которой настоящим включено посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к генной терапии с помощью векторов на основе аденоассоциированного вируса. В частности, настоящее изобретение относится к вирионам рекомбинантного аденоассоциированного вируса, содержащим сконструированный капсидный белок.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Данная заявка подается в электронном виде через EFS-Web и содержит представленный в электронном виде перечень последовательностей в формате .txt. Файл .txt содержит перечень последовательностей под названием «TENA_019_01WO_SeqList_ST25.txt», созданный 13 апреля 2021 года и имеющий размер ~479 килобайтов. Перечень последовательностей, содержащийся в этом файле .txt, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Аденоассоциированный вирус (AAV) является перспективным для генной терапии и других биомедицинских вариантов применения. В частности, AAV можно применять для доставки продуктов гена к различным тканям и клеткам как *in vitro*, так и *in vivo*. Капсидные белки AAV в значительной степени определяют иммуногенность и тропизм векторов на основе AAV.

[0005] Что касается тканей сердца, AAV подтипа 9 (AAV9) представляет собой предпочтительный вектор на основе AAV, вследствие его способности осуществлять трансдукцию сердца после системной доставки. В то время как AAV9 может достигать умеренной трансдукции сердца, большинство векторов

транспортируется в печень. Более того, для достижения терапевтических уровней трансдукции в сердце требуются относительно высокие системные дозы, потенциально приводящие к системному воспалению и, в свою очередь, к токсичности.

[0006] Существует необходимость в разработке аденоассоциированного вируса со сконструированным капсидным белком, который обеспечивает улучшенный сердечный тропизм и необязательно улучшенную селективность тканей сердца по сравнению с печенью. В настоящем изобретении предусмотрены варианты капсида AAV9 и/или химерного капсида AAV5/AAV9, которые образуют вирионы rAAV, способные осуществлять трансдукцию тканей и/или типов клеток сердца более эффективно и/или с большей селективностью, чем вирионы rAAV, содержащие капсидные белки AAV9 дикого типа, которые можно применять для безопасной и эффективной генной терапии сердца.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены капсидные белки рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащие вариант полипептидной последовательности в одном или более из сайта VR-IV, сайта VR-V, сайта VR-VII и сайта VR-VIII исходной последовательности, где исходная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 463. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности представляет собой кардиотропный вариант полипептидной последовательности.

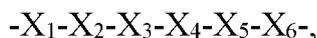
[0008] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок по настоящему изобретению содержит вариант полипептида в сайте VR-IV исходной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-IV имеет последовательность:



где X_1 представляет собой G, S или V; X_2 представляет собой Y, Q или I; X_3 представляет собой H, W, V или I; X_4 представляет собой K или N; X_5 представляет

собой S, G или I; X₆ представляет собой G или R; X₇ представляет собой A, P или V; X₈ представляет собой A или R; и X₉ представляет собой Q или D (SEQ ID NO: 477). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-IV содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6–104. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-IV содержит аминокислотную последовательность, выбранную из GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6), VIKSGAAQ (SEQ ID NO: 7), GYHKIGAAQ (SEQ ID NO: 8), SQVNGRPRD (SEQ ID NO: 33) и GYHKSGVAQ (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-IV содержит аминокислотную последовательность GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6) или последовательность, содержащую не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен относительно GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6).

[0009] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок по настоящему изобретению содержит вариант полипептида в сайте VR-V исходной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-V имеет последовательность:



где X₁ представляет собой S, L, H, N или A; X₂ представляет собой T, M, K, G или N; X₃ представляет собой S, T, M или I; X₄ представляет собой S, P, F, M или N; X₅ представляет собой F, S, P или L; и X₆ представляет собой I, V или T (SEQ ID NO: 474). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-V содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 105–203. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-V содержит аминокислотную последовательность, выбранную из LNSMLI (SEQ ID NO: 105), NGMSFT (SEQ ID NO: 106), HKTFSI (SEQ ID NO: 107) и SMSNFV (SEQ ID NO: 108). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-V содержит аминокислотную последовательность LNSMLI (SEQ ID NO: 105) или последовательность, содержащую не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен относительно LNSMLI (SEQ ID NO: 105).

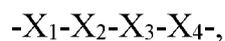
[0010] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок по настоящему изобретению содержит вариант полипептида в сайте VR-VII исходной

последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-VII имеет последовательность:



где X_1 представляет собой V, L, Q, C или R; X_2 представляет собой S, H, G, C или D; X_3 представляет собой Y, S, L, G или N; X_4 представляет собой S, L, H, Q или N; и X_5 представляет собой V, I или R (SEQ ID NO: 475). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-VII содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 204–302. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-VII содержит аминокислотную последовательность, выбранную из RGNQV (SEQ ID NO: 204), VSLNR (SEQ ID NO: 205), CDYSV (SEQ ID NO: 206) и QHGH (SEQ ID NO: 207). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-VII содержит аминокислотную последовательность RGNQV (SEQ ID NO: 204) или последовательность, содержащую не более 1, 2, или 3 аминокислотных замен относительно RGNQV (SEQ ID NO: 204).

[0011] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок по настоящему изобретению содержит вариант полипептида в сайте VR-VII исходной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-VIII имеет последовательность:



где X_1 представляет собой S, N или A; X_2 представляет собой V, M, N или A; X_3 представляет собой Y, V, S или G; и X_4 представляет собой Y, T, M, G или N (SEQ ID NO: 476). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-VIII содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 303–401. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-VIII содержит аминокислотную последовательность, выбранную из ANYG (SEQ ID NO: 305), NVSY (SEQ ID NO: 303), SMVN (SEQ ID NO: 304) и NVGT (SEQ ID NO: 306). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида в сайте VR-VIII содержит аминокислотную последовательность ANYG (SEQ ID NO: 305) или последовательность, содержащую не более 1 или 2 аминокислотных замен относительно ANYG (SEQ ID NO: 305). В некоторых вариантах осуществления

вариант полипептида в сайте VR-VIII содержит аминокислотную последовательность NVSY (SEQ ID NO: 303) или последовательность, содержащую не более 1 или 2 аминокислотных замен относительно NVSY (SEQ ID NO: 303).

[0012] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены капсидные белки рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащие вариант полипептидной последовательности в одном или более из сайта VR-IV, сайта VR-V, сайта VR-VII и сайта VR-VIII исходной последовательности, где исходная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 463. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 402–410. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 402. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 403. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 404. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 406. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную 482. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную 483. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере

мере 99% или 100% идентичную 484. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную 485.

[0013] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок представляет собой химерный капсидный белок AAV5/AAV9. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит по меньшей мере один сегмент из капсидного белка AAV5. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит: а) первый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 411 или SEQ ID NO: 412; б) второй сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 413 или SEQ ID NO: 414; в) третий сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 415 или SEQ ID NO: 416; г) четвертый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 417 или SEQ ID NO: 418; д) пятый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 419 или SEQ ID NO: 420; где по меньшей мере один сегмент получен из капсидного белка AAV5, и по меньшей мере один сегмент получен из капсидного белка AAV9. В некоторых вариантах осуществления химерный капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 445–462. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 457. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 459. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 445. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 446. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по

меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 447. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 448.

[0014] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает капсидные белки рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащие последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 463. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности представляет собой кардиотропный вариант полипептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит по меньшей мере один сегмент из капсидного белка AAV5. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит:

a) первый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 411 или SEQ ID NO: 412;

b) второй сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 413 или SEQ ID NO: 414;

c) третий сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 415 или SEQ ID NO: 416;

d) четвертый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 417 или SEQ ID NO: 418;

e) пятый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 419 или SEQ ID NO: 420,

где по меньшей мере один сегмент получен из капсидного белка AAV5, и по меньшей мере один сегмент получен из капсидного белка AAV9. В некоторых вариантах осуществления химерный капсидный белок содержит последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 421–444. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ

ID NO: 434. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 438. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 441.

[0015] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены вирионы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащие капсидный белок по настоящему изобретению и гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более продуктов гена. В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV содержит капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 404. В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV содержит капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 483. В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в клетках сердца по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления клетки сердца расположены в левом желудочке сердца. В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в кардиомиоцитах, полученных из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPS-CM), по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в клетках, представляющих собой сердечные фибробласты человека (hCF), по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-CM при множественности инфицирования (MOI), составляющей 100000. В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции

в клетках iPS-СМ при множественности инфицирования (MOI), составляющей 75000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции сердца у мыши C57BL/6J, где мышь получает инъекцию вириона в дозе, составляющей $2,5E+11$ vg/мышь. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 1,5-кратное повышение эффективности трансдукции сердца у мыши C57BL/6J, где мышь получает инъекцию вириона в дозе, составляющей $2E+11$ vg/мышь. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции сердца у мыши C57BL/6J, где мышь получает инъекцию вириона в дозе, составляющей $1E+11$ vg/мышь. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует сниженную эффективность трансдукции в клетках печени по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует улучшенное уклонение от NAb по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует повышенную селективность вириона гAAV в отношении клеток сердца по сравнению с клетками печени. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует повышенную селективность вириона гAAV в отношении клеток iPS-СМ по сравнению с клетками печени.

[0016] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие вирион гAAV по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0017] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие капсидный белок по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 404. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую капсидный белок, содержащий

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 483.

[0018] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы трансдукции клетки сердца, включающие приведение клетки сердца в контакт с вирионом гAAV по настоящему изобретению, где вирион гAAV осуществляет трансдукцию клетки сердца. В некоторых вариантах осуществления клетка сердца представляет собой кардиомиоцит. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в клетке по сравнению с вирионом AAV, содержащим последовательность капсидного белка AAV9. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции в клетке по сравнению с вирионом AAV, содержащим последовательность капсидного белка AAV9, при множественности инфицирования (MOI), составляющей 75000.

[0019] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы доставки одного или более продуктов гена в клетку сердца, включающие приведение клетки сердца в контакт с вирионом гAAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка сердца представляет собой кардиомиоцит.

[0020] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения патологии сердца у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества вириона гAAV по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, где вирион гAAV осуществляет трансдукцию ткани сердца. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более продуктов гена. В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов гена предусматривают MYBPC3, DWORF, KCNH2, TRPM4, DSG2, PKP2 и/или ATP2A2. В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов гена предусматривают CACNA1C, DMD, DMPK, EPG5, EVC, EVC2, FBN1, NF1, SCN5A, SOS1, NPR1, ERBB4, VIP, MYH7 и/или Cas9. В некоторых вариантах осуществления

один или более продуктов гена предусматривают MYOCD, ASCL1, GATA4, MEF2C, TBX5, miR-133 и/или MESP1.

[0021] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и инструкции по применению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0022] На **фиг. 1** изображен капсид AAV9 с выделенными аминокислотами в выбранных переменных областях AAV9 (сайт VR-IV, VR-V, VR-VII и VR-VIII).

[0023] На **фиг. 2** показано схематическое изображение стратегии направленного эволюционного отбора и определения характеристик вариантов. После получения библиотеки каждую библиотеку подвергали одному раунду отбора в hiPSC-CM и двум раундам отбора на мышинной модели. Для ведущих вариантов из каждой библиотеки определяли характеристики посредством оценки трансдукции *in vitro* (hiPSC-CM) и трансдукции *in vivo* (сердце и печень) после системной доставки вируса. Ведущие варианты подвергали скринингу в отношении способности к уклонению от ингибирования человеческими NAb.

[0024] На **фиг. 3** показано графическое представление библиотек модифицированных VR после трех раундов скрининга библиотек. Показано графическое представление сложности библиотеки для VR-IV (**фиг. 3A**), VR-V (**фиг. 3B**), VR-VII (**фиг. 3C**) и VR-VIII (**фиг. 3D**) у исходной вирусной библиотеки и после трех раундов отбора, где каждый ряд на изображении соотнесен с одним пикселем изображения. Белковым последовательностям присвоен уникальный цвет, исходя из гидрофобности последовательности, и ряды из одной последовательности объединены в кластеры.

[0025] На **фиг. 4** изображены белковые мотивы, идентифицированные в сайте VR-IV (**фиг. 4A**), VR-V (**фиг. 4B**), VR-VII (**фиг. 4C**) и VR-VIII (**фиг. 4D**) после направленной эволюции.

[0026] На **фиг. 5** показано, что варианты AAV с модифицированной VR-IV демонстрируют превосходную трансдукцию hiPSC-CM по сравнению с AAV9. Человеческие кардиомиоциты, полученные из iPSC, инфицировали при MOI,

составляющей 100000, с помощью AAV9 или различных образованных вариантов капсида, упаковывающих репортерный GFP с универсальной экспрессией. Через три дня после инфицирования экспрессию GFP определяли количественно посредством проточной цитометрии. Для CR9-01 (129-кратное), CR9-07 (16-кратное) и CR9-13 (9-кратное) продемонстрировано значительное улучшение трансдукции по сравнению с AAV9, в то время как для CR9-10, CR9-13 и CR9-14 продемонстрировано небольшое повышение трансдукции. На нижней половине фигуры показаны репрезентативные изображения AAV9 и CR9-01, демонстрирующего резкое повышение трансдукции.

[0027] На **фиг. 6** показано определение характеристик новых вариантов AAV *in vivo*. AAV9:CAG-GFP или CAG-GFP, упакованные в новый капсид, вводили посредством ретроорбитальной инъекции мышам C57BL/6J при дозе $2,5 \times 10^{11}$ vg/мышь ($n=2-3$ мыши на группу). На **фиг 6A** показано, что CR9-07, CR9-10, CR9-13 и CR9-14 демонстрировали значительно более высокую трансдукцию сердца, чем AAV9, как определено с помощью ELISA ($p < 0,05$, однофакторный ANOVA; критерий множественных сравнений Даннета). На **фиг. 6B** показаны репрезентативные поперечные срезы сердца для ведущих трансдуцирующих вариантов. На **фиг. 6C** показано, что CR9-10 и CR9-14 демонстрировали значительно сниженный тропизм в отношении печени по сравнению с AAV9 ($p < 0,03$, однофакторный ANOVA; критерий множественных сравнений Даннета). На **фиг. 6D** показаны репрезентативные изображения ИНС печени для ведущих вариантов.

[0028] На **фиг. 7A-7C** показана восприимчивость новых вариантов AAV к ингибированию с помощью NAb под действием объединенных человеческих IgG. **Фиг. 7A** представляет собой графическую иллюстрацию схемы эксперимента для оценки уклонения от нейтрализующих антител при различных дозах объединенных человеческих IgG (~2000 пациентов), находящихся в диапазоне 0–600 $\mu\text{g}/\text{мл}$. На **фиг. 7B** показана кривая «доза-эффект», демонстрирующая снижение нейтрализации CR9-07 и CR9-13 при концентрациях IgG выше 300 $\mu\text{g}/\text{мл}$. На **фиг. 7C** показано, что CR9-07 и CR9-13 характеризуются значительным снижением

нейтрализации по сравнению с AAV9 ($p < 0,0001$, однофакторный ANOVA; критерий множественных сравнений Даннета)

[0029] На **фиг. 8** показано визуальное представление получения библиотеки химерных AAV5/9 посредством перестановки в ДНК. AAV9 подвергали модификации кодонов для улучшения гомологии с AAV5, и оба гена *Cap* фрагментировали путем расщепления с помощью ДНКазы I и повторно собирали с помощью ПЦР на основе частичной гомологии между двумя генами *Cap*.

[0030] На **фиг. 9** показано, что сложность библиотеки для библиотеки химерного AAV5/9 значительно снижалась после одного раунда скрининга *in vivo*. Последовательности отдельных химер AAV изображены графически.

[0031] На **фиг. 10** показано определение характеристик ведущих химер AAV5/9 *in vitro*. На **фиг. 10А** показана эффективность трансдукции hiPSC-СМ при MOI, составляющей 75000. ZC44 демонстрирует улучшенную трансдукцию hiPSC-СМ по сравнению с AAV9. На **фиг. 10В** показана оценка уклонения от NAb для ведущих химер AAV5/9 при 1 мг/мл объединенных человеческих IgG. ZC44 показывает усиленное уклонение от NAb по сравнению с AAV9.

[0032] На **фиг. 11** показано определение характеристик химерных вариантов AAV *in vivo*. AAV9:CAG-GFP или CAG-GFP, упакованные в химерный капсид, вводили посредством ретроорбитальной инъекции мышам C57BL/6J при дозе 2×10^{11} vg/мышь ($n=3$ мыши на группу). Через 14 дней после инъекции собирали сердце (**фиг. 11А**) и печень (**фиг. 11В**) и определяли экспрессию GFP для оценки эффективности и специфичности трансфекции. ZC40 и ZC47 демонстрировали улучшенную специфичность в отношении сердца по сравнению с AAV9 дикого типа.

[0033] На **фиг. 12** изображено получение комбинированных вариантов AAV путем комбинирования ведущих химер AAV5/9 и вариантов AAV9 с модифицированной VR.

[0034] На **фиг. 13** показана оценка технологичности изготовления вариантов комбинированного капсида AAV с модифицированной VR. Проводили получение вектора в средних масштабах для оценки технологичности изготовления вариантов

капсида AAV. CR9-07, CR9-10 и TN40-14 характеризовались улучшенной технологичностью изготовления по сравнению с AAV9.

[0035] На **фиг. 14** продемонстрировано, что комбинированные варианты AAV характеризуются значительным улучшением трансдукции hiPSC-CM. Человеческие кардиомиоциты, полученные из iPSC, инфицировали при MOI, составляющей 100000, с помощью AAV9 или различных вариантов комбинированного капсида, упаковывающих репортерный GFP с универсальной экспрессией. Через пять дней после инфицирования экспрессию GFP определяли количественно с применением считывающего устройства с клеточной визуализацией Cytation 5. TN44-07 и TN47-07 характеризовались значительно улучшенной трансдукцией (более чем в 15 раз) hiPSC-CM по сравнению с AAV9.

[0036] На **фиг. 15** показан результат определения характеристик новых вариантов AAV *in vivo*. AAV9:CAG-GFP или CAG-GFP, упакованные в новый капсид, вводили посредством ретроорбитальной инъекции мышам C57BL/6J при дозе 1×10^{11} vg/мышь ($n=4$ мыши на группу). Через 14 дней после инъекции собирали сердце и печень и оценивали экспрессию GFP. На **фиг. 15A** показана эффективность трансдукции каждого варианта капсида в сердце. На **фиг. 15B** показана эффективность трансдукции каждого варианта капсида в печени. На **фиг. 15C** показано отношение эффективности трансдукции в сердце/эффективности трансдукции в печени. TN44-07 и TN47-10 демонстрировали усиленную трансдукцию сердца по сравнению с AAV9, в то время как TN47-14 потерял нацеленность на печень и характеризовался значительно более высоким соотношением трансдукции сердца и печени, чем AAV9.

[0037] На **фиг. 16** показана оценка уклонения от человеческих NAb для ведущих вариантов комбинированного капсида. Все варианты комбинированного капсида AAV демонстрировали улучшенное уклонение от нейтрализующих антител в объединенных человеческих IgG, при этом TN44-07 являлся наиболее скрытным капсидом, характеризующимся весьма значительным снижением нейтрализации с помощью NAb ($p = 0,0002$, t-критерий, поправка Уэлча) по сравнению с AAV9.

[0038] На **фиг. 17A** показана относительная трансдукция для вирионов rAAV с разными сконструированными капсидами в левом желудочке сердца макаков-

крабоедов при тестировании в сравнении со стандартным капсидом AAV9. Два варианта капсида TN3 и TN6 демонстрировали значительное улучшение трансдукции в левом желудочке сердца. На **фиг. 17B** показан профиль трансдукции для вариантов капсида в печени. Большинство вариантов капсида демонстрируют сниженный тропизм в отношении печени по сравнению с AAV9. На **фиг. 17C** показано относительное соотношение трансдукции сердца и печени, нормализованное по капсиду AAV9. TN3 показал 5-кратное повышение специфичности в отношении сердца по сравнению с печенью при сравнении с AAV9.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0039] В настоящем изобретении предусмотрены вирионы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV). В частности, в настоящем изобретении предусмотрены сконструированные капсидные белки (включая химерные капсидные белки), способы их идентификации и способы их применения. Способы идентификации новых капсидных белков, раскрытые в данном документе, могут найти широкое применение для любого серотипа AAV, включая химерные капсидные белки. Кроме того, они могут применяться для итеративного улучшения капсидных белков, которые содержат мутации, введенные с помощью данного или других способов. В целом, способы по настоящему изобретению относятся к получению рандомизированных или полурандомизированных библиотек капсидов AAV в форме полинуклеотидов гена *cap*, получению вирионов AAV, содержащих такие капсиды (либо путем включения библиотеки гена *cap* в геном AAV, либо обеспечения его состояния *in trans*, например, на плазмиде, трансфицированной в паковую линию), осуществлению позитивного или негативного отбора вирионов AAV и выделению гена *cap* для секвенирования. В некоторых вариантах осуществления выделение и секвенирование включают нанопоровое секвенирование. Могут применяться другие способы высокопроизводительного секвенирования или секвенирования нового поколения (NGS).

[0040] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены вирионы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащие:

- a) капсидный белок, описанный в данном документе; и
- b) гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более продуктов гена.

[0041] В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV, раскрытые в данном документе, содержат капсидный белок AAV9, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV, раскрытые в данном документе, содержат химерный капсидный белок AAV5/AAV9, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV, раскрытые в данном документе, содержат комбинированный капсидный белок, раскрытый в данном документе.

[0042] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV9 содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 1, показанной ниже. N-концевой остаток VP1, VP2 и VP3, а также сайты VR (VR-IV, VR-V, VR-VII и VR-VIII) указаны в последовательности полноразмерного VP1 (SEQ ID NO: 1) ниже.

VP1-->

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK
RLL

VP2-->

EPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQAQAKKRLNFGQTGDTEVDPDQPIG

VP3-->

EPPAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTY
NNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFK
LFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLT
LNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNLID

VR-IV

VR-V

QYLYYLSKTINGSGONQOTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWP

VR-VII

GASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIK

VR-VIII

TTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNF

HPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR
WNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRIGTRYLTRNL
(SEQ ID NO: 1)

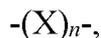
Капсидный белок с вариантом полипептидной последовательности в сайтах VR

[0043] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены капсидные белки AAV9, где капсидный белок содержит варианты полипептидной последовательности относительно исходной последовательности в одном или более сайтах исходной последовательности. В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов исходной последовательности выбраны из группы, состоящей из сайта VR-IV, сайта VR-V, сайта VR-VII и сайта VR-VIII. Как отмечено в SEQ ID NO: 1 выше, сайт VR-IV располагается между остатками 452 и 460 в исходной последовательности («NGSGQNQQT», SEQ ID NO: 2); сайт VR-V располагается между остатками 497 и 502 в исходной последовательности («NNSEFA», SEQ ID NO: 3); сайт VR-VII располагается между остатками 549 и 553 в исходной последовательности («GRDNV», SEQ ID NO: 4); сайт VR-VIII располагается между остатками 586 и 589 в исходной последовательности («SAQA», SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV9 содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 1, за исключением сайта VR-IV, сайта VR-V, сайта VR-VII и/или сайта VR-VIII. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV9 содержит вариант полипептидной последовательности в одном или более из сайта VR-IV, сайта VR-V, сайта VR-VII и сайта VR-VIII исходной последовательности, где исходная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 463. (В SEQ ID NO:463 аминокислотные остатки, помеченные «X», исключены из расчета идентичности последовательности.)

[0044] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV9 содержит вариант полипептидной последовательности, которая либо получена с помощью рационального дизайна; введена посредством мутагенеза; либо

рандомизирована посредством получения библиотеки последовательностей с применением случайных кодонов в одном или более сайтах. Капсидные белки по настоящему изобретению включают любые варианты полипептидной последовательности, идентифицированные как обогащенные путем направленной эволюции с последующим секвенированием, как показано без ограничения в разделе «Примеры». Без ограничения каким-либо конкретным сайтом замены в некоторых вариантах осуществления один или более сайтов, выбранных из группы, состоящей из сайта VR-IV, сайта VR-V, сайта VR-VII и сайта VR-VIII, содержат аминокислотные замены, описанные в данном документе.

[0045] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок по настоящему изобретению содержит вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV. В некоторых вариантах осуществления сайт VR-IV («NGSGQNQQT», SEQ ID NO: 2) полностью замещен пептидом формулы:



где n составляет 7–11, и X представляет любую из 20 стандартных аминокислот (SEQ ID NO: 478).

[0046] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV представляет собой:



[0047] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV представляет собой:



где X_1 представляет собой G, S или V; X_2 представляет собой Y, Q или I; X_3 представляет собой H, W, V или I; X_4 представляет собой K или N; X_5 представляет собой S, G или I; X_6 представляет собой G или R; X_7 представляет собой A, P или V; X_8 представляет собой A или R; и/или X_9 представляет собой Q или D (SEQ ID NO: 477).

[0048] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV содержит последовательность, выбранную из GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6), VIKSGAAQ (SEQ ID NO: 7), GYHKIGAAQ (SEQ ID

NO: 8), GYHKSGVAQ (SEQ ID NO: 9), VYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 10), GYHKISAAQ (SEQ ID NO: 11), TTVPSSSRV (SEQ ID NO: 12), VIIRVVRLS (SEQ ID NO: 13), TVLGQNQQT (SEQ ID NO: 14), IYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 15), TVLDKNQQT (SEQ ID NO: 16), YSGTDVRYK (SEQ ID NO: 17), VTASGKEHR (SEQ ID NO: 18), GYRKSGAAQ (SEQ ID NO: 19), NRTVSNGSE (SEQ ID NO: 20), TVLDRINKT (SEQ ID NO: 21), TGVGHLSA (SEQ ID NO: 22), GYHKGGAQ (SEQ ID NO: 23), VIAKSGAAQ (SEQ ID NO: 24), GYHKSGAAH (SEQ ID NO: 25), FIIKSGAAQ (SEQ ID NO: 26), GYHKVVRLS (SEQ ID NO: 27), GATRSVES (SEQ ID NO: 28), TVSGQNQQT (SEQ ID NO: 29), LSHKSGAAQ (SEQ ID NO: 30), SSSGQNQQT (SEQ ID NO: 31), SGSGQNQQT (SEQ ID NO: 32), SQVNGRPRD (SEQ ID NO: 33), GYHKEWCGS (SEQ ID NO: 34), VVSSKSLNS (SEQ ID NO: 35), GYHKSGAAP (SEQ ID NO: 36), DASSREKVR (SEQ ID NO: 37), SYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 38), TANGSQKYL (SEQ ID NO: 39), VIIRVGAAQ (SEQ ID NO: 40), SSTNKISTA (SEQ ID NO: 41), TVLDRIQQT (SEQ ID NO: 42), GYHKSGAVQ (SEQ ID NO: 43), TVLDQNQQT (SEQ ID NO: 44), VNMSSPIKT (SEQ ID NO: 45), AAYNSNSAF (SEQ ID NO: 46), GYHKSGAAR (SEQ ID NO: 47), VIIRVVRLQ (SEQ ID NO: 48), RFWTQNQQT (SEQ ID NO: 49), SSPRASSAL (SEQ ID NO: 50), IIRVVRLS (SEQ ID NO: 51), KSSNLTAMP (SEQ ID NO: 52), NLNSDRHSA (SEQ ID NO: 53), LSLKSGAAQ (SEQ ID NO: 54), TVLDRNQQT (SEQ ID NO: 55), GSERVSNSG (SEQ ID NO: 56), VIAKIGAAQ (SEQ ID NO: 57), VYHKIGAAQ (SEQ ID NO: 58), LSYKSGAAQ (SEQ ID NO: 59), STVSQPVRT (SEQ ID NO: 60), GHHKSGAAQ (SEQ ID NO: 61), YAGIDPRYH (SEQ ID NO: 62), DRSRKSMCD (SEQ ID NO: 63), VIIRSGAAQ (SEQ ID NO: 64), GYHKSGGSA (SEQ ID NO: 65), VIKIGAAQ (SEQ ID NO: 66), GYHKVVQLS (SEQ ID NO: 67), VIKLVAAQ (SEQ ID NO: 68), KVSSHVCD (SEQ ID NO: 69), GYHKRVRLS (SEQ ID NO: 70), GYHKSSAAQ (SEQ ID NO: 71), GYRKIGAAQ (SEQ ID NO: 72), GYHKSGAAC (SEQ ID NO: 73), GYRQSGAAQ (SEQ ID NO: 74), VIKLIAAQ (SEQ ID NO: 75), VIIRVVRAQ (SEQ ID NO: 76), GYHKSGAAW (SEQ ID NO: 77), GYHKSGAVS (SEQ ID NO: 78), GYHKEWCSS (SEQ ID NO: 79), SSSSNRLAD (SEQ ID NO: 80), SNNSSSAKF (SEQ ID NO: 81), VKLSSTSSS (SEQ ID NO: 82), GYHKEWCAQ (SEQ ID NO: 83), AGSGQNQQT (SEQ ID NO: 84), NPHGTATYL (SEQ ID NO: 85), NGSGQNQHT (SEQ ID NO: 86), GYHKVGAAQ (SEQ ID NO: 87), VIIRVVRLK (SEQ

ID NO: 88), NSIPSTSKW (SEQ ID NO: 89), VIIRVVQLQ (SEQ ID NO: 90), SQVNGRPPQD (SEQ ID NO: 91), NGSQDQQT (SEQ ID NO: 92), GLNSSDRRL (SEQ ID NO: 93), IYHKIGAAQ (SEQ ID NO: 94), YHKSGAAQL (SEQ ID NO: 95), YSGTDVQYK (SEQ ID NO: 96), LGSGQNQQT (SEQ ID NO: 97), PVSSGADRR (SEQ ID NO: 98), EHSTKLNAC (SEQ ID NO: 99), NGSDRINKR (SEQ ID NO: 100), VIKGGAAQ (SEQ ID NO: 101), GYHRVVRLS (SEQ ID NO: 102), VIIRVVRL (SEQ ID NO: 103) и VILKSGAAQ (SEQ ID NO: 104), или состоит из нее.

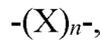
[0049] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV содержит полипептидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную одной из SEQ ID NO: 6–104, по сути состоит или состоит из нее.

[0050] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен относительно GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен относительно GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV представляет собой GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6).

[0051] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную SQVNGRPRD (SEQ ID NO: 33), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен относительно SQVNGRPRD (SEQ ID NO: 33), по сути состоит или состоит из

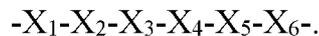
нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен относительно SQVNGRPRD (SEQ ID NO: 33), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-IV представляет собой SQVNGRPRD (SEQ ID NO: 33).

[0052] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок по настоящему изобретению содержит вариант полипептидной последовательности в сайте VR-V. В некоторых вариантах осуществления сайт VR-V («NNSEFA», SEQ ID NO: 3) полностью замещен пептидом формулы:

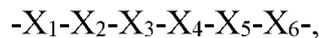


где n составляет 4-8, и X представляет любую из 20 стандартных аминокислот (SEQ ID NO: 479).

[0053] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-V представляет собой:



[0054] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-V представляет собой:



где X_1 представляет собой S, L, H, N или A; X_2 представляет собой T, M, K, G или N; X_3 представляет собой S, T, M или I; X_4 представляет собой S, P, F, M или N; X_5 представляет собой F, S, P или L; и X_6 представляет собой I, V или T (SEQ ID NO: 474).

[0055] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-V содержит последовательность, выбранную из LNSMLI (SEQ ID NO: 105), NGMSFT (SEQ ID NO: 106), HKTF SI (SEQ ID NO: 107), SMSNFV (SEQ ID NO: 108), ATIPPI (SEQ ID NO: 109), SSTHFD (SEQ ID NO: 110), NNQFSY (SEQ ID NO: 111), NMGHYS (SEQ ID NO: 112), SKQMFQ (SEQ ID NO: 113), WPSAGV (SEQ ID NO: 114), NGGYQC (SEQ ID NO: 115), STSPIV (SEQ ID NO: 116), SQSGLW (SEQ ID NO: 117), VNSQFS (SEQ ID NO: 118), SGIEFR (SEQ ID NO:

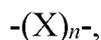
119), SASKFT (SEQ ID NO: 120), QLNWTS (SEQ ID NO: 121), SMGFPV (SEQ ID NO: 122), SSFMGL (SEQ ID NO: 123), GSNFHV (SEQ ID NO: 124), DMTLYA (SEQ ID NO: 125), MGCLFT (SEQ ID NO: 126), ALAFNS (SEQ ID NO: 127), SKFLFA (SEQ ID NO: 128), QDAGLL (SEQ ID NO: 129), QDASLL (SEQ ID NO: 130), RDDMFS (SEQ ID NO: 131), LSRCFQ (SEQ ID NO: 132), LSRDFQ (SEQ ID NO: 133), QGLTPV (SEQ ID NO: 134), QWDVFT (SEQ ID NO: 135), PRVSFA (SEQ ID NO: 136), QSYYNP (SEQ ID NO: 137), RASHLG (SEQ ID NO: 138), IILFVP (SEQ ID NO: 139), IISFSY (SEQ ID NO: 140), LDSMLI (SEQ ID NO: 141), NIGHYS (SEQ ID NO: 142), NRMSFT (SEQ ID NO: 143), NGMSFA (SEQ ID NO: 144), IILLLP (SEQ ID NO: 145), RMRSLL (SEQ ID NO: 146), RRRCRF (SEQ ID NO: 147), PKQMFQ (SEQ ID NO: 148), LMSNFV (SEQ ID NO: 149), GASHLG (SEQ ID NO: 150), CASISW (SEQ ID NO: 151), SMTTFR (SEQ ID NO: 152), AAIPPI (SEQ ID NO: 153), PGCESL (SEQ ID NO: 154), SMGFAC (SEQ ID NO: 155), FLPSLM (SEQ ID NO: 156), NGISFT (SEQ ID NO: 157), ESSRWA (SEQ ID NO: 158), QLYFVP (SEQ ID NO: 159), SSNFHV (SEQ ID NO: 160), LEFMLI (SEQ ID NO: 161), QFDSFD (SEQ ID NO: 162), SPVFAC (SEQ ID NO: 163), VRLIFD (SEQ ID NO: 164), NGMSFI (SEQ ID NO: 165), LLFPPI (SEQ ID NO: 166), GAGVTG (SEQ ID NO: 167), QWMSFT (SEQ ID NO: 168), SIGFPV (SEQ ID NO: 169), RMQSLL (SEQ ID NO: 170), TSALQV (SEQ ID NO: 171), SLTHFD (SEQ ID NO: 172), QELPFL (SEQ ID NO: 173), LYFLLP (SEQ ID NO: 174), LSFFFA (SEQ ID NO: 175), LSRIFQ (SEQ ID NO: 176), DEVILF (SEQ ID NO: 177), RAGVAG (SEQ ID NO: 178), NGMSLP (SEQ ID NO: 179), PFEDFQ (SEQ ID NO: 180), QYGSLF (SEQ ID NO: 181), NYTFVL (SEQ ID NO: 182), MSGYQC (SEQ ID NO: 183), NYAFVP (SEQ ID NO: 184), RAGVTG (SEQ ID NO: 185), WNSMLI (SEQ ID NO: 186), IRRFSI (SEQ ID NO: 187), NGMSFY (SEQ ID NO: 188), IIQFSY (SEQ ID NO: 189), NGCLFT (SEQ ID NO: 190), RDASLL (SEQ ID NO: 191), ADSMLI (SEQ ID NO: 192), VDSQFS (SEQ ID NO: 193), SIGNFV (SEQ ID NO: 194), NGMSLL (SEQ ID NO: 195), NYTFVP (SEQ ID NO: 196), IRRLVF (SEQ ID NO: 197), PMSNFV (SEQ ID NO: 198), LWVFPV (SEQ ID NO: 199), VRLHFD (SEQ ID NO: 200), SMSNLF (SEQ ID NO: 201), STSLIV (SEQ ID NO: 202) и НКТФГИ (SEQ ID NO: 203) или состоит из нее.

[0056] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-V содержит полипептидную последовательность, на

по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную одной из SEQ ID NO: 105–203, по сути состоит или состоит из нее.

[0057] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-V содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную LNSMLI (SEQ ID NO: 105), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-V содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен относительно LNSMLI (SEQ ID NO: 105), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-V содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен относительно LNSMLI (SEQ ID NO: 105), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-V представляет собой LNSMLI (SEQ ID NO: 105).

[0058] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок по настоящему изобретению содержит вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII. В некоторых вариантах осуществления сайт VR-VII («GRDNV», SEQ ID NO: 4) полностью замещен пептидом формулы:



где n составляет 3-7, и X представляет любую из 20 стандартных аминокислот (SEQ ID NO: 480).

[0059] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII представляет собой:



[0060] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII представляет собой:



где X_1 представляет собой V, L, Q, C или R; X_2 представляет собой S, H, G, C или D; X_3 представляет собой Y, S, L, G или N; X_4 представляет собой S, L, H, Q или N; и X_5 представляет собой V, I или R (SEQ ID NO: 475).

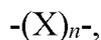
[0061] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII содержит последовательность, выбранную из RGNQV (SEQ ID NO: 204), VSLNR (SEQ ID NO: 205), CDYSV (SEQ ID NO: 206), QHGH I (SEQ ID NO: 207), LCLSV (SEQ ID NO: 208), PTIYV (SEQ ID NO: 209), DVIHI (SEQ ID NO: 210), AEFYA (SEQ ID NO: 211), NSVVC (SEQ ID NO: 212), VRSNC (SEQ ID NO: 213), LANNI (SEQ ID NO: 214), NLQFM (SEQ ID NO: 215), EFRDL (SEQ ID NO: 216), DFGSL (SEQ ID NO: 217), VTNYC (SEQ ID NO: 218), WNTNA (SEQ ID NO: 219), TESTC (SEQ ID NO: 220), SGAAV (SEQ ID NO: 221), GGCDI (SEQ ID NO: 222), SGSVV (SEQ ID NO: 223), SSNAC (SEQ ID NO: 224), YNTTV (SEQ ID NO: 225), SKCLA (SEQ ID NO: 226), SAYTV (SEQ ID NO: 227), VRDTV (SEQ ID NO: 228), WRSMV (SEQ ID NO: 229), AYHGV (SEQ ID NO: 230), GMNTI (SEQ ID NO: 231), AETSL (SEQ ID NO: 232), TLVYV (SEQ ID NO: 233), NHDWI (SEQ ID NO: 234), TVGIV (SEQ ID NO: 235), SLPTV (SEQ ID NO: 236), TGILC (SEQ ID NO: 237), TDTYI (SEQ ID NO: 238), LPVTY (SEQ ID NO: 239), GDVYI (SEQ ID NO: 240), LYGTV (SEQ ID NO: 241), GCEFI (SEQ ID NO: 242), SAGLL (SEQ ID NO: 243), IKSNI (SEQ ID NO: 244), VTTSI (SEQ ID NO: 245), AVTSV (SEQ ID NO: 246), RDIHI (SEQ ID NO: 247), SAISL (SEQ ID NO: 248), VASTC (SEQ ID NO: 249), IKGLL (SEQ ID NO: 250), GSYHT (SEQ ID NO: 251), RIGFV (SEQ ID NO: 252), NDIYI (SEQ ID NO: 253), AVSCV (SEQ ID NO: 254), QHNLL (SEQ ID NO: 255), VSSCV (SEQ ID NO: 256), LNLDV (SEQ ID NO: 257), LGATI (SEQ ID NO: 258), PVLCV (SEQ ID NO: 259), SARHI (SEQ ID NO: 260), RATLI (SEQ ID NO: 261), PYNHA (SEQ ID NO: 262), IGDSI (SEQ ID NO: 263), SPMLC (SEQ ID NO: 264), YDSTL (SEQ ID NO: 265), ALKHV (SEQ ID NO: 266), ADLLT (SEQ ID NO: 267), NNGHL (SEQ ID NO: 268), INSEV (SEQ ID NO: 269), SNKTT (SEQ ID NO: 270), GSTGL (SEQ ID NO: 271), DSDMI (SEQ ID NO: 272), TSNFI (SEQ ID NO: 273), RNFTT (SEQ ID NO: 274), SHKYS (SEQ ID NO: 275), VSDIV (SEQ ID NO: 276), RVVQA (SEQ ID NO: 277), AACAV (SEQ ID NO: 278), RGRQI (SEQ ID NO: 279), AVANI (SEQ ID NO: 280), AGYDL (SEQ ID NO: 281), LSEAA (SEQ ID NO: 282), MSNYL (SEQ ID NO: 283), NFSDN (SEQ ID NO: 284),

SCCDV (SEQ ID NO: 285), LASSV (SEQ ID NO: 286), PDHAV (SEQ ID NO: 287), KFDII (SEQ ID NO: 288), NSSSA (SEQ ID NO: 289), HTMHV (SEQ ID NO: 290), TLSYC (SEQ ID NO: 291), ADTHR (SEQ ID NO: 292), SMYSV (SEQ ID NO: 293), SVNLV (SEQ ID NO: 294), MSGHL (SEQ ID NO: 295), KISDT (SEQ ID NO: 296), TGLLA (SEQ ID NO: 297), AWTTS (SEQ ID NO: 298), GGALI (SEQ ID NO: 299), SCIEV (SEQ ID NO: 300), PPVIC (SEQ ID NO: 301) и GTYNL (SEQ ID NO: 302), или состоит из нее.

[0062] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII содержит полипептидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную одной из SEQ ID NO: 204–302, по сути состоит или состоит из нее.

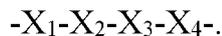
[0063] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную RGNQV (SEQ ID NO: 204), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен относительно RGNQV (SEQ ID NO: 204), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен относительно RGNQV (SEQ ID NO: 204), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII представляет собой RGNQV (SEQ ID NO: 204).

[0064] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок по настоящему изобретению содержит вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VII. В некоторых вариантах осуществления сайт VR-VIII («SAQA», SEQ ID NO: 5) полностью замещен пептидом формулы:

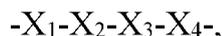


где n составляет 2-6, и X представляет любую из 20 стандартных аминокислот (SEQ ID NO: 481).

[0065] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII представляет собой:



[0066] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII представляет собой:



где X_1 представляет собой S, N или A; X_2 представляет собой V, M, N или A; X_3 представляет собой Y, V, S или G; и X_4 представляет собой Y, T, M, G или N (SEQ ID NO: 476).

[0067] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII содержит последовательность, выбранную из NVSY (SEQ ID NO: 303), SMVN (SEQ ID NO: 304), ANYG (SEQ ID NO: 305), NVGT (SEQ ID NO: 306), SAYM (SEQ ID NO: 307), EKVT (SEQ ID NO: 308), TTPG (SEQ ID NO: 309), GVYS (SEQ ID NO: 310), SYVG (SEQ ID NO: 311), LQYN (SEQ ID NO: 312), DPAK (SEQ ID NO: 313), THFS (SEQ ID NO: 314), IGGV (SEQ ID NO: 315), SSWN (SEQ ID NO: 316), SVYV (SEQ ID NO: 317), TLNG (SEQ ID NO: 318), NTSN (SEQ ID NO: 319), VQYA (SEQ ID NO: 320), DQYR (SEQ ID NO: 321), MPVS (SEQ ID NO: 322), SAQA (SEQ ID NO: 323), MTVA (SEQ ID NO: 324), TVMG (SEQ ID NO: 325), FSSI (SEQ ID NO: 326), SLRL (SEQ ID NO: 327), SAMG (SEQ ID NO: 328), YIKL (SEQ ID NO: 329), LMTM (SEQ ID NO: 330), QVHL (SEQ ID NO: 331), YNSV (SEQ ID NO: 332), CVIS (SEQ ID NO: 333), RLDG (SEQ ID NO: 334), AIMV (SEQ ID NO: 335), GTTG (SEQ ID NO: 336), ASYT (SEQ ID NO: 337), LHVG (SEQ ID NO: 338), LQFA (SEQ ID NO: 339), VRGD (SEQ ID NO: 340), NVMI (SEQ ID NO: 341), SLYG (SEQ ID NO: 342), GTVG (SEQ ID NO: 343), FNSV (SEQ ID NO: 344), TRLG (SEQ ID NO: 345), LKVL (SEQ ID NO: 346), SIRV (SEQ ID NO: 347), KIQG (SEQ ID NO: 348), QILG (SEQ ID NO: 349), QRDA (SEQ ID NO: 350), EAVR (SEQ ID NO: 351), AITV (SEQ ID NO: 352), KESI (SEQ ID NO: 353), LMVN (SEQ ID NO: 354), INLS (SEQ ID NO: 355), GQVS (SEQ ID NO: 356), TSLI (SEQ ID NO: 357), SSSL (SEQ ID NO: 358), YEFK (SEQ ID NO: 359), DGKL (SEQ ID NO: 360), QVYS (SEQ ID NO: 361), QKEG (SEQ ID NO: 362), ARDM (SEQ ID NO: 363), DNFR (SEQ ID NO: 364), SHGL (SEQ ID NO: 365), VSVN (SEQ ID NO: 366), GLKD (SEQ ID NO: 367),

QPVF (SEQ ID NO: 368), VYSM (SEQ ID NO: 369), VMAQ (SEQ ID NO: 370), FVGM (SEQ ID NO: 371), WSTP (SEQ ID NO: 372), SYPV (SEQ ID NO: 373), TTYS (SEQ ID NO: 374), TVTT (SEQ ID NO: 375), KDKT (SEQ ID NO: 376), YREL (SEQ ID NO: 377), LSHF (SEQ ID NO: 378), SPGT (SEQ ID NO: 379), LMGT (SEQ ID NO: 380), AASL (SEQ ID NO: 381), FSNN (SEQ ID NO: 382), QARL (SEQ ID NO: 383), YHIA (SEQ ID NO: 384), ARQD (SEQ ID NO: 385), VAYT (SEQ ID NO: 386), TPSY (SEQ ID NO: 387), MILH (SEQ ID NO: 388), LGNV (SEQ ID NO: 389), TSIS (SEQ ID NO: 390), TMVY (SEQ ID NO: 391), LVVG (SEQ ID NO: 392), SPLY (SEQ ID NO: 393), YKSE (SEQ ID NO: 394), FTRL (SEQ ID NO: 395), VSYN (SEQ ID NO: 396), ERTP (SEQ ID NO: 397), FRSE (SEQ ID NO: 398), NYTE (SEQ ID NO: 399), QTIN (SEQ ID NO: 400) и DVHR (SEQ ID NO: 401), или состоит из нее.

[0068] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII содержит полипептидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную одной из SEQ ID NO: 303–401, по сути состоит или состоит из нее.

[0069] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную ANYG (SEQ ID NO: 305), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII содержит последовательность, включающую не более 1, 2 или 3 аминокислотных замен относительно ANYG (SEQ ID NO: 305), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII содержит последовательность, включающую не более 1, 2 или 3 консервативных аминокислотных замен относительно ANYG (SEQ ID NO: 305), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII представляет собой ANYG (SEQ ID NO: 305).

[0070] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную NVSY (SEQ ID

NO: 303), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII содержит последовательность, включающую не более 1, 2 или 3 аминокислотных замен относительно NVSY (SEQ ID NO: 303), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII содержит последовательность, включающую не более 1, 2 или 3 консервативных аминокислотных замен относительно NVSY (SEQ ID NO: 303), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте VR-VIII представляет собой NVSY (SEQ ID NO: 303).

[0071] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит полипептидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную одной из SEQ ID NO: 402–410 и 464–468, или ее функциональный фрагмент, по сути состоит или состоит из нее.

Таблица 1. Последовательности капсидного белка

Название/альтернативное название	SEQ ID NO:
CR9-01/TN1	402
CR9-07	403
CR9-07-A/TN5	482
CR9-07-E/TN6	483
CR9-08	464
CR9-09	465
CR9-10/TN3	404
CR9-11	466
CR9-13	405
CR9-14/TN4	406
CR9-15	467
CR9-16	468
CR9-17	407
CR9-20	408
CR9-21	409
CR9-22	410
HV1/TN7	484

HV2/TN11	485
----------	-----

Химерный капсид AAV5/AAV9

[0072] В настоящем изобретении также предусмотрены капсидные белки рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащие последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 463. (В SEQ ID NO:463 аминокислотные остатки, помеченные «X», исключены из расчета идентичности последовательности.) В некоторых вариантах осуществления капсидный белок представляет собой химерный капсидный белок AAV5/AAV9. В некоторых вариантах осуществления последовательность химерного капсидного белка AAV5/AAV9 на более чем приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентична последовательности капсидного белка AAV9 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления 500 С-концевых остатков последовательности химерного капсидного белка AAV5/AAV9 являются на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичными 500 С-концевым остаткам последовательности капсидного белка AAV9 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления остаток в положении, эквивалентном Q688 в последовательности капсидного белка AAV9 (SEQ ID NO: 1), представляет собой лизин (K) в химерном капсидном белке.

[0073] В некоторых вариантах осуществления химерный капсидный белок содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или более полипептидных сегментов, полученных из капсидного белка AAV5. В некоторых вариантах осуществления химерный капсидный белок содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или более полипептидных сегментов, полученных из капсидного белка AAV9. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полипептидный сегмент получен из капсидного белка AAV5, и по меньшей мере один полипептидный сегмент получен из капсидного белка AAV9.

[0074] В некоторых вариантах осуществления первые 250 остатков на N-конце химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов,

полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления первые 225 остатков на N-конце химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления первые 200 остатков на N-конце химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления первые 150 остатков на N-конце химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления первые 100 остатков на N-конце химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления первые 50 остатков на N-конце химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5, характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью капсида AAV5.

[0075] В некоторых вариантах осуществления остатки 50–250 химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления остатки 50–200 химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления остатки 50–150 химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления остатки 100–250 химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления остатки 100–200 химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления остатки 150–250 химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5, характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 85%,

90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью капсида AAV5.

[0076] В некоторых вариантах осуществления последние 100 остатков на С-конце химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления последние 50 остатков на С-конце химерного капсидного белка содержат один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5, характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью капсида AAV5. В некоторых вариантах осуществления химерный капсидный белок содержит один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5, на N-конце химерного капсидного белка или вблизи него, как описано выше, и один или более полипептидных сегментов, полученных из капсида AAV5, на С-конце химерного капсидного белка или вблизи него, как описано в данном абзаце.

[0077] В некоторых вариантах осуществления химерный капсидный белок содержит в порядке от N-конца к С-концу: первый полипептидный сегмент, имеющий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 411 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 412; второй полипептидный сегмент, имеющий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 413 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 414; третий полипептидный сегмент, имеющий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 415 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 416; четвертый полипептидный сегмент, имеющий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 417 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 418; и пятый полипептидный сегмент, имеющий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 419 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 420. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полипептидный сегмент получен из капсидного белка AAV5, и по меньшей мере один полипептидный сегмент получен из капсидного белка AAV9.

[0001] Полипептидный сегмент 1, полученный из AAV9:

[0002] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARG
LVLPGY (SEQ ID NO: 411).

[0003] Последовательность полипептидного сегмента 1, полученного из AAV5:

[0004] MSFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLV
LPGY (SEQ ID NO: 412).

[0005] Последовательность полипептидного сегмента 2, полученного из AAV9:

[0006] KYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLK (SEQ ID NO:
413).

[0007] Последовательность полипептидного сегмента 2, полученного из AAV5:

[0008] NYLGPGNGLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLE (SEQ ID
NO: 414).

[0009] Последовательность полипептидного сегмента 3, полученного из AAV9:

[0010] AGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLPEP
(SEQ ID NO: 415).

[0011] Последовательность полипептидного сегмента 3, полученного из AAV5:

[0012] AGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGNLGKAVFQAKKRVLEP (SEQ ID NO: 416).

[0013] Последовательность полипептидного сегмента 4, полученного из AAV9:

[0014] LGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFG QTGDTEVPDPQPIGEPAAAPSGVGSMTMASGGGAPVA (SEQ ID NO: 417).

[0015] Последовательность полипептидного сегмента 4, полученного из AAV5:

[0016] FGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG SQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLG (SEQ ID NO: 418).

[0017] Последовательность полипептидного сегмента 5, полученного из AAV9:

[0018] DNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHL
YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRP
KRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCL
PPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFEN
VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAV
QGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMAS
HKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTgrdnvDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATN
HQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLGPIWAKIPHTDGNFHPSPLM
GGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKEN
SKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID
NO: 419).

[0019] Последовательность полипептидного сегмента 5, полученного из AAV9, с мутацией Q688K:

[0020] DNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHL
YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRP
KRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCL

PPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFEN
 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYL YYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAV
 QGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMAS
 HKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTgrdnvDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATN
 HQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLGPIWAKIPHTDGNFHPSPML
 GGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELKKEN
 SKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID
 NO: 420).

[0078] В некоторых вариантах осуществления химерный капсидный белок содержит полипептидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную одной из SEQ ID NO: 421–444, или ее функциональный фрагмент, по сути состоит или состоит из нее.

Таблица 2. Последовательности капсидного белка

Название/альтернативное название	SEQ ID NO:
ZC23	421
ZC24	422
ZC25	423
ZC26	424
ZC27	425
ZC28	426
ZC29	427
ZC30	428
ZC31	429
ZC32	430
ZC33	431
ZC34	432
ZC35	433
ZC40/TN8	434
ZC41	435
ZC42	436
ZC43	437
ZC44/TN10	438

ZC45	439
ZC46	440
ZC47/TN14	441
ZC48	442
ZC49	443
ZC50	444

Комбинированный капсидный белок

[0079] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены комбинированные капсидные белки. Используемый в данном документе «комбинированный капсидный белок» относится к химерному капсидному белку AAV5/AAV9, описанному в настоящем изобретении, который дополнительно содержит аминокислотные видоизменения относительно исходной химерной последовательности в одном или более сайтах. В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов исходной химерной последовательности выбраны из тех, которые эквивалентны сайту VR-IV, сайту VR-V, сайту VR-VII и сайту VR-VIII капсидного белка AAV9.

[0080] Комбинированные капсидные белки по настоящему изобретению включают любые варианты полипептидной последовательности, идентифицированные, как показано без ограничения в разделе «Примеры». Без ограничения каким-либо конкретным примером, в некоторых вариантах осуществления комбинированный капсидный белок содержит остов химерного капсидного белка AAV5/AAV9 и дополнительно содержит вариант полипептидной последовательности в одном или более сайтах, выбранных из группы, состоящей из тех, которые эквивалентны сайту VR-IV, сайту VR-V, сайту VR-VII и сайту VR-VIII капсидного белка AAV9, описанного в данном документе.

[0081] В некоторых вариантах осуществления комбинированный капсидный белок содержит в порядке от N-конца к C-концу: первый полипептидный сегмент, имеющий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 411 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 412; второй полипептидный сегмент, имеющий

последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 413 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 414; третий полипептидный сегмент, имеющий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 415 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 416; четвертый полипептидный сегмент, имеющий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 417 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 418; и пятый полипептид сегмент, имеющий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 419 или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную SEQ ID NO: 420 (в данном случае области, эквивалентные сайту VR-IV, сайту VR-V, сайту VR-VII и сайту VR-VIII капсидного белка AAV9, исключены из расчета идентичности последовательности пятого полипептидного сегмента). В некоторых вариантах осуществления комбинированный капсидный белок содержит вариант полипептидной последовательности в одном или более из сайта VR-IV, сайта VR-V, сайта VR-VII и сайта VR-VIII исходной последовательности, где исходная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 463. (В SEQ ID NO:463 аминокислотные остатки, помеченные «X», исключены из расчета идентичности последовательности.)

[0082] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полипептидный сегмент получен из капсидного белка AAV5, и по меньшей мере один полипептидный сегмент получен из капсидного белка AAV9.

[0083] В некоторых вариантах осуществления комбинированный капсидный белок дополнительно содержит вариант полипептидной последовательности в

одном или более сайтах, выбранных из тех, которые эквивалентны сайту VR-IV, сайту VR-V, сайту VR-VII и сайту VR-VIII капсидного белка AAV9.

[0084] В некоторых вариантах осуществления комбинированный капсидный белок содержит вариант полипептидной последовательности в сайте, эквивалентном сайту VR-IV капсидного белка AAV9, которая содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте, эквивалентном сайту VR-IV капсидного белка AAV9, содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен относительно GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6), по сути состоит или состоит из нее.

[0085] В некоторых вариантах осуществления комбинированный капсидный белок содержит вариант полипептидной последовательности в сайте, эквивалентном сайту VR-V капсидного белка AAV9, которая содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную LNSMLI (SEQ ID NO: 105), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте, эквивалентном сайту VR-V капсидного белка AAV9, содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен относительно LNSMLI (SEQ ID NO: 105), по сути состоит или состоит из нее.

[0086] В некоторых вариантах осуществления комбинированный капсидный белок содержит вариант полипептидной последовательности в сайте, эквивалентном сайту VR-VIII капсидного белка AAV9, которая содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентичную ANYG (SEQ ID NO: 305) или NVSY (SEQ ID NO: 303), по сути состоит или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептидной последовательности в сайте, эквивалентном сайту VR-VIII капсидного белка AAV9, содержит последовательность, включающую не более 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен относительно ANYG (SEQ ID NO: 305) или NVSY (SEQ ID NO: 303), по сути состоит или состоит из нее.

[0087] В некоторых вариантах осуществления остаток в положении, эквивалентном Q688 последовательности капсидного белка AAV9 (SEQ ID NO: 1), представляет собой лизин (K) в комбинированном капсидном белке.

[0088] В некоторых вариантах осуществления комбинированный капсидный белок содержит полипептидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% идентичную одной из SEQ ID NO: 445–462, или ее функциональный фрагмент, по сути состоит или состоит из нее.

Таблица 3. Последовательности капсидного белка

Название/альтернативное название	SEQ ID NO:
TN47-07	445
TN47-10/TN12	446
TN47-13	447
TN47-14	448
TN47-17	449
TN47-22	450
TN40-07	451
TN40-10	452
TN40-13	453
TN40-14	454
TN40-17	455
TN40-22	456
TN44-07/TN13	457
TN44-10	458
TN44-13	459
TN44-14	460
TN44-17	461
TN44-22	462

Дополнительные мутации

[0089] Например, могут быть включены дополнительные аминокислотные замены для дополнительного улучшения эффективности трансдукции или тканевой

селективности. Иллюстративные неограничивающие замены включают без ограничения S651A, T578A или T582A относительно последовательности AAV5 в капсиде на основе либо AAV5, либо AAV9.

[0090] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит мутацию, выбранную из S651A, T578A, T582A, K251R, Y709F, Y693F или S485A, относительно последовательности AAV5 в капсиде на основе либо AAV5, либо AAV9. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок содержит мутацию, выбранную из K251R, Y709F, Y693F или S485A, относительно последовательности AAV5 в капсиде на основе либо AAV5, либо AAV9.

Эффективность трансдукции, тропизм и уклонение от NAb

[0091] Эффективность трансдукции можно определить с применением способов, известных из уровня техники или описанных в разделе «Примеры». В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV со сконструированным капсидным белком демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в клетках сердца по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность.

[0092] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в клетках, представляющих собой сердечные фибробласты человека (hCF), по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления сердечные фибробласты человека расположены в левом желудочке сердца.

[0093] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках hCF при множественности инфицирования (MOI), составляющей 100000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 2- до приблизительно 16-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 14-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 12-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 10-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 8-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 6-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 4-кратное или от приблизительно 2 до приблизительно 3-кратное

повышение эффективности трансдукции в клетках hCF при множественности инфицирования (MOI), составляющей 100000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6, 7-, 8-, 9-, 10, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках hCF при множественности инфицирования (MOI), составляющей 100000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 20% до 30%, от приблизительно 30% до 40%, от приблизительно 40% до 50%, от приблизительно 50% до 80%, от приблизительно 80% до 100%, от приблизительно 100% до 125%, от приблизительно 125% до 150%, от приблизительно 150% до 175% или от приблизительно 175% до 200% повышение эффективности трансдукции в клетках hCF при множественности инфицирования (MOI), составляющей 100000.

[0094] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках hCF при множественности инфицирования (MOI), составляющей 1000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 2- до приблизительно 16-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 14-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 12-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 10-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 8-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 6-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 4-кратное или от приблизительно 2 до приблизительно 3-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках hCF при множественности инфицирования (MOI), составляющей 1000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 20% до 30%, от приблизительно 30% до 40%, от приблизительно 40% до 50%, от приблизительно 50% до 80%, от приблизительно 80% до 100%, от приблизительно 100% до 125%, от приблизительно 125% до 150%, от приблизительно 150% до 175% или от приблизительно 175% до 200% повышение эффективности трансдукции в клетках hCF при множественности инфицирования (MOI), составляющей 1000.

[0095] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в кардиомиоцитах, полученных из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPS-CM), по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность.

[0096] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-CM при множественности инфицирования (MOI), составляющей 100000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 2- до приблизительно 16-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 14-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 12-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 10-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 8-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 6-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 4-кратное или от приблизительно 2 до приблизительно 3-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-CM при множественности инфицирования (MOI), составляющей 100000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 20% до 30%, от приблизительно 30% до 40%, от приблизительно 40% до 50%, от приблизительно 50% до 80%, от приблизительно 80% до 100%, от приблизительно 100% до 125%, от приблизительно 125% до 150%, от приблизительно 150% до 175% или от приблизительно 175% до 200% повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-CM при множественности инфицирования (MOI), составляющей 100000.

[0097] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-CM при множественности инфицирования (MOI), составляющей 75000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 2- до приблизительно 16-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 14-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 12-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 10-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 8-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 6-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 4-кратное или

от приблизительно 2 до приблизительно 3-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-СМ при множественности инфицирования (МОИ), составляющей 75000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 20% до 30%, от приблизительно 30% до 40%, от приблизительно 40% до 50%, от приблизительно 50% до 80%, от приблизительно 80% до 100%, от приблизительно 100% до 125%, от приблизительно 125% до 150%, от приблизительно 150% до 175% или от приблизительно 175% до 200% повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-СМ при множественности инфицирования (МОИ), составляющей 75000.

[0098] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-СМ при множественности инфицирования (МОИ), составляющей 1000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 2- до приблизительно 16-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 14-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 12-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 10-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 8-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 6-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 4-кратное или от приблизительно 2 до приблизительно 3-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-СМ при множественности инфицирования (МОИ), составляющей 1000. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 20% до 30%, от приблизительно 30% до 40%, от приблизительно 40% до 50%, от приблизительно 50% до 80%, от приблизительно 80% до 100%, от приблизительно 100% до 125%, от приблизительно 125% до 150%, от приблизительно 150% до 175% или от приблизительно 175% до 200% повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-СМ при множественности инфицирования (МОИ), составляющей 1 000.

[0099] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок по настоящему изобретению, демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в сердце по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления

эффективность трансдукции в сердце отслеживают посредством инъекции мышам C57BL/6J либо AAV9:CAG-GFP, либо CAG-GFP, инкапсулированных в сконструированный капсидный белок по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления доза инъекции составляет $2,5E+11$ vg/мышь. В некоторых вариантах осуществления доза инъекции составляет $2E+11$ vg/мышь. В некоторых вариантах осуществления доза инъекции составляет $1E+11$ vg/мышь. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное повышение эффективности трансдукции в сердце. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 2- до приблизительно 16-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 14-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 12-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 10-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 8-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 6-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 4-кратное или от приблизительно 2 до приблизительно 3-кратное повышение эффективности трансдукции в сердце. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 20% до 30%, от приблизительно 30% до 40%, от приблизительно 40% до 50%, от приблизительно 50% до 80%, от приблизительно 80% до 100%, от приблизительно 100% до 125%, от приблизительно 125% до 150%, от приблизительно 150% до 175% или от приблизительно 175% до 200% повышение эффективности трансдукции в сердце.

[0100] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок по настоящему изобретению, демонстрирует сниженную эффективность трансдукции в клетках печени по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления эффективность трансдукции в печени отслеживают посредством инъекции мышам C57BL/6J либо AAV9:CAG-GFP, либо CAG-GFP, инкапсулированных в сконструированный капсидный белок по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления доза инъекции составляет $2,5E+11$ vg/мышь. В некоторых вариантах осуществления доза инъекции составляет $2E+11$ vg/мышь. В некоторых вариантах осуществления доза инъекции составляет $1E+11$ vg/мышь. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV

демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное снижение эффективности трансдукции в печени. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 2- до приблизительно 16-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 14-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 12-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 10-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 8-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 6-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 4-кратное или от приблизительно 2 до приблизительно 3-кратное снижение эффективности трансдукции в печени. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV демонстрирует от приблизительно 20% до 30%, от приблизительно 30% до 40%, от приблизительно 40% до 50%, от приблизительно 50% до 80% или от приблизительно 80% до 100% снижение эффективности трансдукции в печени.

[0101] Селективность в отношении типа клеток и/или типа тканей/органов повышается, если соотношение показателей эффективности трансдукции для одного типа клеток/тканей/органов по сравнению с другим повышается для вирионов гAAV, содержащих сконструированный капсидный белок по настоящему изобретению, по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок, демонстрирует повышенную селективность в отношении клеток iPS-СМ по сравнению с клетками печени. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок, демонстрирует повышенную селективность в отношении сердца по сравнению с печенью при инъекции *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок, демонстрирует повышенную селективность в отношении левого желудочка сердца по сравнению с печенью при инъекции *in vivo*.

[0102] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок, демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное повышение селективности в отношении клеток iPS-СМ по сравнению с клетками печени и/или в отношении

сердца по сравнению с печенью. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок, демонстрирует от приблизительно 2- до приблизительно 16-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 14-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 12-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 10-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 8-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 6-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 4-кратное или от приблизительно 2- до приблизительно 3-кратное повышение селективности в отношении клеток iPS-СМ по сравнению с клетками печени и/или в отношении сердца по сравнению с печенью. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок, демонстрирует от приблизительно 20% до 30%, от приблизительно 30% до 40%, от приблизительно 40% до 50%, от приблизительно 50% до 80%, от приблизительно 80% до 100%, от приблизительно 100% до 125%, от приблизительно 125% до 150%, от приблизительно 150% до 175% или от приблизительно 175% до 200% повышение селективности в отношении клеток iPS-СМ по сравнению с клетками печени и/или в отношении сердца по сравнению с печенью.

[0103] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок по настоящему изобретению, демонстрирует улучшенную способность уклоняться от человеческих NAb (нейтрализующих антител) по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность. В некоторых вариантах осуществления способность уклоняться от человеческих NAb измеряют путем анализа ингибирования с помощью NAb. Неограничивающие примеры анализов ингибирования с помощью NAb описаны в разделе «Примеры» настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления анализы ингибирования с помощью NAb выполняют посредством инкубирования вирионов AAV с объединенными человеческими NAb (например, IgG) перед обработкой клетки-мишени при заранее определенной MOI и измерения снижения эффективности трансдукции по сравнению с вирионами AAV, не инкубированными с объединенными человеческими NAb. Более низкое ингибирование с помощью NAb указывает на улучшенную способность вириона AAV уклоняться от человеческих NAb. В некоторых вариантах осуществления

вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок, демонстрирует по меньшей мере 2-, 3-, 4-, 5-, 6, 7-, 8-, 9-, 10, 11-, 12-, 13-, 14- или 15-кратное улучшение способности уклоняться от человеческих NAb. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок, демонстрирует от приблизительно 2- до приблизительно 16-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 14-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 12-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 10-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 8-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 6-кратное, от приблизительно 2- до приблизительно 4-кратное или от приблизительно 2- до приблизительно 3-кратное улучшение способности уклоняться от человеческих NAb. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV, содержащий сконструированный капсидный белок, демонстрирует от приблизительно 20% до 30%, от приблизительно 30% до 40%, от приблизительно 40% до 50%, от приблизительно 50% до 80%, от приблизительно 80% до 100%, от приблизительно 100% до 125%, от приблизительно 125% до 150%, от приблизительно 150% до 175% или от приблизительно 175% до 200% улучшение способности уклоняться от человеческих NAb.

[0104] Полинуклеотид, кодирующий капсидный белок, может содержать последовательность, содержащую либо нативные кодоны гена *cap* дикого типа, либо альтернативные кодоны, выбранные таким образом, чтобы они кодировали тот же белок. Частоту использования кодонов во вставки можно изменять. Выбор подходящих нуклеотидных последовательностей и получение альтернативных нуклеотидных последовательностей для кодирования любого капсидного белка по настоящему изобретению находятся в пределах компетентности специалистов в данной области. Обратную трансляцию белковой последовательности можно выполнять с применением таблицы частоты использования кодонов для организма-хозяина, т. е. частоты использования эукариотических кодонов для человека.

[0105] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полинуклеотид, кодирующий капсидный белок, полученный из AAV9, содержащий последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 402–410 и 464–468.

[0106] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полинуклеотид, кодирующий химерный капсидный белок AAV5/AAV9, содержащий последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 421–444.

[0107] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает полинуклеотид, кодирующий комбинированный капсидный белок, содержащий последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 445–462.

[0108] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает капсидный белок AAV9, химерный капсидный белок AAV5/AAV9 или комбинированный капсидный белок, содержащие последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичную модифицированному капсиду, выбранному из SEQ ID NO: 402–410, 421–462, 464–468, где допускаются аминокислотные замены, необязательно консервативные замены, с указанным процентным уровнем идентичности.

Продукт гена

[0109] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV по настоящему изобретению содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует один или более продуктов гена, выбранных из MYBPC3, KCNH2, TRPM4, DSG2, ATP2A2, CACNA1C, DMD, DMPK, EPG5, EVC, EVC2, FBN1, NF1, SCN5A, SOS1, NPR1, ERBB4, VIP, MYH7, или ее мутантную форму, вариант или фрагмент.

[0110] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV по настоящему изобретению содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует один или более продуктов гена, выбранных из ASCL1, MYOCD, MEF2C и TBX5. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV по настоящему изобретению содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует один или более продуктов гена, выбранных из ASCL1, MYOCD, MEF2C и TBX5, CCNB1, CCND1, CDK1, CDK4, AURKB, OCT4, BAF60C, ESRRG, GATA4,

GATA6, HAND2, IRX4, ISLL, MESP1, MESP2, NKX2.5, SRF, TBX20, ZFPM2 и MIR-133.

[0111] В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV по настоящему изобретению содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует один или более продуктов гена, выбранных из MYBPC3, DWORF, KCNH2, TRPM4, DSG2, PKP2 и ATP2A2.

[0112] В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV по настоящему изобретению содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует один или более продуктов гена, выбранных из CACNA1C, DMD, DMPK, EPG5, EVC, EVC2, FBN1, NF1, SCN5A, SOS1, NPR1, ERBB4, VIP, MYH7 и Cas9.

[0113] В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV по настоящему изобретению содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует один или более продуктов гена, выбранных из MYOCD, ASCL1, GATA4, MEF2C, TBX5, miR-133 и MESP1.

Определения

[0114] Если в контексте не указано иное, признаки настоящего изобретения могут применяться в любой комбинации. Любой изложенный признак или комбинация признаков могут быть исключены или опущены. Определенные признаки настоящего изобретения, которые описаны в отдельных вариантах осуществления, также могут предусматриваться в комбинации в одном варианте осуществления. Признаки настоящего изобретения, которые описаны в одном варианте осуществления, также могут предусматриваться по отдельности или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления раскрыты в данном документе таким образом, как если бы все без исключения комбинации были раскрыты по отдельности. Все подкомбинации вариантов осуществления и элементов раскрыты в данном документе таким образом, как если бы каждая из таких подкомбинаций была раскрыта по отдельности.

[0115] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, какое в общепринятом

смысле является понятным специалисту средней квалификации в области, к которой относится настоящее изобретение. Подробное описание разделено на разделы лишь для удобства читателя, и раскрытие, находящееся в любом разделе, можно комбинировать с таковым из другого раздела. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, также могут применяться при осуществлении на практике или тестировании настоящего изобретения, сейчас описываются иллюстративные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются указанные публикации. Ссылка на публикацию не является признанием того, что публикация представляет собой предшествующий уровень техники.

[0116] Формы единственного числа включают соответствующие формы множественного числа, если в контексте явно не требуется иное. Например, ссылка на «вирион рекомбинантного AAV» включает совокупность таких вирионов, а ссылка на «клетку сердца» включает одну или более клеток сердца.

[0117] Союз «и/или» означает как «и», так и «или», и перечни, связанные с помощью «и/или», охватывают все возможные комбинации одного или более из перечисленных объектов.

[0118] Термин «вектор» относится к макромолекуле или комплексу молекул, содержащих полинуклеотид или белок, подлежащие доставке в клетку.

[0119] «AAV» представляет собой сокращение для обозначения аденоассоциированного вируса. Термин охватывает все подтипы AAV, за исключением случаев, когда подтип указан, и как формы, встречающиеся в природе, так и рекомбинантные формы. Сокращение «гAAV» относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу. «AAV» включает AAV или любой его подтип. «AAV5» относится к AAV подтипа 5. «AAV9» относится к AAV подтипа 9. Геномные последовательности различных серотипов AAV, а также последовательности нативных инвертированных концевых повторов (ITR), белков Rep и субъединиц капсида можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. См., например, номера доступа в GenBank NC_002077 (AAV1), AF063497 (AAV1), NC_001401 (AAV2), AF043303 (AAV2), NC_001729

(AAV3), NC_001829 (AAV4), U89790 (AAV4), NC_006152 (AAV5), AF513851 (AAV7), AF513852 (AAV8), NC_006261 (AAV8) и AY530579 (AAV9). Публикации, описывающие AAV, включают Srivistava et al. (1983) *J. Virol.* 45:555; Chiorini et al. (1998) *J. Virol.* 71:6823; Chiorini et al. (1999) *J. Virol.* 73:1309; Bantel-Schaal et al. (1999) *J. Virol.* 73:939; Xiao et al. (1999) *J. Virol.* 73:3994; Muramatsu et al. (1996) *Virol.* 221:208; Shade et al. (1986) *J. Virol.* 58:921; Gao et al. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 11854; Moris et al. (2004) *Virology* 33:375-383; публикации международных заявок на патент №№ WO2018/222503A1, WO2012/145601A2, WO2000/028061A2, WO1999/61601A2 и WO1998/11244A2; заявки на патент США №№ 15/782980 и 15/433322 и патенты США №№ 10036016, 9790472, 9737618, 9434928, 9233131, 8906675, 7790449, 7906111, 7718424, 7259151, 7198951, 7105345, 6962815, 6984517 и 6156303.

[0120] «Вектор на основе AAV» или «вектор на основе гAAV» используются в данной области техники для обозначения либо ДНК, упакованной в вирион гAAV, либо самого вириона гAAV, в зависимости от контекста. Как используется в данном документе, если из контекста явно не следует иное, вектор на основе гAAV относится к нуклеиновой кислоте (как правило, плазмиде), содержащей полинуклеотидную последовательность, поддающуюся запаковке в вирион гAAV, но с капсидом или другими белками вириона гAAV. В целом, вектор на основе гAAV содержит гетерологичную полинуклеотидную последовательность (т. е. полинуклеотид, происходящий не из AAV) и одну или две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV, фланкирующие гетерологичную полинуклеотидную последовательность. В гAAV может быть запакована только одна из двух ITR, и, тем не менее, инфекционность полученного вириона гAAV может сохраняться. См. Wu et al. (2010) *Mol Ther.* 18:80. Вектор на основе гAAV может быть разработан для получения либо в виде односторонней (ssAAV), либо в виде самокомплементарной (scAAV) формы. См. McCarty D. (2008) *Mo. Ther.* 16:1648-1656; WO2001/11034; WO2001/92551; WO2010/129021.

[0121] «Вирион гAAV» относится к внеклеточной вирусной частице, включающей по меньшей мере один вирусный капсидный белок (например, VP1), и

заклученному в капсид вектору на основе гAAV (или его фрагменту), включающему капсидные белки.

[0122] Для краткости и ясности в настоящем изобретении упомянуты «капсидный белок» или «капсидные белки». Специалистам в данной области понятно, что такие упоминания относятся к VP1, VP2 или VP3 или к комбинациям VP1, VP2 и VP3. Так как в AAV дикого типа и большинстве рекомбинантных систем экспрессии VP1, VP2 и VP3 экспрессируются с одной и той же открытой рамки считывания, при этом конструирование последовательности, которая кодирует VP3, неизбежно изменяет последовательности С-концевого домена VP1 и VP2. Могут также экспрессироваться капсидные белки с других открытых рамок считывания, в таком случае капсид полученного вириона гAAV может содержать смесь капсидных белков дикого типа и сконструированных капсидных белков, а также смеси разных сконструированных капсидных белков.

[0123] Термин «инвертированные концевые повторы» или «ITR», используемый в данном документе, относится к цис-элементам вируса AAV, названным так по причине их симметрии. Данные элементы имеют большое значение для эффективного размножения генома AAV. Не ограничиваясь теорией, считается, что минимальным набором элементов, незаменимым для функции ITR, является Rep-связывающий сайт и сайт концевого разрешения с вариабельной палиндромной последовательностью, обеспечивающей возможность образования шпильки. В настоящем изобретении подразумевается, что могут существовать альтернативные способы получения генома AAV или они могут быть разработаны в будущем таким образом, чтобы они были совместимы с капсидными белками по настоящему изобретению.

[0124] «Функциональные элементы вируса-помощника» относятся к функциональным элементам, кодируемым в геноме вируса-помощника, которые обеспечивают возможность репликации и упаковки AAV.

[0125] «Упаковка» относится к серии внутриклеточных явлений, которые приводят к сборке вириона гAAV, включая заключение вектора на основе гAAV в капсид. Гены «*rep*» и «*cap*» AAV относятся к полинуклеотидным последовательностям, кодирующим аденоассоциированного вируса, ответственные

за репликацию и заключение в капсид. *rep* и *cap* AAV упоминаются в данном документе как «пакующие гены» AAV. Для осуществления упаковки требуется либо сам вирус-помощник, либо, более часто в рекомбинантных системах, функциональный элемент вируса-помощника, поставляемый системой без помощника (т. е. одной или более плазмидами-помощниками).

[0126] «Вирус-помощник» для AAV относится к вирусу, который обеспечивает возможность для репликации и упаковки AAV (*например*, AAV дикого типа) в клетке млекопитающего. Вирусы-помощники могут представлять собой аденовирус, вирус герпеса или вирус оспы, такой как вирус осповакцины.

[0127] «Инфекционный» вирион или вирусная частица представляют собой таковые, которые содержат компетентным образом собранный вирусный капсид и способны осуществлять доставку полинуклеотидного компонента в клетку, в отношении которой вирион обладает тропизмом. Термин необязательно подразумевает какую-либо репликационную способность вируса.

[0128] «Инфекционность» относится к мере способности вириона инфицировать клетку. Инфекционность может выражаться в виде отношения количества инфекционных вирусных частиц к общему количеству вирусных частиц. Инфекционность в целом определяется применительно к конкретному типу клеток. Ее можно измерять как *in vivo*, так и *in vitro*. Способы определения отношения количества инфекционных вирусных частиц к общему количеству вирусных частиц известны из уровня техники. См., например, Grainger et al. (2005) *Mol. Ther.* 11:S337 (в которой описывается анализ инфекционного титра TCID₅₀); и Zolotukhin et al. (1999) *Gene Ther.* 6:973.

[0129] Термины «исходный капсид» или «исходная последовательность» относятся к эталонной последовательности, из которой получен капсид или последовательность частицы. Если не указано иное, исходная последовательность относится к последовательности капсидного белка дикого типа того же серотипа, к которому относится сконструированный капсидный белок.

[0130] Репликационно-компетентный вирус (*например*, репликационно-компетентный AAV) относится к вирусу, который является инфекционным и также способен реплицироваться в инфицированной клетке (т. е. в присутствии вируса-

помощника или функциональных элементов вируса-помощника). В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV по настоящему изобретению содержит геном, в котором отсутствует ген *rep* или оба из генов *rep* и *cap*, и, следовательно, он является репликационно-некомпетентным.

[0131] В практическом осуществлении настоящего изобретения, если не указано иное, будут использоваться традиционные методики культивирования ткани, иммунологии, молекулярной биологии, клеточной биологии и рекомбинантной ДНК, которые находятся в пределах компетентности специалиста в данной области. См., например, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; патент США № 4683195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; IRL Press (1986) *Immobilized Cells and Enzymes*; Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd edition (2002) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sohail (2004) *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application* (CRC Press); и Sell (2013) *Stem Cells Handbook*.

[0132] Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме любой длины из нуклеотидов, или дезоксирибонуклеотидов, или рибонуклеотидов, или их аналогов. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают линейные и кольцевые нуклеиновые кислоты, матричную РНК (мРНК), кДНК, рекомбинантные

полинуклеотиды, векторы, зонды и праймеры. Если не указано или не требуется иное, любой вариант осуществления настоящего изобретения, описанный в данном документе, который представляет собой полинуклеотид, охватывает как двухнитевую форму, так и каждую из двух комплементарных одонитевых форм, известных как образующие или прогнозируемо образующих двухнитевую форму.

[0133] Термины «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме любой длины из аминокислот, которые могут включать кодируемые генетическим кодом аминокислоты и аминокислоты, не кодируемые генетическим кодом, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты, а также полипептиды, имеющие модифицированные пептидные остовы. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован; например, за счет образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, фосфорилирования или конъюгации с метящим компонентом.

[0134] Термин «пептид» относится к короткому полипептиду, например, пептиду, имеющему от приблизительно 4 до 30 аминокислотных остатков.

[0135] Термин «выделенный» означает отделенный от составляющих, клеточных и иных, с которыми вирион, клетка, ткань, полинуклеотид, пептид, полипептид или белок в норме связаны в природе. Например, выделенная клетка представляет собой клетку, которая отделена от ткани или клеток несхожего фенотипа или генотипа.

[0136] Используемая в данном документе «идентичность последовательности» или «идентичность» относится к процентной доле аминокислот, которые являются идентичными между представляющей интерес последовательностью и эталонной последовательностью. В целом, идентичность определяют посредством выравнивания представляющей интерес последовательности с эталонной последовательностью, при этом определяют число аминокислот, которые являются идентичными между выравниваемыми последовательностями, делят данное число на общее число аминокислот в эталонной последовательности и умножают результат на 100 с получением процентной доли. Последовательности можно выравнивать с применением

различных компьютерных программ, таких как BLAST, доступных по адресу ncbi.nlm.nih.gov. Другие методики для выравнивания описаны в *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996); и *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997); *J. Mol. Biol.* 48: 44. Специалисты в данной области способны выбрать подходящий способ выравнивания в зависимости от различных факторов, включая длину последовательности, дивергенцию, а также наличие отсутствия вставок или делеций относительно эталонной последовательности.

[0137] Термин «рекомбинантный» применительно к полинуклеотиду означает, что полинуклеотид является продуктом различных комбинаций стадий клонирования, рестрикции или лигирования, а также других процедур, которые приводят к получению конструкции, которая отличается от полинуклеотида, встречающегося в природе, или что полинуклеотид собран из синтетических олигонуклеотидов. «Рекомбинантный» белок представляет собой белок, полученный с помощью рекомбинантного полипептида. Рекомбинантный вирион представляет собой вирион, который содержит рекомбинантный полинуклеотид и/или рекомбинантный белок, например, рекомбинантный капсидный белок.

[0138] «Ген» относится к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере одну открытую рамку считывания, который способен кодировать конкретный белок после его транскрипции и трансляции. «Продукт гена» представляет собой молекулу, полученную в результате экспрессии конкретного гена. Продукты гена могут включать без ограничения полипептид, белок, аптамер, интерферирующую РНК или мРНК. Системы редактирования гена (например, систему CRISPR/Cas) могут описываться как один продукт гена или как несколько продуктов гена, требуемых для получения системы (например, белок Cas и направляющая РНК).

[0139] «Короткая шпилечная РНК» или shRNA представляет собой полинуклеотидную конструкцию, применяемую для экспрессии siRNA.

[0140] «Контрольный элемент» или «контрольная последовательность» представляют собой нуклеотидную последовательность, участвующую во взаимодействии молекул, которая вносит вклад в функциональную регуляцию полинуклеотида, включая репликацию, дубликацию, транскрипцию, сплайсинг,

трансляцию или расщепление полинуклеотида. Регуляция может воздействовать на частоту, скорость или специфичность процесса и по своей природе может быть стимулирующей или ингибирующей. Контрольные элементы включают последовательности, регулирующие транскрипцию, такие как промоторы и/или энхансеры.

[0141] «Промотор» представляет собой последовательность ДНК, способную при определенных условиях связываться с РНК-полимеразой и инициировать транскрипцию кодирующей области, обычно располагающейся ниже (в направлении 3') промотора. Термин «тканеспецифический промотор», используемый в данном документе, относится к промотору, который является функциональным в клетках конкретного органа или ткани, таких как ткань сердца.

[0142] «Операционно связанный» или «функционально связанный» относится к смежному расположению генетических элементов, где элементы находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать ожидаемым для них образом. Например, промотор операционно связан с кодирующей областью, если промотор помогает инициировать транскрипцию кодирующей последовательности. Между промотором и кодирующей областью могут находиться промежуточные остатки при условии, что данная функциональная взаимосвязь сохраняется.

[0143] «Вектор экспрессии» представляет собой вектор, содержащий кодирующую последовательность, которая кодирует представляющий интерес продукт гена, применяемый для осуществления экспрессии продукта гена в клетках-мишенях. Вектор экспрессии содержит контрольные элементы, операционно связанные с кодирующей последовательностью таким образом, чтобы облегчать экспрессию продукта гена.

[0144] Термин «кассета экспрессии» относится к гетерологичному полинуклеотиду, содержащему кодирующую последовательность, которая кодирует представляющий интерес продукт гена, применяемому для осуществления экспрессии продукта гена в клетках-мишенях. Если не указано иное, кассета экспрессии вектора на основе AAV включает полинуклеотиды между (и не включающие) ITR.

[0145] Термин «доставка гена» или «перенос гена», используемый в данном документе, относится к способам или системам для надежной вставки чужеродных последовательностей нуклеиновых кислот, например, ДНК, в клетки-хозяева. Такие способы могут приводить к временной экспрессии неинтегрированной перенесенной ДНК, внехромосомной репликации и экспрессии перенесенных репликаонов (например, эписом) или интеграции перенесенного генетического материала в геномную ДНК клеток-хозяев.

[0146] «Гетерологичный» означает полученный из объекта, генотипически отличного от остальной части объекта, с которыми его сравнивают. Например, полинуклеотид, введенный посредством методик генной инженерии в плазмиду или вектор, полученный от другого вида, представляет собой гетерологичный полинуклеотид. Промотор, удаленный из его нативной кодирующей последовательности и операционно связанный с кодирующей последовательностью, с которой он не связан в природе, представляет собой гетерологичный промотор. Таким образом, например, гAAV, который включает гетерологичную нуклеиновую кислоту, представляет собой гAAV, который включает нуклеиновую кислоту, в норме не включенную в AAV, встречающийся в природе.

[0147] Термины «генетическое изменение» и «генетическая модификация» (и их грамматические варианты) используются в данном документе взаимозаменяемо для упоминания процесса, при котором генетический элемент (например, полинуклеотид) вводится в клетку способом, отличным от митоза или мейоза. Элемент может быть гетерологичным по отношению к клетке или он может быть дополнительной копией или улучшенным вариантом элемента, уже присутствующего в клетке. Генетическое изменение может осуществляться, например, путем трансфекции клетки с помощью рекомбинантной плазмиды или другого полинуклеотида посредством любого процесса, известного из уровня техники, такого как электропорация, осаждение фосфатом кальция или приведение в контакт с комплексом полинуклеотид-липосома. Генетическое изменение может также осуществляться, например, посредством трансдукции или инфицирования с помощью вектора.

[0148] Клетку называют «стабильно» измененной, трансдуцированной, генетически модифицированной или трансформированной с помощью полинуклеотидной последовательности, если последовательность доступна для осуществления своей функции во время длительного культивирования клетки *in vitro*. В целом, такая клетка является «наследственно» измененной (генетически модифицированной) по той причине, что вводится генетическое изменение, которое также передается по наследству потомству измененной клетки.

[0149] Термин «трансфекция», используемый в данном документе, относится к поглощению молекулы экзогенной нуклеиновой кислоты клеткой. Клетка была подвергнута «трансфекции», если экзогенная нуклеиновая кислота была введена во внутреннее пространство, окруженное клеточной мембраной. Ряд методик трансфекции общеизвестен из уровня техники. См., например, Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, and Chu et al. (1981) *Gene* 13:197. Такие методики можно применять для введения одной или более молекул экзогенной нуклеиновой кислоты в подходящие клетки-хозяева.

[0150] Термин «трансдукция», используемый в данном документе, относится к переносу экзогенной нуклеиновой кислоты в клетку с помощью рекомбинантного вириона, в отличие от «инфицирования» вирионом дикого типа. Если инфицирование применяется в отношении рекомбинантного вириона, термины «трансдукция» и «инфекционный» являются синонимами, и, следовательно, «инфекционность» и «эффективность трансдукции» являются эквивалентными и могут определяться с применением аналогичных способов.

[0151] Если не указано иное, вся медицинская терминология подразумевает обычное значение термина, применяемое специалистом в области медицины, как, например, в справочнике *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15 изд., который включен посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей, в частности, главы, посвященные сердечным или сердечно-сосудистым заболеваниям, нарушениям, состояниям и нарушениям функции.

[0152] Термины «лечение», «осуществление лечения» и «лечить» определяются как осуществление действия в отношении заболевания, нарушения или состояния с помощью средства, чтобы привести к снижению или облегчению вредных или любых других нежелательных эффектов заболевания, нарушения или состояния и/или их симптомов.

[0153] Термины «введение», «осуществление введения» и т. п., при их применении в связи с композицией по настоящему изобретению, относятся и к непосредственному введению (введение субъекту специалистом в области медицины или посредством самостоятельного введения субъектом), и/или к опосредованному введению (назначение композиции пациенту). Как правило, вводится эффективное количество, при этом количество может быть определено специалистом в данной области. Может применяться любой способ введения. Введение субъекту может обеспечиваться путем, например, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, внутрисосудистой или интрамиокардиальной доставки.

[0154] Используемый в данном документе термин «эффективное количество» и т. п. применительно к количеству композиции относится к количеству, которое является достаточным для индуцирования требуемого физиологического последствия (например, перепрограммирования клетки или лечения заболевания). Эффективное количество можно вводить в виде одного или более введений, применений или доз. Такая доставка зависит от ряда переменных, включая промежуток времени, в течение которого отдельная единица дозирования будет применяться, биологическую доступность композиции, путь введения и т. д. Понятно, однако, что конкретные количества композиций (например, вирионов rAAV) для любого конкретного субъекта зависят от различных факторов, включая активность конкретного используемого средства, возраст, вес тела, общее состояние здоровья, пол и рацион питания субъекта, время введения, скорость выведения, комбинацию композиции, степень тяжести конкретного заболевания, подлежащего лечению, и форму введения.

[0155] Термины «индивидуум», «субъект» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к млекопитающему, включая без

ограничения человека и отличных от человека приматов (например, обезьян); спортивных животных, относящихся к млекопитающим (например, лошадей); сельскохозяйственных животных, относящихся к млекопитающим (например, овец, коз и т. д.); домашних животных, относящихся к млекопитающим (например, собак, кошек и т. д.) и грызунов (например, мышей, крыс и т. д.).

[0156] Термины «патология сердца» или «нарушение функции сердца» используются взаимозаменяемо и относятся к любому нарушению насосной функции сердца. Это включает, например, нарушения сократимости, нарушения способности к расслаблению (иногда называемые диастолической дисфункцией), аномальное или неправильное функционирование клапанов сердца, заболевания сердечной мышцы (иногда называемые кардиомиопатиями), заболевания, такие как стенокардия, ишемия и/или инфаркт миокарда, характеризующиеся недостаточным кровоснабжением сердечной мышцы, инфильтративные заболевания, такие как амилоидоз и гемохроматоз, общую или регионарную гипертрофию (такую, которая может возникать при некоторых видах кардиомиопатии или системной гипертензии) и аномальные сообщения между камерами сердца.

[0157] Используемый в данном документе термин «кардиомиопатия» относится к любому заболеванию или нарушению функции, которые воздействуют непосредственно на миокард. Этиология заболевания или нарушения может быть, например, воспалительной, метаболической, токсической, инфильтративной, фибропластической, гематологической, генетической или неизвестного происхождения. Различают две основные формы: (1) первичный тип, включающий заболевание сердечной мышцы неясной причины; и (2) вторичный тип, включающий заболевание миокарда известной причины или ассоциированный с заболеванием, вовлекающим другие системы органов. Термин «специфическая кардиомиопатия» относится к заболеваниям сердца, ассоциированным с определенными системными или сердечными нарушениями; примеры которых включают гипертензивную и метаболическую кардиомиопатию. Кардиомиопатии включают дилатационную кардиомиопатию (DCM), нарушение, при котором нарушена систолическая насосная функция левого и/или правого желудочка, что приводит к прогрессирующему увеличению сердца; гипертрофическую

кардиомиопатию, характеризующуюся гипертрофией левого желудочка без очевидных причин, таких как гипертензия или стеноз аорты; и рестриктивную кардиомиопатию, характеризующуюся аномальной диастолической функцией и избыточной ригидностью стенок желудочков, которая препятствует наполнению желудочков. Кардиомиопатии также включают некомпактность левого желудочка, аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка и аритмогенную дисплазию правого желудочка.

[0158] Термин «сердечная недостаточность» относится к патологическому состоянию, при котором аномалия сердечной функции отвечает за неспособность сердца прокачивать кровь со скоростью, соответствующей требованиям метаболизирующих тканей, и/или позволяет сердцу делать это только при аномально повышенном диастолическом объеме. Сердечная недостаточность включает систолическую и диастолическую недостаточность. Пациентов с сердечной недостаточностью подразделяют на пациентов с низким минутным объемом сердца (как правило, вторичным по отношению к ишемической болезни сердца, гипертензии, дилатационной кардиомиопатии и/или заболеванию клапанов или перикарда) и пациентов с высоким минутным объемом сердца (как правило, вследствие гипертиреоза, анемии, беременности, артериовенозных фистул, болезни бери-бери и болезни Педжета). Сердечная недостаточность включает сердечную недостаточность со сниженной фракцией выброса (HFrEF) и сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF).

[0159] Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые в рамках обоснованного медицинского суждения подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно с разумным соотношением польза/риск.

[0160] Термин «очищенный», используемый в данном документе, относится к материалу, который был выделен в условиях, которые снижают или устраняют присутствие неродственных материалов, т. е. примесей, включая нативные материалы, из которых получают материал. Например, очищенная ДНК вектора на

основе rAAV предпочтительно по сути не содержит компонентов клеток или культуры, включая компоненты культуры ткани, загрязняющие вещества и т. п.

[0161] Термины «регенерировать», «регенерация» и т. п., используемые в данном документе в контексте поврежденной ткани сердца, будут подразумевать свои обычные значения и также будут относиться к процессу роста и/или развития новой ткани сердца в сердце или ткани сердца, которые были повреждены, например, повреждены вследствие ишемии, инфаркта, реперфузии или другого заболевания. В некоторых вариантах осуществления регенерация ткани сердца предусматривает образование кардиомиоцитов.

[0162] Термин «терапевтический ген», используемый в данном документе, относится к гену, который при экспрессии обеспечивает благоприятный эффект для клетки или ткани, в которых он присутствует, или у млекопитающего, в организме которого ген экспрессируется. Примеры благоприятных эффектов включают облегчение признака или симптома состояния или заболевания, предупреждение или ингибирование состояния или заболевания или обеспечение требуемой характеристики. Терапевтические гены включают гены, которые частично или полностью корректируют генетический дефект в клетке или в организме млекопитающего.

[0163] Используемый в данном документе термин «функциональный кардиомиоцит» относится к дифференцированному кардиомиоциту, который способен посылать или принимать электрические сигналы. В некоторых вариантах осуществления кардиомиоцит называется функциональным кардиомиоцитом, если он демонстрирует электрофизиологические свойства, такие как потенциалы действия и/или транзиенты Ca^{2+} .

[0164] Используемая в данном документе «дифференцированная клетка, отличная от клетки сердца» может относиться к клетке, которая не способна дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма (т. е. не является плюрипотентной клеткой) и которая относится к линии дифференцировки клеток, отличной от линии дифференцировки клеток сердца (например, линии дифференцировки нейрональных клеток или линии дифференцировки клеток соединительной ткани). Дифференцированные клетки включают без ограничения

мультипотентные клетки, олигопотентные клетки, унипотентные клетки, клетки-предшественники и окончательно дифференцированные клетки. В конкретных вариантах осуществления клетка с более низкой потентностью считается «дифференцированной» относительно клетки с более высокой потентностью.

[0165] «Соматическая клетка» представляет собой клетку, образующую тело организма. Соматические клетки включают клетки, составляющие органы, кожу, кровь, кости и соединительную ткань в организме, но не половые клетки.

[0166] Используемый в данном документе термин «тотипотентный» означает способность клетки образовывать все линии дифференцировки клеток организма. Например, у млекопитающих только зигота и бластомеры на первой стадии дробления являются тотипотентными.

[0167] Используемый в данном документе термин «плюрипотентный» означает способность клетки образовывать все линии дифференцировки тела или сомы. Например, эмбриональные стволовые клетки представляют собой тип плюрипотентных стволовых клеток, которые способны образовывать клетки из каждого из трех зародышевых листков, эктодермы, мезодермы и энтодермы. Плюрипотентные клетки можно распознавать по экспрессии ими таких маркеров, как Nanog и Rex1.

[0168] Используемый в данном документе термин «мультипотентный» относится к способности взрослой стволовой клетки образовывать несколько типов клеток одной линии дифференцировки. Например, кроветворные стволовые клетки способны образовывать все клетки из линии дифференцировки клеток крови, например, лимфоидные и миелоидные клетки.

[0169] Используемый в данном документе термин «олигопотентный» относится к способности взрослой стволовой клетки дифференцироваться только в небольшое количество разных типов клеток. Например, лимфоидные или миелоидные стволовые клетки способны образовывать клетки либо лимфоидной, либо миелоидной линий дифференцировки соответственно.

[0170] Используемый в данном документе термин «унипотентный» означает способность клетки образовывать один тип клеток. Например, сперматогониальные стволовые клетки способны образовывать только сперматозоиды.

[0171] Используемый в данном документе термин «перепрограммирование» или «трансдифференцировка» относится к получению клетки определенной линии дифференцировки (например, клетки сердца) из другого типа клеток (например, клетки-фибробласта) без промежуточного процесса дедифференцировки клетки в клетку, демонстрирующую характеристики плюрипотентной стволовой клетки.

[0172] Используемый в данном документе термин «клетка сердца» относится к любой клетке, присутствующей в сердце, которая обеспечивает сердечную функцию, такую как сокращение сердца или кровоснабжение, или иным образом служит для поддержания структуры сердца. Клетки сердца, используемые в данном документе, охватывают клетки, которые существуют в эпикарде, миокарде или эндокарде сердца. Клетки сердца также включают, например, клетки сердечной мышцы или кардиомиоциты, а также клетки сосудов сердца, такие как клетки коронарной артерии или вены. Другие неограничивающие примеры клеток сердца включают эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты, сердечные стволовые клетки или клетки-предшественники, проводящие клетки сердца и клетки-водители ритма сердца, которые составляют сердечную мышцу, кровеносные сосуды и поддерживающую структуру из клеток сердца. Клетки сердца можно получать из стволовых клеток, включая, например, эмбриональные стволовые клетки или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[0173] Термин «кардиомиоцит» или «кардиомиоциты», используемый в данном документе, относится к саркомер-содержащим клеткам поперечнополосатой мышцы, встречающимся в природе в сердце млекопитающих, в отличие от клеток скелетной мышцы. Кардиомиоциты характеризуются экспрессией специализированных молекул, например, белков, таких как тяжелая цепь миозина, легкая цепь миозина, сердечный α -актинин. Используемый в данном документе термин «кардиомиоцит» представляет собой собирательный термин, включающий любую субпопуляцию или подтип кардиомиоцитов, например, предсердные, желудочковые кардиомиоциты и кардиомиоциты-водители ритма.

[0174] Термин «клетки, подобные кардиомиоцитам» предназначен для обозначения клеток, обладающих общими признаками с кардиомиоцитами, но которые могут не обладать всеми признаками кардиомиоцитов. Например, клетка, подобная кардиомиоциту, может отличаться от кардиомиоцита по экспрессии определенных генов сердца.

[0175] Термин «культивирование» или «культивирование клеток» означает поддержание клеток в искусственной среде *in vitro*. «Система культивирования клеток» используется в данном документе для обозначения условий культивирования, при которых популяцию клеток можно выращивать в виде монослоев или в виде суспензии. «Среда для культивирования» используется в данном документе для обозначения раствора питательных веществ для культивирования, роста или пролиферации клеток. Среда для культивирования может характеризоваться функциональными свойствами, такими как без ограничения способность поддерживать клетки в определенном состоянии (например, плюрипотентном состоянии, состоянии покоя и т. д.), обеспечивать созревание клеток – в некоторых случаях, в частности, для содействия дифференцировке клеток-предшественников в клетки конкретной линии дифференцировки (например, кардиомиоцит).

[0176] Используемый в данном документе термин «экспрессия» или «экспрессировать» относится к процессу, посредством которого полинуклеотиды подвергаются транскрипции с получением мРНК, и/или к процессу, посредством которого транскрибированная мРНК впоследствии подвергается трансляции с получением пептидов, полипептидов или белков. Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке. Уровень экспрессии гена можно определять путем измерения количества мРНК или белка в клетке или образце ткани.

[0177] Термин «индуцированный кардиомиоцит» или сокращение «iCM» относится к клетке, отличной от кардиомиоцита (и ее потомству), которая была трансформирована с получением кардиомиоцита (и/или клетки, подобной кардиомиоциту). Способы по настоящему изобретению можно применять в сочетании с любыми способами, известными в настоящее время или открытыми

позднее, для получения индуцированных кардиомиоцитов, например, для улучшения других методик.

[0178] Термин «кардиомиоциты, полученные из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки», используемый в данном документе, относится к человеческим индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам, которые были подвергнуты дифференцировке с получением клеток, подобных кардиомиоцитам. Иллюстративные способы получения клеток iPS-СМ представлены в Karakikes et al. *Circ Res.* 2015 Jun 19; 117(1): 80–88.

[0179] Термины «сердечный фибробласт человека» и «сердечный фибробласт мышцы», используемые в данном документе, относятся к первичной клетке, выделенной из желудочков сердца взрослого человека или мышцы соответственно и поддерживаемой в культуре *ex vivo*.

[0180] Термин «клетка, отличная от кардиомиоцита», используемый в данном документе, относится к любой клетке или популяции клеток в препарате клеток, не удовлетворяющим критериям для «кардиомиоцита», определенным и используемым в данном документе. Неограничивающие примеры клеток, отличных от кардиомиоцитов, включают соматические клетки, сердечные фибробласты, несердечные фибробласты, сердечные клетки-предшественники и стволовые клетки.

[0181] Используемый в данном документе термин «перепрограммирование» включает трансдифференцировку, дедифференцировку и т. п.

[0182] Используемый в данном документе термин «эффективность перепрограммирования» относится к числу клеток в образце, которые были успешно перепрограммированы в кардиомиоциты, относительно общего числа клеток в образце.

[0183] Термин «фактор перепрограммирования», используемый в данном документе, включает фактор, который вводится для экспрессии в клетке для облегчения перепрограммирования клетки из одного типа клеток в другой. Например, фактор перепрограммирования может включать фактор транскрипции, который, в комбинации с другими факторами транскрипции и/или малыми

молекулами, способен перепрограммировать сердечный фибробласт в индуцированный кардиомиоцит. Если в контексте четко не указано иное, фактор перепрограммирования относится к полипептиду, который может кодироваться полинуклеотидом, доставленным с помощью AAV. Факторы перепрограммирования могут также включать малые молекулы.

[0184] Термин «стволовые клетки» относится к клеткам, которые обладают способностью к самообновлению и образованию дифференцированного потомства. Термин «плюрипотентные стволовые клетки» относится к стволовым клеткам, которые могут давать начало клеткам всех трех зародышевых листков (энтодермы, мезодермы и эктодермы), но не обладают способностью давать начало целому организму.

[0185] Используемый в данном документе термин «их эквиваленты» касательно полипептида или последовательности нуклеиновой кислоты относится к полипептиду или нуклеиновой кислоте, которые отличаются от эталонного полипептида или последовательности нуклеиновой кислоты, однако сохраняют необходимые свойства (например, биологическую активность). Типичный вариант полинуклеотида отличается нуклеотидной последовательностью от другого, эталонного полинуклеотида. Изменения в нуклеотидной последовательности варианта может изменять или не изменять аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого эталонным полинуклеотидом. Изменения нуклеотидов могут приводить к аминокислотным заменам, делециям, добавлениям, слияниям и усечениям в полипептиде, кодируемом эталонной последовательностью. В целом, различия ограничены, так что последовательности эталонного полипептида и варианта в целом являются очень схожими и, во многих областях, идентичными.

[0186] Используемый в данном документе термин «клетка-предшественник» относится к клетке, которая стремится дифференцироваться в определенный тип клетки или образовать определенный тип ткани. Клетка-предшественник, подобно стволовой клетке, может дополнительно дифференцироваться в один или более видов клеток, однако является более зрелой, чем стволовая клетка, и, следовательно, обладает более лимитированной/ограниченной способностью к дифференцировке.

[0187] Термин «генетическая модификация» относится к постоянному или временному генетическому изменению, индуцированному в клетке после введения новой нуклеиновой кислоты (т. е. нуклеиновой кислоты, экзогенной по отношению к клетке). Генетическое изменение может осуществляться путем включения новой нуклеиновой кислоты в геном клетки сердца или путем временного или стабильного поддержания новой нуклеиновой кислоты в качестве внехромосомного элемента. В случае, если клетка представляет собой эукариотическую клетку, постоянное генетическое изменение может обеспечиваться посредством введения нуклеиновой кислоты в геном клетки. Подходящие способы генетической модификации включают инфицирование вирусом, трансфекцию, конъюгацию, слияние протопластов, электропорацию, технологию генной пушки, осаждение фосфатом кальция, прямую микроинъекцию и т. п.

[0188] Термин «стволовые клетки» относится к клеткам, которые обладают способностью к самообновлению и образованию дифференцированного потомства. Термин «плюрипотентные стволовые клетки» относится к стволовым клеткам, которые могут давать начало клеткам всех трех зародышевых листков (энтодермы, мезодермы и эктодермы), но не обладают способностью давать начало целому организму. В некоторых вариантах осуществления композиции для индуцирования фенотипа кардиомиоцита могут применяться в отношении популяции клеток для индуцирования перепрограммирования. В других вариантах осуществления композиции индуцируют фенотип кардиомиоцита.

[0189] Термин «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» будет подразумевать свое обычное значение и также будет относиться к дифференцированным соматическим клеткам млекопитающего (например, взрослым соматическим клеткам, таким как кожа), которые были перепрограммированы таким образом, чтобы они демонстрировали по меньшей мере одну характеристику плюрипотентности. См., например, Takahashi et al. (2007) *Cell* 131(5):861-872, Kim et al. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(19): 7838-7843, Sell (2013) *Stem Cells Handbook*.

[0190] Термин «эффективность трансдукции» относится к процентной доле клеток, трансдуцированных с помощью по меньшей мере одного генома AAV.

Например, если 1×10^6 клеток подвергаются воздействию вируса и $0,5 \times 10^6$ клеток определены как содержащие по меньшей мере одну копию генома AAV, то эффективность трансдукции составляет 50%. Иллюстративный способ определения эффективности трансдукции представляет собой проточную цитометрию. Например, процентная доля GFP+ клеток представляет собой меру эффективности трансдукции, если геном AAV содержит полинуклеотид, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP).

[0191] Термин «селективность» относится к соотношению эффективности трансдукции для одного типа клеток по сравнению с другим или по сравнению со всеми другими типами клеток.

[0192] Термин «инфекционность» относится к способности вириона AAV инфицировать клетку, в частности, клетку *in vivo*. Следовательно, инфекционность представляет собой функцию по меньшей мере биораспределения и уклонения от нейтрализующих антител.

[0193] Если не указано иное, сокращения, используемые на всем протяжении описания, имеют следующие значения: AAV, аденоассоциированный вирус, rAAV, рекомбинантный аденоассоциированный вирус; hCF, сердечный фибробласт взрослого человека; APCF, сердечный фибробласт взрослой свиньи, α -MHC-GFP; тяжелая цепь альфа-миозина-зеленый флуоресцентный белок; CF, сердечный фибробласт; см, сантиметр; CO, минутный объем сердца; EF, фракция выброса; FACS, сортировка флуоресцентно-активированных клеток; GFP, зеленый флуоресцентный белок; GMT, Gata4, Mef2c и Tbx5; GMTc, Gata4, Mef2c, Tbx5, TGF- β i, WNTi; GO, генная онтология; hCF, сердечный фибробласт человека; iCM, индуцированный кардиомиоцит; кг, килограмм; мкг, микрограмм; мкл, микролитр; мг, миллиграмм; мл, миллилитр; MI, инфаркт миокарда; мс, миллисекунда; мин, минута; MyAMT, миокардин, Ascl1, Mef2c и Tbx5; MyA, миокардин и Ascl1; MyMT, миокардин, Mef2c и Tbx5; MyMTc, миокардин, Mef2c, Tbx5, TGF- β i, WNTi; MRI, магнитно-резонансная визуализация; PBS, фосфатно-солевой буфер; PBST, фосфатно-солевой буфер, Triton; PFA, параформальдегид; qPCR, количественная полимеразная цепная реакция; qRT-PCR, количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой; РНК, рибонуклеиновая кислота; RNA-seq,

секвенирование РНК; **RT-PCR**, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой; **s**, секунда; **SV**, ударный объем; **TGF- β** , трансформирующий фактор роста-бета; **TGF- β i**, ингибитор трансформирующего фактора роста-бета; **WNT**, wingless-Int; **WNTi**, ингибитор wingless-Int; **YFP**, желтый флуоресцентный белок; **4F**, Gata4, Mef2c, TBX5 и миокардин; **4Fc**, Gata4, Mef2c, TBX5 и миокардин + TGF- β i и WNTi; **7F**, Gata4, Mef2c и Tbx5, Essrg, миокардин, Zfp201 и Mesp1; **7Fc**, Gata4, Mef2c и Tbx5, Essrg, миокардин, Zfp201 и Mesp1 + TGF- β и WNTi.

[0194] Термин «консервативные аминокислотные замены» относится к заменам аминокислотных остатков, которые обладают схожими физическими свойствами боковой цепи с остатками, которые заменяются. Консервативные замены включают замену полярных остатков на полярные, неполярных остатков на неполярные, гидрофобных остатков на гидрофобные, небольших остатков на небольшие и крупных остатков на крупные. Консервативные замены дополнительно предусматривают замены в пределах следующих групп: {S, T}, {A, G}, {F, Y}, {R, H, K, N, E}, {S, T, N, Q}, {C, U, G, P, A} и {A, V, I, L, M, F, Y, W}.

Композиции

[0195] Попытки идентифицировать варианты капсида со свойствами, применимыми для генной терапии, включали перестановку в ДНК генов *cap* AAV2 и AAV5, описанную в патенте США № 9233131; а также направленную эволюцию, описанную в международных заявках на патент №№ WO2012/145601A2 и WO2018/222503A1. Раскрытия этих документов включены в настоящий документ для всех целей и, в частности, для способов получения и применения вирионов AAV и для полинуклеотидных последовательностей и продуктов гена, раскрытых в них, а также для комбинаций факторов транскрипции, применимых в лечении сердечных заболеваний или нарушений.

[0196] Капсид AAV кодируется геном *cap* AAV, который также называется правой открытой рамкой считывания (ORF) (в отличие от левой ORF, *rep*). Структуры репрезентативных капсидов AAV описаны в различных публикациях, включая Xie et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:10405-1040 (AAV2); Govindasamy et al. (2006) *J. Virol.* 80:11556-11570 (AAV4); Nam et al. (2007) *J. Virol.* 81:12260-12271 (AAV8); и Govindasamy et al. (2013) *J. Virol.* 87:11187-11199 (AAV5).

[0197] Капсид AAV содержит 60 копий (всего) трех вирусных белков (VP), VP1, VP2 и VP3, с прогнозируемым соотношением 1:1:10, расположенных с икосаэдрической симметрией T=1. Три VP транслируются с одной и той же мРНК, при этом VP1 содержит уникальный N-концевой домен в дополнение к полной последовательности VP2 в его С-концевой области. VP2 содержит добавочную N-концевую последовательность в дополнение к VP3 на его С-конце. В большинстве кристаллических структур наблюдается только С-концевая полипептидная последовательность, общая для всех капсидных белков (~530 аминокислот). Полагают, что N-концевая уникальная область VP1, перекрывающаяся область VP1-VP2 и первые 14–16 N-концевых остатков VP3 являются, главным образом, неупорядоченными. Данные криоэлектронной микроскопии и реконструкции изображений позволяют предположить, что в интактных капсидах AAV N-концевые области белков VP1 и VP2 располагаются внутри капсида и являются недоступными для связывания с рецептором и антителом. Таким образом, фенотипы прикрепления к рецептору и трансдукции, в целом, определяются аминокислотными последовательностями в пределах общего С-концевого домена VP1, VP2 и VP3.

[0198] В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных вставок, замен или делеций располагаются в петле GH или петле IV капсидного белка AAV, например, в доступной для растворителя части петли GH или петли IV капсидного белка AAV. Информацию касательно петли GH/петли IV капсида AAV см., например, в van Vliet et al. (2006) *Mol. Ther.* 14:809; Padron et al. (2005) *Virology* 79:5047; и Shen et al. (2007) *Mol. Ther.* 15: 1955. В некоторых вариантах осуществления «исходный» капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV5 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления «исходный» капсидный белок AAV представляет собой химерный капсидный белок AAV. Аминокислотные последовательности различных капсидных белков AAV известны из уровня техники. См., например, номер доступа в GenBank NP_049542 касательно AAV1; номер доступа в GenBank NP_044927 касательно AAV4; номер доступа в GenBank AAD13756 касательно AAV5; номер доступа в GenBank AAB95450 касательно AAV6; номер доступа в GenBank YP_077178 касательно AAV7; номер доступа в GenBank YP_077180 касательно AAV 8; номер доступа в GenBank AAS99264 касательно AAV9 и номер доступа в GenBank AAT46337 касательно

AAV10. См., например, Santiago-Ortiz et al. (2015) *Gene Ther.* 22:934 касательно прогнозируемого предкового капсида AAV.

[0199] Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой дефектный по репликации парвовирус, геном которого, представляющий собой одностороннюю ДНК, имеет длину приблизительно 4,7 т. о., включая два инвертированных концевых повтора (ITR) длиной 145 нуклеотидов. Существует несколько серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV известны. Например, геном AAV5 представлен под номером доступа в GenBank AF085716. Обзор жизненного цикла и генетики AAV представлен в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992). Получение псевдотипированного rAAV раскрыто, например, в WO 01/83692. Также предусмотрены другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с мутациями капсида. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Иллюстративные векторы на основе AAV предусмотрены в US 7105345; US 15/782980; US 7259151; US 6962815; US 7718424; US 6984517; US 7718424; US 6156303; US 8524446; US 7790449; US 7906111; US 9737618; заявке на патент США № 15/433322; US 7198951, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[0200] Вирионы rAAV по настоящему изобретению содержат гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более продуктов гена. Продукт(-ы) гена может(-гут) представлять собой либо полипептид, либо РНК, либо оба. Если продукт гена представляет собой полипептид, нуклеотидная последовательность кодирует матричную РНК, необязательно с одним или более интронами, которая транслируется в продукт гена, представляющего собой полипептид. Нуклеотидная последовательность может кодировать один, два, три или более продуктов гена (хотя число ограничено пакующей способностью вириона rAAV, как правило, приблизительно 5,2 т. о.). Продукты гена могут быть операционно связаны с одним промотором (для одной единицы транскрипции) или более чем одним промотором. Несколько продуктов гена могут также быть получены с применением сигнала внутренней посадки рибосомы (IRES) или саморасщепляющегося пептида (например, пептида 2A).

[0201] В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления полипептидный продукт гена представляет собой полипептид, который индуцирует перепрограммирование сердечного фибробласта с получением индуцированной клетки, подобной кардиомиоциту (iCM). В некоторых вариантах осуществления полипептидный продукт гена представляет собой полипептид, который усиливает функцию клетки сердца. В некоторых вариантах осуществления полипептидный продукт гена представляет собой полипептид, который обеспечивает функцию, которая отсутствует или является дефектной в клетке сердца. В некоторых вариантах осуществления полипептидный продукт гена представляет собой редактирующую геном эндонуклеазу.

[0202] В некоторых вариантах осуществления продукт гена предусматривает слитый белок, который слит с гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления продукт гена предусматривает редактирующую геном нуклеазу, слитую с аминокислотной последовательностью, которая обеспечивает субклеточную локализацию, т.е. партнер по слиянию представляет собой последовательность субклеточной локализации (например, один или более сигналов ядерной локализации (NLS) для нацеливания на ядро, два или более NLS, три или более NLS и т. д.).

[0203] В целом, вирусный вектор получают путем введения конструкции вирусной ДНК или РНК в линию «продуцирующих клеток» или «пакующих клеток». Линии пакующих клеток включают без ограничения любую линию клеток, легко поддающихся трансфекции. Линии пакующих клеток могут быть основаны на линиях клеток HEK291, 293T, NIH3T3, COS, HeLa или Sf9. Примеры линий пакующих клеток включают без ограничения Sf9 (ATCC® CRL-1711™). Иллюстративные линии пакующих клеток и способы получения вирионов rAAV представлены в публикациях международных заявок на патент №№ WO2017075627, WO2015/031686, WO2013/063379, WO2011/020710, WO2009/104964, WO2008/024998, WO2003/042361 и WO1995/013392; патентах США №№ US9441206B2, US8679837 и US7091029B2.

[0204] В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой функциональный сердечный белок. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой редактирующую геном эндонуклеазу (необязательно с направляющей РНК, единой направляющей РНК и/или матрицей для репарации), которая приводит к замене или репарации нефункционального сердечного белка в функциональный сердечный белок. Функциональные сердечные белки включают без ограничения сердечный тропонин Т; сердечный саркомерный белок; тяжелую цепь β -миозина; эссенциальную легкую цепь желудочкового миозина 1; регуляторную легкую цепь желудочкового миозина 2; сердечный а-актин; а-тропомиозин; сердечный тропонин I; сердечный миозин-связывающий белок С; белок 1 с четырьмя с половиной доменами LIM; титин; гамма субъединица 5'-АМР-активируемой протеинкиназы-2; тропонин I типа 3, легкую цепь миозина 2, альфа-актин 1 сердечной мышцы; сердечный белок LIM; кавеолин 3 (CAV3); альфа-галактозидазу (GLA); лизосомально-ассоциированный мембранный белок 2 (LAMP2); глициновую митохондриальную транспортную РНК (MTTG); изолейциновую митохондриальную транспортную РНК (MTTI); лизиновую митохондриальную транспортную РНК (MTTK); глутаминовую митохондриальную транспортную РНК (MTTQ); легкую цепь миозина 3 (MYL3); тропонин С (TNNC1); транстиретин (TTR); кальций-АТФазу 2а саркоэндоплазматического ретикулула (SERCA2a); стромальный фактор-1 (SDF-1); аденилатциклазу-6 (AC6); бета-ARKct (С-конец β -адренергической рецепторной киназы); фактор роста фибробластов (FGF); тромбоцитарный фактор роста (PDGF); фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); фактор роста гепатоцитов; индуцируемый гипоксией фактор роста; тимозин-бета 4 (TMSB4X); синтазу оксида азота-3 (NOS3); унокартин 3 (UCN3); мелузин; аполипопротеин-Е (ApoE); супероксиддисмутазу (SOD) и S100A1 (малый кальций-связывающий белок; см., например, Ritterhoff and Most (2012) *Gene Ther.* 19:613; Kraus et al. (2009) *Mol. Cell. Cardiol.* 47:445).

[0205] В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой продукт гена, экспрессия которого восполняет дефект в гене, отвечающем за генетическое нарушение. В настоящем изобретении предусмотрены вирионы gAAV, содержащие полинуклеотид, кодирующий одно или более из следующего, например, для применения без ограничения при нарушении, указанном в скобках,

или для других нарушений, вызванных каждым из TAZ (синдром Барта); FXN (атаксия Фридрейха); CASQ2 (CPVT); FBN1 (синдром Марфана); RAF1 и SOS1 (синдром Нунан); SCN5A (синдром Бругада); KCNQ1 и KCNH2 (синдром удлиненного интервала QT); DMPK (миотоническая дистрофия 1); LMNA (конечностно-поясная дистрофия типа 1B); JUP (болезнь Наксоса); TGFBR2 (синдром Лойса-Дитца); EMD (X-сцепленная EDMD) и ELN (аортальный стеноз SV). В некоторых вариантах осуществления вирион gAAV содержит полинуклеотид, кодирующий один или более из сердечного тропонина T (TNNT2); регулятора 3 молекулярного шаперона семейства BAG (BAG3); тяжелой цепи миозина (MYH7); тропомиозина 1 (TPM1); миозин-связывающего белка C (MYBPC3); гамма-субъединицы 5'-AMP-активируемой протеинкиназы 2 (PRKAG2); тропонина I типа 3 (TNNI3); титина (TTN); легкой цепи миозина 2 (MYL2); альфа-актина 1 сердечной мышцы (ACTC1); представителя 1 KQT-подобного подсемейства калиевых потенциалзависимых каналов (KCNQ1); плакофилина 2 (PKP2); энхансерного фактора 2с миоцитов (MEF2C) и сердечного белка LIM (CSRP3).

[0206] В некоторых вариантах осуществления продукты гена по настоящему изобретению представляют собой полипептидные факторы перепрограммирования. Факторы перепрограммирования являются предпочтительными в качестве средства для превращения одного типа клеток в другой. Клетки, отличные от кардиомиоцитов, можно подвергать дифференцировке в клетки, представляющие собой кардиомиоциты, *in vitro* или *in vivo* с применением любого способа, доступного специалисту в данной области. Например, см. способы, описанные в Ieda et al. (2010) *Cell* 142:375-386; Christoforou et al. (2013) *PLoS ONE* 8:e63577; Addis et al. (2013) *J. Mol. Cell Cardiol.* 60:97-106; Jayawardena et al. (2012) *Circ. Res.* 110: 1465-1473; Nam Y et al. (2003) *PNAS USA* 110:5588-5593; Wada R et al. (2013) *PNAS USA* 110: 12667-12672; и Fu J et al. (2013) *Stem Cell Reports* 1:235-247.

[0207] В контексте сердца факторы перепрограммирования могут быть способны превращать сердечный фибробласт в сердечный миоцит либо непосредственно, либо через промежуточный тип клетки. В частности, возможно непосредственное перепрограммирование или перепрограммирование посредством превращения фибробласта в плюрипотентную или тотипотентную стволовую клетку

в первую очередь. Такая плюрипотентная стволовая клетка называется индуцированной плюрипотентной стволовой (iPS) клеткой. Клетка iPS, которая впоследствии превращается в сердечный миоцит (CM), называется клеткой iPS-CM. В примерах iPS-CM, полученные *in vitro* из сердечных фибробластов, применяются *in vivo* для отбора представляющих интерес капсидных белков. В настоящем изобретении также предусмотрено применение капсидных белков по настоящему изобретению, чтобы, в свою очередь, получать клетки iPS-CM *in vitro*, но конкретнее *in vivo*, в качестве части терапевтической схемы генной терапии. Индуцированные клетки, подобные кардиомиоцитам (iCM), относятся к клеткам, подвергающимся непосредственному перепрограммированию в кардиомиоциты.

[0208] Индуцированные кардиомиоциты экспрессируют один или более кардиомиоцит-специфических маркеров, при этом кардиомиоцит-специфические маркеры включают без ограничения сердечный тропонин I, сердечный тропонин-C, тропомиозин, кавеолин-3, тяжелую цепь миозина, легкую цепь миозина 2a, легкую цепь миозина 2v, рианодиновый рецептор, саркомерный α -актинин, Nkx2.5, коннексин 43 и предсердный натрийуретический фактор. Индуцированные кардиомиоциты могут также демонстрировать саркомерные структуры. Индуцированные кардиомиоциты демонстрируют повышенный уровень экспрессии кардиомиоцит-специфических генов ACTC1 (сердечный α -актин), ACTN2 (актинин $\alpha 2$), MYH6 (тяжелая цепь α -миозина), RYR2 (рианодиновый рецептор 2), MYL2 (регуляторная легкая цепь 2 миозина, желудочковая изоформа), MYL7 (регуляторная легкая цепь миозина, предсердная изоформа), TNNT2 (сердечный тропонин T типа 2) и NPPA (предшественник натрийуретического пептида типа A), PLN (фосфоламбан). Экспрессия маркеров фибробластов, таких как Colla2 (коллаген Ia2), снижена в индуцированных кардиомиоцитах по сравнению с фибробластами, из которых получен iCM.

[0209] Способы перепрограммирования с участием полипептидных факторов перепрограммирования (в некоторых случаях дополненные низкомолекулярными факторами перепрограммирования, обеспечиваемыми в сочетании с rAAV), включают таковые, описанные в US2018/0112282A1, WO2018/005546, WO2017/173137, US2016/0186141, US2016/0251624, US2014/0301991 и

US2013/0216503A1, которые включены во всей своей полноте, в частности, для раскрытых способов и факторов перепрограммирования.

[0210] В некоторых вариантах осуществления клетки сердца перепрограммируют в индуцированные клетки, подобные кардиомиоцитам (iCM), с применением одного или более факторов перепрограммирования, которые модулируют экспрессию одного или более представляющих интерес полинуклеотидов или белков, таких как гомолог 1 achaete-scute (ASCL1), миокардин (MYOCD), миоцит-специфический энхансерный фактор 2С (MEF2C) и/или фактор транскрипции Т-box 5 (TBX5). В некоторых вариантах осуществления один или более факторов перепрограммирования предусмотрены в виде полинуклеотида (например, полинуклеотида РНК, мРНК или ДНК), который кодирует один или более представляющих интерес полинуклеотидов или белков. В некоторых вариантах осуществления один или более факторов перепрограммирования предусмотрены в виде белка.

[0211] В некоторых вариантах осуществления факторы перепрограммирования представляют собой микроРНК или антагонисты микроРНК, siRNA или малые молекулы, которые способны повышать экспрессию одного или более представляющих интерес полинуклеотидов или белков. В некоторых вариантах осуществления экспрессия представляющих интерес полинуклеотидов или белков повышается за счет экспрессии микроРНК или антагониста микроРНК. Например, эндогенная экспрессия полипептида *Ost* может быть повышена за счет введения микроРНК-302 (miR-302) или за счет повышенной экспрессии miR-302. См., например, Hu et al., *Stem Cells* 31(2): 259-68 (2013), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Таким образом, miRNA-302 может быть индуцирующим фактором эндогенной экспрессии полипептида *Ost*. miRNA-302 может вводиться отдельно или с нуклеиновой кислотой, которая кодирует полипептид *Ost*. В некоторых вариантах осуществления подходящий продукт гена в виде нуклеиновой кислоты представляет собой микроРНК. Подходящие микроРНК включают, например, mir-1, mir-133, mir-208, mir-143, mir-145 и mir-499.

[0212] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение вириона гAAV по настоящему изобретению до, во время или после введения низкомолекулярного фактора перепрограммирования. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный фактор перепрограммирования представляет собой малую молекулу, выбранную из группы, состоящей из SB431542, LDN-193189, дексаметазона, LY364947, D4476, мирицетина, IWR1, XAV939, докозагексаеновой кислоты (DHA), S-нитрозо-TV-ацетилпенициллина (SNAP), Nh-Agl.5, алпростадила, кромакалима, MNITMT, A769662, п-гидроксианилида ретиноевой кислоты, дибромида декаметония, нифедипина, пироксикама, бацитрацина, азтреонама, гидрохлорида гармалола, амид-C2 (A7), Ph-C12 (CIO), mCF3-C-7 (J5), G856-7272 (A473), 5475707 или любой их комбинации.

[0213] В некоторых вариантах осуществления продукты гена предусматривают факторы перепрограммирования, которые модулируют экспрессию одного или более представляющих интерес белков, выбранных из ASCL1, MYOCD, MEF2C и TBX5. В некоторых вариантах осуществления продукты гена предусматривают один или более факторов перепрограммирования, выбранных из ASCL1, MYOCD, MEF2C и TBX5, CCNB1, CCND1, CDK1, CDK4, AURKB, OCT4, BAF60C, ESRRG, GATA4, GATA6, HAND2, IRX4, ISLL, MESP1, MESP2, NKX2.5, SRF, TBX20, ZFPM2 и miR-133.

[0214] В некоторых вариантах осуществления продукты гена предусматривают GATA4, MEF2C и TBX5 (т. е. GMT). В некоторых вариантах осуществления продукты гена предусматривают MYOCD, MEF2C и TBX5 (т. е. MyMT). В некоторых вариантах осуществления продукты гена предусматривают MYOCD, ASCL1, MEF2C и TBX5 (т. е. MyAMT). В некоторых вариантах осуществления продукты гена предусматривают MYOCD и ASCL1 (т. е. MyA). В некоторых вариантах осуществления продукты гена предусматривают GATA4, MEF2C, TBX5 и MYOCD (т. е. 4F). В других вариантах осуществления продукты гена предусматривают GATA4, MEF2C, TBX5, ESRRG, MYOCD, ZFPM2 и MESP1 (т. е. 7F). В некоторых вариантах осуществления продукты гена предусматривают один или более из ASCL1, MEF2C, GATA4, TBX5, MYOCD, ESRRG и MESPL.

[0215] В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV обеспечивают получение сердечных миоцитов *in vitro* или *in vivo*. Кардиомиоциты или сердечные миоциты представляют собой мышечные клетки, которые составляют сердечную мышцу. Каждая клетка миокарда содержит миофибриллы, которые представляют собой длинные цепи саркомеров, сократительных единиц мышечных клеток. Кардиомиоциты демонстрируют исчерченность, сходную с таковой на клетках скелетных мышц, однако в отличие от многоядерных скелетных клеток они содержат только одно ядро. Кардиомиоциты характеризуются высокой плотностью митохондрий, которая позволяет им быстро продуцировать АТФ, что делает их высокоустойчивыми к утомлению. Зрелые кардиомиоциты могут экспрессировать один или более из следующих сердечных маркеров: α -актинин, MLC2 ν , MY20, сМНС, NKX2-5, GATA4, сTNT, сTNI, MEF2C, MLC2a или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления зрелые кардиомиоциты экспрессируют NKX2-5, MEF2C или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления сердечные клетки-предшественники экспрессируют маркеры сердечных предшественников ранней стадии, такие как GATA4, ISL1 или их комбинация.

[0216] В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, как описано ниже, продукт гена представляет собой направляющую РНК, способную связываться с РНК-направляемой эндонуклеазой. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту, способную снижать уровень мРНК и/или полипептидного продукта гена, например, в клетке сердца. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный продукт гена представляет собой интерферирующую РНК, способную селективно инактивировать транскрипт, кодируемый аллелем, который вызывает сердечное заболевание или нарушение. В качестве примера, аллель представляет собой аллель тяжелой цепи бета-миозина 7 сердечной мышцы (MYH7), который содержит мутацию, вызывающую гипертрофическую кардиомиопатию. Другие примеры включают, например, интерферирующие РНК, которые селективно инактивируют транскрипт, кодируемый аллелем, который вызывает гипертрофическую кардиомиопатию (HCM), дилатационную кардиомиопатию (DCM) или некомпактность левого желудочка сердца (LVNC), где аллель представляет собой

аллель MYL3 (легкая цепь миозина 3, щелочной, желудочковый, медленная скелетная мышца), MYH7, TNNI3 (тропонин I типа 3 (сердечный)), TNNT2 (тропонин T типа 2 (сердечный)), TPM1 (тропомиозин 1 (альфа)) или ACTC1, содержащий мутацию, вызывающую HCM, вызывающую DCM или вызывающую LVNC. См., например, публикацию заявки на патент США №2016/0237430 для примеров мутаций, вызывающих сердечное заболевание.

[0217] В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой РНК, кодирующую полипептид. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой интерферирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой аптамер. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой терапевтический полипептид, например, полипептид, который обеспечивает клинически благоприятный эффект. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой сайт-специфическую нуклеазу, которая обеспечивает сайт-специфический нокдаун функции гена. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой РНК-направляемую эндонуклеазу, которая обеспечивает модификацию нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах осуществления продукты гена представляют собой i) РНК-направляемую эндонуклеазу, которая обеспечивает модификацию нуклеиновой кислоты-мишени; и ii) направляющую РНК, которая содержит первый сегмент, который связывается с последовательностью-мишенью в нуклеиновой кислоте-мишени, и второй сегмент, который связывается с РНК-направляемой эндонуклеазой. В некоторых вариантах осуществления продукты гена представляют собой i) РНК-направляемую эндонуклеазу, которая обеспечивает модификацию нуклеиновой кислоты-мишени; ii) первую направляющую РНК, которая содержит первый сегмент, который связывается с первой последовательностью-мишенью в нуклеиновой кислоте-мишени, и второй сегмент, который связывается с РНК-направляемой эндонуклеазой; и iii) первую направляющую РНК, которая содержит первый сегмент, который связывается со второй последовательностью-мишенью в нуклеиновой кислоте-мишени, и второй сегмент, который связывается с РНК-направляемой эндонуклеазой.

[0218] Нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный продукт гена, в вирионе rAAV по настоящему изобретению может быть функционально связана с промотором. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный продукт гена, в вирионе rAAV по настоящему изобретению может быть функционально связана с конститутивным промотором, регулируемым промотором или промотором, специфическим в отношении клеток сердца. Подходящие конститутивные промоторы включают промотор гена α -субъединицы фактора элонгации 1 (EF1 α) человека, промотор гена β -актина, промотор гена α -актина, промотор гена β -глюкуронидазы, промотор CAG, супер-коровый промотор и промотор гена убиквитина. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный продукт гена, в вирионе rAAV по настоящему изобретению функционально связана со специфическим в отношении сердца транскрипционным регуляторным элементом (TRE), где специфические в отношении сердца TRE включают промоторы и энхансеры. Подходящие специфические в отношении сердца TRE включают без ограничения TRE, полученные из следующих генов: легкой цепи миозина 2 (MLC-2), тяжелой цепи α -миозина (α -MHC), ген десмина, AE3, сердечного тропонина C (cTnC) и сердечного актина. Franz et al. (1997) *Cardiovasc. Res.* 35:560-566; Robbins et al. (1995) *Ann. NY. Acad. Sci.* 752:492-505; Linn et al. (1995) *Circ. Res.* 76:584-591; Parmacek et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 1870-1885; Hunter et al. (1993) *Hypertension* 22:608-617; и Sartorelli et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4047-4051. См. также Pacak et al. (2008) *Genet Vaccines Ther.* 6:13. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор гена α -MHC, промотор гена MLC-2 или промотор гена cTnT.

[0219] Полинуклеотид, кодирующий продукт гена, функционально связан с промотором и/или энхансером таким образом, чтобы облегчать экспрессию продукта гена. В зависимости от используемой системы хозяин/вектор любой из ряда подходящих транскрипционных и трансляционных контрольных элементов, включая конститутивные и индуцируемые промоторы, транскрипционные энхансерные элементы, терминаторы транскрипции и т. д., может применяться в вирионе rAAV (например, Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153:516-544).

[0220] Отдельные промоторы и/или энхансеры могут использоваться для каждого из полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один и тот же промотор и/или энхансер применяется для двух или более полинуклеотидов в одной открытой рамке считывания. Векторы, в которых используется данная конфигурация генетических элементов, называются «полицистронными». Иллюстративный пример полицистронного вектора содержит энхансер и промотор, операционно связанные с одной открытой рамкой считывания, содержащей два или более полинуклеотидов, связанных с помощью области(-ей) 2А, при этом экспрессия открытой рамки считывания приводит к образованию нескольких полипептидов, получаемых посредством совместной трансляции. Считается, что область 2А опосредует образование нескольких полипептидных последовательностей за счет пропуска кодона; однако настоящее изобретение также относится к полицистронным векторам, в которых используется посттрансляционное расщепление с образованием представляющих интерес двух или более белков из одного и того же полинуклеотида. Иллюстративные последовательности 2А, векторы и связанные с ними способы представлены в US20040265955A1, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0221] Неограничивающие примеры подходящих эукариотических промоторов (промоторов, функциональных в эукариотической клетке) включают промотор CMV, немедленно-ранний промотор CMV, промотор гена тимидинкиназы HSV, ранний и поздний промотор SV40, промотор длинных концевых повторов (LTR) из ретровируса и промотор гена металлопротеиназы I мыши. В некоторых вариантах осуществления будут применяться промоторы, способные обеспечивать экспрессию, специфическую в отношении сердца. Неограничивающие примеры подходящих промоторов, специфических в отношении сердца, включают промоторы гена десмина (Des), гена тяжелой цепи альфа-миозина (α -MHC), гена легкой цепи миозина 2 (MLC-2), гена сердечного тропонина Т (сTnT) и гена сердечного тропонина С (сTnC). Неограничивающие примеры подходящих нейрон-специфических промоторов включают промоторы гена синапсина I (SYN), гена кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, гена тубулина-альфа I, гена нейрон-специфической энлазы и гена бета-цепи тромбоцитарного фактора роста и

гибридные промоторы, полученные посредством слияния энхансера цитомегаловируса (E) с такими нейрон-специфическими промоторами.

[0222] Примеры подходящих промоторов для управления экспрессией факторов перепрограммирования включают без ограничения ретровирусные элементы длинных концевых повторов (LTR); конститутивные промоторы, такие как промоторы CMV, HSV1-TK, SV40, EF-1a, β -актина, фосфоглицеринкиназы (PGK); индуцируемые промоторы, такие как промоторы, содержащие Tet-операторные элементы; промоторы, специфические в отношении сердца, такие как промоторы гена десмина (DES), гена тяжелой цепи альфа-миозина (α -MHC), гена легкой цепи миозина 2 (MLC-2), гена сердечного тропонина T (cTnT) и гена сердечного тропонина C (cTnC); нейрон-специфические промоторы, такие как промоторы гена нестина, ядер нейронов (NeuN), гена ассоциированного с микротрубочками белка 2 (MAP2), гена бета III тубулина, гена нейрон-специфической энлазы (NSE), линии олигодендроцитов (Olig1/2) и гена фибриллярного кислого белка глии (GFAP); а также промоторы, специфические в отношении поджелудочной железы, такие как промоторы гена Pax4, Nkx2.2, Ngn3, инсулина, глюкагона и соматостатина.

[0223] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид функционально связан со специфическим в отношении типа клеток транскрипционным регуляторным элементом (TRE), где TRE включают промоторы и энхансеры. Подходящие TRE включают без ограничения TRE, полученные из следующих генов: легкой цепи миозина 2, тяжелой цепи α -миозина, AE3, сердечного тропонина C и сердечного актина. Franz et al. (1997) *Cardiovasc. Res.* 35:560-566; Robbins et al. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 752:492-505; Linn et al. (1995) *Circ. Res.* 76:584-591; Parmacek et al. (1994) *Cell. Biol.* 14:1870-1885; Hunter et al. (1993) *Hypertension* 22:608-617; и Sartorelli et al. (1992) *PNAS USA* 89:4047-4051.

[0224] Промотор может представлять собой промотор, естественным образом ассоциированный с геном или сегментом нуклеиновой кислоты. Подобным образом, в случае РНК (например, микроРНК) промотор может представлять собой промотор, естественным образом ассоциированный с геном микроРНК (например, геном miRNA-302). Такой естественным образом ассоциированный промотор может

называться «естественным промотором» и может быть получен посредством выделения 5'-некодирующих последовательностей, расположенных выше кодирующего сегмента и/или экзона. Подобным образом, энхансер может представлять собой энхансер, естественным образом ассоциированный с последовательностью нуклеиновой кислоты. Однако энхансер может располагаться либо ниже, либо выше такой последовательности.

[0225] В качестве альтернативы определенные преимущества будут получены за счет помещения сегмента кодирующей нуклеиновой кислоты под контроль рекомбинантного или гетерологичного промотора, что относится к промотору, который в норме не ассоциирован с нуклеиновой кислотой в своей естественной окружающей среде. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также относится к энхансеру, в норме не ассоциированному с последовательностью нуклеиновой кислоты в своей естественной окружающей среде. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов, и промоторы или энхансеры, выделенные из любых других прокариотических, вирусных или эукариотических клеток, и промоторы или энхансеры, не «встречающиеся в природе», т.е. содержащие разные элементы разных транскрипционных регуляторных областей и/или мутации, которые изменяют экспрессию. В дополнение к получению последовательностей нуклеиновой кислоты промоторов и энхансеров синтетическим путем, последовательности можно получать с применением рекомбинантного клонирования и/или технологии амплификации нуклеиновой кислоты, включая PCR™, в связи с композициями, раскрытыми в данном документе (см. патент США № 4683202, патент США № 5928906, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки).

[0226] Используемые промоторы могут являться конститутивными, индуцируемыми, специфическими в отношении развития, тканеспецифическими и/или применимыми в подходящих условиях для управления высоким уровнем экспрессии сегмента нуклеиновой кислоты. Например, промотор может представлять собой конститутивный промотор, такой как промотор CMV, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса CMV, промотор CAG, промотор EF-1 α , промотор HSV1-TK, промотор SV40, промотор гена β -актина, промотор гена

РГК или их комбинация. Примеры эукариотических промоторов, которые можно применять, включают без ограничения конститутивные промоторы, например, вирусные промоторы, такие как промоторы CMV, SV40 и RSV, а также регулируемые промоторы, например, индуцируемый или репрессируемый промотор, такой как промотор гена *tet*, промотор гена *hsp70* и синтетический промотор, регулируемый CRE. В определенных вариантах осуществления промоторы, специфические в отношении типа клеток, применяют для управления экспрессией факторов перепрограммирования в конкретных типах клеток. Примеры подходящих промоторов, специфических в отношении типа клеток, применимых для способов, описанных в данном документе, включают без ограничения синтетический промотор, специфический в отношении макрофагов, описанный в He et al (2006), *Human Gene Therapy* 17:949-959; промоторы гена лизоцима M, специфические в отношении гранулоцитов и макрофагов (см., например, Faust et al (2000), *Blood* 96(2):719-726); и миелоид-специфический промотор гена CD11b (см., например, Dziennis et al (1995), *Blood* 85(2):319-329). Другие примеры промоторов, которые можно использовать, включают промотор гена фактора элонгации EF1 α человека, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса CMV, промотор гена альбумина CAG курицы, вирусный промотор, ассоциированный с любым из вирусных векторов, описанных в данном документе, или промотор, который является гомологичным промоторам, описанным в данном документе (например, от другого вида). Примеры прокариотических промоторов, которые можно применять, включают без ограничения промоторы SP6, T7, T5, *tac*, *bla*, *trp*, *gal*, *lac* или мальтозы.

[0227] В некоторых вариантах осуществления элемент сайтов внутренней посадки рибосомы (IRES) может применяться для получения мультигенных, или полицистронных, транскриптов. Элементы IRES способны обходить модель сканирующей рибосомы при трансляции, зависимой от 5'-метилированного кэпа, и начинать трансляцию во внутренних сайтах (Pelletier and Sonenberg, *Nature* 334(6180):320-325 (1988)). Были описаны элементы IRES от двух представителей семейства пикорнавирусов (вызывающих полиомиелит и энцефаломиокардит) (Pelletier and Sonenberg, *Nature* 334(6180):320-325 (1988)), а также IRES из транскрипта млекопитающего (Macejak & Samow, *Nature* 353:90-94 (1991)). Элементы IRES могут быть связаны с гетерологичными открытыми рамками

считывания. Несколько открытых рамок считывания могут транскрибироваться вместе, при этом каждая отделяется с помощью IRES, что приводит к получению полицистронных транскриптов. Благодаря элементу IRES каждая открытая рамка считывания является доступной для рибосом для эффективной трансляции. Несколько генов можно эффективно экспрессировать с применением одного промотора/энхансера для транскрипции единого транскрипта (см. патенты США № 5925565 и 5935819, включенные в данный документ посредством ссылки).

[0228] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность функционально связана с последовательностью полиаденилирования. Подходящие последовательности полиаденилирования включают сигнал поли-А бычьего гормона роста (bGHpolyA) и короткий сигнал поли-А. Необязательно векторы на основе гAAV по настоящему изобретению содержат посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий продукты гена, соединенные последовательностями, включает так называемый саморасщепляющийся пептид, например, пептиды P2A.

[0229] В некоторых вариантах осуществления продукт гена предусматривает сайт-специфическую эндонуклеазу, которая обеспечивает сайт-специфический нокаут функции гена, например, где эндонуклеаза осуществляет нокаут аллеля, ассоциированного с сердечным заболеванием или нарушением. Например, если доминантный аллель кодирует дефектную копию гена, который в состоянии дикого типа представляет собой структурный белок сердца и/или обеспечивает нормальную функцию сердца, сайт-специфическая эндонуклеаза может быть нацелена на дефектный аллель и осуществлять нокаут дефектного аллеля. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическая эндонуклеаза представляет собой РНК-направляемую эндонуклеазу.

[0230] В дополнение к нокауту дефектного аллеля сайт-специфическая нуклеаза может применяться для стимуляции гомологичной рекомбинации с донорной ДНК, которая кодирует функциональную копию белка, кодируемого дефектным аллелем. Например, заявленный вирион гAAV можно применять для доставки как сайт-специфической эндонуклеазы, которая осуществляет нокаут

дефектного аллеля, так и функциональной копии дефектного аллеля (или его фрагмента), что приводит к репарации дефектного аллеля, тем самым обеспечивая получение функционального сердечного белка (например, функционального тропонина и т. д.). В некоторых вариантах осуществления заявленный вирион гAAV содержит гетерологичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует сайт-специфическую эндонуклеазу, и гетерологичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональную копию дефектного аллеля, где функциональная копия кодирует функциональный сердечный белок. Функциональные сердечные белки включают, например, тропонин, канал хлоридных ионов и т. п.

[0231] Сайт-специфические эндонуклеазы, которые подходят для применения, включают, например, нуклеазы типа «цинковых пальцев» (ZFN); мегануклеазы и эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), при этом такие сайт-специфические эндонуклеазы являются не встречающимися в природе и модифицированы для нацеливания на конкретный ген. Такие сайт-специфические нуклеазы могут быть сконструированы для разрезания конкретных местоположений в пределах генома, а затем негомологичное соединение концов может осуществить репарацию разрыва при одновременной вставке или делеции нескольких нуклеотидов. Такие сайт-специфические эндонуклеазы (также называемые «INDEL») в таком случае приводят к сдвигу рамки считывания белка и эффективно осуществляют нокаут гена. См., например, публикацию заявки на патент США № 2011/0301073. Подходящие сайт-специфические эндонуклеазы включают сконструированные с получением сконструированных мегануклеаз, повторно сконструированных хоминг-эндонуклеаз. Подходящие эндонуклеазы включают нуклеазу I-TevI. Подходящие мегануклеазы включают I-SceI (см., например, Bellaïche et al. (1999) *Genetics* 152: 1037) и I-CreI (см., например, Heath et al. (1997) *Nature Structural Biology* 4:468). Сайт-специфические эндонуклеазы, которые подходят для применения, включают системы CRISPRi и систему SAM на основе Cas9.

[0232] В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой РНК-направляемую эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления

продукт гена предусматривает РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемую эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой направляющую РНК, например, единую направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления продукты гена представляют собой 1) направляющую РНК; и 2) РНК-направляемую эндонуклеазу. Направляющая РНК может содержать а) белок-связывающую область, которая связывается с РНК-направляемой эндонуклеазой; и б) область, которая связывается с нуклеиновой кислотой-мишенью. РНК-направляемая эндонуклеаза в данном документе также называется «редактирующей геном нуклеазой».

[0233] Примеры подходящих редактирующих геном нуклеаз представляют собой эндонуклеазы CRISPR/Cas (например, эндонуклеазы CRISPR/Cas класса 2, такие как эндонуклеазы CRISPR/Cas типа II, типа V или типа VI). Подходящая редактирующая геном нуклеаза представляет собой эндонуклеазу CRISPR/Cas (например, эндонуклеазу CRISPR/Cas класса 2, такую как эндонуклеаза CRISPR/Cas типа II, типа V или типа VI). В некоторых вариантах осуществления продукт гена предусматривает эндонуклеазу CRISPR/Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления продукт гена предусматривает эндонуклеазу CRISPR/Cas класса 2 типа II (например, белок Cas9). В некоторых вариантах осуществления продукт гена предусматривает эндонуклеазу CRISPR/Cas класса 2 типа V (например, белок Cpf1, белок C2c1 или белок C2c3). В некоторых вариантах осуществления продукт гена предусматривает эндонуклеазу CRISPR/Cas класса 2 типа VI (например, белок C2c2; также называемый белком «Cas13a»). В некоторых вариантах осуществления продукт гена предусматривает белок CasX. В некоторых вариантах осуществления продукт гена предусматривает белок CasY.

Способы применения

[0234] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены способы идентификации капсидных белков AAV, которые обеспечивают вирионам гAAV повышенную эффективность трансдукции в клетках-мишенях. Способы включают обеспечение популяции вирионов гAAV, геномы гAAV которых содержат библиотеку полинуклеотидов *cap*, кодирующих варианты

капсидных белков AAV; необязательно приведение популяции в контакт с клетками, отличными от клеток-мишеней, в течение промежутка времени, достаточного для обеспечения прикрепления нежелательных вирионов гAAV к клеткам, отличным от клеток-мишеней; приведение популяции в контакт с клетками-мишенями в течение промежутка времени, достаточного для обеспечения трансдукции полинуклеотида *cap* в клетки-мишени с помощью вирионов гAAV; и секвенирование полинуклеотидов *cap* из клеток-мишеней, тем самым идентифицируя капсидные белки AAV, которые обеспечивают повышенную эффективность трансдукции в клетках-мишенях. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает истощение популяции вирионов гAAV путем приведения популяции в контакт с клетками, отличными от клеток-мишеней, в течение промежутка времени, достаточного для обеспечения прикрепления вирионов гAAV к клеткам, отличным от клеток-мишеней,. Неограничивающие примеры таких способов идентификации представлены в примерах.

[0235] В настоящем изобретении предусмотрены способы получения кардиомиоцитов и/или клеток, подобных кардиомиоцитам, *in vitro* с применением вириона гAAV. Выбранные исходные клетки подвергают трансдукции с помощью гAAV и необязательно подвергают воздействию низкомолекулярных факторов перепрограммирования (до, во время или после трансдукции) в течение промежутка времени и в условиях, достаточных для превращения исходных клеток внутри линий дифференцировки и/или пределов дифференцировки с образованием сердечных клеток-предшественников и/или кардиомиоцитов. В некоторых вариантах осуществления исходные клетки представляют собой клетки-фибробласты. В некоторых вариантах осуществления исходные клетки экспрессируют один или более маркеров, указывающих на дифференцированный фенотип. Время для превращения исходных клеток в сердечные клетки-предшественники и кардиомиоциты может меняться. Например, исходные клетки можно инкубировать после обработки одним или более представляющими интерес полинуклеотидами или белками до тех пор, пока не будут экспрессироваться маркеры сердечных клеток или кардиомиоцитов. Такие маркеры клеток сердца или кардиомиоцитов могут включать любые из следующих маркеров: α -GATA4, TNNT2, MYH6, RYR2, NKX2-5, MEF2C, ANP, актинин, MLC2v, MY20, cMHC, ISL1, cTNT, cTNI и MLC2a или

любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления клетки, представляющие собой индуцированные кардиомиоциты, являются отрицательными в отношении одного или более маркеров нейрональных клеток. Такие маркеры нейрональных клеток могут включать любые из следующих маркеров: DCX, TUBB3, MAP2 и ENO2.

[0236] Инкубирование может продолжаться до тех пор, пока исходные клетки не будут экспрессировать маркеры сердечных клеток-предшественников. Такие маркеры сердечных клеток-предшественников включают GATA4, TNNT2, MYH6, RYR2 или их комбинацию. Маркеры сердечных клеток-предшественников, такие как GATA4, TNNT2, MYH6, RYR2 или их комбинация, могут экспрессироваться через приблизительно 8 дней, или через приблизительно 9 дней, или через приблизительно 10 дней, или через приблизительно 11 дней, или через приблизительно 12 дней, или через приблизительно 14 дней, или через приблизительно 15 дней, или через приблизительно 16 дней, или через приблизительно 17 дней, или через приблизительно 18 дней, или через приблизительно 19 дней, или через приблизительно 20 дней после начала инкубирования клеток в композициях, описанных в данном документе. Дополнительное инкубирование клеток можно выполнять до тех пор, пока не будет наблюдаться экспрессия маркеров сердечных клеток-предшественников поздней стадии, таких как NKX2-5, MEF2C или их комбинация.

[0237] Эффективность перепрограммирования можно измерять как функцию маркеров кардиомиоцитов. Такие маркеры плюрипотентности включают без ограничения экспрессию маркерных белков и мРНК кардиомиоцитов, морфологию и электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов. Неограничивающие примеры маркеров кардиомиоцитов включают α -саркогликан, предсердный натрийуретический пептид (ANP), костный морфогенетический белок 4 (BMP4), коннексин 37, коннексин 40, сурто, десмин, GATA4, GATA6, MEF2C, MYH6, тяжелую цепь миозина, NKX2.5, TBX5 и тропонин T.

[0238] Экспрессию различных маркеров, специфических в отношении кардиомиоцитов, можно определять с помощью традиционных биохимических или иммунохимических способов (например, твердофазного иммуноферментного

анализа, иммуногистохимического анализа и т. п.). В качестве альтернативы можно оценивать экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей кардиомиоцит-специфический маркер. Экспрессию нуклеиновых кислот, кодирующих кардиомиоцит-специфические маркеры, в клетке можно подтверждать с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR) или анализа гибридизации, молекулярно-биологических способов, которые широко применялись в прошлом для амплификации, выявления и анализа мРНК, кодирующей любые маркерные белки. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие маркеры, специфические в отношении кардиомиоцитов, являются известными и доступны благодаря открытым базам данных, таким как GenBank. Таким образом, легко определить маркер-специфические последовательности, необходимые для применения в качестве праймеров или зондов.

[0239] Кардиомиоциты демонстрируют некоторые электрофизиологические свойства, специфические в отношении сердца. Одна электрическая характеристика представляет собой потенциал действия, который представляет собой краткосрочное явление, при котором разница потенциала между внутренней и внешней средой каждой клетки сердца повышается и снижается, следуя постоянной траектории. Еще одна электрофизиологическая характеристика кардиомиоцитов представляет собой циклические вариации концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле, называемые транзиентами Ca^{2+} , которые используются в регуляции сокращения и расслабления кардиомиоцитов. Данные характеристики можно выявлять и определять для оценки того, была ли популяция клеток перепрограммирована в кардиомиоциты.

[0240] В настоящем изобретении предусмотрен способ доставки продукта гена в клетку сердца, например, в сердечный фибробласт. Способы в целом включают инфицирование клетки сердца (например, сердечного фибробласта) с помощью вируса гAAV, где продукт(-ы) гена, кодируемый(-ые) гетерологичной нуклеиновой кислотой, присутствующей в вирусе гAAV, продуцируется(-ются) в клетке сердца (например, сердечном фибробласте). Доставка продукта(-ов) гена в клетку сердца (например, сердечный фибробласт) может обеспечивать лечение сердечного заболевания или нарушения. Доставка продукта(-ов) гена в клетку

сердца (например, сердечный фибробласт) может обеспечивать получение индуцированной клетки, подобной кардиомиоциту (iCM), из сердечного фибробласта. Доставка продукта(-ов) гена в клетку сердца (например, сердечный фибробласт) может обеспечивать редактирование генома клетки сердца (например, сердечного фибробласта).

[0241] В некоторых вариантах осуществления инфицирование или трансдукцию клетки сердца (например, сердечного фибробласта) выполняют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления инфицирование или трансдукцию клетки сердца (например, сердечного фибробласта) выполняют *in vitro* и инфицированную/трансдуцированную клетку сердца (например, сердечный фибробласт) вводят (например, вводят посредством трансфузии или имплантируют) индивидууму, нуждающемуся в этом, например, непосредственно в ткань сердца индивидуума, нуждающегося в этом. Для трансдукции *in vitro* эффективное количество вирионов rAAV, подлежащих доставке в клетки, составляет от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{13} вирионов rAAV. Другие эффективные дозы может с легкостью установить специалист средней квалификации в данной области путем обычных испытаний, в которых устанавливают кривые зависимости «доза-эффект».

[0242] В некоторых вариантах осуществления инфицирование клетки сердца (например, сердечного фибробласта) выполняют *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона rAAV по настоящему изобретению вводят непосредственно в ткань сердца индивидуума, нуждающегося в этом. «Эффективное количество» будет попадать в относительно широкий диапазон, который может быть определен посредством эксперимента и/или клинических испытаний. Например, для инъекции *in vivo*, т. е. инъекции непосредственно в ткань сердца, терапевтически эффективная доза будет составлять порядка от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^{15} вирионов rAAV, например, от приблизительно 10^5 до 10^{12} вирионов rAAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона rAAV по настоящему изобретению вводят путем интрамиокардиальной инъекции через эпикард. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона

гAAV по настоящему изобретению вводят путем сосудистой доставки через коронарную артерию. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через верхнюю полую вену. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через периферическую вену.

[0243] Например, от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^5 , от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^6 , от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^7 , от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^7 , от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 , от приблизительно 10^8 до приблизительно 10^9 , от приблизительно 10^9 до приблизительно 10^{10} , от приблизительно 10^{10} до приблизительно 10^{11} , до приблизительно 10^{11} , от приблизительно 10^{11} до приблизительно 10^{12} , от приблизительно 10^{12} до приблизительно 10^{13} , от приблизительно 10^{13} до приблизительно 10^{14} , от приблизительно 10^{14} до приблизительно 10^{15} копий генома или более 10^{15} копий генома вириона гAAV по настоящему изобретению вводят индивидууму, например, вводят непосредственно в ткань сердца индивидуума или вводят другим путем. Число вирионов гAAV, которые вводят индивидууму, может выражаться в вирусных геномах (vg) на килограмм (кг) веса тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению составляет от приблизительно 10^2 vg/кг до 10^4 vg/кг, от приблизительно 10^4 vg/кг до приблизительно 10^6 vg/кг, от приблизительно 10^6 vg/кг до приблизительно 10^8 vg/кг, от приблизительно 10^8 vg/кг до приблизительно 10^{10} vg/кг, от приблизительно 10^{10} vg/кг до приблизительно 10^{12} vg/кг, от приблизительно 10^{12} vg/кг до приблизительно 10^{14} vg/кг, от приблизительно 10^{14} vg/кг до приблизительно 10^{16} vg/кг, от приблизительно 10^{16} vg/кг до приблизительно 10^{18} vg/кг или более 10^{18} vg/кг.

[0244] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем интрамиокардиальной инъекции через эпикард. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем сосудистой

доставки через коронарную артерию. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через верхнюю полую вену. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через периферическую вену.

[0245] В некоторых вариантах осуществления для достижения необходимого уровня экспрессии гена можно использовать более одного введения (например, два, три, четыре или более введений). В некоторых вариантах осуществления более одного введения осуществляют через различные промежутки времени, например, каждый день, каждую неделю, два раза в месяц, один раз в месяц, каждые 3 месяца, каждые 6 месяцев, один раз в год и т. д. В некоторых вариантах осуществления несколько введений осуществляют на протяжении периода времени, составляющего от 1 месяца до 2 месяцев, от 2 месяцев до 4 месяцев, от 4 месяцев до 8 месяцев, от 8 месяцев до 12 месяцев, от 1 года до 2 лет, от 2 лет до 5 лет или более 5 лет.

[0246] В настоящем изобретении предусмотрен способ перепрограммирования сердечного фибробласта с получением индуцированной клетки, подобной кардиомиоциту (iCM). Способ в целом предусматривает инфицирование сердечного фибробласта с помощью вириона гAAV по настоящему изобретению, где вирион гAAV содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более факторов перепрограммирования.

[0247] Экспрессию различных маркеров, специфических в отношении кардиомиоцитов, определяют с помощью традиционных биохимических или иммунохимических способов (например, твердофазного иммуноферментного анализа, иммуногистохимического анализа и т. п.). В качестве альтернативы можно оценивать экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей кардиомиоцит-специфический маркер. Экспрессию нуклеиновых кислот, кодирующих кардиомиоцит-специфические маркеры, в клетке можно подтверждать с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR) или анализа гибридизации, молекулярно-биологических способов, которые широко применялись в прошлом для амплификации, выявления и анализа мРНК,

кодирующей любые маркерные белки. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие маркеры, специфические в отношении кардиомиоцитов, являются известными и доступны благодаря открытым базам данных, таким как GenBank; таким образом, легко определить маркер-специфические последовательности, необходимые для применения в качестве праймеров или зондов.

[0248] Индуцированные кардиомиоциты могут также демонстрировать спонтанное сокращение. Демонстрирует ли индуцированный кардиомиоцит спонтанное сокращение, можно определять с применением стандартных электрофизиологических способов (например, фиксации потенциала).

[0249] В некоторых вариантах осуществления индуцированные кардиомиоциты могут демонстрировать спонтанные колебания Ca^{2+} . Колебания Ca^{2+} можно определять с применением стандартных способов, например, с применением любого из ряда кальций-чувствительных красителей, при этом красители для выявления внутриклеточных ионов Ca^{2+} включают без ограничения fura-2, bis-fura 2, indo-1, Quin-2, Quin-2 AM, Benzothiaza-1, Benzothiaza-2, indo-5F, Fura-FF, BTC, Mag-Fura-2, Mag-Fura-5, Mag-Indo-1, fluo-3, rhod-2, rhod-3, fura-4F, fura-5F, fura-6F, fluo-4, fluo-5F, fluo-5N, Oregon Green 488 BAPTA, Calcium Green, кальцеин, Fura-C18, Calcium Green-C18, Calcium Orange, Calcium Crimson, Calcium Green-5N, Magnesium Green, Oregon Green 488 BAPTA-1, Oregon Green 488 BAPTA-2, X-rhod-1, Fura Red, Rhod-5F, Rhod-5N, X-Rhod-5N, Mag-Rhod-2, Mag-X-Rhod-1, Fluo-5N, Fluo-5F, Fluo-4FF, Mag-Fluo-4, экворин, конъюгаты декстрана или любые другие производные любого из данных красителей и др. (см., например, каталог или сайт в интернете компании Molecular Probes, Юджин, см. также Nuccitelli, ed., *Methods in Cell Biology*, Volume 40: A Practical Guide to the Study of Calcium in Living Cells, Academic Press (1994); Lambert, ed., *Calcium Signaling Protocols (Methods in Molecular Biology Volume 114)*, Humana Press (1999); W. T. Mason, ed., *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis*, Second Ed, Academic Press (1999); *Calcium Signaling Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 2005, D.G. Lamber, ed., Humana Press).

[0250] В некоторых вариантах осуществления iCM получают *in vitro* и iCM вводят индивидууму, например, iCM имплантируют в ткань сердца индивидуума,

нуждающегося в этом. Способ по настоящему изобретению может включать инфицирование популяции сердечных фибробластов *in vitro* с получением популяции iCM; и популяцию iCM имплантируют в ткань сердца индивидуума, нуждающегося в этом.

[0251] В некоторых вариантах осуществления iCM получают *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления вирион гAAV по настоящему изобретению, который содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более факторов перепрограммирования, вводят индивидууму. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV вводят непосредственно в ткань сердца индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^5 , от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 , от приблизительно 10^9 до приблизительно 10^{10} , от приблизительно 10^{10} до приблизительно 10^{11} , от приблизительно 10^{11} до приблизительно 10^{12} , от приблизительно 10^{12} до приблизительно 10^{13} , от приблизительно 10^{13} до приблизительно 10^{14} , от приблизительно 10^{14} до приблизительно 10^{15} копий генома или более 10^{15} копий генома вириона гAAV по настоящему изобретению, который содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более факторов перепрограммирования, вводят индивидууму, например, вводят непосредственно в ткань сердца индивидуума или посредством другого пути введения. Число вирионов гAAV, которые вводят индивидууму, может выражаться в вирусных геномах (vg) на килограмм (кг) веса тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению составляет от приблизительно 10^2 vg/кг до 10^4 vg/кг, от приблизительно 10^4 vg/кг до приблизительно 10^6 vg/кг, от приблизительно 10^6 vg/кг до приблизительно 10^8 vg/кг, от приблизительно 10^8 vg/кг до приблизительно 10^{10} vg/кг, от приблизительно 10^{10} vg/кг до приблизительно 10^{12} vg/кг, от приблизительно 10^{12} vg/кг до приблизительно 10^{14} vg/кг, от приблизительно 10^{14} vg/кг до приблизительно 10^{14} vg/кг, от приблизительно 10^{14} vg/кг до приблизительно 10^{16} vg/кг или более 10^{16} vg/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем интрамиокардиальной инъекции через эпикард. В некоторых вариантах

осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем сосудистой доставки через коронарную артерию. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через верхнюю полую вену. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через периферическую вену.

[0252] В настоящем изобретении предусмотрен способ модифицирования («редактирования») генома клетки сердца. В настоящем изобретении предусмотрен способ модифицирования («редактирования») генома сердечного фибробласта. В настоящем изобретении предусмотрен способ модифицирования («редактирования») генома кардиомиоцита. Способы в целом предусматривают инфицирование клетки сердца (например, сердечного фибробласта или кардиомиоцита) с помощью вириона гAAV по настоящему изобретению, где вирион гAAV содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, редактирующую геном. В некоторых вариантах осуществления способ включает инфицирование сердечного фибробласта или кардиомиоцита с помощью вириона гAAV по настоящему изобретению, где вирион гAAV содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемую редактирующую геном эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления способ включает инфицирование сердечного фибробласта или кардиомиоцита с помощью вириона гAAV по настоящему изобретению, где вирион гAAV содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую i) РНК-направляемую редактирующую геном эндонуклеазу и ii) одну или более направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления способ включает инфицирование сердечного фибробласта или кардиомиоцита с помощью вириона гAAV по настоящему изобретению, где вирион гAAV содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую i) РНК-направляемую редактирующую геном эндонуклеазу; ii) направляющие РНК и iii) донорную матричную ДНК. Подходящие РНК-направляемые редактирующие геном эндонуклеазы описаны выше.

[0253] В некоторых вариантах осуществления инфицирование клетки сердца (например, сердечного фибробласта; кардиомиоцита) выполняют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления инфицирование клетки сердца (например, сердечного фибробласта; кардиомиоцита) выполняют *in vitro* и инфицированную клетку сердца (например, сердечный фибробласт) вводят (например, имплантируют) индивидууму, нуждающемуся в этом, например, непосредственно в ткань сердца индивидуума, нуждающегося в этом. Для трансдукции *in vitro* эффективное количество вирионов гAAV, подлежащее доставке в клетки, будет составлять порядка от приблизительно 10^8 до приблизительно 10^{13} вирионов гAAV. Другие эффективные дозы может с легкостью установить специалист средней квалификации в данной области путем обычных испытаний, в которых устанавливают кривые зависимости «доза-эффект».

[0254] В некоторых вариантах осуществления инфицирование клетки сердца (например, сердечного фибробласта; кардиомиоцита) выполняют *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят непосредственно в ткань сердца индивидуума, нуждающегося в этом. «Эффективное количество» будет попадать в относительно широкий диапазон, который может быть определен посредством эксперимента и/или клинических испытаний. Например, для инъекции *in vivo*, т. е. инъекции непосредственно в ткань сердца, терапевтически эффективная доза будет составлять порядка от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^{15} вирионов гAAV, например, от приблизительно 10^{11} до 10^{12} вирионов гAAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем интрамиокардиальной инъекции через эпикард. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем сосудистой доставки через коронарную артерию. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через верхнюю полую вену. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через периферическую вену.

[0255] Например, от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^7 , от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 , от приблизительно 10^8 до приблизительно 10^9 , от приблизительно 10^9 до приблизительно 10^{10} , от приблизительно 10^{10} до приблизительно 10^{11} , от приблизительно 10^{11} до приблизительно 10^{12} , от приблизительно 10^{12} до приблизительно 10^{13} , от приблизительно 10^{13} до приблизительно 10^{14} , от приблизительно 10^{14} до приблизительно 10^{15} копий генома или более 10^{15} копий генома вириона гAAV по настоящему изобретению вводят индивидууму, например, вводят непосредственно в ткань сердца индивидуума. Число вирионов гAAV, которые вводят индивидууму, может выражаться в вирусных геномах (vg) на килограмм (кг) веса тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению составляет от приблизительно 10^2 vg/кг до 10^4 vg/кг, от приблизительно 10^4 vg/кг до приблизительно 10^6 vg/кг, от приблизительно 10^6 vg/кг до приблизительно 10^8 vg/кг, от приблизительно 10^8 vg/кг до приблизительно 10^{10} vg/кг, от приблизительно 10^{10} vg/кг до приблизительно 10^{12} vg/кг, от приблизительно 10^{12} vg/кг до приблизительно 10^{14} vg/кг, от приблизительно 10^{14} vg/кг до приблизительно 10^{16} vg/кг, от приблизительно 10^{16} vg/кг до приблизительно 10^{18} vg/кг или более 10^{18} vg/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем интрамиокардиальной инъекции через эпикард. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем сосудистой доставки через коронарную артерию. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через верхнюю полую вену. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вириона гAAV по настоящему изобретению вводят путем системной доставки через периферическую вену.

[0256] В некоторых вариантах осуществления редактирование генома включает репарацию, направляемую гомологией (HDR). В некоторых вариантах осуществления HDR приводит к коррекции дефекта в эндогенной нуклеиновой кислоте-мишени в сердечном фибробласте или кардиомиоците, где дефект ассоциирован с дефектом в структуре и/или функции сердечного фибробласта, или

кардиомиоцита, или компонента сердечного фибробласта или кардиомиоцита, или приводит к нему.

[0257] В некоторых вариантах осуществления редактирование генома включает негомологичное соединение концов (NHEJ). В некоторых вариантах осуществления NHEJ приводит к удалению дефекта в эндогенной нуклеиновой кислоте-мишени в сердечном фибробласте или кардиомиоците, где дефект ассоциирован с дефектом в структуре и/или функции сердечного фибробласта, или кардиомиоцита, или компонента сердечного фибробласта или кардиомиоцита, или приводит к нему.

[0258] Способ по настоящему изобретению для редактирования генома клетки сердца можно применять для коррекции любого из множества генетических дефектов, которые дают начало сердечному заболеванию или нарушению. Представляющие интерес мутации включают мутации в одном или более из следующих генов: сердечного тропонина Т (TNNT2); тяжелой цепи миозина (MYH7); тропомиозина 1 (TPM1); миозин-связывающего белка С (MYBPC3); гамма-субъединицы 5'-АМР-активируемой протеинкиназы 2 (PRKAG2); тропонина I типа 3 (TNNI3); титина (TTN); легкой цепи миозина 2 (MYL2); альфа-актина 1 сердечной мышцы (ACTC1); представителя 1 KQT-подобного подсемейства калиевых потенциалзависимых каналов (KCNQ1); плакофилина 2 (PKP2); энхансерного фактора 2с миоцитов (MEF2C) и сердечного белка LIM (CSRП3). Конкретные представляющие интерес мутации включают без ограничения мутацию R663H MYH7; R173W TNNT2; мутацию 2013delC PKP2; мутацию Q617X PKP2 и миссенс-мутацию G269S KCNQ1. Представляющие интерес мутации включают мутации в одном или более из следующих генов: MYH6, ACTN2, SERCA2, GATA4, TBX5, MYOCD, NKX2-5, NOTCH1, MEF2C, HAND2 и HAND1. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес мутации включают мутации в следующих генах: MEF2C, TBX5 и MYOCD. Сердечные заболевания и нарушения, которые можно лечить с помощью способа по настоящему изобретению, включают коронарное заболевание сердца, кардиомиопатию, эндокардит, врожденные сердечно-сосудистые дефекты и застойную сердечную недостаточность. Сердечные заболевания и нарушения, которые можно лечить с помощью способа по

настоящему изобретению, включают гипертрофическую кардиомиопатию; порок клапана сердца; инфаркт миокарда; застойную сердечную недостаточность; синдром удлиненного интервала QT; предсердную аритмию; желудочковую аритмию; диастолическую сердечную недостаточность; систолическую сердечную недостаточность; клапанную болезнь сердца; кальцификацию сердечного клапана; некомпактность левого желудочка сердца; дефект межжелудочковой перегородки и ишемию.

Способы лечения

[0259] В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения патологии сердца у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей вирион rAAV, где вирион rAAV осуществляет трансдукцию ткани сердца.

[0260] Субъекты, нуждающиеся в лечении с применением композиций и способов по настоящему изобретению, включают без ограничения индивидуумов с врожденным пороком сердца, индивидуумов, страдающих дегенеративным мышечным заболеванием, индивидуумов, страдающих состоянием, которое приводит к ишемии тканей сердца (например, индивидуумов с заболеванием коронарных артерий) и т. п. В некоторых примерах способ применим для лечения дегенеративного мышечного заболевания или состояния (например, семейной кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, гипертрофической кардиомиопатии, рестриктивной кардиомиопатии или заболевания коронарных артерий с развитием в его результате ишемической кардиомиопатии). В некоторых примерах рассматриваемый способ применим для лечения индивидуумов, имеющих сердечное или сердечно-сосудистое заболевание или нарушение, например, сердечное-сосудистое заболевание, аневризму, стенокардию, аритмию, атеросклероз, нарушение мозгового кровообращения (инсульт), цереброваскулярное заболевание, врожденный порок сердца, застойную сердечную недостаточность, миокардит, поражение клапанов сердца, заболевание коронарных артерий, дилатационную диастолическую дисфункцию, эндокардит, высокое кровяное давление (гипертензию), кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию,

рестриктивную кардиомиопатию, заболевание коронарных артерий с развитием в его результате ишемической кардиомиопатии, пролапс митрального клапана, инфаркт миокарда (сердечный приступ) или венозную тромбоэмболию.

[0261] Субъектов, которые подходят для лечения с применением композиций, клеток и способов по настоящему изобретению, включают индивидуумов (например, субъектов-млекопитающих, таких как люди, отличные от человека приматы, домашние млекопитающие, экспериментальные отличные от человека субъекты-млекопитающие, такие как мыши, крысы и т. д.) с сердечным состоянием, включая с ограничением состояние, которое приводит к ишемии ткани сердца (например, индивидуумы с заболеванием коронарных артерий) и т. п.

[0262] В некоторых примерах индивидуум, который подходит для лечения, страдает сердечным или сердечно-сосудистым заболеванием или состоянием, например, сердечно-сосудистым заболеванием, аневризмой, стенокардией, аритмией, атеросклерозом, нарушением мозгового кровообращения (инсультом), цереброваскулярным заболеванием, врожденным пороком сердца, застойной сердечной недостаточностью, миокардитом, поражением клапанов сердца, заболеванием коронарных артерий, дилатационной диастолической дисфункцией, эндокардитом, высоким кровяным давлением (гипертензией), кардиомиопатией, гипертрофической кардиомиопатией, рестриктивной кардиомиопатией, заболеванием коронарных артерий с развитием в его результате ишемической кардиомиопатии, пролапсом митрального клапана, инфарктом миокарда (сердечным приступом) или венозной тромбоэмболией. В некоторых примерах индивидуумы, которые подходят для лечения с помощью заявленного способа, включают индивидуумов, которые имеют дегенеративное мышечное заболевание, например, семейную кардиомиопатию, дилатационную кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, рестриктивную кардиомиопатию или заболевание коронарных артерий с развитием в его результате ишемической кардиомиопатии.

[0263] Например, патология сердца может быть выбрана из группы, состоящей из застойной сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, ишемии сердца, миокардита и аритмии. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется диабет. В некоторых вариантах осуществления у субъекта отсутствует

диабет. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает диабетической кардиомиопатией.

[0264] Для терапии вирионы гAAV по настоящему изобретению и/или фармацевтические композиции на их основе можно вводить местно или системно. Вирион гAAV можно вводить с помощью инъекции, катетера, имплантируемого устройства и т.п. Вирион гAAV можно вводить в любом физиологически приемлемом вспомогательном веществе или носителе, которые не оказывают неблагоприятного влияния на клетки. Например, вирионы гAAV по настоящему изобретению и/или фармацевтические композиции на их основе можно вводить внутривенно или посредством внутрисердечного пути (например, эпикардиально или интрамиокардиально). Способы введения вирионов гAAV по настоящему изобретению и/или фармацевтических композиций на их основе субъектам, в частности, субъектам-людям, включают инъекцию или инфузию фармацевтических композиций (например, композиций, содержащих вирионы гAAV). Инъекция может включать непосредственную внутримышечную инъекцию и инфузия может включать внутрисосудистую инфузию. Вирионы гAAV или фармацевтические композиции могут быть внесены в устройство для доставки, которое облегчает введение путем инъекции в организм субъектов. Такие устройства для доставки включают трубки, например, катетеры, для инъекции клеток и жидкостей в тело субъекта-реципиента. Трубки могут дополнительно включать иглу, например, шприц, через которую клетки по настоящему изобретению можно вводить субъекту в требуемое местоположение.

[0265] В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV вводят посредством подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутрибрюшинной или внутрисердечной инъекции или путем внутрисердечной катетеризации. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV вводят путем прямой интрамиокардиальной инъекции или трансваскулярного введения. В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV вводят путем прямой интрамиокардиальной инъекции, антеградной внутрикоронарной инъекции, ретроградной инъекции, трансэндомиокардиальной инъекции или молекулярного хирургического вмешательства на сердце с рециркулирующей доставкой (MCARD).

[0266] Вирионы гAAV могут быть внесены в такое устройство для доставки, например, шприц, в различных формах. Вирион гAAV может обеспечиваться в форме фармацевтической композиции. Такая композиция может включать изотоническое вспомогательное вещество, полученное в достаточной степени стерильных условиях для введения человеку. Для получения информации об общих принципах составления лекарственных препаратов читателю следует обратиться к *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; и *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000. Выбор вспомогательного вещества и любых сопутствующих составляющих композиции может быть адаптирован для оптимизации введения с помощью используемого пути и/или устройства.

[0267] Рекомбинантный AAV можно вводить местно или системно. Рекомбинантный AAV может быть сконструирован для нацеливания на специфические типы клеток путем выбора соответствующего капсидного белка по настоящему изобретению. Для определения пригодности различных терапевтических схем введения и доз композиций на основе вириона AAV вирионы гAAV сначала можно тестировать на подходящей животной модели. На одном уровне рекомбинантные AAV оценивают в отношении их способности инфицировать клетки-мишени *in vivo*. Рекомбинантный AAV также можно оценивать, чтобы выяснить, мигрирует ли он к тканям-мишеням, индуцируют ли они иммунный ответ у хозяина, или для определения соответствующего числа или дозы вирионов гAAV, подлежащих введению. Способность вызывать иммунный ответ может быть желательной или нежелательной для рекомбинантного AAV в зависимости от заболевания, подлежащего лечению. В целом, если требуется повторное введение вириона, будет предпочтительно, если вирион не является иммуногенным. Для целей тестирования композиции на основе вириона гAAV можно вводить иммунодефицитным животным (таким как бестимусные мыши или животные, приведенные в иммунодефицитное состояние химическим путем или с помощью облучения). Ткани- или клетки-мишени можно собирать после периода инфицирования и подвергать оценке для определения, были ли ткани или клетки

инфицированы и был ли индуцирован требуемый фенотип (например, индуцированный кардиомиоцит) в ткани- или клетках-мишенях.

[0268] Вирионы рекомбинантного AAV можно вводить различными путями, в том числе без ограничения путем прямой инъекции в сердце или катетеризации сердца. В качестве альтернативы вирионы rAAV можно вводить системно, например, путем внутривенной инфузии. При использовании прямой инъекции ее можно выполнять либо путем хирургической операции на открытом сердце, либо путем минимально инвазивной хирургической операции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные вирусы доставляются в перикардальное пространство путем инъекции или инфузии. Вводимые посредством инъекции или инфузии рекомбинантные вирусы можно отследить различными способами. Например, рекомбинантный AAV, помеченный выявляемой меткой (такой как зеленый флуоресцентный белок или бета-галактозидаза) или экспрессирующей ее, может быть легко выявлен. Рекомбинантный AAV может быть сконструирован таким образом, чтобы он вызывал в клетке-мишени экспрессию маркерного белка, такого как белок, экспрессируемый на поверхности, или флуоресцентный белок. В качестве альтернативы инфицирование клеток-мишеней рекомбинантным AAV можно выявить по экспрессии ими клеточного маркера, который не экспрессируется у животного, используемого для тестирования (например, антигена, специфического для человека, при инъекции клеток экспериментальному животному). Наличие и фенотип клеток-мишеней можно оценить с помощью флуоресцентной микроскопии (например, в отношении зеленого флуоресцентного белка или бета-галактозидазы), с помощью иммуногистохимического анализа (например, с применением антитела к антигену человека), с помощью ELISA (с применением антитела к антигену человека) или с помощью анализа методом RT-PCR с применением праймеров и условий гибридизации, которые обуславливают специфичность амплификации в отношении РНК, указывающей на сердечный фенотип.

Фармацевтические композиции

[0269] В настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая вирион rAAV по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция может включать один или более из фармацевтически

приемлемого носителя, разбавителя, вспомогательного вещества и буфера. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или буфер подходят для применения у человека. Такие вспомогательные вещества, носители, разбавители и буферы включают любое фармацевтическое средство, которое можно вводить без излишней токсичности. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают без ограничения жидкости, такие как вода, солевой раствор, глицерин и этанол. В них могут быть включены фармацевтически приемлемые соли, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т. п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т. п. Кроме того, в таких средах-носителях могут присутствовать дополнительные вещества, такие как буферные вещества для поддержания pH. Самые различные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества известны из уровня техники и не требуют подробного обсуждения в данном документе. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества были подробно описаны в ряде публикаций, включая, например, A. Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (1999) H.C. Ansel et al., eds., 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; и *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

[0270] В случае необходимости или требований при подготовке композиции вирион rAAV получают и подвергают очистке. rAAV можно смешивать с фармацевтически приемлемым носителем или суспендировать в нем. Эти rAAV можно доводить до соответствующей концентрации и необязательно комбинировать с другими средствами. Концентрация вириона rAAV и/или другого средства, включенных в однократную дозу, может варьироваться в широких пределах. Доза и число введений могут быть оптимизированы специалистами в данной области. Например, могут быть введены приблизительно 10^2 – 10^{10} векторных геномов (vg). В некоторых вариантах осуществления доза будет составлять по меньшей мере приблизительно 10^2 vg, приблизительно 10^3 vg, приблизительно 10^4 vg, приблизительно 10^5 vg, приблизительно 10^6 vg, приблизительно 10^7 vg, приблизительно 10^8 vg, приблизительно 10^9 vg, приблизительно 10^{10} vg или более

векторных геномов. Суточные дозы соединений также могут варьироваться. Такие суточные дозы могут находиться в диапазоне, например, от по меньшей мере приблизительно 10^2 vg/день, приблизительно 10^3 vg/день, приблизительно 10^4 vg/день до приблизительно 10^5 vg/день, приблизительно 10^6 vg/день, приблизительно 10^7 vg/день, приблизительно 10^8 vg/день, приблизительно 10^9 vg/день, приблизительно 10^{10} vg/день или более векторных геномов в день.

[0271] В определенных вариантах осуществления способ лечения улучшен за счет введения одного или более противовоспалительных средств, например, противовоспалительного стероида или нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID).

[0272] Противовоспалительные стероиды для применения в настоящем изобретении включают кортикостероиды и, в частности, кортикостероиды с глюкокортикостероидной активностью, например, дексаметазон и преднизон. Нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) для применения в настоящем изобретении в целом действуют путем блокирования продуцирования простагландинов, которые вызывают воспаление и боль, циклооксигеназы-1 (COX-1) и/или циклооксигеназы-2 (COX-2). Традиционные NSAID воздействуют путем блокирования как COX-1, так и COX-2. Селективные ингибиторы COX-2 блокируют только фермент COX-2. В определенном варианте осуществления NSAID представляет собой селективный ингибитор COX-2, например, целекоксиб (Celebrex[®]), рофекоксиб (Vioxx) и валдекоксиб (Vextra). В определенных вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой ингибитор простагландина NSAID, например, пироксикам.

[0273] Количество вириона rAAV для применения в лечении будет варьироваться не только в зависимости от конкретного выбранного носителя, но также в зависимости от пути введения, природы состояния, подвергаемого лечению, а также возраста и состояния пациента. В конечном итоге лечащий врач может определить подходящую дозу. Фармацевтическая композиция может быть составлена при подходящем соотношении каждого соединения в единичной стандартной лекарственной форме для введения с клетками или без них. Клетки или

векторы можно обеспечивать по отдельности и можно либо смешивать с жидким раствором составной композиции, либо вводить по отдельности.

[0274] Рекомбинантный AAV может быть составлен для парентерального введения (например, введения путем инъекции, например, болюсной инъекции или непрерывной инфузии) и может быть представлен в стандартной лекарственной форме в ампулах, предварительно заполненных шприцах, контейнерах для инфузии малого объема или многодозовых контейнерах с добавленным консервантом. Фармацевтические композиции могут принимать форму суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных средах-носителях и могут содержать средства для составления, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Подходящие носители включают солевой раствор, фосфатно-солевой буфер и другие материалы, широко применяемые в данной области.

[0275] Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как средства, применимые для лечения сердечных заболеваний, состояний и повреждений, такие как, например, антикоагулянт (например, далтепарин (Fragmin), данапароид (Orgaran), эноксапарин (Lovenox), гепарин, тинзапарин (Innohep) и/или варфарин (Coumadin)), антиагрегантное средство (например, аспирин, тиклопидин, клопидогрел или дипиридамо), ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (например, беназеприл (Lotensin), каптоприл (Capoten), эналаприл (Vasotec), фозиноприл (Monopril), лизиноприл (Prinivil, Zestril), моэксиприл (Univasc), периндоприл (Aceon), хинаприл (Accupril), рамиприл (Altace) и/или трандолаприл (Mavik)), блокаторы рецептора ангиотензина II (например, кандесартан (Atacand), эпросартан (Teveten), ирбесартан (Avapro), лозартан (Cozaar), телмисартан (Micardis) и/или валсартан (Diovan)), бета-блокатор (например, ацебутолол (Sectral), атенолол (Tenormin), бетаксоллол (Kerlone), бисопролол/гидрохлоротиазид (Ziac), бисопролол (Zebeta), картеолол (Cartrol), метопролол (Lopressor, Toprol XL), надолол (Corgard), пропранолол (Inderal), соталол (Betapace) и/или тимолол (Blocadren)), блокаторы кальциевых каналов (например, амлодипин (Norvasc, Lotrel), бепридил (Vascor), дилтиазем (Cardizem, Tiazac), фелодипин (Plendil), нифедипин (Adalat, Procardia), нимодипин (Nimotop), нисолдипин (Sular), верапамил (Calan, Isoptin, Verelan), диуретики (например, амилорид (Midamor), буметанид (Bumex),

хлоротиазид (Diuril), хлорталидон (Hygroton), фуросемид (Lasix), гидрохлоротиазид (Esidrix, Hydrodiuril), индапамид (Lozol) и/или спиронолактон (Aldactone)), вазодилататоры (например, динитрат изосорбида (Isordil), несиритид (Natrecor), гидралазин (Apresoline), нитраты и/или миноксидил), статины, никотиновая кислота, гемфиброзил, клофибрат, дигоксин, дигитоксин, ланоксин или любая их комбинация.

[0276] Также могут быть включены дополнительные средства, такие как антибактериальные средства, антимикробные средства, противовирусные средства, модификаторы биологического ответа, факторы роста; иммуномодуляторы, моноклональные антитела и/или консерванты. Композиции по настоящему изобретению можно также применять в сочетании с другими формами терапии.

[0277] Вирионы гAAV, описанные в данном документе, можно вводить субъекту для лечения заболевания или нарушения. Такая композиция может находиться в однократной дозе, в многократных дозах, предназначенных для введения непрерывным или прерывистым образом, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, того, состоит ли цель введения в ответе на травматическое повреждение или оно предназначено для более продолжительных терапевтических целей, и других факторов, известных практикующим специалистам. Введение соединений и композиций по настоящему изобретению может быть по сути непрерывным в течение заранее выбранного периода времени или может быть представлено в виде серии разнесенных во времени доз. Предусмотрено как местное, так и системное введение. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается локализованная доставка вириона гAAV. В некоторых вариантах осуществления локализованную доставку вирионов гAAV применяют для получения популяции клеток в пределах сердца. В некоторых вариантах осуществления такая локализованная популяция работает в качестве «клеток-водителей ритма» в сердце. В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV применяются для получения, регенерации, репарации, замещения и/или обновления одного или более из синусно-предсердного (SA) узла, предсердно-желудочкового (AV) узла, пучка Гиса и/или волокон Пуркинье.

[0278] Для контроля тоничности водная фармацевтическая композиция может содержать физиологическую соль, такую как натриевая соль. Хлорид натрия (NaCl) является предпочтительным, он может присутствовать в концентрации 1–20 мг/мл. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат калия, двузамещенный гидрофосфат натрия, хлорид магния и хлорид кальция.

[0279] Композиции могут включать один или более буферов. Типичные буферы включают фосфатный буфер; буфер Tris; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер или цитратный буфер. Как правило, буферы будут включены в концентрации в диапазоне 5–20 мМ. рН композиции в целом будет составлять от 5 до 8 и, более типично, от 6 до 8, например, от 6,5 до 7,5 или от 7,0 до 7,8.

[0280] Предпочтительно композиция является стерильной. Предпочтительно композиция не содержит глютен. Предпочтительно композиция является непирогенной.

[0281] В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая клетки, может включать криопротекторное средство. Неограничивающие примеры криопротекторных средств включают гликоль (например, этиленгликоль, пропиленгликоль и глицерин), диметилсульфоксид (DMSO), формамид, сахарозу, трегалозу, декстрозу и любые их комбинации.

[0282] Один или более из следующих типов соединений могут также присутствовать в композиции с вирионами гAAV: агонист WNT, ингибитор GSK3, ингибитор передачи сигнала TGF-бета, эпигенетический модификатор, ингибитор LSD1, агонист аденилилциклазы или любая их комбинация.

Наборы

[0283] В данном документе описан ряд наборов, которые включают любую композицию (например, вирионы гAAV), описанную в данном документе. Набор может включать любые из композиций, описанных в данном документе, либо смешанные вместе, либо индивидуально упакованные, а также в сухой или гидратированной форме. Вирионы гAAV и/или другие средства, описанные в

данном документе, могут быть упакованы по отдельности в отдельные флаконы, бутылки или другие контейнеры. В качестве альтернативы любые из вирионов гAAV и/или средств, описанных в данном документе, могут быть упакованы совместно в виде одной композиции или в виде двух или более композиций, которые можно применять совместно или по отдельности. Соединения и/или средства, описанные в данном документе, могут быть упакованы при соотношениях и/или количествах, подходящих для содействия превращению выбранных клеток внутри пределов дифференцировки с образованием сердечных клеток-предшественников и/или кардиомиоцитов.

[0284] Набор может включать инструкции по введению данных композиций, соединений и/или средств. В таких инструкциях может предоставляться информация, описанная на всем протяжении настоящей заявки. Вирион гAAV или фармацевтическая композиция могут предусматриваться в рамках любого из наборов в форме устройства для доставки. В качестве альтернативы устройство для доставки может быть отдельно включено в наборы, и в инструкциях может быть описано, как собирать устройство для доставки перед введением субъекту.

[0285] Любой из наборов может также включать шприцы, катетеры, скальпели, стерильные контейнеры для сбора образцов или клеток, разбавители, фармацевтически приемлемые носители и т.п. В наборах могут быть предусмотрены другие факторы, такие как любые из дополнительных факторов или лекарственных средств, описанных в данном документе для композиций в предыдущем разделе или других частях заявки.

[0286] Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют некоторую часть экспериментальной работы, связанной с разработкой настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Идентификация капсида AAV9 с модифицированной вариабельной областью

Получение библиотек и отбор AAV

[0287] Вариабельные области (сайты VR-IV, VR-V, VR-VII и VR-VIII) на капсиде AAV9 показаны на **фиг. 1**. Стратегию скрининга библиотек использовали

для получения библиотек с высоким разнообразием посредством случайного изменения остатков в пределах каждого сайта капсида AAV9 для идентификации вариантов AAV с улучшением эффективности трансдукции и/или селективности в отношении ткани сердца, как показано на **фиг. 2**. Вкратце, получали отдельные библиотеки для каждой вариабельной области наряду с библиотекой, состоящей из комбинаций всех библиотек модифицированных VR. Эти библиотеки независимо подвергали трем раундам направленной эволюции. Первый раунд эволюции выполняли в hiPSC-CM с целью отбора вариантов, тропных в отношении человека. Остальные два раунда направленной эволюции выполняли посредством системной доставки библиотек мышам α MHC-Cre с целью отбора кардиотропных вариантов, которые могут проникать через эндотелиальный барьер сердца посредством трансцитоза и приводить к трансдукции кардиомиоцитов после системной доставки. После трех раундов направленной эволюции каждая библиотека демонстрировала различные уровни конвергенции, как показано на **фиг. 3A–3D** и **4A–4D**.

Подтверждение повышенной эффективности трансдукции in vitro и in vivo

[0288] Ведущие варианты из каждой библиотеки сначала оценивали в отношении их способности трансдуцировать человеческие iPSC-CM in vitro. Клетки инфицировали с помощью каждого варианта, упаковывающего репортерный GFP с универсальной экспрессией, при MOI, составляющей 100000. Капсиды AAV с модифицированной VR-IV демонстрировали значительно усиленную трансдукцию hiPSC-CM по сравнению с AAV9, при этом CR9-01 демонстрировал 129-кратное повышение эффективности трансдукции (**фиг. 5**). После этого варианты оценивали in vivo в отношении их способности трансдуцировать сердца после системной доставки. Для этой цели мышам C57BL/6J проводили инъекцию $2,5E+11$ vg/мышь либо AAV9:CAG-GFP, либо CAG-GFP, инкапсулированных с помощью нового варианта капсида. Через семь дней после инъекции животных умерщвляли, и сердце и печень извлекали для анализа экспрессии GFP с помощью ELISA. Варианты из каждой библиотеки демонстрировали повышенную трансдукцию сердца по сравнению с AAV9 (**фиг. 6A–6B**). Большинство вариантов с повышенной трансдукцией сердца также демонстрировали снижение тропизма в отношении

печени (фиг. 6C–6D), что привело к идентификации капсидов с улучшенной специфичностью в отношении сердца. Наконец, самые успешные варианты капсида AAV оценивали в отношении их способности уклоняться от человеческих NAb. Варианты, упаковывающие CAG-GFP, инкубировали с повышающимися концентрациями объединенных человеческих IgG в течение 30 минут перед обработкой клеток НЕК293Т при MOI, составляющей 100000. Через сорок восемь часов после инфицирования экспрессию GFP оценивали посредством проточной цитометрии (фиг. 7A). Два варианта, CR9-07 и CR9-13, демонстрировали улучшенное уклонения от NAb по сравнению с немодифицированным AAV9 (фиг. 7B–7C).

Пример 2: Идентификация химерного капсида AAV5/9

[0289] Перестановку капсида применяли для идентификации вариантов химерного белка AAV5/9 с улучшенным тропизмом в отношении кардиомиоцитов. Получали библиотеку химерных AAV5/9 с целью идентификации химер с благоприятными свойствами AAV5 и AAV9 (снижение тропизма в отношении печени, низкая восприимчивость к NAb, трансцитоз и/или трансдукция сердца), как показано на фиг. 8. После одного раунда отбора *in vivo* сложность библиотеки резко снижалась, что приводило к получению менее 100 вариантов, которые были способны трансдуцировать сердце после системной доставки исходной библиотеки (фиг. 9). Большинство кроссоверных явлений возникало в пределах области VP1 капсида, при этом большинство вариантов имели области VP3 с доминированием AAV9. Затем hiPSC-СМ инфицировали при MOI, составляющей 75000, с помощью либо AAV9:CAG-GFP, либо CAG-GFP, инкапсулированных химерным капсидом AAV5/9. Через семьдесят два часа после инфицирования клетки собирали, и эффективность трансдукции для каждого капсида оценивали с применением проточной цитометрии (фиг. 10A). ZC44 демонстрировал улучшение эффективности трансдукции в клетках hiPSC-СМ по сравнению с AAV9.

[0290] Химерные капсиды AAV5/9 оценивали в отношении их способности уклоняться от человеческих NAb. В этом случае варианты, упаковывающие CAG-GFP, инкубировали с 1 мг/мл объединенных человеческих IgG в течение 30 минут перед обработкой клеток НЕК293Т при MOI, составляющей 100000. Через 48 часов

после инфицирования экспрессию GFP оценивали посредством проточной цитометрии. В дополнение к повышенной эффективности трансдукции ZC44 демонстрировал сниженную восприимчивость к NAb по сравнению с AAV9 (фиг. 10B).

[0291] Ведущие химерные варианты оценивали *in vivo* в отношении их способности трансдуцировать сердце и печень после системной доставки. Мышам C57BL/6J проводили инъекцию 2E+11 vg/мышь либо AAV9:CAG-GFP, либо CAG-GFP, инкапсулированных новым вариантом капсида. Через четырнадцать дней после инъекции животных умерщвляли, и сердце и печень извлекали для анализа экспрессии GFP с помощью ELISA. ZC47 демонстрировал повышенную трансдукцию сердца по сравнению с AAV9; ZC40, ZC44 и ZC49 сохраняли способность трансдуцировать ткань сердца *in vivo*, эквивалентную исходному AAV9 (фиг. 11A). Каждый из Z40, Z41, Z46 и Z47 продемонстрировал утрату нацеливания на печень, о чем свидетельствовало выраженное снижение трансдукции печени после системной доставки (фиг. 11B).

Пример 3: Идентификация комбинированного капсида

[0292] Модификации в пределах капсидов с модифицированной вариабельной областью и химерных капсидов комбинировали с получением дополнительных вариантов комбинированного капсида. В общей сложности получали 18 комбинированных вариантов, содержащих последовательности VP1, полученные из AAV5, и модифицированные вариабельные области (фиг. 12). Проводили получение вектора в средних масштабах для оценки технологичности изготовления вариантов капсида AAV (фиг. 13). Затем оценивали комбинированные варианты в отношении эффективности трансдукции hiPSC-СМ следующим образом: клетки инфицировали либо AAV9:CAG-GFP, либо комбинированным капсидом AAV, упаковывающими CAG-GFP, при MOI, составляющей 75000. Через 5 дней после инфицирования клетки собирали, и эффективность трансдукции для каждого капсида оценивали с применением считывающего устройства с клеточной визуализацией Cytation 5. TN44-07 и TN47-07 демонстрировали трансдукцию, превосходящую AAV9 (более чем в 15 раз) (фиг. 14).

[0293] Комбинированные варианты оценивали *in vivo* в отношении их способности трансдуцировать сердце после системной доставки. Мышам C57BL/6J проводили инъекцию $1E+11$ vg/мышь либо AAV9:CAG-GFP, либо комбинированного варианта капсида, упаковывающих кассету с одинаковым трансгеном. Через четырнадцать дней после инъекции животных умерщвляли, и сердце и печень извлекали для анализа экспрессии GFP с помощью ELISA. TN44-07 и TN47-10 демонстрировали улучшение трансдукции сердца по сравнению с AAV9; TN47-14 трансдуцировал сердце на аналогичном уровне с AAV9 (фиг. 15A). Примечательно, что TN47-14 почти полностью утратил тропизм в отношении печени, о чем свидетельствовало весьма значительное снижение экспрессии GFP в печени (фиг. 15B). Как TN47-10, так и TN47-14 характеризуются улучшением соотношения трансдукции сердца и печени по сравнению с AAV9 после системной доставки (фиг. 15C). Выбранные варианты комбинированного капсида также оценивали в отношении уклонения от человеческих NAb. AAV9 или вариант капсида, упаковывающие CAG-GFP, инкубировали в течение 30 минут при 37°C в отсутствие или в присутствии (600 мкг/мл) объединенных человеческих IgG от ~2500 пациентов. После инкубирования вирус инкубировали с клетками HEK293T при MOI, составляющей 100000. На следующий день среду восполняли и клетки инкубировали в течение дополнительных 24 часов для обеспечения возможности адекватной экспрессии GFP. Количественное определение экспрессии GFP осуществляли посредством проточной цитометрии, и трансдукцию нормализовали по контролю без IgG. Все эти варианты комбинированного капсида AAV (TN44-07, TN47-07, TN47-10, TN47-13 и TN47-14) демонстрировали улучшенное уклонение от нейтрализующих антител в объединенных человеческих IgG. Среди них вирионы, содержащие комбинированный капсид TN44-07, были наиболее скрытными, характеризуясь весьма значительным снижением нейтрализации с помощью NAb ($p = 0,0002$, t-критерий, поправка Уэлча) по сравнению с AAV9 (фиг. 16).

Пример 4: Тестирование на отличных от человека приматах

[0294] Трансдукцию рекомбинантного AAV, опосредованную панелью сконструированных капсидов, оценивали у самцов макаков-крабоедов (*Macaca fascicularis*) после внутривенной доставки каждого капсида, упаковывающего CAG-

GFP, в дозе 1×10^{12} vg/kg ($n=3$ /группа). Через тридцать дней после введения дозы животных подвергали эвтаназии и органы собирали для анализа специфической трансдукции.

[0295] С целью оценки органоспецифического профиля трансдукции у новых сконструированных вариантов капсида высокопроизводительным способом использовали подход с применением штрихкод-секвенирования РНК. Каждому капсиду (двум исходным и 12 новым вариантам) присваивали уникальный штрихкод, который помещали в 3'-UTR кассеты с универсальной экспрессией GFP (CAG-GFP). Экспериментально определил, что каждый выбранный штрихкод характеризовался отсутствием эффекта в отношении экспрессии белка/стабильности РНК. rAAV изготавливали индивидуально для каждого капсида с целью связывания штрихкода с капсидом, и все препараты rAAV объединяли вместе при равных концентрациях. Самцам макаков-крабоедов (в возрасте 2–5 лет) либо вводили дозу 1×10^{13} vg/kg объединенной вирусной библиотеки ($n=3$), либо имитировали обработку с помощью HBSS ($n=1$). Через тридцать дней после даты инъекции животных умерщвляли и ткань собирали для анализа РНК. Относительную численность каждого штрихкода определяли посредством секвенирования нового поколения транскриптов GFP-штрихкод с применением Illumina NextSeq550 и индивидуального скрипта на языке Python. Относительную экспрессию штрихкодов для каждой ткани нормализовали по AAV9. Результаты показаны на **фиг. 17**.

[0296] Трансдукцию rAAV, содержащего сконструированный капсид, оценивали в левом желудочке сердца и печени животных. Сконструированные капсиды TN3 и TN6 показали наиболее высокий уровень трансдукции в левом желудочке сердца по сравнению с AAV9 (**фиг. 17А**). В то время как сконструированный капсид TN6 демонстрировал трансдукцию клеток печени, сопоставимую с AAV9, TN3 демонстрировал существенно более низкий уровень трансдукции в печени по сравнению с AAV9 (**фиг. 17В**). Соотношение трансдукции левого желудочка сердца (LV) и печени для каждого сконструированного капсида показано на **фиг. 17С**. Сконструированный капсид TN3 показывает наиболее предпочтительный профиль трансдукции. Он характеризуется высоким уровнем трансдукции LV при одновременном сохранении низкого уровня трансдукции в

печени. гAAV-индуцированная токсичность, обусловленная нецелевой трансдукцией в печени, может представлять собой сложную задачу при видах клинического применения, и профиль трансдукции, который показывает сконструированный капсид TN3, может преодолеть данное ограничение. Более широкий профиль трансдукции получили при анализе трансдукции гAAV, опосредованной панелью сконструированных капсидов в различных тканях (фиг. 17D).

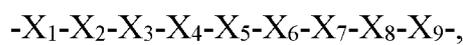
Формула изобретения

1. Капсидный белок рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий вариант полипептидной последовательности в одном или более из сайта VR-IV, сайта VR-V, сайта VR-VII и сайта VR-VIII исходной последовательности, где исходная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 463.

2. Капсидный белок по п. 1, где вариант полипептидной последовательности представляет собой кардиотропный вариант полипептидной последовательности.

3. Капсидный белок по п. 1 или п. 2, где капсидный белок содержит вариант полипептида в сайте VR-IV исходной последовательности.

4. Капсидный белок по п. 3, где вариант полипептида в сайте VR-IV имеет последовательность:



где

- a) X_1 представляет собой G, S или V;
- b) X_2 представляет собой Y, Q или I;
- c) X_3 представляет собой H, W, V или I;
- d) X_4 представляет собой K или N;
- e) X_5 представляет собой S, G или I;
- f) X_6 представляет собой G или R;
- g) X_7 представляет собой A, P или V;
- h) X_8 представляет собой A или R; и
- i) X_9 представляет собой Q или D (SEQ ID NO: 477).

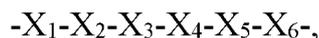
5. Капсидный белок по п. 3, где вариант полипептида в сайте VR-IV содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6–104.

6. Капсидный белок по п. 3, где вариант полипептида в сайте VR-IV содержит аминокислотную последовательность, выбранную из GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6), VIIKSGAAQ (SEQ ID NO: 7), GYHKIGAAQ (SEQ ID NO: 8), SQVNGRPRD (SEQ ID NO: 33) и GYHKSGVAQ (SEQ ID NO: 9).

7. Капсидный белок по п. 3, где вариант полипептида в сайте VR-IV содержит аминокислотную последовательность GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6) или последовательность, содержащую не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен относительно GYHKSGAAQ (SEQ ID NO: 6).

8. Капсидный белок по любому из пп. 1–7, где капсидный белок содержит вариант полипептида в сайте VR-V исходной последовательности.

9. Капсидный белок по п. 8, где вариант полипептида в сайте VR-V имеет последовательность:



где

- a) X_1 представляет собой S, L, H, N или A;
- b) X_2 представляет собой T, M, K, G или N;
- c) X_3 представляет собой S, T, M или I;
- d) X_4 представляет собой S, P, F, M или N;
- e) X_5 представляет собой F, S, P или L; и
- f) X_6 представляет собой I, V или T (SEQ ID NO: 474).

10. Капсидный белок по п. 8, где вариант полипептида в сайте VR-V содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 105–203.

11. Капсидный белок по п. 8, где вариант полипептида в сайте VR-V содержит аминокислотную последовательность, выбранную из LNSMLI (SEQ ID NO: 105), NGMSFT (SEQ ID NO: 106), HKTFSI (SEQ ID NO: 107) и SMSNFV (SEQ ID NO: 108).

12. Капсидный белок по п. 8, где вариант полипептида в сайте VR-V содержит аминокислотную последовательность LNSMLI (SEQ ID NO: 105) или

последовательность, содержащую не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен относительно LNSMLI (SEQ ID NO: 105).

13. Капсидный белок по любому из пп. 1–12, где капсидный белок содержит вариант полипептида в сайте VR-VII исходной последовательности.

14. Капсидный белок по п. 13, где вариант полипептида в сайте VR-VII имеет последовательность:



где

- a) X_1 представляет собой V, L, Q, C или R;
- b) X_2 представляет собой S, H, G, C или D;
- c) X_3 представляет собой Y, S, L, G или N;
- d) X_4 представляет собой S, L, H, Q или N; и
- e) X_5 представляет собой V, I или R (SEQ ID NO: 475).

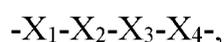
15. Капсидный белок по п. 13, где вариант полипептида в сайте VR-VII содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 204–302.

16. Капсидный белок по п. 13, где вариант полипептида в сайте VR-VII содержит аминокислотную последовательность, выбранную из RGNQV (SEQ ID NO: 204), VSLNR (SEQ ID NO: 205), CDYSV (SEQ ID NO: 206) и QHGH I (SEQ ID NO: 207).

17. Капсидный белок по п. 13, где вариант полипептида в сайте VR-VII содержит аминокислотную последовательность RGNQV (SEQ ID NO: 204) или последовательность, содержащую не более 1, 2 или 3 аминокислотных замен относительно RGNQV (SEQ ID NO: 204).

18. Капсидный белок по любому из пп. 1-17, где капсидный белок содержит вариант полипептида в сайте VR-VII исходной последовательности.

19. Капсидный белок по п. 18, где вариант полипептида в сайте VR-VIII имеет последовательность:



где

- a) X_1 представляет собой S, N или A;
- b) X_2 представляет собой V, M, N или A;
- c) X_3 представляет собой Y, V, S или G; и
- d) X_4 представляет собой Y, T, M, G или N (SEQ ID NO: 476).

20. Капсидный белок по п. 18, где вариант полипептида в сайте VR-VIII содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 303–401.

21. Капсидный белок по п. 18, где вариант полипептида в сайте VR-VIII содержит аминокислотную последовательность, выбранную из ANYG (SEQ ID NO: 305), NVSY (SEQ ID NO: 303), SMVN (SEQ ID NO: 304) и NVGT (SEQ ID NO: 306).

22. Капсидный белок по п. 18, где вариант полипептида в сайте VR-VIII содержит аминокислотную последовательность ANYG (SEQ ID NO: 305) или последовательность, содержащую не более 1 или 2 аминокислотных замен относительно ANYG (SEQ ID NO: 305).

23. Капсидный белок по п. 18, где вариант полипептида в сайте VR-VIII содержит аминокислотную последовательность NVSY (SEQ ID NO: 303) или последовательность, содержащую не более 1 или 2 аминокислотных замен относительно NVSY (SEQ ID NO: 303).

24. Капсидный белок по п. 1, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 402–410.

25. Капсидный белок по п. 1, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 402.

26. Капсидный белок по п. 1, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 403.

27. Капсидный белок по п. 1, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 404.

28. Капсидный белок по п. 1, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 406.

29. Капсидный белок по п. 1, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 409.

30. Капсидный белок по п. 1, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 483.

31. Капсидный белок по любому из пп. 1–23, где капсидный белок представляет собой химерный капсидный белок AAV5/AAV9.

32. Капсидный белок по п. 31, где капсидный белок содержит по меньшей мере один сегмент из капсидного белка AAV5.

33. Капсидный белок по п. 31 или п. 32, где капсидный белок содержит:

a) первый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 411 или SEQ ID NO: 412;

b) второй сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 413 или SEQ ID NO: 414;

c) третий сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 415 или SEQ ID NO: 416;

d) четвертый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 417 или SEQ ID NO: 418;

e) пятый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 419 или SEQ ID NO: 420;

где по меньшей мере один сегмент получен из капсидного белка AAV5, и по меньшей мере один сегмент получен из капсидного белка AAV9.

34. Капсидный белок по п. 31, где химерный капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 445–462.

35. Капсидный белок по п. 31, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 457.

36. Капсидный белок по п. 31, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 459.

37. Капсидный белок по п. 31, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 445.

38. Капсидный белок по п. 31, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 446.

39. Капсидный белок по п. 31, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 447.

40. Капсидный белок по п. 31, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 448.

41. Капсидный белок рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 463.

42. Капсидный белок по п. 41, где вариант полипептидной последовательности представляет собой кардиотропный вариант полипептидной последовательности.

43. Капсидный белок по п. 41 или п. 42, где капсидный белок содержит по меньшей мере один сегмент из капсидного белка AAV5.

44. Капсидный белок по любому из пп. 41–43, где капсидный белок содержит:

- a) первый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 411 или SEQ ID NO: 412;
- b) второй сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 413 или SEQ ID NO: 414;
- c) третий сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 415 или SEQ ID NO: 416;
- d) четвертый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 417 или SEQ ID NO: 418;
- e) пятый сегмент, содержащий последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 419 или SEQ ID NO: 420,

где по меньшей мере один сегмент получен из капсидного белка AAV5, и по меньшей мере один сегмент получен из капсидного белка AAV9.

45. Капсидный белок по любому из пп. 41–44, где химерный капсидный белок содержит последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 421–444.

46. Капсидный белок по п. 45, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 434.

47. Капсидный белок по п. 45, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 438.

48. Капсидный белок по п. 45, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 441.

49. Вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий

- a) капсидный белок по любому из пп. 1–48 и

b) гетерологичную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более продуктов гена.

50. Вирион гAAV по п. 49, где вирион гAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в клетках сердца по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность.

51. Вирион гAAV по п. 49 или п. 50, где вирион гAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в кардиомиоцитах, полученных из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPS-CM), по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность.

52. Вирион гAAV по любому из пп. 49–51, где вирион гAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в клетках, представляющих собой сердечные фибробласты человека (hCF), по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность.

53. Вирион гAAV по п. 52, где сердечные фибробласты человека расположены в левом желудочке сердца.

54. Вирион гAAV по п. 51, где вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-CM при множественности инфицирования (MOI), составляющей 100000.

55. Вирион гAAV по п. 51, где вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции в клетках iPS-CM при множественности инфицирования (MOI), составляющей 75000.

56. Вирион гAAV по любому из пп. 49–55, где вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции сердца у мыши C57BL/6J, где мышь получает инъекцию вириона в дозе, составляющей $2,5E+11$ vg/мышь.

57. Вирион гAAV по любому из пп. 49–55, где вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 1,5-кратное повышение эффективности трансдукции сердца у мыши C57BL/6J, где мышь получает инъекцию вириона в дозе, составляющей $2E+11$ vg/мышь.

58. Вирион гAAV по любому из пп. 49–55, где вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции сердца у мыши C57BL/6J, где мышь получает инъекцию вириона в дозе, составляющей $1E+11$ vg/мышь.

59. Вирион гAAV по любому из пп. 49–58, где вирион гAAV демонстрирует сниженную эффективность трансдукции в клетках печени по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность.

60. Вирион гAAV по любому из пп. 49–59, где вирион гAAV демонстрирует улучшенное уклонение от NAb по сравнению с вирионом AAV, содержащим исходную последовательность.

61. Вирион гAAV по любому из пп. 49–60, где вирион гAAV демонстрирует повышенную селективность вириона гAAV в отношении клеток сердца по сравнению с клетками печени.

62. Вирион гAAV по любому из пп. 49–61, где вирион гAAV демонстрирует повышенную селективность вириона гAAV в отношении клеток iPS-СМ по сравнению с клетками печени.

63. Вирион гAAV по любому из пп. 49–62, где капсидный белок содержит последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 404.

64. Вирион гAAV по любому из пп. 49–62, где капсидный белок содержит последовательность, на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 483.

65. Фармацевтическая композиция, содержащая вирион гAAV по любому из пп. 49–64 и фармацевтически приемлемый носитель.

66. Полинуклеотид, кодирующий капсидный белок по любому из пп. 1–64.

67. Способ трансдукции клетки сердца, включающий приведение клетки сердца в контакт с вирионом гAAV по любому из пп. 49–64, где вирион гAAV осуществляет трансдукцию клетки сердца.

68. Способ по п. 67, где клетка сердца представляет собой кардиомиоцит.

69. Способ по п. 67 или п. 68, где вирион гAAV демонстрирует повышенную эффективность трансдукции в клетке по сравнению с вирионом AAV, содержащим последовательность капсидного белка AAV9.

70. Способ по любому из пп. 67–69, где вирион гAAV демонстрирует по меньшей мере 2-кратное повышение эффективности трансдукции в клетке по сравнению с вирионом AAV, содержащим последовательность капсидного белка AAV9, при множественности инфицирования (MOI), составляющей 75000.

71. Способ доставки одного или более продуктов гена в клетку сердца, включающий приведение клетки сердца в контакт с вирионом гAAV по любому из пп. 49–64.

72. Способ по п. 71, где клетка сердца представляет собой кардиомиоцит.

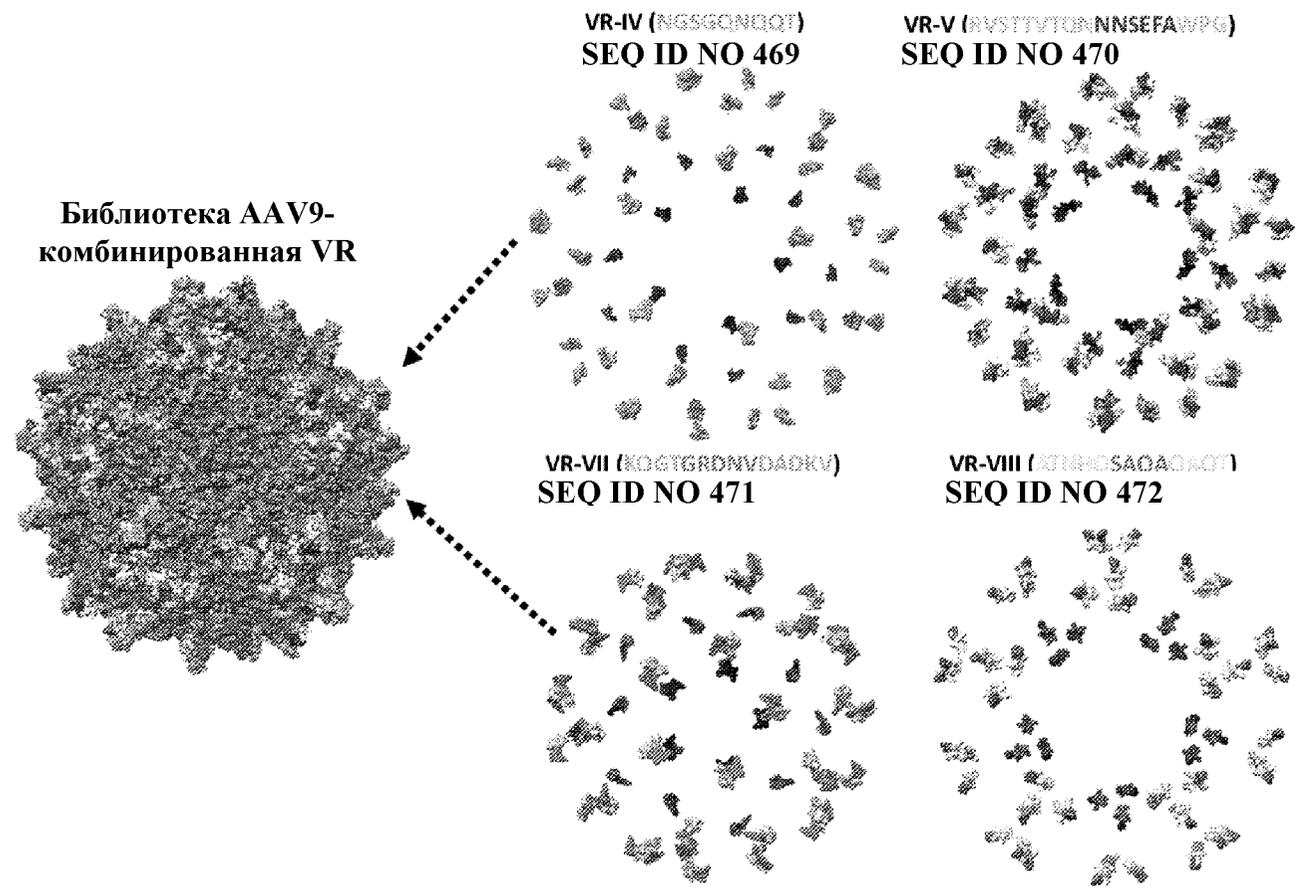
73. Способ лечения патологии сердца у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества вириона гAAV по любому из пп. 49–64 или фармацевтической композиции по п. 61, где вирион гAAV осуществляет трансдукцию ткани сердца.

74. Способ по п. 73, где один или более продуктов гена предусматривают MYBPC3, DWORF, KCNH2, TRPM4, DSG2, PKP2 и/или ATP2A2.

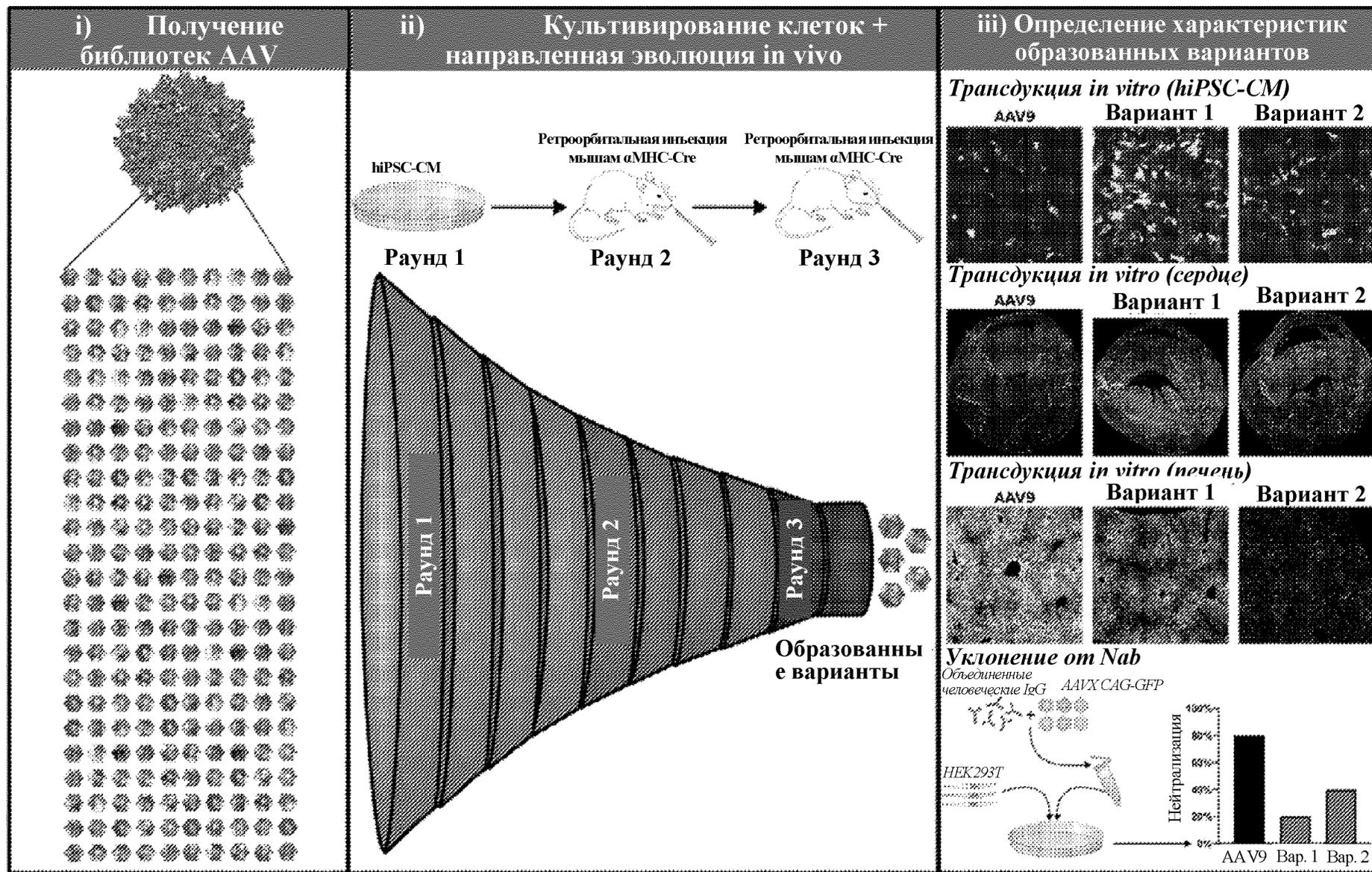
75. Способ по п. 73, где один или более продуктов гена предусматривают CACNA1C, DMD, DMPK, EPG5, EVC, EVC2, FBN1, NF1, SCN5A, SOS1, NPR1, ERBB4, VIP, MYH7 и/или Cas9.

76. Способ по п. 73, где один или более продуктов гена предусматривают MYOCD, ASCL1, GATA4, MEF2C, TBX5, miR-133 и/или MESP1.

77. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по п. 67 и инструкции по применению.

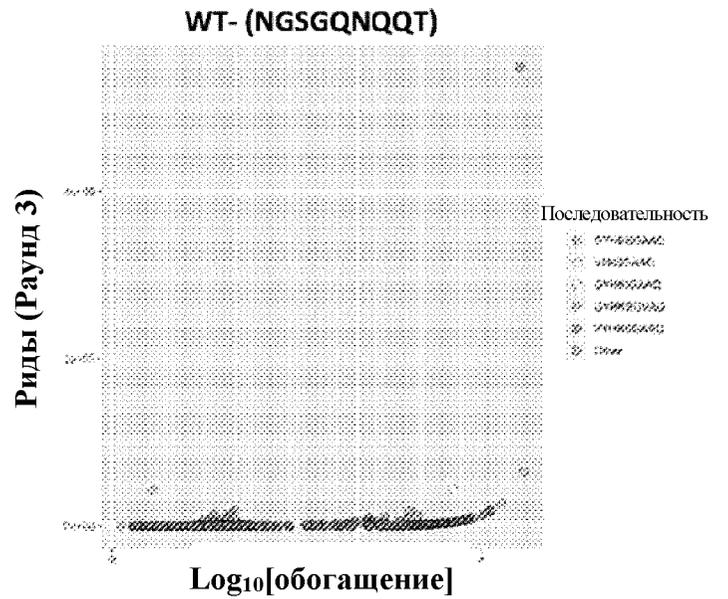
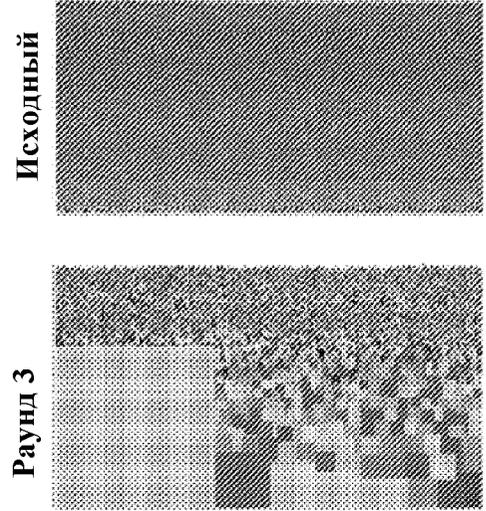


Фиг. 1

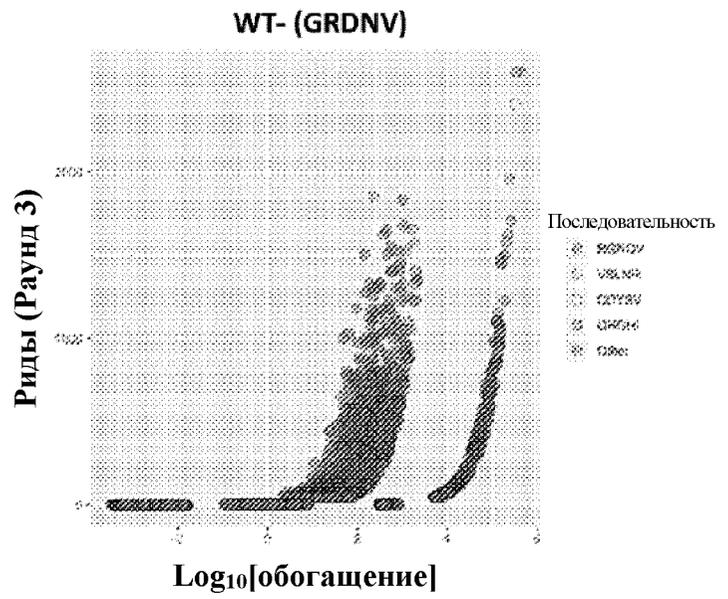
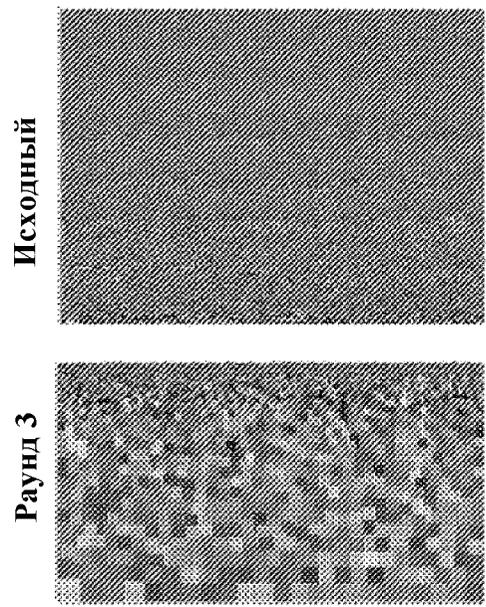


Фиг. 2

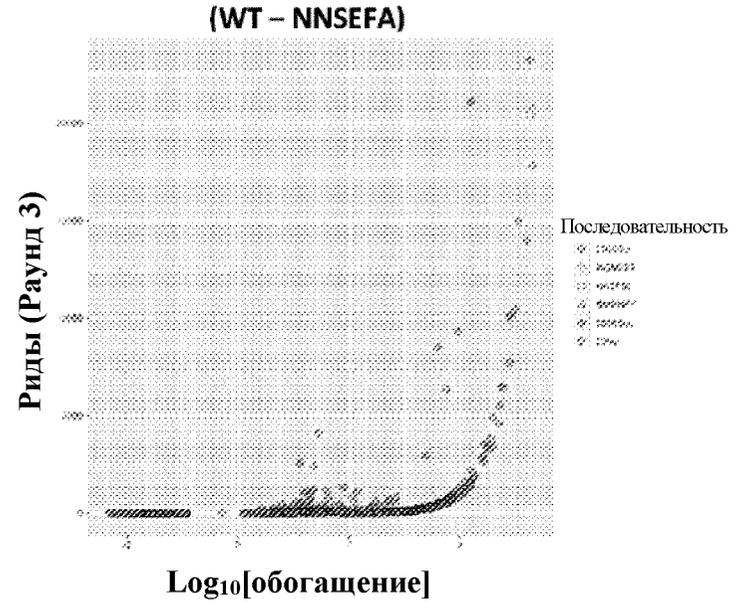
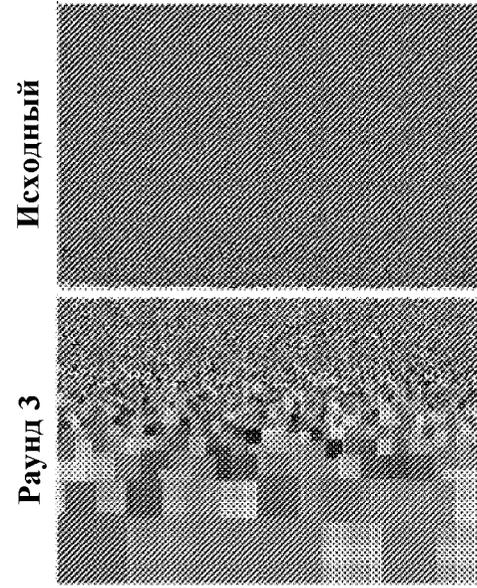
Фиг. 3А



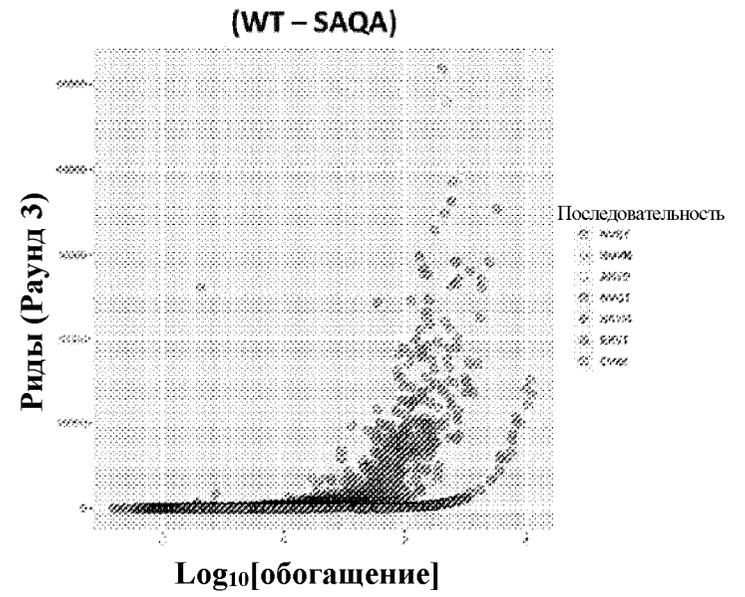
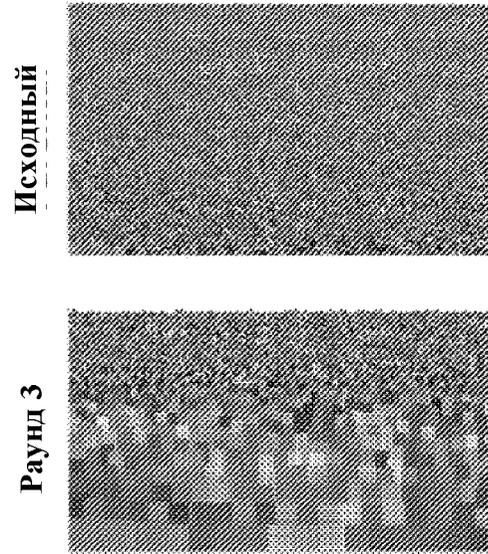
Фиг. 3В



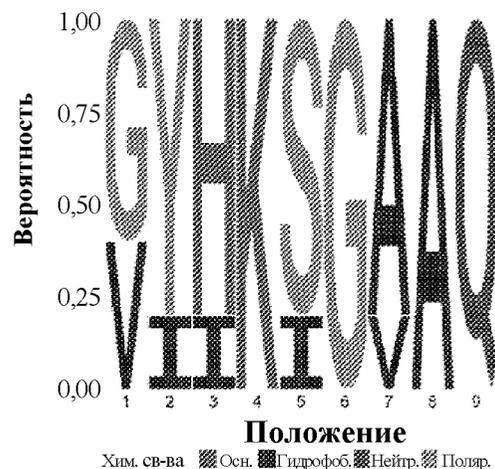
Фиг. 3С



Фиг. 3D

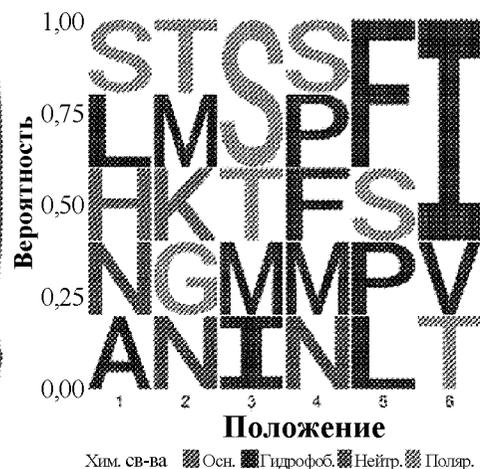


Фиг. 4А



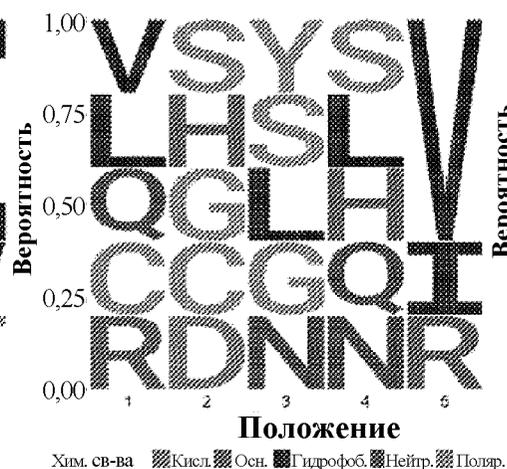
SEQ ID NO 473

Фиг. 4В



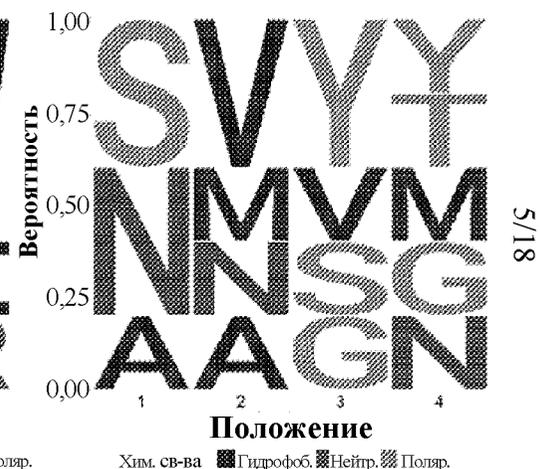
SEQ ID NO 474

Фиг. 4С



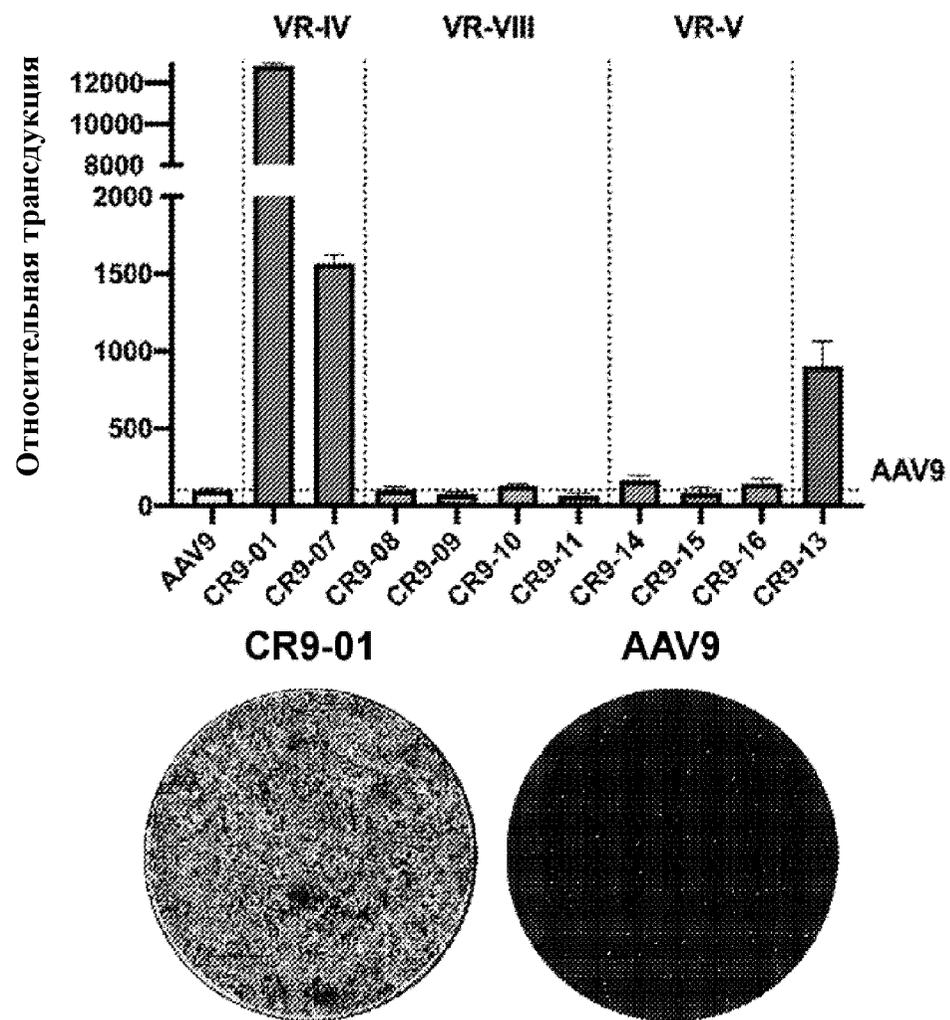
SEQ ID NO 475

Фиг. 4D



SEQ ID NO 476

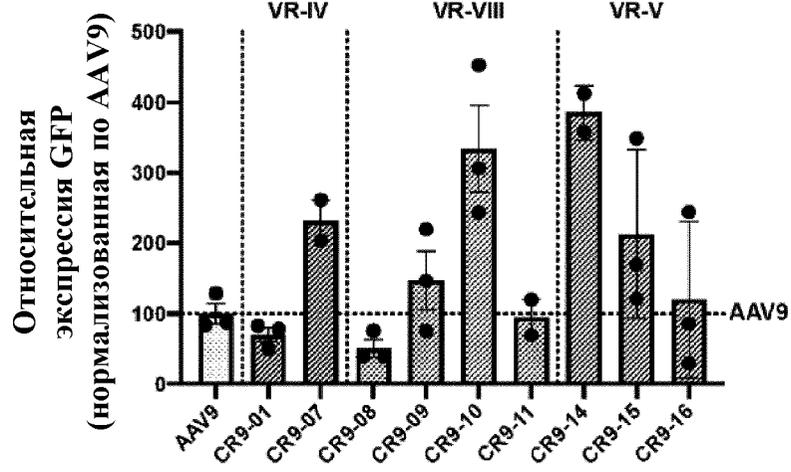
Трансдукция hiPSC-СМ



Фиг. 5

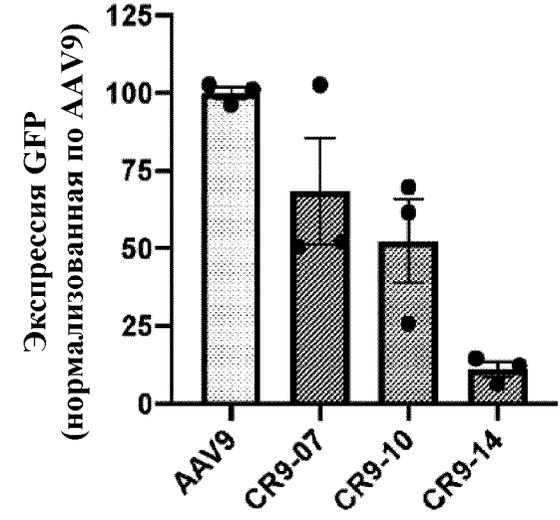
Фиг. 6А

Трансдукция сердца in vivo

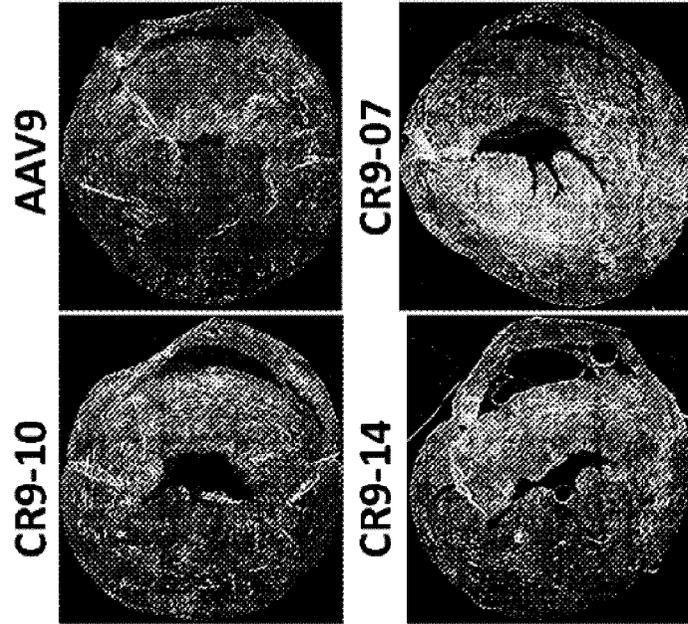


Фиг. 6С

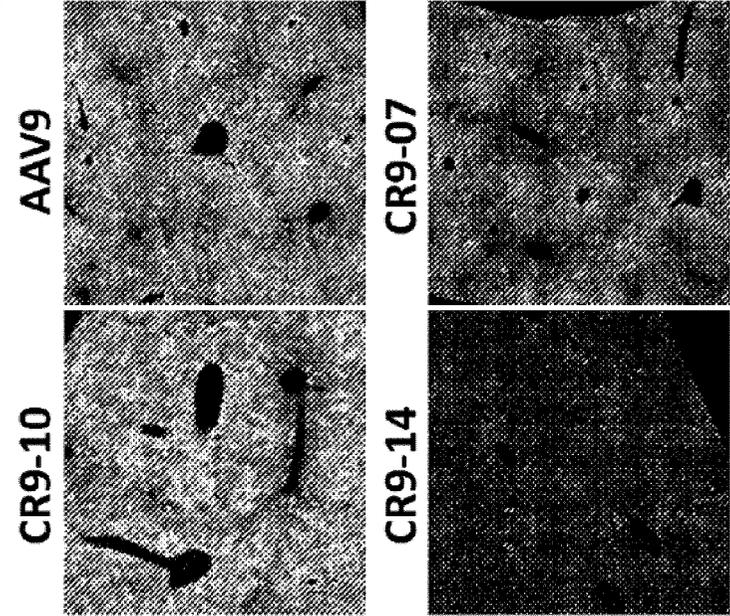
Трансдукция печени in vivo



Фиг. 6В

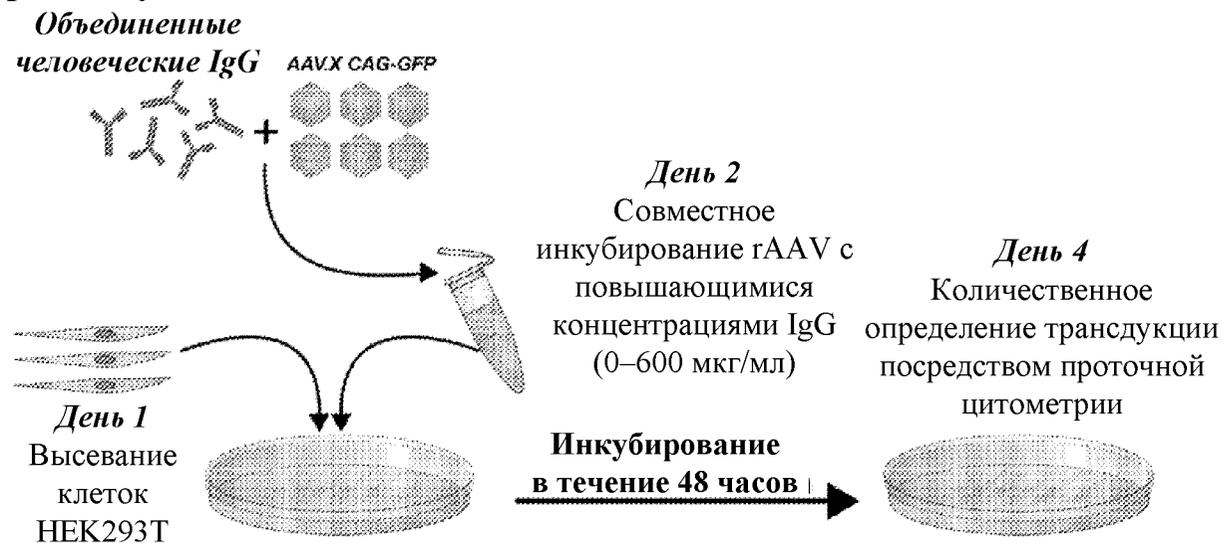


Фиг. 6D

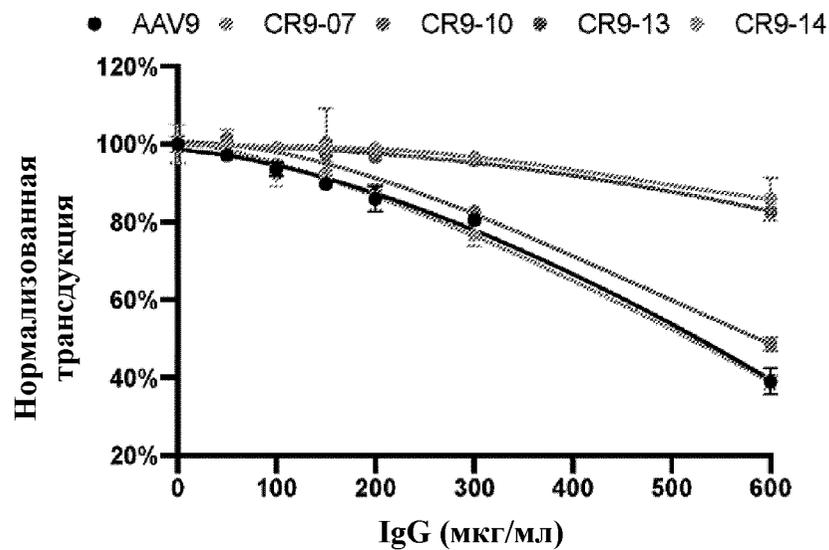


Скрининг уклонения от NAb

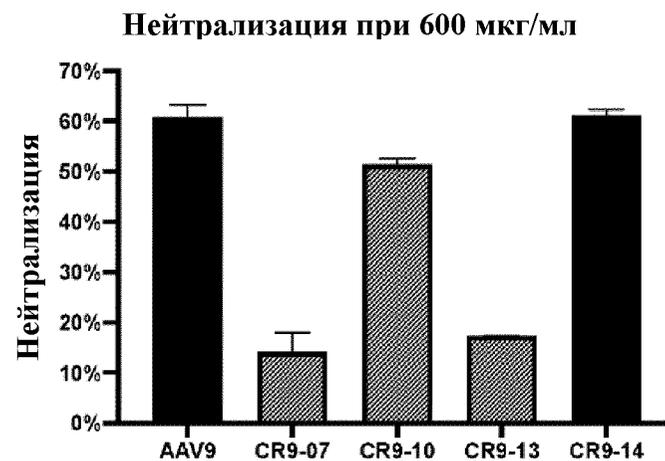
Фиг. 7А

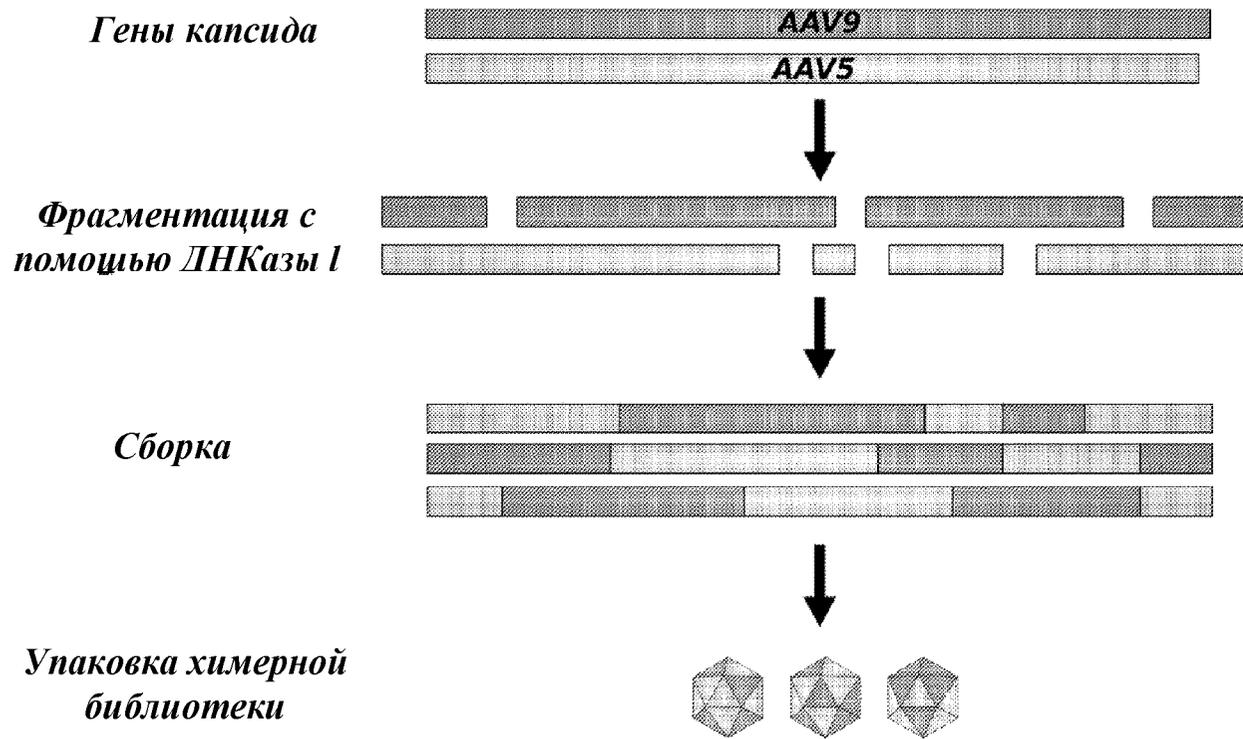


Фиг. 7В



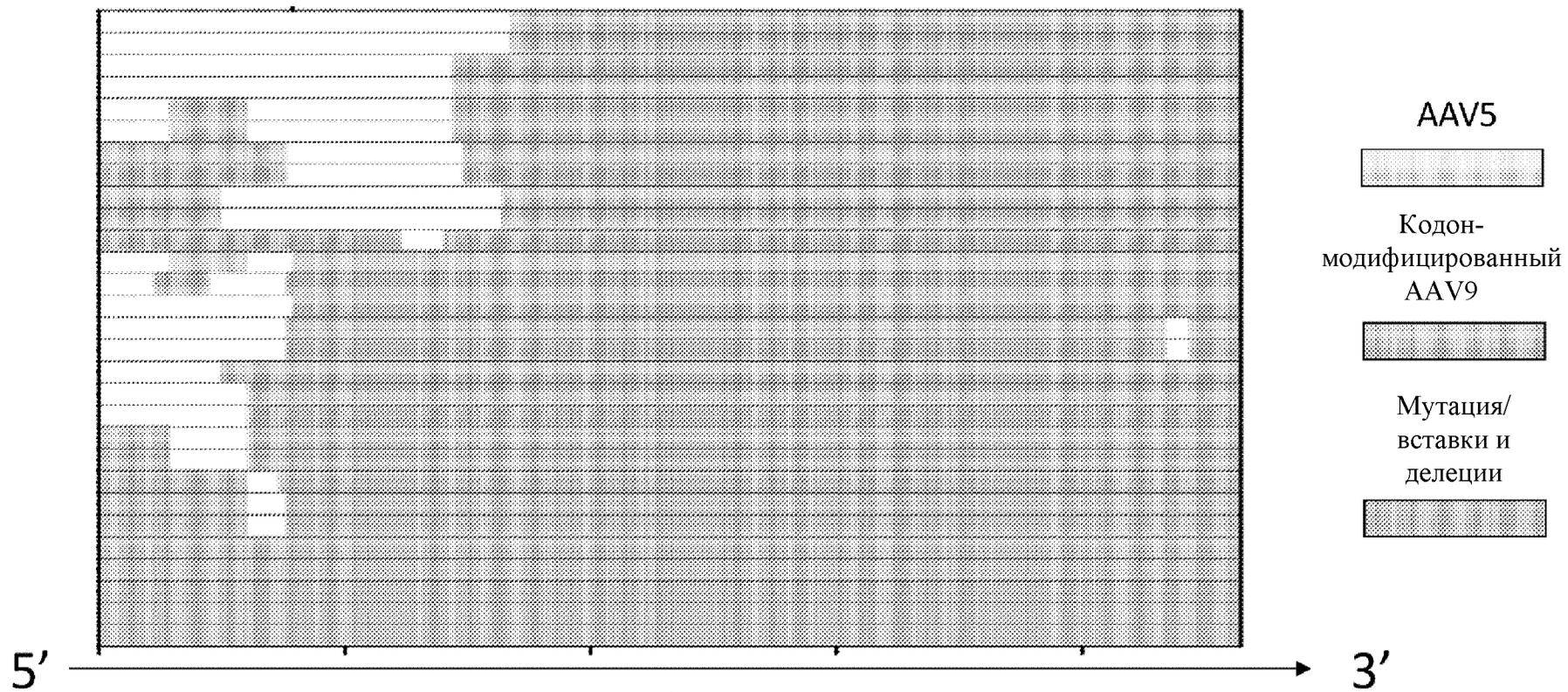
Фиг. 7С





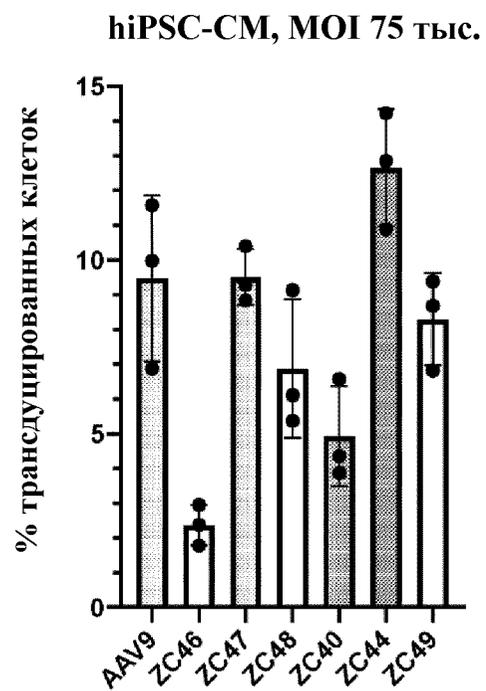
Фиг. 8

Состав химер после отбора *in vivo*

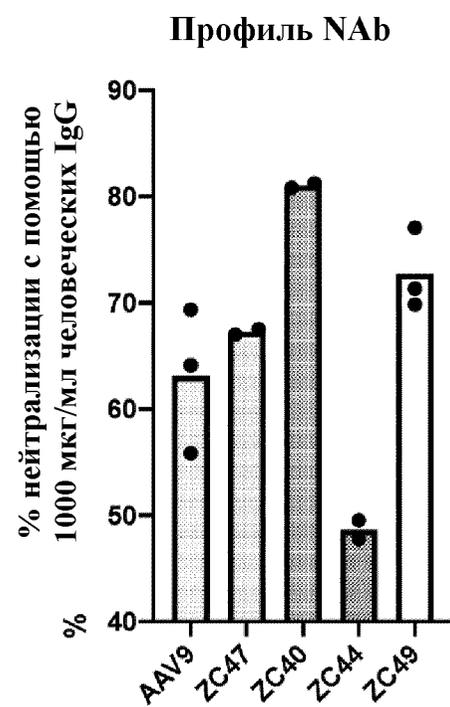


Фиг. 9

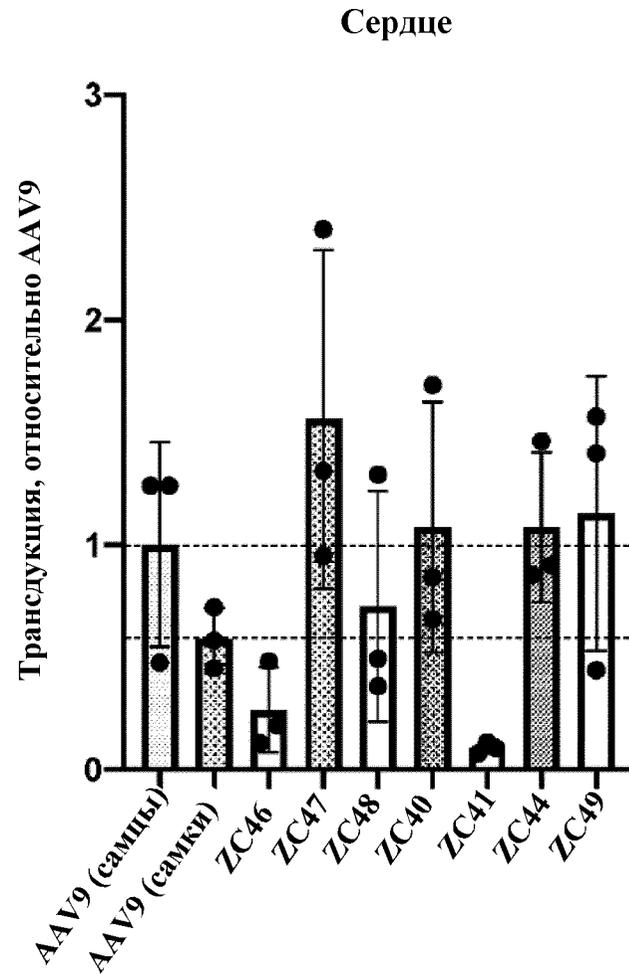
Фиг. 10А



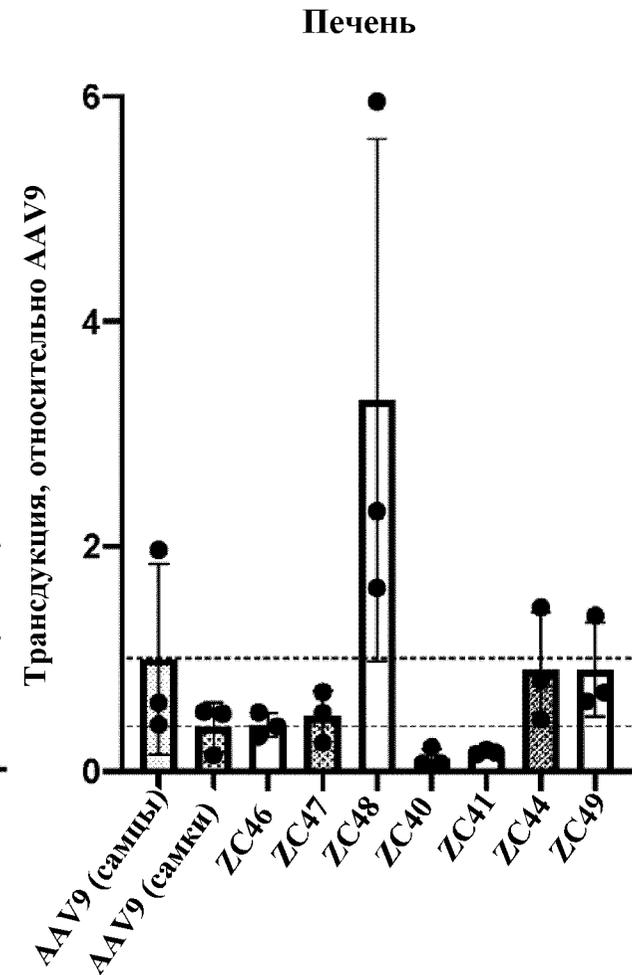
Фиг. 10В



Фиг. 11А



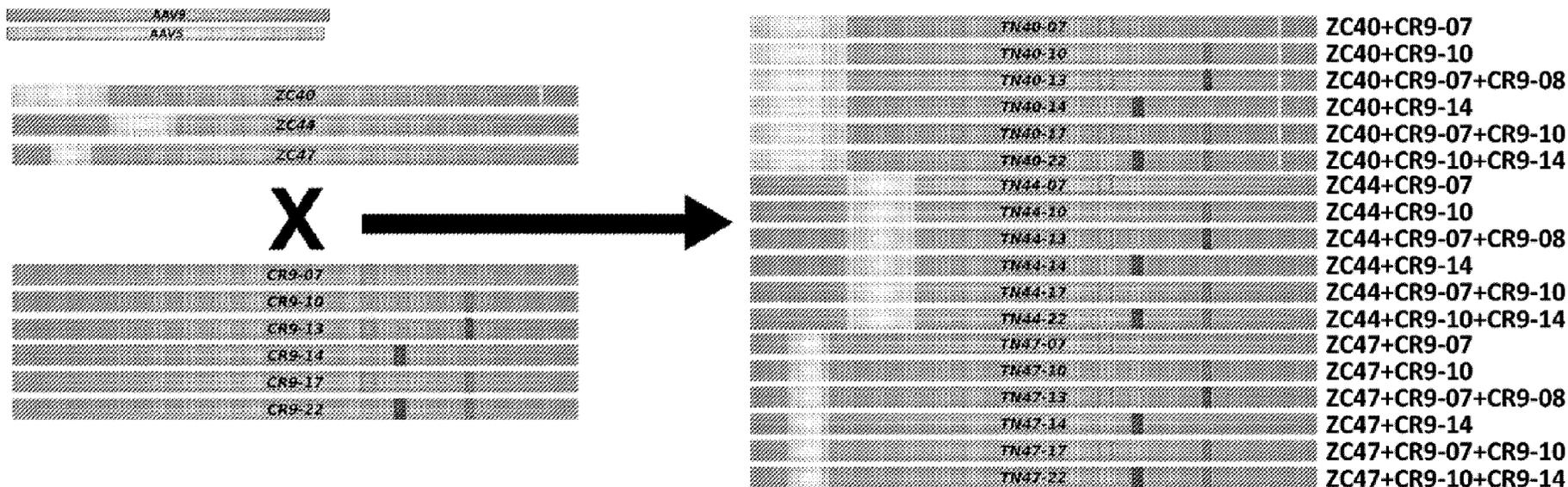
Фиг. 11В



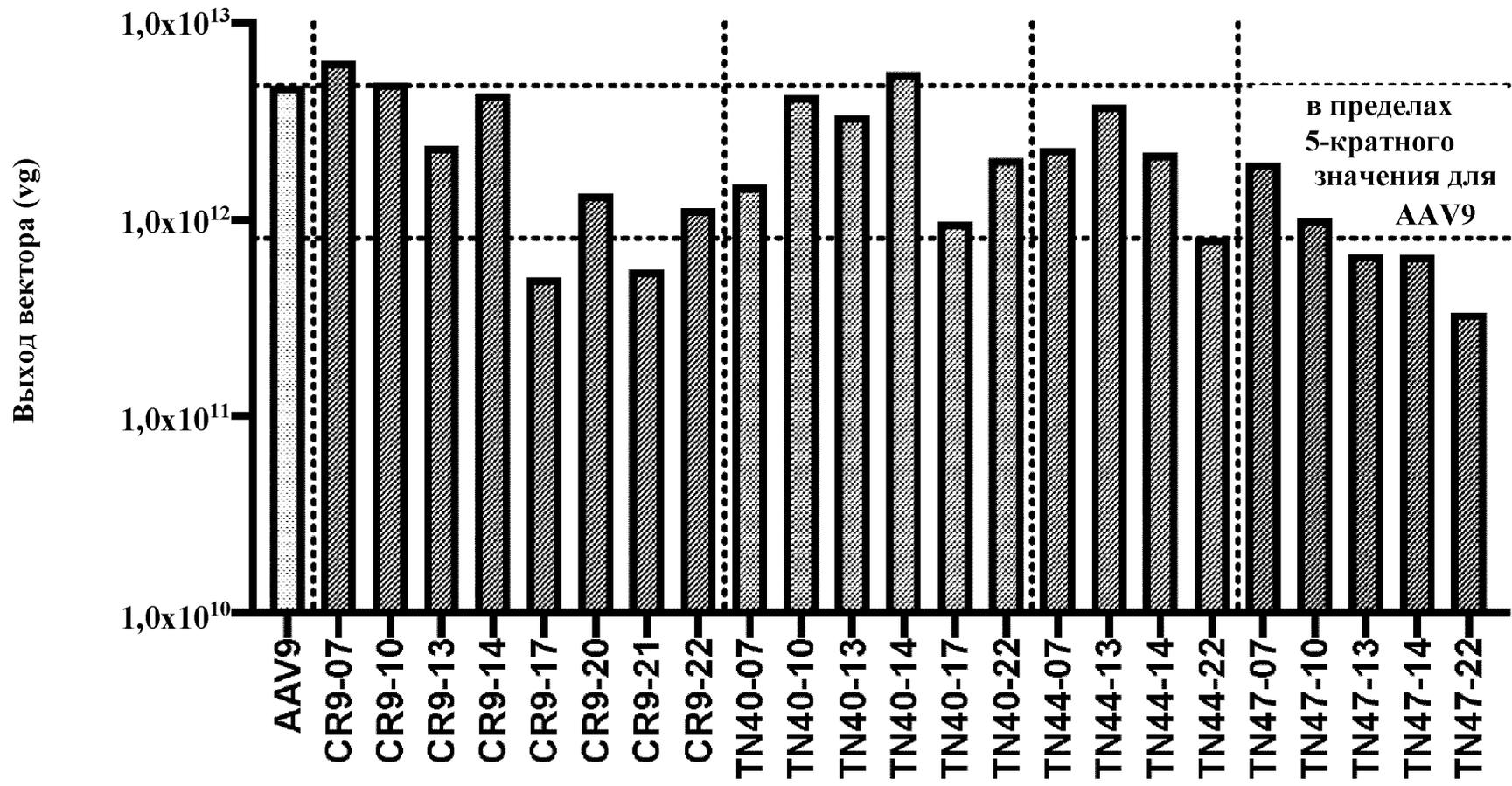
Столбики с узором обозначают группы, в которых используются самки мышей

Номенклатура для комбинированных вариантов

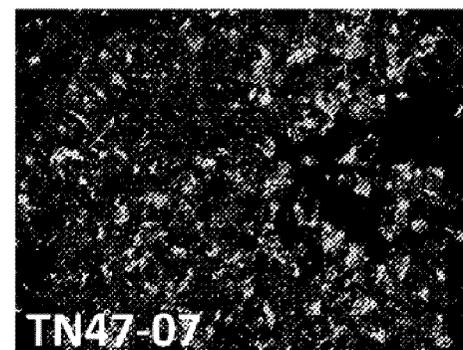
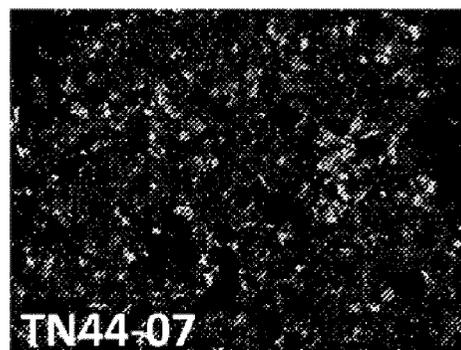
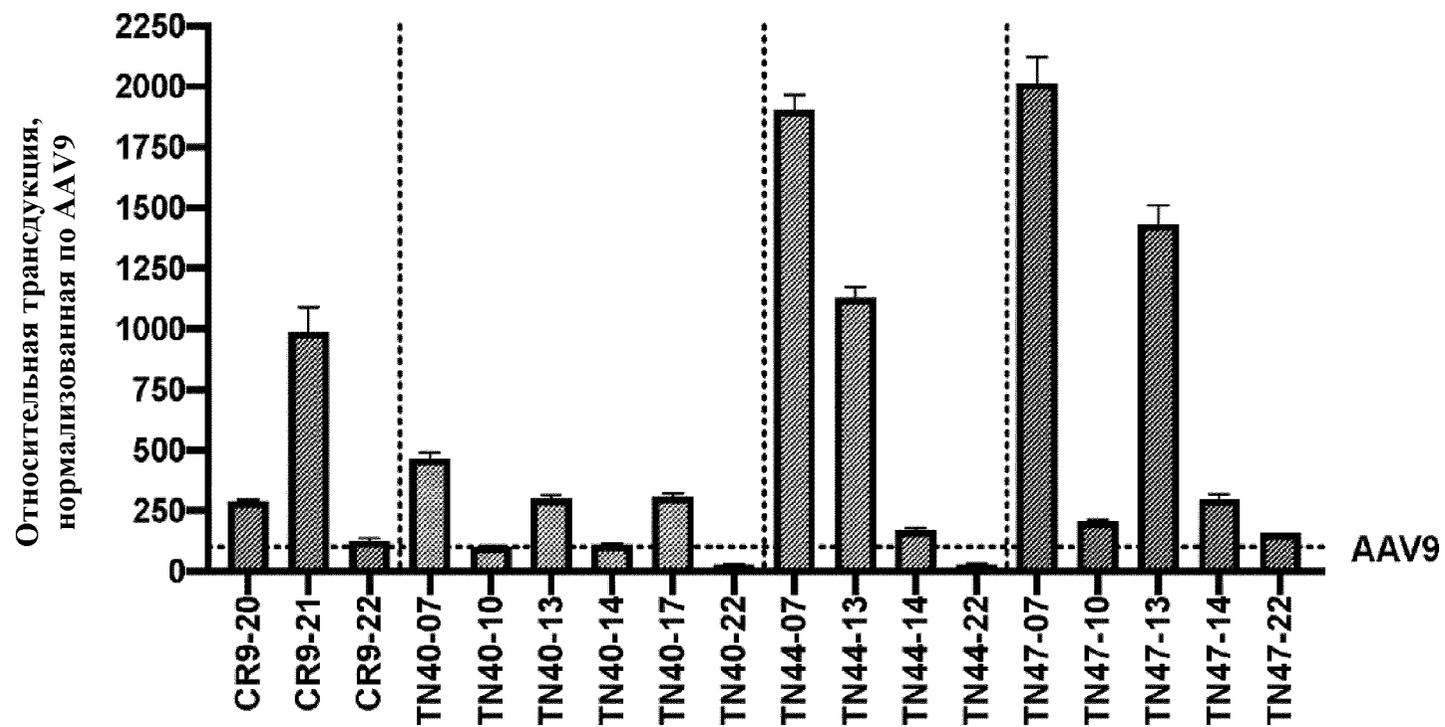
TN(ZC)-(CR)



Фиг. 12

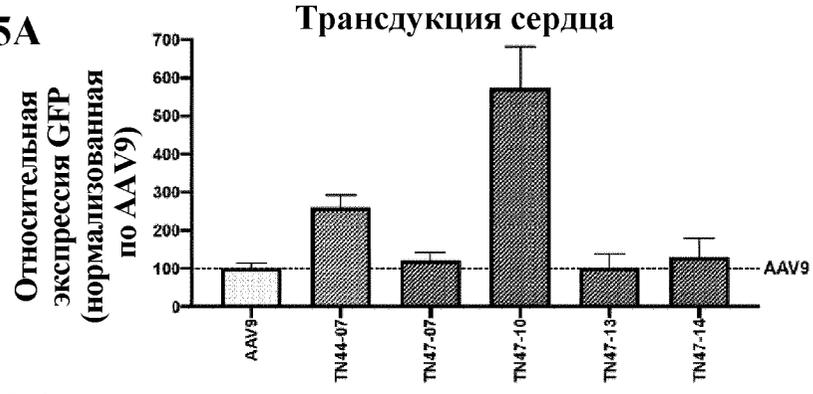


Фиг. 13

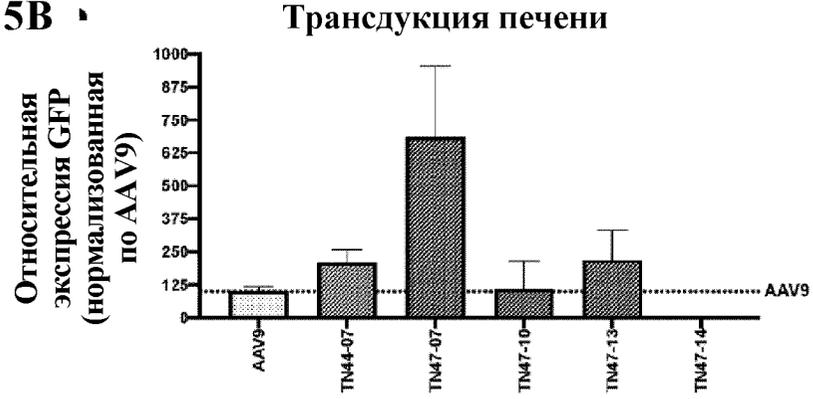


Фиг. 14

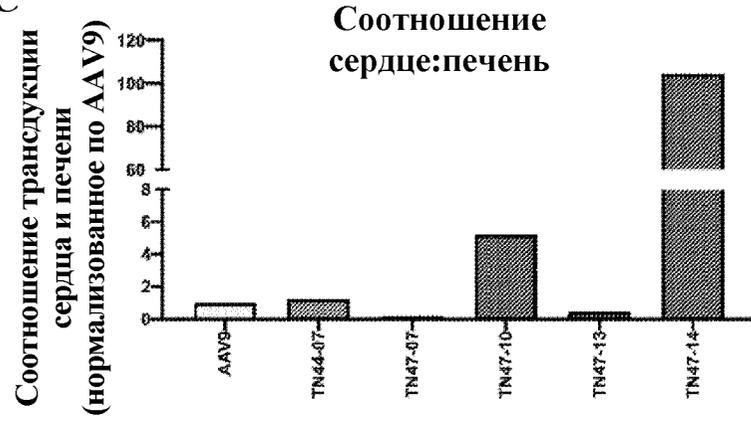
Фиг. 15А



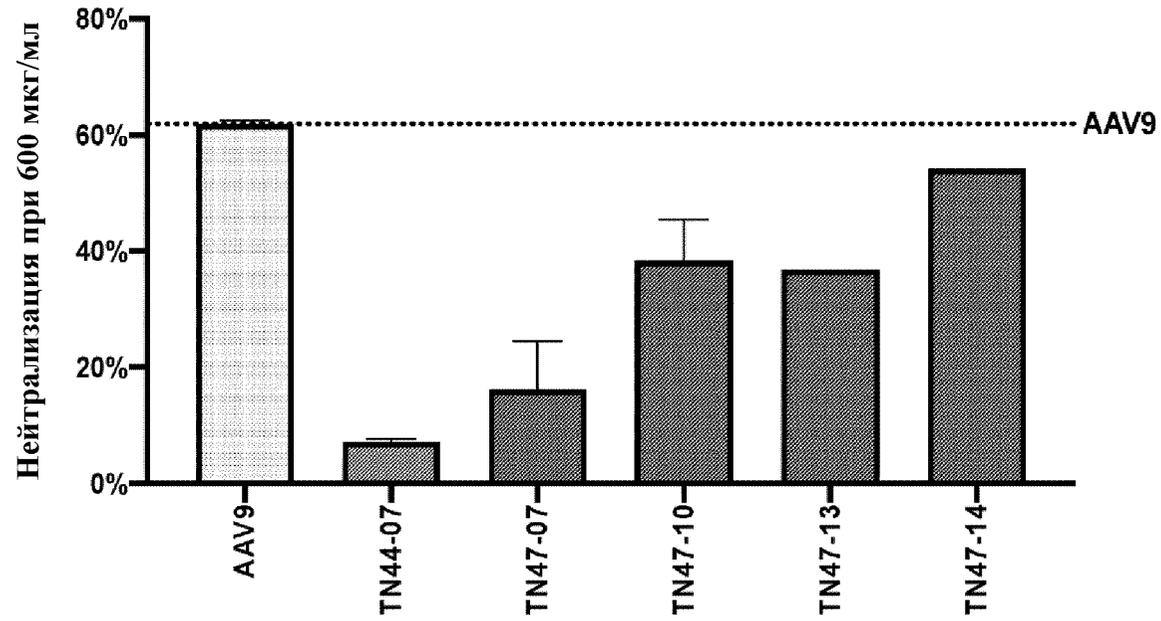
Фиг. 15В



Фиг. 15С



Уклонение от NAb

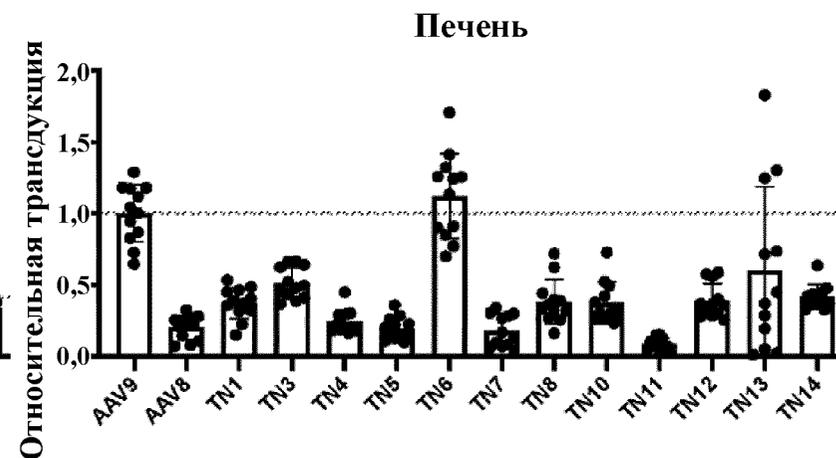


Фиг. 16

Фиг. 17А



Фиг. 17В



Фиг. 17С

