(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390429 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.22

(22) Дата подачи заявки
2021.07.22

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ НАЦЕЛЕННЫЕ НА МЫШЦЫ КОМПОЗИЦИИ

(31) **63/055,265; 63/107,394; 63/183,038**
(32) **2020.07.22; 2020.10.29; 2021.05.02**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/042812**
(87) **WO 2022/020616 2022.01.27**

(71) Заявитель:
ЗЕ БРОУД ИНСТИТЬЮТ, ИНК.; ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОУЗ ОФ ГАРВАРД КОЛЛЕДЖ; МАССАЧУСЕТС ИНСТИТЬЮТ ОФ ТЕКНОЛОДЖИ (US)

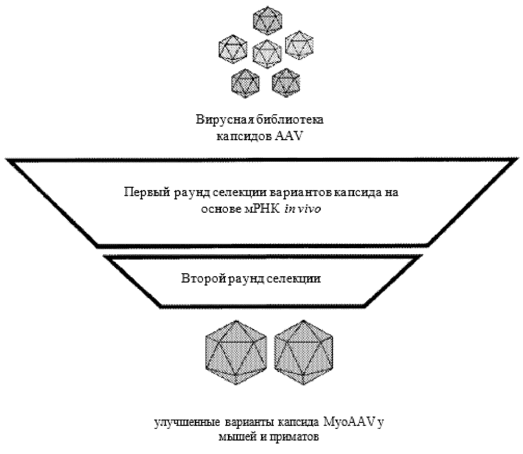
(72) Изобретатель:
Сабети Пардис, Табебордбар Мохаммадшариф, Йе Саймон (US)

(74) Представитель:
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Строкова О.В., Джермакян Р.В. (RU)

202390429 A1

(57) В данном документе описаны специфичные для мышц нацеливающие фрагменты и композиции, включающие специфичные для мышц нацеливающие мотивы. В данном документе также описано применение специфичных для мышц нацеливающих мотивов и композиций, включающих специфичные для мышц нацеливающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления специфичные для мышц нацеливающие фрагменты, и композиции, включающие специфичные для мышц нацеливающие фрагменты, могут быть использованы для прямой доставки карго в мышечную клетку.

aa585 XXX RGD XXXX aa589



202390429 A1

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ НАЦЕЛЕННЫЕ НА МЫШЦЫ КОМПОЗИЦИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает преимущество и приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/055265, поданной 22 июля 2020 г., и под названием «Сконструированные нацеленные на мышцы композиции», предварительной заявке на патент США № 63/107394, поданной 29 октября 2020 г., под названием «Сконструированные нацеленные на мышцы композиции» и предварительная заявка на патент США № 63/183038, поданной 2 мая 2021 г., под названием «Сконструированные нацеленные на мышцы композиции», содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[01] Это заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронной форме в виде файла ASCII.txt под названием BROD-5215WP_ST25.txt, созданного 13 июля 2021 г. и имеющего размер 186097 байт (188 кб на диске). Содержание перечня последовательностей включено в данный документ во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Объект изобретения, раскрытый в данном документе, в целом относится к нацеленным на мышцы композициям, включая векторы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV) и их системы, композиции и их применение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Рекомбинантные AAV (rAAV) являются наиболее часто используемыми средствами доставки для генной терапии и редактирования генов. Тем не менее, rAAV, содержащие варианты природного капсида, обладают ограниченным клеточным тропизмом. Действительно, rAAV, используемые в настоящее время, в основном инфицируют печень после системной доставки. Кроме того, эффективность трансдукции стандартными rAAV с природными капсидными вариантами в другие типы клеток, тканей и органов ограничена. Поэтому AAV-опосредованная доставка полинуклеотидов для лечения заболеваний, которые поражают клетки, ткани и органы, отличные от печени (например, нервную систему, скелетные мышцы и сердечную мышцу), как правило, требует введения большой дозы вируса (обычно около 1 x 10^{14} вг/кг), что часто приводит к гепатотоксичности. Кроме того, поскольку при использовании стандартных rAAV требуются большие дозы, производство достаточного количества терапевтического rAAV, необходимого для дозирования взрослых пациентов, является чрезвычайно сложной задачей. Кроме того, из-за различий в экспрессии генов и физиологии модели мышей и приматов по-разному отвечают на вирусные капсиды. Эффективность трансдукции различных вирусных частиц различается у разных видов, и в результате доклинические исследования на мышах часто неточно отражают результаты, полученные на приматах, включая человека. Таким образом, существует потребность в улучшенных rAAV для использования при лечении различных генетических заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В определенных примерах осуществления в данном документе описаны композиции, содержащие: нацеливающий фрагмент, эффективный для нацеливания на мышечную клетку, где нацеливающий фрагмент содержит один или более n-мерных мотивов, где по меньшей мере один n-мерный мотив одного или более n-мерных мотивов содержат или состоят из X_mRGDX_n, где каждый из X_m и X_n независимо выбран из любой аминокислоты, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, и где m равно 1-4; и необязательно карго, где карго соединено или иным образом связано с нацеливающим фрагментом.

[0005] В определенных иллюстративных вариантах осуществления по меньшей мере один n-мерный мотив является таким, как в любом из **таблицы 2**, **таблицы 3**, **Фиг. 14** или любой их комбинации.

[0006] В определенных иллюстративных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит полипептид, полинуклеотид, липид, полимер, сахар или их комбинацию.

[0007] В определенных иллюстративных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит вирусный белок.

[0008] В определенных примерах осуществления вирусный белок представляет собой капсидный белок.

[0009] В определенных примерах осуществления вирусный белок представляет собой белок аденоассоциированного вируса (AAV).

[0010] В определенных примерах осуществления n-мерный мотив расположен между двумя аминокислотами вирусного белка, так что n-мерный мотив является внешним по отношению к вирусному капсиду.

[0011] В определенных примерах осуществления n-мерный мотив вставлен между любыми двумя смежными аминокислотами между аминокислотами 262-269, 327-332, 382-386, 452-460, 488-505, 527-539, 545-558, 581-593, 704-714 или любой их комбинацией в капсидном полипептиде AAV9 или в аналогичном положении в капсидном полипептиде AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74, или AAV rh.10.

[0012] В определенных примерах осуществления n-мерный мотив вставлен между аминокислотами 588 и 589 в капсидном полипептиде AAV9 или в аналогичном положении в капсидном полипептиде AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74, или AAV rh.10.

[0013] В определенных примерах осуществления композиция представляет собой сконструированную вирусную частицу.

[0014] В определенных примерах осуществления сконструированная вирусная частица представляет собой сконструированную вирусную частицу AAV.

[0015] В определенных примерах осуществления вирусная частица AAV представляет собой сконструированную вирусную частицу AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV rh.74 или AAV rh.10.

[0016] В определенных примерах осуществления n-мерный мотив состоит из 3-15 аминокислот.

[0017] В определенных иллюстративных вариантах осуществления необязательное карго способно лечить или предотвращать мышечное заболевание или нарушение.

[0018] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мышечное заболевание или нарушение представляет собой

(a) аутоиммунное заболевание;

(b) рак;

(c) мышечную дистрофию;

(d) нервно-мышечное заболевание;

(e) болезнь накопления сахара или гликогена;

(f) болезнь экспансии тринуклеотидных повторов;

(g) обусловленную доминантно-негативной мутацией болезнь;

(h) кардиомиопатию;

(i) вирусное заболевание;

(j) прогероидный синдром; или

(k) любую их комбинацию.

[0019] В определенных примерах осуществления карго представляет собой морфолин, связанный с пептидом морфолин, антисмысловой олигонуклеотид, PMO, терапевтический трансген, полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид или пептид, PPMO, один или более пептидов, один или более полинуклеотидов, кодирующих белок CRISPR-Cas, направляющую РНК или и то, и другое, рибонуклеопротеин, где рибонуклеопротеин содержит молекулу системы CRISPR-Cas, РНК терапевтического трансгена или другую модифицирующую ген или терапевтическую РНК и/или белок, или любую их комбинацию.

[0020] В определенных иллюстративных вариантах осуществления карго способно индуцировать пропуск экзона в гене.

[0021] В определенных иллюстративных вариантах осуществления карго способно индуцировать пропуск экзона в гене дистрофина.

[0022] В определенных иллюстративных вариантах осуществления карго представляет собой ген мини- или микродистрофина.

[0023] В определенных иллюстративных вариантах осуществления ген мини- или микродистрофина содержит спектрин-подобные повторы 1, 2, 3 и 24 и необязательно домен nNOS.

[0024] В определенных иллюстративных вариантах осуществления болезнь экспансии тринуклеотидных повторов представляет собой болезнь Гентингтона, миотоническую дистрофию или лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию (FSHD).

[0025] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, миотоническую дистрофию или FSHD.

[0026] В определенных иллюстративных вариантах осуществления миотоническая дистрофия относится к типу 1 или типу 2.

[0027] В определенных иллюстративных осуществления кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, ассоциированную с DMD кардиомиопатию, или болезнь Данона.

[0028] В определенных примерах осуществления болезнь накопления сахара или гликогена представляет собой МПС типа III или болезнь Помпе.

[0029] В определенных иллюстративных вариантах осуществления МПС типа III, представляет собой МПС типа IIIA, IIIB, IIIC или IIID.

[0030] В определенных иллюстративных вариантах осуществления нервно-мышечное заболевание представляет собой болезнь Шарко-Мари-Тута или атаксию Фридрейха.

[0031] В определенных примерах осуществления композиция обладает повышенной активностью в отношении мышечных клеток, специфичностью в отношении мышечных клеток, сниженной иммуногенностью или любой их комбинацией.

[0032] В определенных иллюстративных вариантах осуществления в данном документе описаны векторные системы, содержащие: вектор, содержащий: один или более полинуклеотидов, каждый из которых кодирует весь или часть одного или более нацеливающих фрагментов, эффективных для нацеливания на мышечную клетку, где каждый нацеливающий фрагмент содержит один или более n-мерных мотивов, где по меньшей мере один n-мерный мотив из одного или более n-мерных мотивов содержит или состоит из X_mRGDX_n, где каждый из X_m и X_n независимо выбран из любой аминокислоты, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, и где m равно 1-4, и где по меньшей мере один из одного или более полинуклеотидов кодирует по меньшей мере один n-мерный мотив; и необязательно регуляторный элемент, функционально связанный с одним или более полинуклеотидами.

[0033] В определенных иллюстративных вариантах осуществления меньшей мере один n-мерный мотив является таким, как в любом из **таблицы 2**, **таблицы 3**, **Фиг. 14F** или любой их комбинации.

[0034] В определенных иллюстративных вариантах осуществления векторная система дополнительно содержит карго.

[0035] В определенных иллюстративных вариантах осуществления карго представляет собой полинуклеотид-карго и необязательно связан с одним или более из одного или более полинуклеотидов, кодирующих нацеливающий фрагмент.

[0036] В определенных иллюстративных вариантах осуществления полинуклеотид-карго присутствует в том же векторе или в другом векторе, как и один или более полинуклеотидов, кодирующих нацеливающий фрагмент.

[0037] В определенных иллюстративных вариантах осуществления векторная система способна продуцировать вирусные частицы, которые содержат карго, если оно присутствует.

[0038] В определенных иллюстративных вариантах осуществления векторная система способна продуцировать капсидный полипептид, содержащий один или более нацеливающих фрагментов.

[0039] В определенных иллюстративных вариантах осуществления векторная система способна продуцировать вирусные частицы AAV.

[0040] В определенных иллюстративных вариантах осуществления вирусные частицы AAV представляют собой сконструированные вирусные частицы AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV rh.74 или AAV rh.10.

[0041] В определенных иллюстративных вариантах осуществления капсидный полипептид представляет собой сконструированные вирусные частицы AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV rh.74 или AAV rh.10.

[0042] В определенных иллюстративных вариантах осуществления векторной системы один или более полинуклеотидов, кодирующих один n-мерный мотив, вставлены между двумя кодонами, соответствующими двум аминокислотам вирусного белка, так что n-мерный мотив(-ы) является внешним по отношению к вирусному капсиду.

[0043] В определенных иллюстративных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более n-мерных мотивов, вставлены между двумя кодонами, соответствующими любым двум смежным аминокислотам, между аминокислотами 262-269, 327-332, 382-386, 452-460, 488-505, 527-539, 545-558, 581-593, 704-714 или любой их комбинацией, в капсидном полипептиде AAV9 или в аналогичном положении в капсидном полипептиде AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74, AAV rh.10.

[0044] В определенных примерах осуществления один или несколько полинуклеотидов, кодирующих один или более n-мерных мотивов, вставлены между кодонами, соответствующими аминокислотам 588 и 589 в капсидном полинуклеотиде AAV9, или в аналогичном положении в капсидном полинуклеотиде AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74, AAV rh.10.

[0045] В определенных иллюстративных вариантах осуществления вектор, содержащий один или более полинуклеотидов, каждый из которых кодирует весь или часть одного или более нацеливающих фрагментов, не содержит регуляторные элементы сплайсинга.

[0046] В определенных иллюстративных вариантах осуществления векторная система дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий вирусный белок rep.

[0047] В определенных иллюстративных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий вирусный белок rep, представляет собой полинуклеотид, кодирующий белок rep AAV.

[0048] В определенных иллюстративных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий вирусный белок rep, содержится в том же векторе или в другом векторе, как и один или более полинуклеотидов, каждый из которых кодирует весь или часть одного или более нацеливающих фрагментов.

[0049] В определенных иллюстративных вариантах осуществления вирусный белок rep функционально связан с регуляторным элементом.

[0050] В определенных иллюстративных вариантах осуществления в данном документе описаны полинуклеотиды, кодируемые и/или продуцируемые векторной системой, описанной в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа.

[0051] В определенных иллюстративных вариантах осуществления полипептид представляет собой вирусный полипептид.

[0052] В определенных иллюстративных вариантах осуществления вирусный полипептид представляет собой полипептид AAV.

[0053] В определенных иллюстративных вариантах осуществления описанные в данном документе частицы получены с помощью векторной системы и/или включают полипептид, описанной в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа.

[0054] В определенных иллюстративных вариантах осуществления частица представляет собой вирусную частицу.

[0055] В определенных иллюстративных вариантах осуществления вирусная частица представляет собой частицу аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусную частицу или ретровирусную частицу.

[0056] В определенных иллюстративных вариантах осуществления вирусная частица обладает специфичным для мышц тропизмом.

[0057] В определенных иллюстративных вариантах осуществления карго способно лечить или предотвращать мышечное заболевание или нарушение.

[0058] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мышечное заболевание или нарушение представляет собой

a. аутоиммунное заболевание;

b. рак;

c. мышечную дистрофию;

d. нервно-мышечное заболевание;

e. болезнь накопления сахара или гликогена;

f. болезнь экспансии тринуклеотидных повторов;

g. обусловленную доминантно-негативной мутацией болезнь;

h. кардиомиопатию;

i. вирусное заболевание;

j. прогероидный синдром; или

k. любую их комбинацию.

[0059] В определенных примерах осуществления карго представляет собой морфолин, связанный с пептидом морфолин, антисмысловой олигонуклеотид, PMO, терапевтический трансген, полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид или пептид, PPMO, один или более пептидов, один или более полинуклеотидов, кодирующих белок CRISPR-Cas, направляющую РНК или и то, и другое, рибонуклеопротеин, где рибонуклеопротеин содержит молекулу системы CRISPR-Cas, РНК терапевтического трансгена или другую модифицирующую ген или терапевтическую РНК и/или белок, или любую их комбинацию.

[0060] В определенных иллюстративных вариантах осуществления карго способно индуцировать пропуск экзона в гене.

[0061] В определенных иллюстративных вариантах осуществления карго способно индуцировать пропуск экзона в гене дистрофина.

[0062] В определенных иллюстративных вариантах осуществления карго представляет собой ген мини- или микродистрофина.

[0063] В определенных иллюстративных вариантах осуществления ген мини- или микродистрофина содержит спектрин-подобные повторы 1, 2, 3 и 24 и необязательно домен nNOS.

[0064] В определенных иллюстративных вариантах осуществления болезнь экспансии тринуклеотидных повторов представляет собой болезнь Гентингтона, миотоническую дистрофию или лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию (FSHD).

[0065] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, миотоническую дистрофию или FSHD.

[0066] В определенных иллюстративных вариантах осуществления миотоническая дистрофия относится к типу 1 или типу 2.

[0067] В определенных иллюстративных осуществления кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, ассоциированную с DMD кардиомиопатию, или болезнь Данона.

[0068] В определенных примерах осуществления болезнь накопления сахара или гликогена представляет собой МПС типа III или болезнь Помпе.

[0069] В определенных иллюстративных вариантах осуществления МПС типа III, представляет собой МПС типа IIIA, IIIB, IIIC или IIID.

[0070] В определенных иллюстративных вариантах осуществления нервно-мышечное заболевание представляет собой болезнь Шарко-Мари-Тута или атаксию Фридрейха.

[0071] В определенных иллюстративных вариантах осуществления полипептид, частица или и то и другое обладают повышенной активностью в отношении мышечных клеток, специфичностью в отношении мышечных клеток, сниженной иммуногенностью или любой их комбинацией.

[0072] В определенных иллюстративных вариантах осуществления в данном документе описаны клетки, содержащие:

a. композицию, описанную в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

b. векторную систему, описанную в предыдущих абзацах или в другом месте данного документа;

c. полипептид, описанный в предыдущих абзацах или в другом месте данного документа;

d. частицу, описанную в предыдущих абзацах или в другом месте данного документа; или

e. их комбинацию.

[0073] В определенных иллюстративных вариантах осуществления клетка является прокариотической.

[0074] В определенных иллюстративных вариантах осуществления клетка является эукариотической.

[0075] В определенных иллюстративных вариантах осуществления в данном документе описаны фармацевтические составы, содержащие:

a. композицию, описанную в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

b. векторную систему, описанную в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

c. полипептид, описанный в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

d. частицу, описанную в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

e. клетку, описанную в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа; или

f. их комбинацию; и

фармацевтически приемлемый носитель.

[0076] В определенных иллюстративных вариантах осуществления в данном документе описаны способы, включающие:

введение субъекту, нуждающемуся в этом,

a. композиции, описанной в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

b. векторной системы, описанной в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

c. полипептида, описанного в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

d. частицы, описанной в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

e. клетки, описанной в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа;

f. фармацевтического состава, описанного в любом из предыдущих абзацев или в другом месте данного документа; или

g. их комбинации,

[0077] В определенных иллюстративных вариантах осуществления субъект имеет мышечное заболевание или нарушение.

[0078] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мышечное заболевание или нарушение представляет собой

a. аутоиммунное заболевание;

b. рак;

c. мышечную дистрофию;

d. нервно-мышечное заболевание;

e. болезнь накопления сахара или гликогена;

f. болезнь экспансии тринуклеотидных повторов;

g. обусловленную доминантно-негативной мутацией болезнь;

h. кардиомиопатию;

i. вирусное заболевание;

j. прогероидный синдром; или

k. любую их комбинацию.

[0079] В определенных иллюстративных вариантах осуществления болезнь экспансии тринуклеотидных повторов представляет собой болезнь Гентингтона, миотоническую дистрофию или лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию (FSHD).

[0080] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, миотоническую дистрофию или FSHD.

[0081] В определенных иллюстративных вариантах осуществления миотоническая дистрофия относится к типу 1 или типу 2.

[0082] В определенных иллюстративных осуществления кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, ассоциированную с DMD кардиомиопатию, или болезнь Данона.

[0083] В определенных примерах осуществления болезнь накопления сахара или гликогена представляет собой МПС типа III или болезнь Помпе.

[0084] В определенных иллюстративных вариантах осуществления МПС типа III, представляет собой МПС типа IIIA, IIIB, IIIC или IIID.

[0085] В определенных иллюстративных вариантах осуществления нервно-мышечное заболевание представляет собой болезнь Шарко-Мари-Тута или атаксию Фридрейха.

[0086] В определенных иллюстративных вариантах осуществления композиции имеют уменьшенную или устраненную нацеленность или специфичность в отношении немышечной клетки. В определенных иллюстративных вариантах осуществления немышечные клетки представляют собой клетки печени.

[0087] Эти и другие аспекты, объекты, признаки и преимущества примеров вариантов осуществления станут очевидны для специалистов в данной области техники с учетом нижеприведенного подробного описания проиллюстрированных примеров вариантов осуществления.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0088] Понимание свойств и преимуществ настоящего изобретения будет получено на основе следующего подробного описания, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых могут быть использованы принципы изобретения, и сопроводительных графических материалов, в которых:

[0089] **Фиг. 1 –** Механизм трансдукции аденоассоциированного вируса (AAV), который приводит к продукции мРНК из трансгена.

[0090] **Фиг. 2 -** Селекция вариантов AAV на основе мРНК может быть более строгой, чем селекция на основе ДНК. Вирусную библиотеку экспрессировали под контролем промотора CMV.

[0091] **Фиг. 3A-3B –** Корреляция между вирусной библиотекой и геномной ДНК вектора (Фиг. 3A) и мРНК (Фиг. 3B) в печени**.**

[0092] **Фиг. 4A-4F -** Варианты капсида, присутствующие на уровне ДНК и экспрессирующиеся на уровне мРНК, идентифицированные в различных тканях. Для этого эксперимента вирусную библиотеку экспрессировали под контролем промотора CMV.

[0093] **Фиг. 5A-5C -** Экспрессия мРНК капсида в различных тканях под контролем специфичных для клеточного типа промоторов (как указано на оси x). CMV был включен в качестве иллюстративного конститутивного промотора. CK8 является специфичным для мышц промотором. MHCK7 является специфичным для мышц промотором. hSyn является нейрон-специфичным промотором. Уровни экспрессии специфичных для типа клеток промоторов нормализовали на основе уровней экспрессии конститутивного промотора CMV в каждой ткани.

[0094] **Фиг. 6 -** Схема, демонстрирующая варианты осуществления способа получения и селекции вариантов капсида для тканеспецифичной доставки генов у разных видов.

[0095] **Фиг.** 7 -Схема, демонстрирующая варианты создания библиотеки вариантов капсида AAV, в частности вставку случайного *n*-мера (n=3-15 аминокислот) в AAV дикого типа, например, AAV9.

[0096] **Фиг. 8 -** Схема, демонстрирующая варианты создания библиотеки вариантов капсида AAV, в частности получение вариантов частиц AAV. Каждый вариант капсида инкапсулирует свою собственную кодирующую последовательность в виде векторного генома.

[0097] **Фиг. 9** – Иллюстративные векторные карты репрезентативных векторов библиотеки плазмид, кодирующих капсиды AAV, (см., например, Фиг. 8), которые можно использовать в векторной системе AAV для создания библиотеки вариантов капсида AAV.

[0098] **Фиг. 10 -** Титр вируса (рассчитанный как векторные геномы AAV9/чашка диаметром 15 см), продуцируемый конструкциями, содержащими различные конститутивные и специфичные для клеточного типа промоторы млекопитающих.

[0099] **Фиг. 11 -** Схема селекции дополнительно оптимизированных вариантов капсида myoAAV (также называемых в данном документе вариантами капсида «улучшенный MyoAAV»).

[0100] **Фиг. 12 -** Варианты капсида «улучшенный MyoAAV» (eMyoAAV) могут более эффективно трансдуцировать мышцы мыши по сравнению с MyoAAV первого поколения после системной доставки.

[0101] **Фиг. 13 -** Варианты капсида myoAAV первого и второго поколения зависят от гетеродимера интегрина aVb6 для трансдукции первичных миотрубочек человека (SEQ ID NO: 2-12).

[0102] **Фиг. 14A-14F -** DELIVER идентифицирует класс тропных к мышцам вариантов капсида AAV, содержащих мотив RGD. **Фиг. 14A**) Схема получения вирусной библиотеки и селекции вариантов капсида с использованием DELIVER (SEQ ID NO: 13). **FIG. 14B**) Сравнение титров rAAV, полученных с использованием конструкций, содержащих ITR, которые экспрессируют кодирующую последовательность капсида AAV9 под контролем промоторов CMV, CK8 или MHCK7. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=4). P-значение, рассчитанное с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с критерием множественных сравнений Тьюки (MCT). **Фиг. 14C-14D**) Экспрессия *in vivo* мРНК библиотеки капсидов AAV9, экспрессируемая под контролем промоторов CMV, CK8 или MHCK7, в скелетных мышцах мыши (**Фиг. 14C**) и сердце (**Фиг. 14D**) после системной инъекции. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=3). P-значение, рассчитанное с помощью однофакторного дисперсионного анализа с MCT Тьюки. *: P<0,05, **: P<0,01. **Фиг. 14E**) Графики, демонстрирующие обогащение вариантов капсида, экспрессируемых под промотором

MHCK7, по сравнению с вирусной библиотекой на уровне ДНК и мРНК в различных скелетных мышцах мыши. **Фиг. 14F**) Последовательность 7-мерной вставки в лучшие варианты капсида с высокой экспрессией в мышцах мышей после второго раунда селекции на основе транскриптов. Варианты с одинаковым цветом в каждой группе кодируются синонимичными кодонами ДНК (SEQ ID NO: 8-12, 14-18). См. также **Фиг. 21A-21I**.

[0103] **Фиг. 15A-15D -** MyoAAV трансдуцирует скелетные мышцы мыши с высокой эффективностью после системной инъекции. **Фиг. 15A-15B**) Флуоресцентные изображения тотального препарата (**Фиг. 15A**) и поперечных срезов (**Фиг. 15B**) скелетных мышц, сердца и печени мышей C57BL/6J, которым системно вводили 1E+12 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. Зеленый: EGFP, красный: ламинин для мышц, лектин для печени, синий: Hoechst. Масштабная линейка в поперечных срезах: 100 мкм. **Фиг. 15C**) Количественная оценка кратной разницы в экспрессии мРНК EGFP в различных тканях инъецированных самцов и самок мышей C57BL/6J. Пунктирная красная линия указывает на относительную экспрессию AAV9-CMV-EGFP. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=3-4); *: P<0,05, **: P<0,01 (t-критерий Стьюдента между мышами, которым вводили AAV9 и MyoAAV 1A, для каждой группы).**Фиг. 15D**) Количественная оценка трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках мыши (слева) и человека (справа), трансдуцированных носителем, AAV9- или MyoAAV 1A-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5); **: P<0,01 (t-критерий Стьюдента). Донор 1: мужчина 29 лет, донор 2: женщина 19 лет, донор 3: мужчина 20 лет, донор 4: женщина 34 года. См. также **Фиг. 22A-22K и 29A-29O.**

[0104] **Фиг. 16A-16D -** Системная инъекция MyoAAV приводит к быстрому и устойчивому высокому уровню экспрессии репортерного трансгена в мышцах по всему телу**. Фиг. 16A**) Биолюминесцентные изображения всего тела *in vivo* мышей BALB/cJ, которым систематически вводили 4E+11 гв AAV8-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Fluc, которые получали в течение 120 дней. **Фиг. 16B**) Количественную оценку общей люминесценции передних и задних конечностей животных, которым вводили AAV8-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Fluc, которые получали в течение 120 дней. P-значение рассчитано между группами AAV8, AAV9 и MyoAAV 1A с помощью двухфакторного ANOVA с MCT Тьюки; данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5). **: P<0,01 как для MyoAAV 1A по сравнению с AAV8, так и для MyoAAV 1A по сравнению с AAV9. Разница между группами AAV8 и AAV9 не является статистически значимой ни в один из моментов времени. **Фиг. 16C**) Люминесцентные изображения всего органа TA, трицепса, икроножной, четырехглавой мышцы и мышц живота у мышей, которым вводили 4E+11 гв AAV8-, AAV9- или MyoAAV-CMV-Fluc, которые получали через 4 месяца после инъекции. Цветовая шкала: 1E+7 – 1E+8. **Фиг. 16D**) Количественную оценку общей люминесценции различных мышц животных, которым вводили AAV8-, AAV9- или MyoAAV-CMV-Fluc, которые получали через 120 дней после инъекции. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n=5). *: P<0,01 (критерий Манна-Уитни между группами MyoAAV и AAV9). См. также **FIGS. 22A-22K, 23A-23B, и 29A-29O**.

[0105] **Фиг. 17A-17O** - Системное введение MyoAAV-*Dmd* CRISPR и MyoAAV-*MTM1* человека приводит к терапевтическому эффекту на мышиных моделях DMD и XLMTM, соответственно. **Фиг. 17A**) Репрезентативные иммунофлуоресцентные изображения для дистрофина (красный) в мышцах mdx, которым вводили AAV9- или MyoAAV 1A-*Dmd* CRISPR. Масштабная линейка: 400 мкм. **Фиг. 17B**) Вестерн-блоты, обнаруживающие дистрофин и GAPDH в мышцах мышей, которым вводили AAV9- или MyoAAV 1A-*Dmd* CRISPR, с относительной интенсивностью сигнала, определенной с помощью денситометрии в нижней части. A.U.: относительная единица, нормализованная к GAPDH. **Фиг. 17C**) Количественная оценка мРНК с делецией экзона 23 на основе Taqman в различных мышцах взрослых мышей mdx, которым вводили AAV9- или MyoAAV 1A-*Dmd* CRISPR. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=9-10); **: P<0,01 (t-критерий Стьюдента). **Фиг. 17D-17E**) Удельная сила передней большеберцовой мышцы (**Фиг. 17D**) и снижение силы после 6 эксцентрических сокращений (**Фиг. 17E**) для мышей C57BL/6J дикого типа, которым вводили носитель (n = 11), и мышей mdx, которым вводили носитель (n = 15), AAV9-*Dmd* CRISPR (n = 15) или MyoAAV 1A-*Dmd* CRISPR (n = 17). **: P <0,01 (дисперсионный анализ с МСТ Тьюки). F) Схема эксперимента по исследованию эффективности 2E+12 гв/кг AAV9- или MyoAAV 1A-MHCK7-*MTM1* человека (h*MTM1*), систематически доставляемого мышам с нокаутом *Mtm1* (KO) в возрасте 4 недель. **Фиг. 17G**) Общая масса тела мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель, или 2E+12 гв/кг AAV9- или MyoAAV 1A-MHCK7-h*MTM1*, и контрольных однопометных дикого типа, которым вводили носитель. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=6 для KO AAV9, n=6 для KO MyoAAV 1A, n=3 для носителя дикого типа, n=3 для носителя KO). P-значение рассчитано между группами MyoAAV 1A и AAV9; **: P<0,01 (множественные t-тесты с МСТ Холма-Сидака). **Фиг. 17H**) Фотографии мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили 2E+12 гв/кг MyoAAV 1A-h*MTM1* или AAV9-h*MTM1* через 16 недель после инъекции вируса. **Фиг. 17K**) Кривая выживаемости для животных с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель, AAV9-h*MTM1* или MyoAAV-h*MTM1*, а также однопометников дикого типа, которым вводили носитель. Точки данных для мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель, взяты из предыдущего эксперимента. **Фиг. 17. I)** Среднечасовая пассивная активность, оцененная по вращению колеса активности в клетке у мышей дикого типа, которым вводили носитель, или мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель, AAV9-h*MTM1* или MyoAAV 1A-h*MTM1*, обе при 2E+12 гв/кг. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=6 для KO AAV9, n=6 для KO MyoAAV 1A, n=3 для носителя дикого типа, n=3 для носителя KO) для еженедельных измерений, усредненных по трехнедельным периодам времени. P-значение рассчитано между группами MyoAAV 1A и AAV9; **: P<0,01 (множественные t-тесты с МСТ Холма-Сидака). **Фиг. 17J)** Количество случаев поднятия на задние лапы в течение 5 минут в мониторе активности у мышей дикого типа, которым вводили носитель, или мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили AAV9-h*MTM1*, или MyoAAV-h*MTM1*, обе при 2E+12 гв/кг. Данные представлены как среднее ± СОС (n=5 для KO AAV9, n=6 для KO MyoAAV, n=3 для носителя дикого типа) для еженедельных измерений, усредненных по трехнедельным периодам времени. P-значение рассчитано между группами MyoAAV и AAV9; *: P<0,05, **: P<0,01 (двухэтапный тест Бенджамини-Кригера-Иекутелли). **Фиг. 17K)** Кривая выживаемости для животных с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель, AAV9-h*MTM1* или MyoAAV 1A-h*MTM1*, а также однопометников дикого типа, которым вводили носитель. (n=6 для KO AAV9, n=6 для KO MyoAAV 1A, n=3 для носителя дикого типа, n=4 для носителя KO). Точки данных для мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель, взяты из предыдущего эксперимента. P-значение рассчитано между группами MyoAAV 1A и AAV9; **: P<0,01 (критерий Мантеля-Кокса). **Фиг. 17L)** Количественную оценку кратной разницы в экспрессии мРНК hMTM1 в икроножной мышце, четырехглавой мышце, сердце и печени мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили AAV9- или MyoAAV 1A-h*MTM1*, проводили через 4 недели после инъекции. Пунктирная красная линия указывает на относительную экспрессию AAV9-h*MTM1*. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=4); *: P<0,05, **: P<0,01 (t-критерий Стьюдента между группами, которым вводили AAV9 и MyoAAV 1A, для каждой ткани). **Фиг. 17M)** Количественное определение векторных геномов на диплоидный геном в различных тканях мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили AAV9- или MyoAAV 1A-h*MTM1*, проанализировали через 4 недели после инъекции. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=4). *: P<0,05, **: P<0,01 (t-критерий Стьюдента). **Фиг. 17N)** Вестерн-блоты, обнаруживающие hMTM1 и GAPDH в мышцах мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель, AAV9- или MyoAAV 1A-h*MTM1*, с относительной интенсивностью сигнала, определенной с помощью денситометрии в нижней части. AU: относительная единица, нормализованная к GAPDH. **Фиг. 17O)**

Удельная сила мышц разгибателя пальцев (EDL) для мышей дикого типа C57BL/6J, которым вводили носитель (n = 4), и мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель (n = 2), AAV9-h*MTM1* (n = 4), или MyoAAV 1A-h*MTM1* (n=4). **: P <0,01 (дисперсионный анализ с МСТ Тьюки). См. также **Фиг. 24A-24G**.

[0106] **Фиг. 18A-18L -** Трансдукция MyoAAV зависит как от гетеродимеров интегрина, так и от AAVR. **Фиг. 18A-18B**) Количественная оценка трансдукции *in vitro* (**Фиг. 18A**) и вирусов, связанных с клеточной поверхностью (**Фиг. 18B**) в клетках HEK293, трансфицированных плазмидами, кодирующими гетеродимеры RGD-связывающего интегрина, или pUC19, и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV-CMV-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± СОС (n=3). Расчетное P-значение по сравнению с клетками, трансфицированными pUC19, в каждой группе. *: P <0,05, **: P<0,01 (дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Даннета). **Фиг. 18C**Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках мышей, обработанных различными концентрациями антагонистов панинтегрина αV GLPG-0187 и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± СОС (n=5). Рассчитанное P-значение по сравнению с условием 0 нМ малых молекул в каждой группе. **: P<0,01 (дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Даннета). **Фиг. 18D)**Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антагонистов панинтегрина αV GLPG-0187 и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV 1A-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). Рассчитанное P-значение по сравнению с условием 0 нМ малых молекул в каждой группе. *: P<0,01 (дисперсионный анализ с МСТ Даннета). **Фиг. 18E-18F**) Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, трансдуцированных MyoAAV 1A-CK8-Nluc (**Фиг. 18E**) или AAV9-CK8-Nluc (**Фиг. 18F**), инкубированных с различными концентрациями рекомбинантных белков αVb1, αVb3, αVb6, αVb8 или MBP. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5). *: P<0,01, **: P<0,001 (дисперсионный анализ с МСТ Даннетта с рекомбинантным белком 0 нМ, установленным в качестве контроля для каждой группы). **Фиг. 18G**) Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антитела к αVb6 и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± СОС (n=5). Расчетное P-значение по сравнению с состоянием антитела 0 нг/мкл в каждой группе. **: P<0,001 (дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Даннета). **Фиг. 18G-18H)**Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антитела к αVb6

(**Фиг. 18G**) или контрольного изотипа (**Фиг. 18H**) и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV 1A-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). Расчетное P-значение по сравнению с условием 0 нг/мкл антитела в каждой группе; *: P<0,01, **: P<0,001 (дисперсионный анализ с МСТ Даннета). **Фиг. 18I-18J**) Количественная оценка трансдукции *in vitro* (**Фиг. 18I**) и вирусов, связанных с клеточной поверхностью (**Фиг. 18J**) в клетках HEK293, трансфицированных плазмидами, кодирующими гетеродимеры RGD-связывающего интегрина, или pUC19 и трансдуцированных MyoAAV 1A-CMV-Nluc. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=3); *: P<0,01 (однофакторный дисперсионный анализ с МСТ Даннетта с клетками, трансфицированными pUC19, выбранными в качестве контроля). На **Фиг. 18K**показана эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антагонистов панинтегрина αV CWHM-12 и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV 1A-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). Рассчитанное P-значение по сравнению с условием 0 нМ малых молекул в каждой группе. *: P<0,01 (дисперсионный анализ с МСТ Даннета. На **Фиг. 18L** показана эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антитела изотипического контроля и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV 1A-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). Расчетное P-значение по сравнению с условием 0 нг/мкл антитела в каждой группе; *: P<0,01, **: P<0,001 (дисперсионный анализ с МСТ Даннета). См. также **FIGS. 25A-25K** и **26A-26O**.

[0107] **Фиг. 19A-19M -** Дальнейшая эволюция MyoAAV с использованием DELIVER приводит к созданию более совершенных тропных к мышцам вариантов капсида**. Фиг. 19A**) Структура поверхностной петли VR-VIII AAV9 и предсказанная структура поверхностной петли VR-VIII MyoAAV 1A с аннотированными аминокислотами. **Фиг. 19B**) Схема дизайна вирусной библиотеки и последовательности лучших выбранных вариантов, идентифицированных в мышцах мыши после инъекции вирусной библиотеки второго цикла в двух разных дозах (SEQ ID NO: 2-7, 19-21). **Фиг. 19C**) Различные ткани мышей C57BL/6J, которым системно вводили 2E+11 гв MyoAAV 1A-CMV-EGFP (слева) или MyoAAV 2A-CMV-EGFP (справа), освещенных синим светом. **Фиг. 19D**) Флуоресцентные изображения тотального препарата икроножной мышцы, трицепса, TA и четырехглавой мышцы мышей, которым системно вводили 2E+11 гв AAV9-, MyoAAV 1A- или MyoAAV 2A-CMV-EGFP. **Фиг. 19E**) Количественная оценка кратной разницы в экспрессии мРНК EGFP в различных тканях мышей C57BL/6J, которым системно вводили 2E+11 гв MyoAAV

1A- или MyoAAV 2A-CMV-EGFP, по сравнению с мышами, которым вводили такую же дозу AAV9-CMV-EGFP. Пунктирная красная линия указывает на относительную экспрессию AAV9-CMV-EGFP. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n = 11 для MyoAAV 1A и MyoAAV 2A, n = 8 для AAV9). Расчетное P-значение по сравнению с группой AAV9. *: P<0,05, **: P<0,01 (дисперсионный анализ с МСТ Даннета). **Фиг. 19F**) Количественная оценка трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, трансдуцированных AAV9-, MyoAAV 1A- или MyoAAV 2A-CK8-Nluc. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n=5). *: P<0,01 (дисперсионный анализ с МСТ Тьюки). **Фиг. 19G**) Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антагонистов интегрина αV GLPG-0187 и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV 2A-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). Рассчитанное P-значение по сравнению с условием 0 нМ малых молекул в каждой группе. *: P<0,05, **: P<0,01 (дисперсионный анализ с МСТ Даннета). **Фиг. 19H-19I**) Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, трансдуцированных MyoAAV 2A-CK8-Nluc (**Фиг. 19H**) или AAV9-CK8-Nluc (**Фиг. 19I**), инкубированных с различными концентрациями рекомбинантных белков αVb1, αVb3, αVb6, αVb8 или MBP. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5). **: P<0,01, ***: P<0,001 (однофакторный дисперсионный анализ с МСТ Даннетта с 0 нМ рекомбинантного белка в каждой группе в качестве контроля). **Фиг. 19J**) Биолюминесцентные изображения всего тела *in vivo* мышей BALB/cJ, которым систематически вводили 2E+11 гв AAVrh74-, AAV9- или MyoAAV 2A-CMV-Fluc, которые получали в течение 21 дней. Цветовая шкала: 6E+6 - 1E+9. **Фиг. 19K**) Количественную оценку общей люминесценции задних конечностей животных, которым вводили AAVrh74-, AAV9- или MyoAAV 2A-CMV-Fluc, которые получали в течение 21 дней. P-значение рассчитано между группами AAVrh74, AAV9 и MyoAAV 2A с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с МСТ Тьюки; **: P<0,01 как для MyoAAV 2A по сравнению с AAVrh74, так и для MyoAAV 2A по сравнению с AAV9. Разница между группами AAVrh74 и AAV9 не является статистически значимой ни в один из моментов времени. **Фиг. 19L)** Количественная оценка векторных геномов на диплоидный геном в различных тканях мышей C57BL/6J, которым вводили 2E+11 гв AAV9-, MyoAAV 1A- или MyoAAV 2A-CMV-EGFP. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n = 11 для MyoAAV 1A и MyoAAV 2A, n = 8 для AAV9). P-значение рассчитано между группами MyoAAV 2A и AAV9; *: P<0,05, **: P<0,01 (t-критерий Стьюдента). **Фиг. 19M)**Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антитела к αVb6 (слева) или 10 нг/мкл антитела изотипического контроля (справа) и трансдуцированных вариантами капсида AAV9 или вариантами капсида, содержащими RGD первого или второго поколения, кодирующими Nluc под контролем промотора CK8. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). P-значение для данных антитела к αVb6, рассчитанное между группами первого и второго поколения. *: P<0,05, **: P<0,01 (двусторонний дисперсионный анализ с МСТ Тьюки). P-значение для данных по изотипическому контролю, рассчитанное между изотипическим контролем и условием 10 нг/мкл антитела к αVb6 для каждой группы; **: P<0,01 (t-критерий Стьюдента). См. также **Фиг. 27A-27B**.

[0108] **Фиг. 20A-20F** -Системная инъекция EMyoAAV-CK8-микродистрофина в низкой дозе 2E+13 гв/кг приводит к широкой экспрессии микродистрофина и эффективному восстановлению мышечной функции у взрослых мышей *DBA/2J-mdx*. **Фиг. 20A**) Репрезентативные иммунофлуоресцентные изображения для микродистрофина-FLAG (красный) в мышцах мышей DBA/2J-mdx, которым вводили 2E+13 гв/кг AAV9- или MyoAAV 2A-CK8-микродистрофина. Масштабная линейка: 400 мкм. **Фиг. 20B**) Вестерн-блоты, обнаруживающие микродистрофин-FLAG и GAPDH в мышцах мышей, которым вводили 2E+13 гв/кг AAV9- или MyoAAV 2A-CK8-микродистрофина, с относительной интенсивностью сигнала, определенной с помощью денситометрии в нижней части. A.U.: относительная единица, нормализованная к GAPDH. **Фиг. 20C**) Количественная оценка кратной разницы в экспрессии мРНК микродистрофина в различных мышцах и печени у мышей DBA/2J-mdx, которым системно вводили 2E+13 гв/кг MyoAAV 2A-CK8-микродистрофина, по сравнению с мышами, которым вводили такую же дозу AAV9-CK8-микродистрофина. Пунктирная красная линия указывает на относительную экспрессию AAV9-CK8-микродистрофина. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=9-10); *: P<0,05, **: P<0,01 (t-критерий Стьюдента).**Фиг. 20D**) Количественная оценка векторных геномов на диплоидный геном в различных мышцах и печени мышей DBA/2J-mdx, которым вводили 2E+13 гв/кг AAV9- или MyoAAV 2A-CK8-микродистрофина. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=9-10). **: P<0,01 (t-критерий Стьюдента). **Фиг. 20E-20F**) Удельная сила мышц (**Фиг. 20E**) и снижение силы после эксцентрических сокращений **(Фиг. 20F**) у мышей DBA2/J, которым вводили носитель (n=10), и мышей DBA/2J-mdx, которым вводили носитель (n=10), AAV9-CK8-микродистрофин (n=10) или MyoAAV 2A-CK8-микродистрофин (n=10). *: P <0,05, **: P <0,01, ***: P <0,001 (дисперсионный анализ с МСТ Тьюки).

[0109] **Фиг. 21A-21I -** DELIVER позволяет выбирать варианты капсида, способные к функциональной трансдукции в различных тканях. **Фиг. 21A**) Схематическое изображение различных стадий трансдукции AAV. **Фиг. 21B-21G**) Графики, демонстрирующие обогащение вариантов капсида, экспрессированных под контролем универсального промотора CMV, по сравнению с вирусной библиотекой на уровне ДНК и мРНК в головном мозге (**Фиг. 21B**), почках (**Фиг. 21C**), легких (**Фиг. 21D**), скелетных мышцах (**Фиг. 21E**), сердце (**Фиг. 21F**) и печени (**Фиг. 21G**) мышей, получивших инъекцию. Селекция на основе транскриптов, используемая в DELIVER, обеспечивает более строгую идентификацию функциональных вариантов капсида по сравнению с селекцией на основе ДНК. Обогащение вирусной библиотеки рассчитывается путем деления количества прочтений на миллион (RPM) для каждого варианта, идентифицированного в ткани, на RPM того же варианта в вирусной библиотеке. **Фиг. 21H-21I**) Корреляция между представленностью каждого капсидного варианта в вирусной библиотеке и представленностью ДНК векторной генома (**Фиг. 21H)** или экспрессируемой мРНК (под контролем промотора CMV, **Фиг. 21I**) из этого варианта, идентифицированного в печени мышей, которым вводили библиотеку вирусов. В то время как относительное количество геномной ДНК вектора из каждого варианта коррелирует с представленностью этого варианта в вирусной библиотеке, практически нет корреляции между уровнями экспрессии капсидной мРНК из каждого варианта и количеством этого варианта в библиотеке вирусов на основе линейной регрессии между двумя типами образцов. RPM: количество прочтений на миллион.

[0110] **Фиг. 22A-22K -** MyoAAV продуцирует рекомбинантный AAV с аналогичными титрами по сравнению с AAV9 и трансдуцирует мышечные стволовые клетки более эффективно, чем AAV8 и AAV9, после системной доставки взрослым мышам *mdx-Ai9*. **Фиг. 22A-22B**) Флуоресцентные изображения тотального препарата (**Фиг. 22A**) и поперечного среза (**Фиг. 22B**) трехглавой, икроножной и брюшной мышц мышей C57BL/6J, которым систематически вводили 1E+12 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. Зеленый: EGFP, красный: ламинин, синий: Hoechst. Масштабная линейка в поперечных срезах: 100 мкм. **Фиг. 22C**) Флуоресцентные изображения тотального препарата легких, почек, селезенки и мозга мышей C57BL/6J, которым систематически вводили 1E+12 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. **Фиг. 22D**) Количественная оценка векторных геномов на диплоидный геном в различных тканях мышей C57BL/6J, которым вводили 1E+12 гв AAV9 или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=4); *: $P<0,05$, **: $P<0,01$ (t-критерий Стьюдента).**Фиг. 22E**) Сравнение титров рекомбинантных AAV, продуцируемых лучшими вариантами капсида, содержащими RGD, с AAV9 дикого типа. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=3). P-значение, рассчитанное с помощью дисперсионного теста с МСТ Даннетта с AAV9 в качестве контроля. **Фиг. 22F**) Схема эксперимента по анализу трансдукции сателлитных клеток. Доставка Cre-рекомбиназы в клетки, содержащие локус Ai9, приводит к удалению СТОП-кассеты из генома и экспрессии tdTomato. **Фиг. 22G**) Процент трансдуцированных tdTomato+ мышечных стволовых клеток, выделенных из 6-месячных мышей mdx-Ai9, через 2 недели после системной инъекции 4E+11 гв AAV8-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Cre. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=4); **: P <0,01 (однофакторный дисперсионный анализ с МСТ Тьюки).**Фиг. 22H**) Репрезентативные графики FACS из мышечных стволовых клеток, выделенных от мышей mdx-Ai9, которым вводили инъекцию. **Фиг. 22I**) Репрезентативные иммунофлуоресцентные изображения миотрубочек, дифференцированных из мышечных стволовых клеток, отсортированных с помощью FACS, выделенных из мышей mdx-Ai9, которым системно вводили AAV8-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Cre. Зеленый, тяжелая цепь миозина (MHC); красный, tdTomato; синий, Hoechst. Масштабная линейка: 400 мкм. **Фиг. 22J)** Вестерн-блоты, обнаруживающие EGFP и винкулин в мышцах мышей, которым вводили носитель, или 1E+12 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. **Фиг. 22K)** Стратегия гейтирования для выделения предшественников скелетных мышц из мононуклеарных клеток в мышцах.

[0111] **Фиг. 23A-23B -** Системное введение MyoAAV приводит к долговременному высокому уровню экспрессии трансгена в мышцах мышей BALB/cJ. **Фиг. 23A**) Биолюминесцентные изображения всего тела *in vivo* у мышей BALB/cJ, которым вводили 4E+11 гв AAV8-, AAV9- или MyoAAV-CMV-Fluc в течение 120 дней. На этом изображении показан сигнал люминесценции от тех же мышей, что и на **Фиг. 16A** с другой цветовой шкалой (5E+6 – 5E+7), чтобы обеспечить обнаружение сигнала в мышцах мышей, которым вводили AAV8- и AAV9-CMV-Fluc. **Фиг. 23B**) Люминесцентные изображения всего органа для TA, трицепса, икроножной, четырехглавой мышцы и мышц живота у мышей, которым вводили 4E+11 гв AAV8-, AAV9- или MyoAAV-CMV-Fluc, которые получали через 4 месяца после инъекции. На этом изображении показан сигнал люминесценции от тех же мышей, что и на **Фиг. 16C** с другой цветовой шкалой (5E+5 – 5E+7), чтобы обеспечить обнаружение сигнала в мышцах мышей, которым вводили AAV8- и AAV9-CMV-Fluc.

[0112] **Фиг. 24A-24G -** Системное введение MyoAAV-*Dmd* CRISPR приводит к более высоким уровням экспрессии SaCas9 и нРНК по сравнению с AAV9-*Dmd* CRISPR во многих мышцах по всему телу. **Фиг. 24A**) Схема конструкций AAV, используемых для создания вирусов AAV9- и MyoAAV 1A-*Dmd* CRISPR. **Фиг. 24B**) Схема восстановления дистрофина после введения AAV-*Dmd* CRISPR мышам mdx. Мышам вводили 4,5E+12 гв SaCas9 и 9E+12 гв нРНК AAV.**Фиг. 24C-24D** Количественная оценка кратной разницы в экспрессии мРНК SaCas9 (**Фиг. 24C**) или нРНК (**Фиг. 24D**) в различных мышцах 8-

недельных мышей mdx, которым системно вводили 4,5E+12 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-SaCas9 и 9E+12 гв AAV9- или MyoAAV 1A-нРНК. Пунктирная красная линия указывает на относительную экспрессию AAV9-CMV-SaCas9 (**Фиг. 24F**) и AAV9-нРНК (**Фиг. 24F**). Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5-6); *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001, ****: P<0,0001 (t-критерий Стьюдента). **Фиг. 24E**) Схема конструкции AAV, используемой для создания вирусов AAV9- и MyoAAV 1A-MHCK7 - MTM1 человека. **Фиг. 24F)** Схема конструкции AAV, используемой для создания вирусов AAV9- и MyoAAV 1A-MHCK7 - MTM1 человека. **Фиг. 24G)** Количество случаев поднятия на задние лапы за 5 минут у мышей дикого типа, которым вводили носитель, или мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель, AAV9-h*MTM1* или MyoAAV 1A-h*MTM1*, обе при 2E+12 гв/кг. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=6 для KO AAV9, n=6 для KO MyoAAV 1A, n=3 для носителя дикого типа, n=4 для носителя KO) для еженедельных измерений, усредненных по трехнедельным периодам времени. Точки данных для мышей с нокаутом *Mtm1*, которым вводили носитель, взяты из предыдущего эксперимента. P-значение рассчитано между группами MyoAAV 1A и AAV9; **: P<0,01 (множественные t-тесты с МСТ Холма-Сидака).

[0113] **Фиг. 25A-25K -** Проточная цитометрия и вестерн-блоттинг подтверждают сверхэкспрессию белков интегрина альфа и бета после трансфекции плазмидами в клетках HEK293. **Фиг. 25A-25G**) Репрезентативные гистограммы из анализа методом проточной цитометрии клеток HEK293, трансфицированных pUC19 или плазмидами, экспрессирующими интегрин αV (**Фиг. 25A**), β1 (**Фиг. 25B**), α5 (**Фиг. 25C**), β8 (**Фиг. 25D**), β5 (**Фиг. 25E**), β3 (**Фиг. 25F**), или β6 (**Фиг. 25G**) под контролем промотора EF1α, и окрашенных антителами против сверхэкспрессированного белка. **Фиг. 25H-25I)** Вестерн-блоты, демонстрирующие сверхэкспрессию интегрина α8 (**Фиг. 25H**), αIIb (**Фиг. 25I**), β3 (**Фиг. 25J**), и β8 (**Фиг. 25K)** в клетках HEK293, трансфицированных соответствующей плазмидой, кодирующей интегрин, (дорожки 1 и 2) по сравнению с клетками, трансфицированными pUC19 (дорожки 3 и 4).

[0114] **Фиг. 26A-26O -** Антагонисты интегрина αV подавляют трансдукцию MyoAAV, но не AAV9 в первичных миотрубочках мыши, а также в первичных миотрубочках человека от разных доноров.**Фиг. 26A-26B**) Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках мышей, получавших различные концентрации антагонистов интегрина αV CWHM-12 (**Фиг. 26A**) или GLPG-0187 (**Фиг. 26B и Фиг. 26J**) и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV-CK8-Nluc (MyoAAV 1A-CK8-Nluc). Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n=5). *: P <0,05, **: P<0,01 (дисперсионный анализ с МСТ Даннета с условием 0 нМ для каждой группы в качестве контроля).**Фиг. 26C-**

26H) Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека от трех разных доноров, получавших различные концентрации антагонистов интегрина αV CWHM-12 (**Фиг. 26C, 26E и 26G**) или GLPG-0187 (**Фиг. 26D, 26F и 26H**) и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV 1A-CK8-Nluc.Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5). *: P <0,05, **: P<0,01 (дисперсионный анализ с МСТ Даннета с условием 0 нМ для каждой группы в качестве контроля). **Фиг. 26I)** Количественная оценка трансдукции *in vitro* в клетках HEK293FT, клетках AAVR KO HEK293FT и клетках AAVR KO HEK293FT, сверхэкспрессирующих AAVR, трансфицированных плазмидами, кодирующими гетеродимеры RGD-связывающего интегрина, или pUC19, и трансдуцированных AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=3). **: P<0,0001 (критерий Стьюдента с использованием логарифмически преобразованных данных). **Фиг. 26J-26K**) Количественная оценка трансдукции *in vitro* (**Фиг. 26J**) и связывания (**Фиг. 26K**) необработанных клеток HEK293 или клеток, предварительно обработанных NA и трансдуцированных AAV2-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Nluc. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5); *: P<0,01, **: P<0,0001 (t-критерий Стьюдента с использованием логарифмически преобразованных данных). **Фиг. 26L**) Количественная оценка трансдукции *in vitro* (K) и связывания (L) клеток HEK293, предварительно обработанных NA и ECL или только NA с AAV2-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Nluc. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5); *: P<0,01, **: P<0,0001 (t-критерий Стьюдента с использованием логарифмически преобразованных данных). **Фиг. 26M**) Сравнение трансдукции *in vitro* между клетками HEK293FT и AAVR KO HEK293FT, трансдуцированными AAV2-, AAV4-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=3). **: P<0,0001 (t-критерий Стьюдента с использованием логарифмически преобразованных данных). **Фин. 26N**) Количественная оценка in vitro связывания клеток HEK293, предварительно обработанных NA и ECL или только NA с AAV2-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Nluc. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5); *: P<0,01, **: P<0,0001 (t-критерий Стьюдента с использованием логарифмически преобразованных данных). **Фиг. 26O**) Сравнение трансдукции in vitro между клетками HEK293FT и AAVR KO HEK293FT, трансдуцированными AAV2-, AAV4-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=3). **: P<0,0001 (t-критерий Стьюдента с использованием логарифмически преобразованных данных).

[0115] **Фиг. 27A-27B -** Содержащие RGD варианты капсида второго поколения в меньшей степени зависят от αVβ6 для трансдукции первичных миотрубочек человека по сравнению с вариантами первого поколения. **Фиг. 27A**) Количественная оценка векторных геномов на диплоидный геном в различных тканях мышей C57BL/6J, которым вводили 2E+11 гв AAV9-, MyoAAV- или EMyoAAV-CMV-EGFP. Данные представлены как среднее ± СОС (n = 11 для MyoAAV и EMyoAAV, n = 8 для AAV9). *: P<0,05 (критерий Манна-Уитни). **Фиг. 27B**) Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антитела к αVβ6 и трансдуцированных вариантами капсида AAV9 или вариантами капсида, содержащими RGD, первого или второго поколения, кодирующими Nluc под контролем промотора CK8. Данные представлены как среднее значение ± СОС (n=5). График слева демонстрирует эффективность трансдукции для каждого отдельного варианта. На графике справа результаты для вариантов первого поколения (RGDLTTP (SEQ ID NO: 12), RGDLSTP (SEQ ID NO: 8), RGDLNQY (SEQ ID NO: 9), RGDATEL (SEQ ID NO: 10) и RGDTMSK (SEQ ID NO: 11)) и варианты второго поколения (GPGRGDQTTL (SEQ ID NO: 2), AEGRGDQYTR (SEQ ID NO: 3), ATGRGDLGQA (SEQ ID NO: 4), AVARGDQGLI (SEQ ID NO: 5), NISRGDQGYQ (SEQ ID NO: 6), APARGDQGSQ (SEQ ID NO: 7)) нанесены в виде двух групп. *: P<0,01 (двухэтапный тест Бенджамини-Кригера-Иекутелли между группами первого и второго поколений) (SEQ ID NO: 2-12).

[0116] **Фиг. 28A-28K -** Варианты капсида класса MyoAAV, выработанные у NHP, с высокой эффективностью трансдуцируют различные мышцы яванских макак. **Фиг. 28A-28B**) Схема дизайна вирусной библиотеки и последовательности лучших выбранных вариантов, идентифицированных из мышц NHP после двух циклов селекции *in vivo* у макак из вариантов капсида, содержащих случайную 7-мерную вставку (**Фиг. 28A**) (SEQ ID NO: 13, 22-27) или из одного раунда селекции *in vivo* у макак с использованием 120000 лучших выбранных вариантов, идентифицированных в первом раунде RGD-фиксированной селекции у мышей (**Фиг. 28B**) (SEQ ID NO: 19, 28-32). **Фиг. 28C**) Сравнение трансдукции *in vitro* между 11 вариантами тропного к мышцам капсида, отобранными у мышей в первичных миотрубочках человека от четырех разных доноров. Данные представлены в виде отдельных точек данных со средним значением; **: P<0,01 (односторонний дисперсионный анализ с МСТ Даннета с MyoAAV 1A в качестве контроля). **Фиг. 28D**) Схема баркодированного трансгена фратаксина человека и пула вариантов капсида, используемых для характеристики лучших тропных к мышцам вариантов в NHP (SEQ ID NO: 28, 30, 32-33). **Фиг. 28E**) Кратность изменения экспрессии мРНК по сравнению с AAVrh74 в различных скелетных мышцах, сердце и печени 3 яванских макак. Экспрессию мРНК определяют путем глубокого секвенирования баркодов, связанных с каждым вариантом капсида. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=3). *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001, ****: P<0,0001 (односторонний дисперсионный анализ с МСТ Даннета с AAVrh74 в качестве контроля). **Фиг. 28F**) Сравнение титров AAVrh74, MyoAAV 3A, MyoAAV 4A, MyoAAV 4C и MyoAAV 4E и AAV9 с 6 различными трансгенами. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=6). *: p<0,05; ****: P<0,0001 (однофакторный дисперсионный анализ с МСТ Даннетта с AAVrh74 в качестве контроля). **Фиг. 28G**)Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антагониста интегрина αV GLPG-0187 и трансдуцированных AAV9-, MyoAAV 3A-, MyoAAV 4A-, MyoAAV 4C- или MyoAAV 4E-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). P-значение рассчитано с помощью однофакторного дисперсионного анализа с МСТ Даннета с условием 0 нМ для каждой группы в качестве контроля. : P<0,0001 для MyoAAV 3A, MyoAAV 4A, MyoAAV 4C, и MyoAAV 4E; : P<0,0001 для MyoAAV 4A и MyoAAV 4E. **Фиг. 28H-28I**) Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, трансдуцированных AAV9-CK8-Nluc (**Фиг. 28H**) или MyoAAV 3A-, MyoAAV 4A-, MyoAAV 4C- или MyoAAV 4E-CK8-Nluc (**Фиг. 28I**), инкубированных с различными концентрациями рекомбинантных белков αVb1, αVb3, αVb6, αVb8 или MBP. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5). **: P<0,01, ***: P<0,001, ****: P<0,0001 (однофакторный дисперсионный анализ с МСТ Даннетта с 0 нМ рекомбинантного белка в каждой группе в качестве контроля). **Фиг. 28J**) Эффективность трансдукции *in vitro* в первичных миотрубочках человека, обработанных различными концентрациями антитела к αVb6 или мышиного изотипического контроля и трансдуцированных AAV9-, MyoAAV 3A-, MyoAAV 4A-, MyoAAV 4C- или MyoAAV 4E-CK8-Nluc. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5). : P<0,0001 для MyoAAV 3A, MyoAAV 4A, MyoAAV 4C и MyoAAV 4E; : P<0,0001 для MyoAAV 3A, MyoAAV 4A и MyoAAV 4E (однофакторный дисперсионный анализ с МСТ Даннета с условием 0 нМ для каждой группы в качестве контроля).**Фиг. 28K**) Сравнение трансдукции *in vitro* между клетками HEK293FT и AAVR KO HEK293FT, трансдуцированными AAV2-, AAV4-, AAV9-, MyoAAV 3A-, MyoAAV 4A-, MyoAAV 4C- или MyoAAV 4E-CMV-Nluc. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=4). : P<0,0001 (t-критерий Стьюдента для логарифмически преобразованных данных).

[0117] **Фиг. 29A-29O** - MyoAAV 1A эффективно трансдуцирует различные скелетные мышцы после системного введения мышам с фонами DBA/2J и BALB/cJ и имеют высокую эффективность в трансдукции мышц после внутримышечной доставки. **Фиг. 29A-29D**) Различные ткани самок мышей DBA/2J (**Фиг. 29A**), самцов мышей DBA/2J (**Фиг. 29B**), самок мышей BALB/cJ (**Фиг. 29C**) и самцов мышей BALB/cJ (**Фиг. 29D**), которым системно вводили 1E+12 гв AAV9-CMV-EGFP (вверху) или MyoAAV 1A-CMV-EGFP (внизу), освещенных синим светом. **Фиг. 29E**) Количественная оценка кратной разницы в экспрессии мРНК EGFP в трицепсе, икроножной мышце, сердце и печени самцов и самок мышей DBA/2J и BALB/cJ, которым систематически вводили 1E+12 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. Пунктирная серая линия указывает на относительную экспрессию AAV9-CMV-EGFP. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=4-5); **: P<0,01, ***: P<0,001 (t-критерий Стьюдента между мышами, которым вводили AAV9 и MyoAAV 1A, для каждой группы). **Фиг. 29F**) Количественная оценка кратной разницы в экспрессии мРНК EGFP в TA мышей C57BL/6J, которым внутримышечно вводили 2E+10 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. Пунктирная серая линия указывает на относительную экспрессию AAV9-CMV-EGFP. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5); ****: P<0,0001 (t-критерий Стьюдента). **Фиг. 29G**) Вестерн-блоты, обнаруживающие EGFP и тубулин в мышцах TA мышей C57BL/6J, которым внутримышечно вводили носитель, или 2E+10 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. **Фиг. 29H**) Иммунофлуоресцентные изображения TA от мышей C57BL/6J, которым внутримышечно вводили носитель, или 2E+10 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. Шкала серого: EGFP, красный: ламинин, синий: Hoechst. Масштабная линейка на поперечных срезах: 400 мкм. **Фиг. 29I-29J**)Количественное определение уровней ферментов АЛТ (**Фиг. 29I**) и АСТ (**Фиг. 29J**) в сыворотке мышей C57BL/6J перед инъекцией, а также через 14 и 28 дней после системной инъекции носителя или 1E+12 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). P-значение, рассчитанное с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с МСТ Тьюки. Порог значимости: P<0,05. Разница между любыми двумя группами в каждый момент времени незначительна. **Фиг. 29K-29L**) Ингибирование трансдукции AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Nluc в клетках HEK293 сывороткой мышей, инъецированных AAV9-CMV-EGFP (**Фиг. 29K**) или MyoAAV 1A-CMV EGFP (**Фиг. 29L**); данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5); ****: P<0,0001 (двусторонний дисперсионный анализ с МСТ Сидака). **Фиг. 29M**) Люминесцентные изображения всего органа TA, трицепса, икроножной, четырехглавой мышцы и мышц живота у мышей, которым вводили 4E+11 гв AAV8-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Fluc, которые получали через 4 месяца после инъекции. Шкала серого: 1E+7 – 1E+8. **Фиг. 29N**) Количественную оценку общей люминесценции различных мышц животных, которым вводили AAV8-, AAV9-, или MyoAAV 1A-CMV-Fluc, которые получали через 120 дней после инъекции. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5); **: P<0,01, ***: P<0,001 (односторонний дисперсионный анализ с МСТ Тьюки). **Фиг. 29O**)

Люминесцентные изображения всего органа для TA, трицепса, икроножной, четырехглавой мышцы и мышц живота у мышей, которым вводили 4E+11 гв AAV8-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Fluc, которые получали через 4 месяца после инъекции. На этом изображении показан сигнал люминесценции от тех же мышей, что и на **Фиг. 17C** со шкалой серого (5E+5 – 5E+7), чтобы обеспечить обнаружение сигнала в мышцах мышей, которым вводили AAV8- и AAV9-CMV-Fluc.

[0118] **Фиг. 30A-30C -** Характеристика вариантов тропного к мышцам капсида, выработанных у яванского макака.**Фиг. 30A-30B**) Кратность изменения экспрессии мРНК по сравнению с AAVrh74 в различных тканях мышей C57BL/6J (**Фиг. 30A**) или яванских макак (**Фиг. 30B**). Экспрессию мРНК количественно определяли путем глубокого секвенирования баркодов, связанных с каждым вариантом капсида. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5 для мышей и n=3 для макак). *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001, ****: P<0,0001 (односторонний дисперсионнный анализ с MCT Даннета с AAVrh74 в качестве контроля). **Фиг. 30C**) Репрезентативные иммунофлуоресцентные изображения для (ITGB6) интегрина бета-6 (шкала серого) и изотипического контроля (шкала серого) в трехглавой мышце мыши C57BL/6J, трехглавой мышце яванского макака и передней лестничной мышце человека. Масштабная линейка: 400 мкм.

[0119] Приведенные в данном документе фигуре предназначены только для иллюстративных целей и не обязательно выполнены в масштабе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Общие определения

[0120] Если не указано иное, употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, известные специалисту в области техники, к которой принадлежит данное раскрытие. Определения общих терминов и методов молекулярной биологии можно найти в Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (1989) (Sambrook, Fritsch, and Maniatis); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition (2012) (Green and Sambrook); Current Protocols in Molecular Biology (1987) (F.M. Ausubel et al. eds.); серии Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (1995) (M.J. MacPherson, B.D. Hames, and G.R. Taylor eds.): Antibodies, A Laboratory Manual (1988) (Harlow and Lane, eds.): Antibodies A Laboratory Manual, 2nd edition 2013 (E.A. Greenfield ed.); Animal Cell Culture (1987) (R.I. Freshney, ed.); Benjamin Lewin, Genes IX, published by Jones and Bartlet, 2008 (ISBN 0763752223); Kendrew *et al.* (eds.), The

Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 9780471185710); Singleton *et al*., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992); и Marten H. Hofker and Jan van Deursen, Transgenic Mouse Methods and Protocols, 2nd edition (2011).

[0121] В контексте данного документа формы единственного числа включают ссылки на формы как единственного, так и множественного числа, если из контекста явно следует иное.

[0122] Термин «необязательный» или «необязательно» означает, что следующее за ним описанное событие или обстоятельство может происходить или нет, и что описание включает случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда оно не происходит.

[0123] Указание числовых диапазонов по конечным значениям включает все числовые и дробные значения, входящие в соответствующие диапазоны, в также указанные конечные значения. Далее будет понятно, что конечные точки каждого из диапазонов значимы как по отношению к другой конечной точке, так и независимо от другой конечной точки. Также следует понимать, что в данном документе описано большое число значений и что каждое значение также описано в данном документе в терминах «около» этого конкретного значения помимо самого значения. Например, если описано значение «10», то также описано «около 10». Диапазоны могут быть указаны в данном документе в виде от «около» одного конкретного значения и/или до «около» другого конкретного значения. Аналогичным образом, когда значения выражены как приблизительные значения с использованием предшествующего слова «около», следует понимать, что конкретное значение формирует дополнительный вариант осуществления. Например, если описано значение «около 10», то также описано «10».

[0124] Следует понимать, что такой формат диапазона используется для удобства и краткости, и должен интерпретироваться гибко для включения не только числовых значений, явным образом указанных как пределы данного диапазона, но и для включения всех отдельных числовых значений или поддиапазонов в пределах данного диапазона, как если бы каждое числовое значение и поддиапазон указывались явным образом. Для иллюстрации числовой диапазон «от около 0,1% до 5%» следует интерпретировать как включающий не только явно указанные значения от около 0,1% до около 5%, но также и отдельные значения (например, около 1%, около 2%, около 3% и около 4%) и поддиапазоны (например, от около 0,5% до около 1,1%; от около 5% до около 2,4%; от около 0,5% до около 3,2% и от около 0,5% до около 4,4%, и другие возможные поддиапазоны) в пределах указанного диапазона. Если выражен диапазон, дополнительный вариант осуществления включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения.

[0125] Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что данное изобретение охватывает каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в данное изобретение с учетом любого специальным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба этих включенных предела, также включены в данное изобретение. Например, если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в данное изобретение, например, фраза «от x до y» включает диапазон от «x» до «y», а также диапазон от большего, чем «x», до меньшего, чем «y». Диапазон также может быть выражен как верхний предел, например, «около x, y, z или меньше», и его следует интерпретировать как включающий конкретные диапазоны «около x», «около y» и «около z», а также диапазоны «меньше x», «меньше y» и «меньше z». Аналогичным образом, фразу «около x, y, z или больше» следует интерпретировать как включающую конкретные диапазоны «около x», «около y» и «около z», а также диапазоны «больше x», «больше y» и «больше z». Кроме того, фраза «от «x» до «y», где «x» и «y» являются числовыми значениями, включает «от «около x» до «около y».

[0126] В контексте данного документа подразумевается, что термины «около» или «приблизительно», употребляемые в отношении измеряемого значения, такого как параметр, количество, время и т. п., включают вариации указанного значения, такие как вариации +/- 10 % или менее, +/- 5 % или менее, +/- 1 % или менее и +/- 0,1 % или менее указанного значения, в той мере, в которой такие вариации применимы для осуществления раскрытого изобретения. Следует понимать, что значение, к которому относится определяющее слово «около» или «приблизительно», также само по себе конкретно и предпочтительно раскрыто. В контексте данного документа термины «около», «примерно», «точно или приблизительно» и «по существу» могут означать, что рассматриваемое количество или значение может быть точным значением или значением, которое обеспечивает эквивалентные результаты или эффекты, указанные в пункты формулы изобретения или изложенные в данном документе. То есть, следует понимать, что количества, размеры, составы, параметры и другие величины и характеристики не должны быть точными, но могут быть приблизительными и/или большими или меньшими, в случае необходимости, отражая отклонения, коэффициенты перевода, округления, погрешности измерений и т. п., а также другие факторы, известные специалистам в данной области техники, которые позволяют получить эквивалентные результаты или эффекты. В некоторых обстоятельствах значение, обеспечивающее эквивалентные результаты или эффекты, не может быть обоснованно определено. В общем случае количество, размер, состав, параметр или другая величина или характеристика описываются в терминах «около», «примерно» или «точно или приблизительно», вне зависимости от того, указано это конкретным образом или нет. Следует понимать, что если «около», «примерно», или «точно или приблизительно» используется перед количественным значением, то параметр также включает само конкретное количественное значение, если четко не указано иное.

[0127] В контексте данного документа термин «биологический образец» может содержать целые клетки, и/или живые клетки, и/или клеточный дебрис. Биологический образец может содержать (или быть получен из) «биологическую жидкость». Настоящее изобретение охватывает варианты осуществления, в которых биологическая жидкость выбрана из амниотической жидкости, водянистой влаги, жидкости стекловидного тела, желчи, сыворотки крови, грудного молока, спинномозговой жидкости, ушной серы (серной пробки), хилуса, химуса, эндолимфы, перилимфы, экссудата, кала, женского эякулята, желудочной кислоты, желудочного сока, лимфы, слизи (включая выделения из носа и мокроту), перикардиальной жидкости, перитонеальной жидкости, плевральной жидкости, гноя, выделений слизистых оболочек, слюны, кожного сала (секрета сальных желез), спермы, мокроты, синовиальной жидкости, пота, слез, мочи, влагалищного секрета, рвотных масс и их смесей. Биологические образцы включают культуры клеток, биологические жидкости, культуры клеток из биологических жидкостей. Биологические жидкости могут быть получены из организма млекопитающего, например, путем пункции или других процедур сбора или отбора проб.

[0128] Термины «субъект», «индивид» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения позвоночного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека. Млекопитающие включают, помимо прочего, мышей, обезьян, людей, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и домашних животных. Также охватываются ткани, клетки и их потомство для биологического объекта, полученного in vivo или культивированного in vitro.

[0129] Далее описаны различные варианты осуществления. Следует отметить, что конкретные варианты осуществления не предназначены для исчерпывающего описания или ограничения более широких вариантов осуществления, обсуждаемых в данном документе. Один вариант осуществления, описанный в связи с конкретным вариантом осуществления, не обязательно ограничивается этим вариантом осуществления и может применяться на практике с любым другим вариантом осуществления. Ссылка в данном описании на «один вариант осуществления», «вариант осуществления», «иллюстративный вариант осуществления» означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, присутствие фраз «в одном варианте осуществления», «в варианте осуществления» или «иллюстративном варианте осуществления» в различных местах данного описания не обязательно все относится к одному и тому же варианту осуществления, но может. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть скомбинированы подходящим образом, как станет понятно специалисту в данной области техники из этого раскрытия, в одном или более вариантах осуществления. Кроме того, хотя некоторые описанные в данном документе варианты осуществления включают некоторые, но не другие признаки, включенные в другие варианты осуществления, подразумевается, что комбинации признаков разных вариантов осуществления входят в объем данного изобретения. Например, в прилагаемой формуле изобретения любые из заявленных вариантов осуществления можно использовать в любой комбинации.

[0130] Все публикации, опубликованные патентные документы и заявки на патенты, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, опубликованный патентный документ или заявка на патент были специально и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

ОБЗОР ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0131] Варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают специфичные для мышц нацеливающие фрагменты, которые могут быть связаны с карго или иным образом связаны с ним. Варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают полипептиды и частицы, которые могут включать один или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов. Полипептиды и/или частицы могут быть соединены, присоединены, инкапсулированы или иным образом включены в карго, тем самым связывая карго с нацеливающим фрагментом(-ами).

[0132] Варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают специфичные для мышц нацеливающие фрагменты, которые могут содержать один или более n-мерных мотивов, как дополнительно описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив представляет собой мотив усиленного myoAAV. В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив может придавать мышечную специфичность нацеливающему фрагменту.

[0133] В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив не содержит R-G-D в качестве первых трех аминокислот мотива. В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив представляет собой мотив RGD второго поколения. В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив, содержащий мотив RGD второго поколения, обладает большей мышечной специфичностью, нацеленностью и/или эффективностью, чем n-мерный мотив, не содержащий мотив RGD второго поколения.

[0134] Варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают сконструированные капсиды аденоассоциированного вируса (AAV), которые могут быть сконструированы для придания специфичного для клеток и/или видоспецифичного тропизма сконструированной частице AAV.

[0135] Варианты осуществления, описанные в данном документе, также обеспечивают способы получения rAAV, имеющих сконструированные капсиды, которые могут включать систематическое направленное получение разнообразных библиотек вариантов модифицированных поверхностных структур, таких как варианты капсидных белков. Варианты осуществления способа получения rAAV со сконструированными капсидами также могут включать строгую селекцию вариантов капсида, способных нацеливаться на определенный тип клеток, тканей и/или органов. Варианты осуществления способа получения rAAV со сконструированными капсидами могут включать строгую селекцию вариантов капсида, способных к эффективной и/или однородной трансдукции по меньшей мере у двух или более видов.

[0136] Варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают векторы и их системы, способные продуцировать сконструированный AAV, описанный в данном документе.

[0137] Варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают клетки, которые могут быть способны продуцировать сконструированные частицы AAV, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки включают один или более векторов или их систем, описанных в данном документе.

[0138] Варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают сконструированные AAV, которые могут включать сконструированный капсид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированный AAV может включать полинуклеотид-карго для доставки в клетку. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид-карго представляет собой полинуклеотид модифицированного гена.

[0139] Варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают составы, которые могут содержать сконструированный вектор AAV или его систему, сконструированный капсид AAV, сконструированные частицы AAV, включая сконструированный капсид AAV, описанный в данном документе, и/или сконструированную клетку, описанную в данном документе, которая содержит сконструированный капсид AAV, и/или сконструированный вектор AAV или его систему. В некоторых вариантах осуществления состав может также содержать фармацевтически приемлемый носитель. Составы, описанные в данном документе, могут быть доставлены нуждающемуся в этом субъекту или в клетку.

[0140] Варианты осуществления, описанные в данном документе, также обеспечивают наборы, которые содержат один или более из одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, сконструированных капсидов AAV, сконструированных частиц AAV, клеток или других фрагментов, описанных в данном документе, и их комбинации, а также фармацевтических составов, описанных в данном документе. В вариантах осуществления один или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, сконструированных капсидов AAV, сконструированных частиц AAV, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, могут быть представлены в виде комбинированного набора

[0141] Варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают способы применения сконструированных AAV, обладающих описанным в данном специфичным для клеток тропизмом, для доставки, например, терапевтического полинуклеотида в клетку. Таким образом, сконструированные AAV, описанные в данном документе, можно использовать для лечения и/или профилактики заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Варианты осуществления, описанные в данном документе, также обеспечивают способы доставки сконструированных капсидов AAV, сконструированных вирусных частиц AAV, сконструированных векторов AAV или их систем и/или их составов в клетку. В данном документе также предложены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом, путем доставки сконструированной частицы AAV, сконструированного капсида AAV, сконструированного капсидного вектора AAV или их системы, сконструированной клетки и/или их состава субъекту.

[0142] Дополнительные признаки и преимущества сконструированных AAV вариантов осуществления и способы изготовления и применения сконструированных AAV дополнительно описаны в данном документе.

Специфичные для мышц нацеливающие фрагменты и их композиции

[0143] В данном документе описаны нацеливающие фрагменты, которые могут быть способны специфично нацеливаться, связываться, ассоциироваться или иным образом специфично взаимодействовать с мышечной клеткой. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент может представлять собой n-мерный мотив или включать его.

[0144] В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив содержит мотив RGD второго поколения. Термин «мотив RGD второго поколения» относится к n-мерным мотивам, которые включают аминокислотный мотив R-G-D, и имеет общую формулу, состоящую из X_mRGDX_n, где каждый из X_m и X_n независимо выбран из любой аминокислоты, где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, где m равно 1-4. Иллюстративные n-мерные мотивы и способы создания и идентификации подходящих n-мерных мотивов, способных нацеливаться на мышцы, более подробно описаны в другом месте данного документа.

[0145] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент может включать более одного n-мерного мотива. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более n-мерных мотивов. В некоторых вариантах осуществления все n-мотивы, включенные в нацеливающий фрагмент, могут быть одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, когда включено более одного n-мерного мотива, по меньшей мере два n-мерного мотива отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления, когда включено более одного n-мерного мотива, все n-мерные мотивы отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления каждый n-мерный мотив, включенный в нацеливающий фрагмент, может быть любым из мотивов, указанных в любой из **таблиц 2-3, Фиг. 14F** или любой из представленных на фигурах и рабочих примерах, приведенных в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив, содержащий мотив RGD второго поколения, придает большую мышечную специфичность, направленность и/или эффективность, чем n-мерный мотив, не содержащий мотив RGD второго поколения. В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив, содержащий мотив RGD второго поколения, придает большую мышечную специфичность, направленность и/или эффективность, чем n-мерный мотив, содержащий R-G-D в качестве первых трех аминокислот мотива.

[0146] В некоторых вариантах осуществления первые 1, 2, 3 или 4 аминокислоты n-мерного мотива могут заменять 1, 2, 3 или 4 аминокислоты полипептида, в который он вставлен, и предшествуют сайту вставки. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты n-мерного мотива, которые заменяют 1 или более аминокислот полипептида, в который вставлен n-мерный мотив, располагаются перед или непосредственно перед «RGD» в n-мерном мотиве. Например, в одной или более 10-мерных вставках, приведенных, например, в **таблицах 2-3**, первые три приведенные аминокислоты могут заменять 1-3 аминокислоты в полипептиде, в который они могут быть вставлены. Используя AAV в качестве другого неограничивающего примера, один или более n-мерных мотивов могут быть вставлены, например, в капсидный пролил-пептид AAV9 между аминокислотами 588 и 589, и вставка может заменять аминокислоты 586, 587 и 588, так что аминокислота, непосредственно предшествующая n-мерному мотиву после вставки, представляет собой остаток 585. Следует понимать, что этот принцип может применяться в любом другом положении вставки и не обязательно ограничивается вставкой между остатками 588 и 589 капсида AAV9 или эквивалентным положением в другом капсиде AAV. Кроме того, следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления ни одна аминокислота в полипептиде, в который встроен n-мерный мотив, не заменена n-мерным мотивом.

[0147] Специфичный для мышц нацеливающий фрагмент может быть связан с карго или иным образом связан с ним. В некоторых вариантах осуществления один или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, описанных в данном документе, непосредственно соединены с карго. В некоторых вариантах осуществления один или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, описанных в данном документе, непрямо соединены с карго, например, через линкерную молекулу. В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов, специфичных для мышц, описанных в данном документе, связаны с полипептидом или другой частицей, которая связана, присоединена, инкапсулирует и/или содержит карго.

[0148] Примеры частиц включают, без ограничения, вирусные частицы (например, вирусные капсиды, включая капсиды бактериофагов), полисомы, липосомы, наночастицы, микрочастицы, экзосомы, мицеллы и т.п. В контексте данного документа термин «наночастица» включает наноразмерный осадок гомогенного или гетерогенного материала. Наночастицы могут иметь правильную или неправильную форму и могут быть сформированы из множества совместно осажденных частиц, которые образуют составную наночастицу. Наночастицы могут быть, как правило, сферическими по форме или иметь составную форму, образованную из множества совместно осажденных, как правило, сферических частиц. Примеры форм наночастиц включают, но не ограничиваются ими, сферическую, стержневую, эллиптическую, цилиндрическую, дисковую и т.п. В некоторых вариантах осуществления наночастицы имеют по существу сферическую форму.

[0149] В контексте данного документа термин «специфичный», когда он используется в отношении описанного взаимодействия между двумя фрагментами, относится к нековалентной физической ассоциации первого и второго фрагментов, где связь между первым и вторым фрагментами в по меньшей мере 2 раза сильнее, по меньшей мере 5 раз сильнее, по меньшей мере 10 раз сильнее, по меньшей мере 50 раз сильнее, по меньшей мере 100 раз сильнее или сильнее, чем ассоциация любого фрагмента с большинством или всеми другими фрагментами, присутствующими в среде, в которой происходит связывание. Связывание двух или более соединений можно считать специфичным, если равновесная константа диссоциации Kd составляет 10^{-3} М или менее, 10^{-4} М или менее, 10^{-5} М или менее, 10^{-6} М или менее, 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М или менее, 10^{-10} М или менее, 10^{-11} М или менее или 10^{-12} М или менее в используемых условиях, например, в физиологических условиях, таких как условия внутри клетки или соответствующие выживанию клетки. В некоторых вариантах осуществления специфичное связывание может быть достигнуто за счет множества более слабых взаимодействий (например, множества отдельных взаимодействий, где каждое отдельное взаимодействие характеризуется Kd более 10^{-3} М). В некоторых вариантах осуществления специфичное связывание, которое можно назвать «молекулярным распознаванием», представляет собой насыщаемое связывающее взаимодействие между двумя соединениями, которое зависит от комплементарной ориентации функциональных групп на каждом соединении. Примеры специфичных взаимодействий включают взаимодействие праймер-полинуклеотид, взаимодействие аптамер-аптамер-мишень, взаимодействие антитело-антиген, взаимодействие авидин-биотин, взаимодействие лиганд-рецептор, взаимодействие металл-хелат, гибридизацию между комплементарными нуклеиновыми кислотами и т. д.

[0150] В некоторых вариантах осуществления в дополнение к n-мерному мотиву(-ам) нацеливающий фрагмент может включать полипептид, полинуклеотид, липид, полимер, сахар или их комбинацию.

[0151] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент вставлен в вирусный белок, такой как капсидный белок, включая, помимо прочего, белки лентивируса, аденовируса, AAV, бактериофага, ретровируса. В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив расположен между двумя аминокислотами вирусного белка, так что n-мерный мотив является внешним (т.е. представлен на поверхности) по отношению к вирусному капсиду.

[0152] В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая один или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, описанных в данном документе, обладает повышенной активностью в отношении мышечных клеток, специфичностью в отношении мышечных клеток, сниженной иммуногенностью или любой их комбинацией.

В контексте данного документа термины «специфичный для мышц», «специфичность для мышечных клеток», «активность в отношении мышечных клеток» и т.п. относятся к повышенной специфичности, селективности или активности специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, и композиций, содержащих указанные специфичные для мышц нацеливающие фрагменты по настоящему изобретению для мышечных клеток по сравнению с немышечными клетками. В некоторых вариантах осуществления специфичность, или селективность, или активность в отношении клеток, или их комбинация для специфичного для мышц нацеливающего фрагмента, или композиции, содержащей специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, описанный в данном документе, по меньшей мере в 2-500 раз более специфичны, селективны, и/или активны в отношении мышечной клетки по сравнению с немышечной клеткой. В некоторых вариантах осуществления специфичность, или селективность, или активность специфичного для мышц нацеливающего фрагмента, описанного в данном документе, в по меньшей мере от 2 до/или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 раз более специфична или селективна в отношении мышечной клетки по сравнению с немышечной клеткой.

[0153] Как указано в качестве альтернативы, в некоторых вариантах осуществления специфичные для мышц нацеливающие фрагменты и/или композиции, содержащие один или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, описанных в данном документе, обладают сниженной активностью в отношении немышечных клеток, специфичностью в отношении немышечных клеток, сниженной иммуногенностью, или любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления специфичные для мышц нацеливающие фрагменты, и/или композиции, содержащие один или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, описанных в данном документе, по меньшей мере в 2–500 раз менее специфичны, менее селективны и/или менее эффективны в отношении немышечной клетки по сравнению с мышечной клеткой. В некоторых вариантах осуществления специфичность, или селективность, или активность специфичного для мышц нацеливающего фрагмента, описанного в данном документе, в по меньшей мере от 2 до/или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 раз менее специфична или селективна в отношении немышечной клетки по сравнению с мышечной клеткой.

[0154] Иммуногенность композиций, содержащих специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, может быть снижена, например, в 1-100 или более раз. В некоторых вариантах осуществления иммуногенность снижается от 1 до/или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 и более раз.

[0155] Карго могут включать любую молекулу, которая способна связываться или ассоциироваться со специфичными для мышц нацеливающими фрагментами, описанными в данном документе. Карго могут включать, помимо прочего, нуклеотиды, олигонуклеотиды, полинуклеотиды, аминокислоты, пептиды, полипептиды, рибопротеины, липиды, сахара, фармацевтически активные агенты (например, лекарственные средства, визуализирующие и другие диагностические агенты и т.п.), химические соединения и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления карго представляет собой ДНК, РНК, аминокислоты, пептиды, полипептиды, антитела, аптамеры, рибозимы, направляющие последовательности для рибозимов, которые ингибируют трансляцию или транскрипцию основных опухолевых белков и генов, гормоны, иммуномодуляторы, жаропонижающие, анксиолитики, нейролептики, анальгетики, спазмолитики, противовоспалительные, антигистаминные, противоинфекционные средства, радиационные сенсибилизаторы, химиотерапевтические средства, радиоактивные соединения, визуализирующие агенты и их комбинации.

[0156] В некоторых вариантах осуществления карго способно лечить или предотвращать мышечное заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления мышечное заболевание или нарушение представляет собой (a) аутоиммунное заболевание; (b) рак; (c) мышечную дистрофию; (d) нервно-мышечное заболевание; (e) болезнь накопления сахара или гликогена; (f) болезнь экспансии тринуклеотидных повторов; (g) обусловленную доминантно-негативной мутацией болезнь; (h) кардиомиопатию; (i) вирусное заболевание; (j) прогероидный синдром; или (k) любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления болезнь экспансии тринуклеотидных повторов представляет собой болезнь Гентингтона, миотоническую дистрофию или лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию (FSHD). В некоторых вариантах осуществления мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, миотоническую дистрофию или FSHD. В некоторых вариантах осуществления миотоническая дистрофия относится к типу 1 или типу 2. В некоторых вариантах осуществления болезнь накопления сахара или гликогена представляет собой МПС типа III или болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления МПС типа III, представляет собой МПС типа IIIA, IIIB, IIIC или IIID. В некоторых вариантах осуществления нервно-мышечное заболевание представляет собой болезнь Шарко-Мари-Тута или атаксию Фридрейха.

[0157] В некоторых вариантах осуществления карго представляет собой морфолин, связанный с пептидом морфолин, антисмысловой олигонуклеотид, PMO, терапевтический трансген, полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид или пептид, PPMO, один или более пептидов, один или более полинуклеотидов, кодирующих белок CRISPR-Cas, направляющую РНК или и то, и другое, рибонуклеопротеин, где рибонуклеопротеин содержит молекулу системы CRISPR-Cas, РНК терапевтического трансгена или другую модифицирующую ген или терапевтическую РНК и/или белок, или любую их комбинацию.

[0158] В некоторых вариантах осуществления карго способно индуцировать пропуск экзона в гене.

[0159] В некоторых вариантах осуществления карго способно индуцировать пропуск экзона в гене дистрофина.

[0160] В некоторых вариантах осуществления карго представляет собой ген мини- или микродистрофина. В некоторых вариантах осуществления ген мини- или микродистрофина содержит спектрин-подобные повторы 1, 2, 3 и 24 или их комбинацию и, необязательно, домен nNOS.

Сконструированные вирусные капсиды и кодирующие полинуклеотиды

[0161] В данном документе описаны различные варианты осуществления сконструированных вирусных капсидов, таких как капсиды аденоассоциированного вируса (AAV), которые можно сконструировать для придания сконструированной вирусной частице специфичного для клеток тропизма, такого как специфичный для мышц тропизм. Сконструированные вирусные капсиды могут быть капсидами лентивируса, ретровируса, аденовируса или AAV. Сконструированные капсиды могут быть включены в сконструированную вирусную частицу (например, сконструированную частицу лентивируса, ретровируса, аденовируса или вируса AAV) и могут придавать сконструированной вирусной частице специфичный для клеток тропизм, сниженную иммуногенность или и то, и другое. Сконструированные вирусные капсиды, описанные в данном документе, могут включать один или более сконструированных вирусных капсидных белков, описанных в данном документе. Сконструированные вирусные капсиды, описанные в данном документе, могут включать один или более сконструированных вирусных капсидных белков, описанных в данном документе, которые могут содержать специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, содержащий или состоящий из n-мерного мотива, описанного в другом месте данного документа.

[0162] Сконструированный вирусный капсид и/или капсидные белки могут кодироваться одним или более полинуклеотидами сконструированного вирусного капсида. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид сконструированного вирусного капсида представляет собой полинуклеотид сконструированного вирусного капсида AAV, полинуклеотид сконструированного вирусного капсида лентивируса, полинуклеотид сконструированного вирусного капсида ретровируса полинуклеотид сконструированного вирусного капсида аденовируса. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид сконструированного вирусного капсида (например, полинуклеотид сконструированного капсида AAV, полинуклеотид сконструированного капсида лентивируса, полинуклеотид сконструированного капсида ретровируса или полинуклеотид сконструированного капсида аденовируса) может включать 3’-сигнал полиаденилирования. Сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40.

[0163] Сконструированные вирусные капсиды могут быть вариантами вирусного капсида дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления сконструированные капсиды AAV могут быть вариантами капсидов AAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления капсиды AAV дикого типа могут состоять из капсидных белков VP1, VP2, VP3 или их комбинации. Другими словами, сконструированные капсиды AAV могут включать один или более вариантов капсидных белков VP1 дикого типа, VP2 дикого типа и/или VP3 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления серотип эталонного капсида AAV дикого типа может представлять собой AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-8, AAV-9 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления серотип капсида AAV дикого типа может представлять собой AAV-9. Сконструированные капсиды AAV могут иметь тропизм, отличный от тропизма эталонного капсида AAV дикого типа.

[0164] Сконструированный вирусный капсид может содержать от 1 до 60 сконструированных капсидных белков. В некоторых вариантах осуществления сконструированные вирусные капсиды могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, или 60 сконструированных капсидных белков. В некоторых вариантах осуществления сконструированный вирусный капсид может содержать 0-59 вирусных капсидных белков дикого типа. В некоторых вариантах осуществления сконструированный вирусный капсид может содержать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, или 59 вирусных капсидных белков дикого типа.

[0165] В некоторых вариантах осуществления сконструированный капсид AAV может содержать 1-60 сконструированных капсидных белков. В некоторых вариантах осуществления сконструированные капсиды AAV могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, или 60 сконструированных капсидных белков. В некоторых вариантах осуществления сконструированный капсид AAV может содержать 0-59 капсидных белков AAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления сконструированный капсид AAV может содержать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, или 59 капсидных белков AAV дикого типа.

[0166] В некоторых вариантах осуществления сконструированный вирусный капсидный белок может иметь n-мерный аминокислотный мотив, где n может представлять собой по меньшей мере 3 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления n может составлять 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированный капсид AAV может иметь 6-мерный или 7-мерный аминокислотный мотив. В некоторых вариантах осуществления n-мерный аминокислотный мотив может быть вставлен между двумя аминокислотами в вирусном белке дикого типа (VP) (или капсидном белке). В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив может быть вставлен между двумя аминокислотами в вариабельной аминокислотной области вирусного капсидного белка.

[0167] В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив может быть вставлен между двумя аминокислотами в вариабельной аминокислотной области в капсидном белке AAV. Коровая область каждого вирусного белка AAV дикого типа содержит восьмицепочечный мотив бета-бочки (от бета-B до бета-I) и альфа-спираль (альфа-A), которые сохраняются в капсидах автономного парвовируса (см., например, DiMattia et al. 2012. J. Virol. 86(12):6947-6958). Структурные вариабельные области (VR) встречаются в поверхностных петлях, которые соединяют бета-тяжи, которые объединяются в кластеры и приводят к локальным изменениям на поверхности капсида. AAV имеют 12 вариабельных областей (также называемых гипервариабельными областями) (см., например, Weitzman and Linden. 2011. “Adeno-Associated Virus Biology.” In Snyder, R.O., Moullier, P. (eds.) Totowa, NJ: Humana Press). В некоторых вариантах осуществления один или более *n*-мерных мотивов могут быть вставлены между двумя аминокислотами в одной или более из 12 вариабельных областей в капсидных белках AVV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или более *n*-мерных мотивов может быть вставлен между двумя аминокислотами в VR-I, VR-II, VR-III, VR-IV, VR-V, VR-VI, VR-VII, VR-III, VR-IX, VR-X, VR-XI, VR-XII или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления *n*-мер может быть вставлен между двумя аминокислотами в VR-III капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления сконструированный капсид может иметь *n*-мер, вставленный между любыми двумя смежными аминокислотами, между аминокислотами 262 и 269, между любыми двумя смежными аминокислотами между аминокислотами 327 и 332, между любыми двумя смежными аминокислотами между аминокислотами 382. и 386, между любыми двумя смежными аминокислотами между аминокислотами 452 и 460, между любыми двумя смежными аминокислотами между аминокислотами 488 и 505, между любыми двумя смежными аминокислотами между аминокислотами 545 и 558, между любыми двумя смежными аминокислотами между аминокислотами 581 и 593, между любыми двумя смежными аминокислотами между аминокислотами 704 и 714 вирусного белка AAV9. В некоторых вариантах осуществления сконструированный капсид может иметь *n*-мер, вставленный между аминокислотами 588 и 589 вирусного белка AAV9. В некоторых вариантах осуществления сконструированный капсид может иметь 7-мерный мотив, вставленный между аминокислотами 588 и 589 вирусного белка AAV9. SEQ ID NO: 1 представляет собой эталонную последовательность капсида AAV9 по меньшей мере для обозначения сайтов вставки, рассмотренных выше. Следует понимать, что *n*-меры могут быть вставлены в аналогичные положения в вирусных белках AAV других серотипов. В некоторых вариантах осуществления, как обсуждалось ранее, *n*-мер(-ы) может быть вставлен между любыми двумя смежными аминокислотами в вирусном белке AAV, а в некоторых вариантах осуществления вставка осуществляется в вариабельной области.

[0168] В некоторых вариантах осуществления первые 1, 2, 3 или 4 аминокислоты n-мерного мотива могут заменять 1, 2, 3 или 4 аминокислоты полипептида, в который он вставлен, и предшествуют сайту вставки. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты n-мерного мотива, которые заменяют 1 или более аминокислот полипептида, в который вставлен n-мерный мотив, располагаются перед или непосредственно перед «RGD» в n-мерном мотиве. Например, в одной или более 10-мерных вставках, приведенных, например, в таблицах 2-3, первые три приведенные аминокислоты могут заменять 1-3 аминокислоты в полипептиде, в который они могут быть вставлены. Используя AAV в качестве другого неограничивающего примера, один или более n-мерных мотивов могут быть вставлены, например, в капсидный пролил-пептид AAV9 между аминокислотами 588 и 589, и вставка может заменять аминокислоты 586, 587 и 588, так что аминокислота, непосредственно предшествующая n-мерному мотиву после вставки, представляет собой остаток 585. Следует понимать, что этот принцип может применяться в любом другом положении вставки и не обязательно ограничивается вставкой между остатками 588 и 589 капсида AAV9 или эквивалентным положением в другом капсиде AAV. Кроме того, следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления ни одна аминокислота в полипептиде, в который встроен n-мерный мотив, не заменена n-мерным мотивом.

[0169] SEQ ID NO: 1 Эталонная последовательность капсида AAV9.

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPG
NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGG
NLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRL
NFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWH
CDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFN
RFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFT
DSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQML
RTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSV
AGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGP
AMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVA
TNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGF
GMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE
IQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0170] В некоторых вариантах осуществления n-мер может представлять собой аминокислоту, может представлять собой любой аминокислотный мотив, как показано, или кодируется нуклеиновой кислотой, как показано в **таблицах 2-3, на Фиг. 14F** и/или в приведенных в данном документе рабочих примерах. В некоторых вариантах осуществления вставка n-мера в капсид AAV или другого вируса может привести к получению клеток, тканей, органов, специально сконструированных капсидов AAV или других вирусов или другой композиции, которая содержит n-мерный мотив или капсидные белки по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления сконструированный капсид или другая композиция, содержащая n-мерный мотив, имеют специфичность в отношении костной ткани и/или клеток, ткани и/или клеток легких, тканей и/или клеток печени, ткани и/или клеток мочевого пузыря, ткани и/или клеток почек, ткани и/или клеток сердца, ткани и/или клеток скелетных мышц, ткани и/или клеток гладких мышц, нервной ткани и/или ее клеток, ткани и/или клеток кишечника, ткани и/или клеток поджелудочной железы, ткани и/или клеток надпочечники, ткани и/или клеток головного мозга, ткани или клеток сухожилий, ткани и/или клеток кожи, ткани и/или клеток селезенки, ткани и/или клеток глаза, клеток крови, клеток синовиальной жидкости, иммунных клеток (включая специфичность в отношении определенных типов иммунных клеток) и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления сконструированный капсид или другая композиция, содержащая n-мерный мотив, обладает специфичностью в отношении мышечных клеток, включая, но не ограничиваясь ими, ткань и/или клетки скелетных мышц и ткань и/или клетки гладкой мускулатуры.

[0171] В некоторых вариантах осуществления капсиды AAV или другие вирусные капсиды или композиции могут быть специфичными в отношении мышц. В некоторых вариантах осуществления специфичность сконструированного AAV или другого вирусного капсида или другой композиции для мышц обеспечивается специфичным для мышц n-мерным мотивом, включенным в сконструированный AAV или другой вирусный капсид или другую композицию, описанную в данном документе. Не желая быть связанными теорией, считается, что n-мерный мотив придает трехмерную структуру домену или области сконструированного капсида AAV или другого вирусного капсида или другой композиции, так что взаимодействие вирусной частицы или другой композиции, содержащей сконструированный капсид AAV, или другой капсид вируса, или другой композиции, описанной в данном документе, обладает повышенным или улучшенным взаимодействием (например, повышенной аффинностью) с рецептором клеточной поверхности и/или другой молекулой на поверхности мышечной клетки. В некоторых вариантах осуществления рецептор клеточной поверхности представляет собой рецептор AAV (AAVR). В некоторых вариантах осуществления рецептор клеточной поверхности представляет собой специфичный для мышечной клетки рецептор AAV. В некоторых вариантах осуществления рецептор клеточной поверхности или другая молекула представляет собой рецептор клеточной поверхности или другую молекулу, селективно экспрессирующуюся на поверхности мышечной клетки. В некоторых вариантах осуществления рецептор или молекула клеточной поверхности представляет собой интегрин или его димер. В некоторых вариантах осуществления рецептор или молекула клеточной поверхности представляет собой гетеродимер интегрина Vb6.

[0172] В некоторых вариантах осуществления специфичная для мышц сконструированная вирусная частица или другая композиция, описанная в данном документе, содержащая специфичный для мышц капсид, n-мерный мотив или специфичный для мышц фрагмент, описанный в данном документе, может иметь повышенное поглощение, скорость доставки, скорость трансдукции, эффективность, количество, или их комбинации в мышечной клетке по сравнению с другими типами клеток и/или другими вирусными частицами (включая, но не ограничиваясь ими, AAV) и другими композициями, которые не содержат специфичный для мышц n-мерный мотив по настоящему изобретению.

[0173] В данном документе также описаны полинуклеотиды, которые кодируют сконструированные специфичные для мышц нацеливающие фрагменты, и другие композиции, описанные в данном документе, (включая, помимо прочего, сконструированные капсиды AAV), описанные в данном документе.

[0174] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид может быть включен в полинуклеотид, сконфигурированный как донор вирусного генома в системе вирусного вектора, которую можно использовать для создания сконструированных вирусных частиц, описанных в другом месте данного документа.

[0175] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид, кодирующий капсид AAV, может быть включен в полинуклеотид, который сконфигурирован как донор генома AAV в векторной системе AAV, которую можно использовать для создания сконструированных частиц AAV, описанных в другом месте данном документа. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид, кодирующий капсид AAV, может быть функционально связан с хвостом полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления хвост полиаденилирования может представлять собой хвост полиаденилирования SV40. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий капсид AAV, может быть функционально связан с промотором. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть тканеспецифичным промотором. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор специфичен для мышц (например, сердечных, скелетных и/или гладких мышц), нейронов и поддерживающих клеток (например, астроцитов, глиальных клеток, шванновских клеток и т. д.), жира, селезенки, печени, почек, иммунных клеток, клеток спинномозговой жидкости, клеток синовиальной жидкости, клеток кожи, хрящей, сухожилий, соединительной ткани, костей, поджелудочной железы, надпочечников, клеток крови, клеток костного мозга, плаценты, эндотелиальных клеток и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть конститутивным промотором. Подходящие тканеспецифичные промоторы и конститутивные промоторы обсуждаются в других местах данного документа, в целом известны в данной области техники и могут быть коммерчески доступны.

[0176] Подходящие специфичные для мышц промоторы включают, но не ограничиваются ими, CK8, MHCK7, промотор миоглобина (Mb), промотор десмина, промотор мышечной креатинкиназы (MCK) и их варианты, а также синтетический промотор SPc5-12.

[0177] Подходящие промоторы, специфичные для иммунных клеток, включают, но не ограничиваются ими, промотор B29 (B-клетки), промотор CD14 (моноциты), промотор CD43 (лейкоциты и тромбоциты), CD68 (макрофаги) и промотор SV40/CD43 (лейкоциты и тромбоциты).

[0178] Подходящие промоторы, специфичные для клеток крови, включают, но не ограничиваются ими, промотор CD43 (лейкоциты и тромбоциты), промотор CD45 (кроветворные клетки), INF-бета (кроветворные клетки), промотор WASP (кроветворные клетки), промотор SV40/CD43 (лейкоциты и тромбоциты) и промотор SV40/CD45 (гемопоэтические клетки).

[0179] Подходящие специфичные для поджелудочной железы промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор эластазы-1.

[0180] Подходящие промоторы, специфичные для эндотелиальных клеток, включают, но не ограничиваются ими, промотор Fit-1 и промотор ICAM-2.

[0181] Подходящие промоторы, специфичные для нервной ткани/клетки, включают, но не ограничиваются ими, промотор GFAP (астроциты), промотор SYN1 (нейроны) и NSE/RU5’ (зрелые нейроны).

[0182] Подходящие специфичные для почек промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор NphsI (подоциты).

[0183] Подходящие специфичные для костей промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор OG-2 (остеобласты, одонтобласты).

[0184] Подходящие специфичные для легких промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор SP-B (легкие).

[0185] Подходящие специфичные для печени промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор SV40/Alb.

[0186] Подходящие специфичные для сердца промоторы включают, но не ограничиваются ими, альфа-MHC.

[0187] Подходящие конститутивные промоторы включают, но не ограничиваются ими, CMV, RSV, SV40, EF1-альфа, CAG и бета-актин.

AAV со сниженной специфичностью в отношении немышечных клеток

[0188] В некоторых вариантах осуществления n-мерный мотив(-ы), описанный в данном документе, вставлен в белок AAV (например, капсидный белок AAV), который имеет пониженную специфичность (или не поддается обнаружению, измерению или клинически значимому взаимодействию) в отношении одного или более типов немышечных клеток. Иллюстративные типы немышечных клеток включают, но не ограничиваются ими, клетки печени, почек, легких, сердца, селезенки, клетки центральной или периферической нервной системы, кости, иммунные клетки, клетки желудка, кишечника, глаза, клетки кожи и т.п. В некоторых вариантах осуществления немышечные клетки представляют собой клетки печени.

[0189] В определенных иллюстративных вариантах осуществления капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный белок AAV со сниженным или устраненным поглощением немышечной клеткой по сравнению с соответствующим капсидным полипептидом AAV дикого типа.

[0190] В определенных иллюстративных вариантах осуществления немышечная клетка представляет собой клетку печени.

[0191] В определенных иллюстративных вариантах осуществления капсидный полипептид дикого типа представляет собой капсидный полипептид AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV rh.74 или AAV rh.10.

[0192] В определенных иллюстративных вариантах осуществления сконструированный капсидный белок AAV содержит одну или более мутаций, которые приводят к уменьшению или отсутствию поглощения немышечной клеткой.

[0193] В определенных иллюстративных вариантах осуществления одна или более мутаций находятся

a. в положении 267,

b. в положении 269,

c. в положении 504,

d. в положении 505,

e. в положении 590

f. или любой их комбинации

в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в одном или более положениях, соответствующих им в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида

AAV9.

[0194] В определенных иллюстративных вариантах осуществления капсидный белок, отличный от капсидного белка AAV9, представляет собой капсидный полипептид AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74 или AAV rh.10.

[0195] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мутация в положении 267 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию G или X в A, где X представляет собой любую аминокислоту.

[0196] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мутация в положении 269 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию от S или X в T, где X представляет собой любую аминокислоту.

[0197] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мутация в положении 504 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию G или X в A, где X представляет собой любую аминокислоту.

[0198] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мутация в положении 505 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию P или X в A, где X представляет собой любую аминокислоту.

[0199] В определенных иллюстративных вариантах осуществления мутация в положении 590 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию Q или X в A, где X представляет собой любую аминокислоту.

[0200] В определенных иллюстративных вариантах осуществления сконструированный капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV9, содержащий мутацию в положении 267, положении 269 или в обоих положениях капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 1), где мутация в положении 267 представляет собой мутация G в A и где мутация в положении 269 представляет собой мутацию S в T.

[0201] В определенных примерных вариантах осуществления сконструированный капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV9, содержащий мутацию в положении 590 капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 1), где мутация в положении 509 представляет собой мутацию Q в A.

[0202] В определенных иллюстративных вариантах осуществления сконструированный капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV9, содержащий мутацию в положении 504, положении 505, или в обоих положениях капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 1), где мутация в положении 504 представляет собой мутация G в A и где мутация в положении 505 представляет собой мутацию P в A.

[0203] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV, в который может быть вставлен n-мерный мотив(-ы), может иметь 80-100 (например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, до/или 100) процентов идентичности с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 из публикации международной заявки на патент WO 2019/217911, которая включена в данный документ посредством ссылки, как если бы она была представлена в полном объеме. Эти последовательности также включены в данный документ как SEQ ID NO: 330 и 331, соответственно. Следует понимать, что при рассмотрении вариантов этих капсидных белков AAV9 со сниженной специфичностью к печени эти остатки 267 и/или 269 должны содержать соответствующие мутации или эквиваленты.

SEQ ID 330:

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
Gly Tyr Lys Val Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Ala Ser Ser Asn Asp Asn
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

SEQ ID NO: 331

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
Gly Tyr Lys Val Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Ala Ser Thr Asn Asp Asn
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

[0204] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV, в который может быть вставлен n-мерный мотив(-ы), может составлять 80-100 (например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, до/или 100) процентов идентичны любому из описанных в Adachi et al., (Nat. Comm. 2014. 5:3075, DOI: 10.1038/ncomms4075), которые имеют пониженную специфичность в отношении клеток, не входящих в ЦНС, особенно клеток печени. Adachi et al., (Nat. Comm. 2014. 5:3075, DOI: 10.1038/ncomms4075) включена в данный документ посредством ссылки, как если бы она была представлена в полном объеме.

[0205] В некоторых вариантах осуществления модифицированный AAV может иметь около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100-процентное или кратное снижение специфичности в отношении немышечных клеток по сравнению с AAV дикого типа или контролем. В некоторых вариантах осуществления модифицированный AAV может не иметь измеримого или обнаруживаемого поглощения и/или экспрессии в одной или более немышечных клетках.

Способы создания сконструированных капсидов AAV

[0206] Также в данном документе предложены способы получения сконструированных капсидов AAV. Сконструированные варианты капсида AAV могут быть вариантами капсида AAV дикого типа. На **Фиг. 6-8** могут иллюстрировать различные варианты осуществления способов, позволяющих создавать сконструированные капсиды AAV с вариантными мотивами, описанными в данном документе. Как правило, капсидная библиотека AAV может быть создана путем экспрессии векторов сконструированного капсида, каждый из которых содержит полинуклеотид сконструированного капсида AAV, ранее описанный в соответствующей линии клеток-продуцентов AAV. См., например, **Фиг. 8**. Следует понимать, что, хотя на **Фиг. 8** показан зависимый от хелпера способ получения частиц AAV, следует понимать, что это можно сделать и с помощью бесхелперного способа. Он может создать библиотеку капсида AAV, которая может содержать еще один необходимый вариант капсида AAV, специфичный для клеток. Как показано на **Фиг. 6**, капсидную библиотеку AAV можно вводить различным животным, отличным от человека, для первого раунда селекции на основе мРНК. Как показано на **Фиг. 1**, процесс трансдукции с помощью AAV и родственных векторов может привести к продукции молекулы мРНК, которая отражает геном вируса, трансдуцирующего клетку. Как, по крайней мере, показано в приведенных в данном документе примерах, селекция на основе мРНК может быть более специфичной и эффективной для определения вирусной частицы, способной к функциональной трансдукции клетки, поскольку она основана на продуцируемом функциональном продукте, а не просто на обнаружении присутствия вирусной частицы в клетке путем измерения присутствия вирусной ДНК.

[0207] После введения в первом раунде одну или более сконструированных вирусных частиц AAV, имеющих желаемый вариант капсида, затем можно использовать для формирования отфильтрованной библиотеки капсидов AAV. Желаемые вирусные частицы AAV можно идентифицировать путем измерения экспрессии мРНК вариантов капсида и определения того, какие варианты высоко экспрессируются в желаемом(-ых) типе(-ах) клеток по сравнению с нежелательным(-и) типом(-ами) клеток. Те, которые высоко экспрессируются в желаемом типе клеток, тканей и/или органов, представляют собой желаемые частицы варианта капсида AAV. В некоторых вариантах осуществления вариант капсида AAV, кодирующий полинуклеотид, находится под контролем тканеспецифичного промотора, обладающего селективной активностью в желаемой клетке, ткани или органе.

[0208] Частицы сконструированного варианта капсида AAV, идентифицированные в первом раунде, затем можно вводить различным животным, отличным от человека. В некоторых вариантах осуществления животные, используемые во втором раунде селекции и идентификации, отличаются от животных, используемых в первом раунде селекции и идентификации. Подобно раунду 1, после введения наиболее экспрессирующие варианты в желаемом типе(-ах) клетки, ткани и/или органа могут быть идентифицированы путем измерения экспрессии вирусной мРНК в клетках. Лучшие варианты, выявленные после второго раунда, могут быть баркодированы и объединены в пул. В некоторых вариантах осуществления лучшие варианты из второго раунда затем можно вводить приматам, отличным от человека, для идентификации лучшего(-их) специфичного(-ых) для клеток варианта(-ов), особенно если конечным применением для лучших вариантов являются люди. Введение в каждом раунде может быть системным.

[0209] В некоторых вариантах осуществления способ создания варианта капсида AAV может включать следующие стадии: (a) экспрессия описанной в данном документе векторной системы, которая содержит полинуклеотид сконструированного капсида AAV, в клетке с получением вариантов сконструированных капсидов вирусных частиц AAV; (b) сбор вариантов сконструированных капсидов вирусных частиц AAV, полученных на стадии (a); (c) введение вариантов сконструированных капсидов вирусных частиц AAV одному или более первым субъектам, где варианты сконструированных капсидов вирусных частиц AAV получают путем экспрессии вектора сконструированного капсида AAV или его системы в клетке и сбора вариантов сконструированных капсидов вирусных частиц AAV, продуцируемых клеткой; и (d) идентификацию одного или более вариантов сконструированных капсидов AAV, продуцируемых на значительно высоком уровне одной или более конкретными клетками или конкретными типами клеток у одного или более первых субъектов. В этом контексте «значительно высокий» может относиться к титру, который может варьироваться от около 2×10^{11} до около 6×10^{12} векторных геномов на чашку с диаметром 15 см.

[0210] Способ может дополнительно включать стадии: (e) введения некоторых или всех сконструированных вариантов капсидных частиц вируса AAV, идентифицированных на стадии (d), одному или более вторым субъектам; и (f) идентификацию одного или более вариантов сконструированных капсидов вирусных частиц AAV, продуцируемых на значительно высоком уровне в одной или более конкретных клетках или конкретных типах клеток у одного или более вторых субъектов. Клетка на стадии (a) может быть прокариотической клеткой или эукариотической клеткой. В некоторых вариантах осуществления введение на стадии (c), стадии (e) или на обеих стадиях является системным. В некоторых вариантах осуществления один или более первых субъектов, один или более вторых субъектов или и те, и другие являются млекопитающими, отличными от человека. В некоторых вариантах осуществления один или более первых субъектов, один или более вторых субъектов или и те, и другие независимо выбраны из группы, состоящей из отличного от человека млекопитающего дикого типа, отличного от человека гуманизированного млекопитающего, специфичной для болезни модели отличного от человека млекопитающего, и отличного от человека примата.

[0211] В некоторых вариантах осуществления может быть выполнена дальнейшая оптимизация вариантных мотивов. В некоторых вариантах осуществления мотивы первого и/или второго поколения (включая RGD-содержащие мотивы капсидов) можно дополнительно использовать для оптимизации вариантов капсида, как показано, например, на **Фиг. 11**, и как дополнительно обсуждается в данном документе в рабочих примерах.

[0212] Полинуклеотиды и векторные системы, описанные в данном документе, также можно использовать для создания вирусных частиц и других композиций, которые могут быть созданы для того, чтобы содержать молекулу карго, которая может быть доставлена в клетку.

Сконструированные векторы и векторные системы

[0213] В данном документе также предложены векторы и векторные системы, которые могут содержать один или более сконструированных полинуклеотидов, описанных в данном документе, которые могут кодировать один или более n-мерных мотивов по настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, сконструированные вирусные полинуклеотиды (например, сконструированные полинуклеотиды AAV). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид(-ы), которые могут кодировать n-мерный мотив по настоящему изобретению, могут быть любыми, как описано в **таблицах 2-3, на Фиг. 14**, и/или как описано в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может кодировать любой n-мерный мотив, указанный в любой из **таблиц 2-3, Фиг. 14,** и/или как описано в другом месте данного документа. Используемый в данном контексте полинуклеотид сконструированного вирусного капсида относится к любому одному или более полинуклеотидам, описанным в данном документе, способным кодировать сконструированный вирусный капсид, как описано в другом месте данного документа, и/или полинуклеотиду(-ам), способному(-ым) кодировать один или более сконструированных вирусных капсидных белков, описанных в другом месте данного документа. Кроме того, если вектор включает полинуклеотид сконструированного вирусного капсида, описанный в данном документе, вектор также может упоминаться и считаться сконструированным вектором или его системой, хотя и не отмечен как таковой. В вариантах осуществления вектор может содержать один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более элементов сконструированного вирусного капсида, описанного в данном документе. Векторы и их системы могут быть использованы для получения бактериальных, грибных, дрожжевых, растительных клеток, клеток животных и трансгенных животных, которые могут экспрессировать один или более фрагментов сконструированного вирусного капсида, частицы или других композиций, описанных в данном документе. В объем данного изобретения входят векторы, содержащие одну или более описанных в данном документе полинуклеотидных последовательностей. Один или более полинуклеотидов, которые являются частью сконструированного вирусного капсида и его системы, описанной в данном документе, могут быть включены в вектор или векторную систему.

[0214] В некоторых вариантах осуществления вектор может включать полинуклеотид сконструированного вирусного (например, AAV) капсида, имеющий 3'-сигнал полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления 3'-полиаденилирование представляет собой сигнал полиаденилирования SV40. В некоторых вариантах осуществления вектор не содержит регуляторные элементы сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит один или более минимальных регуляторных элементов сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления вектор может дополнительно включать модифицированный регуляторный элемент сплайсинга, где модификация инактивирует регуляторный элемент сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицированный регуляторный элемент сплайсинга представляет собой полинуклеотидную последовательность, достаточную для индуцирования сплайсинга между полинуклеотидом белка rep и сконструированным полинуклеотидом варианта капсидного белка вируса (например, AAV). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность может быть достаточной для индукции сплайсинга, если она представляет собой акцептор сплайсинга или донор сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления вирусный (например, AAV) капсидный полинуклеотид представляет собой полинуклеотид сконструированного вирусного (например, AAV) капсида, как описано в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления вектор не содержит один или более минимальных регуляторных элементов сплайсинга, модифицированный регуляторный агент сплайсинга, акцептор сплайсинга и/или донор сплайсинга.

[0215] Векторы и/или векторные системы можно использовать, например, для экспрессии одного или более сконструированных капсидов вируса (например, AAV) и/или других полинуклеотидов в клетке, такой как клетка-продуцент, для получения сконструированных вирусных частиц (например, AAV) и/или других композиций (например, полипептидов, частиц и т. д.), содержащих сконструированный капсид вируса (например, AAV) или другую композицию, содержащую n-мерный мотив по настоящему изобретению, описанный в другом месте данного документа. Другие применения векторов и векторных систем, описанных в данном документе, также входят в объем данного изобретения. В целом и в данном описании термин относится к инструменту, который позволяет или облегчает перенос соединения из одной среды в другую. В некоторых контекстах, которые будут понятны специалистам в данной области, «вектор» может быть термином, обозначающим молекулу нуклеиновой кислоты, способную переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Вектор может представлять собой репликон, такой как плазмида, фаг или космида, в который может быть вставлен другой сегмент ДНК, чтобы вызвать репликацию вставленного сегмента. В общем, вектор способен к репликации, когда он связан с соответствующими регуляторными элементами.

[0216] Векторы включают, но не ограничиваются ими, молекулы нуклеиновых кислот, которые являются одноцепочечными, двухцепочечными или частично двухцепочечными; молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат один или более свободных концов, не имеют свободных концов (например, кольцевые); молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат ДНК, РНК или и то, и другое; и другие разновидности полинуклеотидов, известные в данной области техники. Одним типом вектора является «плазмида», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК, например, с помощью стандартных методов молекулярного клонирования. Другим типом вектора является вирусный вектор, причем в векторе присутствуют вирусные последовательности ДНК или РНК для упаковки в вирус (например, ретровирусы, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы, дефектные по репликации аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы (AAV)). Вирусные векторы также включают полинуклеотиды, переносимые вирусом для трансфекции в клетку-хозяина. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации и эписомные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «векторами экспрессии». Обычные векторы экспрессии, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид.

[0217] Рекомбинантные векторы экспрессии могут состоять из нуклеиновой кислоты (например, полинуклеотида) по изобретению в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные векторы экспрессии включают один или более регуляторных элементов, которые могут быть выбраны на основе клеток-хозяев, используемых для экспрессии, которые функционально связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии. В рекомбинантном векторе экспрессии термины «функционально связанный» и «функционально связано» используются в данном документе взаимозаменяемо и дополнительно определяются в других местах данного документа. В контексте вектора термин «функционально связанный» означает, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность связана с регуляторным элементом(-ами) таким образом, который обеспечивает экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в системе транскрипции/трансляции in vitro или в клетке-хозяине при введении вектора в клетку-хозяина). Преимущественные векторы включают аденоассоциированные вирусы, и типы таких векторов также могут быть выбраны для нацеливания на определенные типы клеток, такие как сконструированные вирусные (например, AAV) векторы, содержащие полинуклеотид сконструированного вирусного (например, AAV) капсида с желаемым специфичным для клеток тропизмом. Эти и другие варианты осуществления векторов и векторных систем описаны в другом месте данного документа.

[0218] В некоторых вариантах осуществления вектор может быть бицистронным вектором. В некоторых вариантах осуществления бицистронный вектор можно использовать для одного или более элементов системы сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления экспрессия элементов системы сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов, описанной в данном документе, может управляться подходящим конститутивным или тканеспецифичным промотором. Если элементом системы сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов является РНК, ее экспрессия может управляться промотором Pol III, таким как промотер U6. В некоторых вариантах осуществления они комбинируются.

Клеточная амплификация и экспрессия вектора

[0219] Векторы могут быть сконструированы для экспрессии одного или более элементов системы сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов или других композиций, содержащих n-мерный мотив по настоящему изобретению, описанный в данном документе (например, транскрипты нуклеиновых кислот, белки, ферменты и их комбинации) в подходящей клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления подходящей клеткой-хозяином является прокариотическая клетка. Подходящие клетки-хозяева включают, но не ограничиваются ими, бактериальные клетки, дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Векторы могут быть вирусными или невирусными. В некоторых вариантах осуществления подходящей клеткой-хозяином является эукариотическая клетка. В некоторых вариантах осуществления подходящая клетка-хозяин представляет собой подходящую бактериальную клетку. Подходящие бактериальные клетки включают, но не ограничиваются ими, бактериальные клетки из бактерий вида Escherichia coli. В данной области техники известны многие подходящие штаммы E.coli для экспрессии векторов. К ним относятся, но не ограничиваются ими, Pir1, Stbl2, Stbl3, Stbl4, TOP10, XL1 Blue и XL10 Gold. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой подходящую клетку насекомого. Подходящие клетки насекомых включают клетки Spodoptera frugiperda. Подходящие штаммы клеток S. frugiperda включают, но не ограничиваются ими, Sf9 и Sf21. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой подходящую дрожжевую клетку. В некоторых вариантах осуществления дрожжевая клетка может происходить из Saccharomyces cerevisiae. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой подходящую клетку млекопитающего. Многие типы клеток млекопитающих были разработаны для экспрессии векторов. Подходящие клетки млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, HEK293, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки миеломы мыши, HeLa, U2OS, A549, HT1080, CAD, P19, NIH 3T3, L929, N2a, MCF-7, Y79, SO-Rb50, HepG G2, DIKX-X11, J558L, клетки почки новорожденного хомячка (BHK) и куриные эмбриональные фибробласты (CEF). Подходящие клетки-хозяева обсуждаются далее в Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

[0220] В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой дрожжевой вектор экспрессии. Примеры векторов для экспрессии в дрожжах Saccharomyces cerevisiae включают pYepSec1 (Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kuijan and Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., 1987. Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), и picZ (InVitrogen Corp, Сан-Диего, штат Калифорния). В контексте данного документа термин «дрожжевой вектор экспрессии» относится к нуклеиновой кислоте, которая содержит одну или более последовательностей, кодирующих РНК и/или полипептид, и может дополнительно содержать любые желаемые элементы, которые контролируют экспрессию нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот), а также любые элементы, которые обеспечивают репликацию и поддержание вектора экспрессии внутри дрожжевой клетки. Многие подходящие дрожжевые векторы экспрессии и их свойства известны в данной области техники; например, различные векторы и способы проиллюстрированы в Yeast Protocols, 2nd edition, Xiao, W., ed. (Humana Press, New York, 2007) и Buckholz, R.G. and Gleeson, M.A. (1991) Biotechnology (NY) 9(11): 1067-72. Дрожжевые векторы могут содержать, без ограничений, центромерную (CEN) последовательность, автономно реплицирующаяся последовательность (ARS), промотор, такой как промотор РНК-полимеразы III, функционально связанный с представляющей интерес последовательностью или геном, терминатор, такой как терминатор РНК-полимеразы III, точку начала репликации и маркерный ген (например, ауксотрофный, антибиотический или другие селектируемые маркеры). Примеры экспрессионных векторов для использования в дрожжах могут включать плазмиды, дрожжевые искусственные хромосомы, плазмиды 2μ, дрожжевые интегративные плазмиды, дрожжевые репликативные плазмиды, челночные векторы и эписомальные плазмиды.

[0221] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой бакуловирусный вектор или вектор экспрессии и может подходить для экспрессии полинуклеотидов и/или белков в клетках насекомых. Бакуловирусные векторы, доступные для экспрессии белков в культивируемых клетках насекомых (например, клетках SF9), включают серии pAc (Smith, et al., 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) и серии pVL(Lucklow and Summers, 1989. Virology 170: 31-39). Векторы на основе rAAV (рекомбинантного аденоассоциированного вируса) предпочтительно получают в клетках насекомых, например, в клетках насекомых Spodoptera frugiperda Sf9, выращенных в бессывороточной суспензионной культуре. Выращенные в бессывороточных условиях клетки насекомых можно приобрести у коммерческих поставщиков, например, Sigma Aldrich (EX-CELL 405).

[0222] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии млекопитающего способен экспрессировать один или более полинуклеотидов и/или полипептидов в клетке млекопитающего. Примеры векторов экспрессии млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) и pMT2PC (Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6: 187-195). Вектор экспрессии млекопитающего может включать один или более подходящих регуляторных элементов, способных контролировать экспрессию одного или более полинуклеотидов и/или белков в клетке млекопитающего. Например, обычно используемые промоторы происходят из полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса, обезьяньего вируса 40 и других, описанных в данном документе и известных в данной области техники. Более подробная информация о подходящих элементах регулирования описана в другом месте данном документа.

[0223] Другие подходящие векторы экспрессии и векторные системы как для прокариотических, так и для эукариотических клеток см., например, в главах 16 и 17 Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

[0224] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор экспрессии млекопитающего способен направлять экспрессию нуклеиновой кислоты предпочтительно в конкретном типе клеток (например, для экспрессии нуклеиновой кислоты используют тканеспецифичные регуляторные элементы). Тканеспецифичные регуляторные элементы известны в данной области техники. Неограничивающие примеры подходящих тканеспецифичных промоторов включают промотор альбумина (специфичный для печени; Pinkert, et al., 1987. *Genes Dev.* 1: 268-277), лимфоид-специфичные промоторы (Calame and Eaton, 1988. *Adv. Immunol.* 43: 235-275), в частности, промоторы Т-клеточных рецепторов (Winoto and Baltimore, 1989. *EMBO J.* 8: 729-733) и иммуноглобулинов (Baneiji, et al., 1983. *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore, 1983. *Cell* 33: 741-748), нейрон-специфичных промоторов (например, промотор нейрофиламента; Byrne and Ruddle, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477), специфичные для поджелудочной железы промоторы (Edlund, et al., 1985. *Science* 230: 912-916), и специфичные для молочной железы промоторы (например, промотор молочной сыворотки; патент США № 4873316 и публикация европейской заявки № 264166). Также включены регулируемые развитием промоторы, например, мышиные hox-промоторы (Kessel and Gruss, 1990. *Science* 249: 374-379) и промотор α-фетопротеина (Campes and Tilghman, 1989. *Genes Dev.* 3: 537-546). В отношении этих прокариотических и эукариотических векторов упоминается патент США 6750059, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки. В других вариантах осуществления могут использоваться вирусные векторы, в отношении которых упоминается заявка на патент США 13/092085, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Тканеспецифичные регуляторные элементы известны в данной области техники, и в этом отношении упоминается патент США 7776321, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может быть функционально связан с одним или несколькими элементами системы сконструированных капсидов AAV, чтобы управлять экспрессией одного или более элементов системы сконструированных капсидов AAV, описанной в данном документе.

[0225] Векторы могут быть введены и размножены в прокариоте или прокариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления прокариот используют для амплификации копий вектора, который нужно ввести в эукариотическую клетку, или в качестве промежуточного вектора при получении вектора, который нужно ввести в эукариотическую клетку (например, амплификацию плазмиды как части системы упаковки вирусного вектора). В некоторых вариантах осуществления прокариот используют для амплификации копий вектора и экспрессии одной или более нуклеиновых кислот, например, в качестве источника одного или более белков для доставки в клетку-хозяин или организм-хозяин.

[0226] В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой слитый вектор или слитый вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления слитые векторы добавляют ряд аминокислот к закодированному в них белку, например, к аминоконцу, карбокси-концу или к обоим концам рекомбинантного белка. Такие слитые векторы могут служить одной или более целям, таким как: (i) увеличить экспрессию рекомбинантного белка; (ii) повысить растворимость рекомбинантного белка; и (iii) способствовать очистке рекомбинантного белка, действуя в качестве лиганда при аффинной очистке. В некоторых вариантах осуществления экспрессия полинуклеотидов (таких как некодирующие полинуклеотиды) и белков в прокариотах может осуществляться в Escherichia coli с помощью векторов, содержащих конститутивные или индуцибельные промоторы, направляющие экспрессию слитых или неслитых полинуклеотидов и/или белков. В некоторых вариантах осуществления слитый вектор экспрессии может включать сайт протеолитического расщепления, который может быть введен в месте соединения остова слитого вектора или другого слитого фрагмента и рекомбинантного полинуклеотида или белка, чтобы сделать возможным отделение рекомбинантного полинуклеотида или белка от остова слитого вектора или другого слитого фрагмента после очистки слитого полинуклеотида или белка. Такие ферменты и родственные им последовательности распознавания включают фактор Xa, тромбин и энтерокиназу. Примеры слитых векторов экспрессии включают pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Беверли, штат Массачусетс) и pRIT5 (Pharmacia, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), которые сливают глутатион-S-трансферазу (GST), белок, связывающий мальтозу E, или белок A, соответственно, с целевым рекомбинантным белком. Примеры подходящих индуцируемых неслитых векторов экспрессии E. coli включают pTrc (Amrann et al., (1988) Gene 69:301-315) и pET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

[0227] В некоторых вариантах осуществления один или более векторов, управляющих экспрессией одного или более элементов системы сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов, или другой композиции, содержащей n-мерный мотив, описанный в данном документе, вводят в клетку-хозяина таким образом, чтобы экспрессия элементов сконструированной системы доставки, описанной в данном документе, непосредственно формирует систему сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов или другую композицию, содержащую n-мерный мотив, описанный в данном документе, (включая, помимо прочего, сконструированную частицу агента переноса гена, которая более подробно описана в другом месте данного документа). Например, каждый из различных элементов системы сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов или другой композиции, содержащей n-мерный мотив, описанный в данном документе, может быть функционально связан с отдельными регуляторными элементами на отдельных векторах. РНК различных элементов сконструированной системы доставки, описанной в данном документе, могут быть доставлены животному или млекопитающему или в их клетку для получения животного или млекопитающего или их клетки, которые конститутивно, индуцируемо или условно экспрессируют различные элементы систему сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов или другую композицию, содержащую n-мерный мотив, описанный в данном документе, которая включает один или более элементов системы сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов, или другой композиции, содержащей n-мерный мотив, описанный в данном документе, или содержащей одну или более клеток, которые включает и/или экспрессирует один или более элементов системы сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов или другой композиции, содержащей n-мерный мотив, описанный в данном документе.

[0228] В некоторых вариантах осуществления два или более элементов, экспрессируемых из одного или разных регуляторных элементов, могут быть объединены в одном векторе с одним или более дополнительными векторами, обеспечивающими любые фрагменты системы, не включенные в первый вектор. Сконструированные полинуклеотиды по настоящему изобретению, объединенные в один вектор, могут быть расположены в любой подходящей ориентации, например, один элемент расположен на 5'-конце («расположен против хода транскрипции от») или на 3'-конце («расположен по ходу транскрипции от») второго элемента. Кодирующая последовательность одного элемента может быть расположена на той же или противоположной цепи кодирующей последовательности второго элемента и ориентирована в том же или противоположном направлении. В некоторых вариантах осуществления один промотор управляет экспрессией транскрипта, кодирующего один или более сконструированных вирусных (например, AAV) капсидных белков или другую композицию, содержащую n-мерный мотив, описанный в данном документе, вставленный в одну или более интронных последовательностей (например, каждый в разные интроны, два или более по меньшей мере в один интрон или все в один интрон). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полинуклеотиды по настоящему изобретению (включая, но не ограничиваясь ими, сконструированные вирусные полинуклеотиды) могут быть функционально связаны с одним и тем же промотором и экспрессироваться с него.

Признаки векторов

[0229] Векторы могут включать дополнительные признаки, которые могут придавать одну или более функциональных особенностей вектору, полинуклеотиду, подлежащему доставке, полученной из него вирусной частице или экспрессируемому им полипептиду. Такие признаки включают, но не ограничиваются ими, регуляторные элементы, селектируемые маркеры, молекулярные идентификаторы (например, молекулярные баркоды), стабилизирующие элементы и т.п. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что конструкция вектора экспрессии и включенные в него дополнительные признаки могут зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, желаемый уровень экспрессии и т. д.

Регуляторные элементы

[0230] В вариантах осуществления полинуклеотиды и/или их векторы, описанные в данном документе, (включая, помимо прочего, полинуклеотиды сконструированного капсида AAV по настоящему изобретению), могут включать один или более регуляторных элементов, которые могут быть функционально связаны с полинуклеотидом. Предполагается, что термин «регуляторный элемент» включает промоторы, энхансеры, внутренние сайты посадки рибосом (IRES) и другие элементы регуляции экспрессии (например, сигналы терминации транскрипции, такие как сигналы полиаденилирования и последовательности поли-U). Такие регуляторные элементы описаны, например, в Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Регуляторные элементы включают те, которые управляют конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и те, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Тканеспецифичный промотор может направлять экспрессию, прежде всего, в желаемой представляющей интерес ткани, такой как мышца, нейрон, кость, кожа, кровь, определенные органы (например, печень, поджелудочная железа), или определенных типах клеток (например, лимфоцитах). Регуляторные элементы также могут направлять экспрессию в зависимости от времени, например, в зависимости от клеточного цикла или стадии развития, что может быть или не быть специфичным для ткани или типа клеток. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит один или более промоторов pol III (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более промоторов pol III), один или более промоторов pol II (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более промоторов pol II), один или более промоторов pol I (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более промоторов pol I) или их комбинации. Примеры промоторов pol III включают, но не ограничиваются ими, промоторы U6 и H1. Примеры промоторов pol II включают, но не ограничиваются ими, LTR-промотор вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) (см., например, Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β-актина, промотор фосфоглицеролкиназы (PGK) и промотор EF1α. Термином «регуляторный элемент» также охвачены энхансерные элементы, такие как WPRE; энхансеры CMV; сегмент R-U5’ в LTR HTLV-I (Mol. Cell. Biol., Vol. 8(1), p. 466-472, 1988); энхансер SV40; и последовательность интронов между экзонами 2 и 3 β-глобина кролика (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78(3), p. 1527-31, 1981).

[0231] В некоторых вариантах осуществления регуляторная последовательность может представлять собой регуляторную последовательность, описанную в патенте США № 7776321, публикации патента США № 2011/0027239 и публикации PCT WO 2011/028929, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления вектор может включать минимальный промотор. В некоторых вариантах осуществления минимальный промотор представляет собой промотор Mecp2, промотор тРНК или U6. В дополнительном варианте осуществления минимальный промотор является тканеспецифичным. В некоторых вариантах длина векторного полинуклеотида с минимальными промоторами и полинуклеотидными последовательностями составляет менее 4,4 т.п.н.

[0232] Для экспрессии полинуклеотида вектор может включать одну или более регуляторных последовательностей инициации транскрипции и/или трансляции, например, промоторы, которые управляют транскрипцией гена и/или трансляцией кодируемого белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления можно использовать конститутивный промотор. Подходящие конститутивные промоторы для клеток млекопитающих в целом известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, SV40, CAG, CMV, EF-1α, β-актин, RSV и PGK. Подходящие конститутивные промоторы для бактериальных клеток, дрожжевых клеток и грибных клеток, как правило, известны в данной области техники, такие как промотор T-7 для бактериальной экспрессии и промотор алкогольдегидрогеназы для экспрессии в дрожжах.

[0233] В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может представлять собой регулируемый промотор. «Регулируемый промотор» относится к промоторам, которые управляют экспрессией гена не конститутивно, а временно и/или пространственно регулируемым образом, и включает тканеспецифичные, предпочтительные к тканям и индуцируемые промоторы. В некоторых вариантах осуществления регулируемый промотор представляет собой тканеспецифичный промотор, как обсуждалось ранее в других местах данного документа. Регулируемые промоторы включают условные промоторы и индуцируемые промоторы. В некоторых вариантах осуществления условные промоторы можно использовать для управления экспрессией полинуклеотида в конкретном типе клеток, в определенных условиях окружающей среды и/или во время определенной фазы развития. Подходящие тканеспецифиные промоторы могут включать, но не ограничиваются ими, специфичные для печени промоторы (например, APOA2, SERPIN A1 (hAAT), CYP3A4 и MIR122), промоторы клеток поджелудочной железы (например, INS, IRS2, Pdx1, Alx3, Ppy), специфичные для сердца промоторы (например, Myh6 (альфа-MHC), MYL2 (MLC-2v), TNI3 (cTnl), NPPA (ANF), Slc8a1 (Ncx1)), промоторы клеток центральной нервной системы (SYN1, GFAP, INA, NES, MOBP, MBP, TH, FOXA2 (HNF3 бета)), специфичные для клеток кожи промоторы (например, FLG, K14, TGM3), специфичные для иммунных клеток промоторы (например, ITGAM, промотор CD43, промотор CD14, промотор CD45, промотор CD68), специфичные для клеток мочеполовой системы промоторы (например, Pbsn, Upk2, Sbp, Fer1l4), специфичные для эндотелиальных клеток промоторы (например, ENG), специфичные для плюрипотентных и эмбриональных клеток зародышевого слоя промоторы (например, Oct4, NANOG, синтетический Oct4, белок брахиурии, NES, SOX17, FOXA2, MIR122) и специфичный для мышечных клеток промотор (например, десмин). Другие специфичные для тканей и/или клеток промоторы обсуждаются в другом месте данном документа, они могут быть широко известны в данной области техники, а также входят в объем настоящего изобретения.

[0234] Индуцируемые/условные промоторы могут быть положительно индуцируемыми/условными промоторами (например, промотором, который активирует транскрипцию полинуклеотида при соответствующем взаимодействии с активированным активатором, или индуктором (соединением, условиями окружающей среды или другим стимулом), или отрицательным/условно индуцируемым промотором (например, промотор, который репрессирован (например, связан с репрессором) до тех пор, пока репрессорное состояние промотора не будет снято (например, индуктор связывает репрессор, связанный с промотором, стимулируя высвобождение промотора репрессором или удаление химического репрессора из среды промотора). Индуктор может быть соединением, условиями окружающей среды или другим стимулом. Таким образом, индуцируемые/условные промоторы могут реагировать на любые подходящие стимулы, такие как химические, биологические или другие молекулярные агенты, температура, свет и/или pH. Подходящие индуцибельные/условные промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор Tet-On, Tet-Off, Lac, pBad, AlcA, LexA, промотор Hsp70, промотор Hsp90, pDawn, XVE/OlexA, GVG и pOp/LhGR.

[0235] Если требуется экспрессия в растительной клетке, фрагменты описанной в данном документе системы сконструированных капсидов AAV, как правило, помещаются под контроль растительного промотора, т.е. промотора, функционального в растительных клетках. Предусматривается использование различных типов промоторов. В некоторых вариантах осуществления включение вектора на основе системы сконструированных вирусных (например, AAV) капсидов в растение может быть использовано для получения вирусных векторов.

[0236] Конститутивный промотор растения представляет собой промотор, способный экспрессировать открытую рамку считывания (ОРС), которую он контролирует, во всех или почти во всех тканях растения на всех или почти всех стадиях развития растения (это называется «конститутивная экспрессия»). Одним неограничивающим примером конститутивного промотора является промотор 35S вируса мозаики цветной капусты. Разные промоторы могут управлять экспрессией генов в разных тканях или типах клеток или на разных стадиях развития, или в ответ на разные окружающие условия. В конкретных вариантах осуществления один или более фрагментов системы сконструированных капсидов AAV экспрессируются под контролем конститутивного промотора, такого как предпочтительные промоторы промотора 35S вируса мозаики цветной капусты, которые можно использовать для направленной усиленной экспрессии в определенных типах клеток в пределах конкретной растительной ткани, например, сосудистых клетках в листьях или корнях или в специфичных клетках семени. Примеры конкретных промоторов для применения в системе сконструированных капсидов AAV и других композициях по настоящему изобретению можно найти в Kawamata et al., (1997) Plant Cell Physiol 38:792-803; Yamamoto et al., (1997) Plant J 12:255-65; Hire et al, (1992) Plant Mol Biol 20:207-18, Kuster et al, (1995) Plant Mol Biol 29:759-72, и Capana et al., (1994) Plant Mol Biol 25:681 -91.

[0237] Примеры промоторов, которые являются индуцируемыми и которые могут обеспечить пространственно-временной контроль редактирования генов или экспрессии генов, могут использовать определенную форму энергии. Форма энергии может включать, помимо прочего, звуковую энергию, электромагнитное излучение, химическую энергию и/или тепловую энергию. Примеры индуцируемых систем включают индуцируемые тетрациклином промоторы (Tet-On или Tet-Off), низкомолекулярные двугибридные системы активации транскрипции (FKBP, ABA и т. д.) или индуцируемые светом системы (фитохром, домены LOV или криптохром), такие как индуцируемый светом эффектор транскрипции (LITE), который определяют изменения в транскрипционной активности специфичным для последовательности образом. фрагменты индуцируемой светом системы могут включать один или более элементов системы сконструированных капсидов AAV или других композиций по настоящему изобретению, описанных в данном документе, светочувствительный гетеродимерный цитохром (например, из Arabidopsis thaliana) и домен активации/репрессии транскрипции. В некоторых вариантах осуществления вектор может включать один или более индуцируемых ДНК-связывающих белков, представленных в публикации PCT WO 2014/018423 и публикациях США, 2015/0291966, 2017/0166903, 2019/0203212, которые описывают, например, варианты реализации индуцируемых ДНК-связывающих белков и способов применения и могут быть адаптированы для применения с настоящим изобретением.

[0238] В некоторых вариантах осуществления временная или индуцируемая экспрессия может быть достигнута путем включения, например, химически регулируемых промоторов, т.е. при применении экзогенного химического вещества индуцируется экспрессия гена. Модуляция экспрессии гена также может быть достигнута путем включения химически репрессируемого промотора, где применение химического вещества подавляет экспрессию гена. Химически индуцируемые промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор ln2-2 кукурузы, активируемый бензолсульфонамидными гербицидными антидотами (De Veylder et al., (1997) Plant Cell Physiol 38:568-77), промотор GST кукурузы (GST-II-27, WO93/01294), активируемый гидрофобными электрофильными соединениями, используемыми в качестве довсходовых гербицидов, и промотор PR-1a табака (Ono et al., (2004) Biosci Biotechnol Biochem 68:803-7), активируемый салициловой кислотой. Промоторы, которые регулируются антибиотиками, такие как индуцируемые тетрациклином и репрессируемые тетрациклином промоторы (Gatz et al., (1991) Mol Gen Genet 227:229-37; патенты США №№ 5814618 и 5789156), также могут быть использованы в данном документе.

[0239] В некоторых вариантах осуществления вектор или его система могут включать один или более элементов, способных перемещать и/или экспрессировать сконструированный полинуклеотид по настоящему изобретению (например, полинуклеотид сконструированного вирусного (например, AAV) капсида) в конкретный(-ом) клеточный(-ом) фрагмент(-е) или органеллу(-е). Такие органеллы могут включать, но не ограничиваться ими, ядро, рибосому, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, хлоропласт, митохондрии, вакуоль, лизосому, цитоскелет, плазматическую мембрану, клеточную стенку, пероксисому, центриоли и т. д.

Селектируемые маркеры и метки

[0240] Один или более сконструированных полинуклеотидов по настоящему изобретению (например, полинуклеотид сконструированного вирусного (например, AAV) капсида) могут быть функционально связаны, слиты или иным образом модифицированы для включения полинуклеотида, который кодирует или является селектируемым маркером или меткой, который может быть полинуклеотидом или полипептидом. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодирующий полипептидный селектируемый маркер, может быть включен в сконструированный полинуклеотид по настоящему изобретению (например, полинуклеотид сконструированного вирусного (например, AAV) капсида), таким образом, что селектируемый маркерный полипептид при трансляции встраивается между двумя аминокислотами между N- и C-концом сконструированного полипептида (например, сконструированного капсидного полипептида AAV) или на N- и/или C-конце сконструированного полипептида (например, сконструированного капсидного полипептида AAV). В некоторых вариантах осуществления селектируемый маркер или метка представляет собой полинуклеотидный баркод или уникальный молекулярный идентификатор (UMI).

[0241] Следует понимать, что полинуклеотид, кодирующий такие селектируемые маркеры или метки, может быть включен в полинуклеотид, кодирующий один или более фрагментов системы сконструированных капсидов AAV, описанной в данном документе, подходящим образом, чтобы обеспечить экспрессию селектируемого маркера или метки. Такие методики и способы описаны в другом месте данного документа и будут понятны специалисту в данной области с учетом данного изобретения. Многие такие селектируемые маркеры и метки, как правило, известны в данной области техники и входят в объем данного изобретения.

[0242] Подходящие селектируемые маркеры и метки включают, но не ограничиваются ими, аффинные метки, такие как хитин-связывающий белок (CBP), мальтоза-связывающий белок (MBP), глутатион-S-трансфераза (GST), поли(His)-метка; метки солюбилизации, такие как тиоредоксин (TRX) и поли(NANP), MBP и GST; хроматографические метки, такие как метки, состоящие из полианионных аминокислот, такие как FLAG-метка; эпитопные метки, такие как метка V5, метка Myc, метка HA и NE-метка; белковые метки, которые могут обеспечивать специфичную ферментативную модификацию (такую как биотинилирование с помощью биотинлигазы) или химическую модификацию (такую как реакция с FlAsH-EDT2 для флуоресцентной визуализации), сегменты ДНК и/или РНК, которые содержат рестрикционные ферменты или сайты расщепления другими ферментами; сегменты ДНК, которые кодируют продукты, которые обеспечивают устойчивость к токсичным соединениям, включая антибиотики, такие как спектиномицин, ампициллин, канамицин, тетрациклин, баста, неомицин фосфотрансфераза II (NEO), гигромицин фосфотрансфераза (HPT)) и т.п.; сегменты ДНК и/или РНК, которые кодируют продукты, отсутствующие в реципиентной клетке (например, гены тРНК, ауксотрофные маркеры); сегменты ДНК и/или РНК, которые кодируют легко идентифицируемые продукты (например, фенотипические маркеры, такие как β-галактозидаза, GUS; флуоресцентные белки, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP), голубой (CFP), желтый (YFP), красный (RFP), люциферазу и белки клеточной поверхности);

полинуклеотиды, которые могут генерировать один или более новых сайтов праймеров для ПЦР (например, сопоставление двух последовательностей ДНК, которые ранее не сопоставлялись друг с другом), последовательности ДНК, на которые не воздействует или на которые не действует рестрикционная эндонуклеаза или другой модифицирующий ДНК фермент, химическое вещество и т.д.; эпитопные метки (например, GFP, FLAG- и His-метки) и последовательности ДНК, образующие молекулярный баркод или уникальный молекулярный идентификатор (UMI), последовательности ДНК, необходимые для конкретной модификации (например, метилирования), которая позволяет ее идентифицировать. Специалисты в данной области техники оценят другие подходящие маркеры.

[0243] Селектируемые маркеры и метки могут быть функционально связаны с одним или более фрагментами системы сконструированных капсидов AAV или другими композициями и/или системами, описанными в данном документе, с помощью подходящего линкера, такого как глициновые или глицин-сериновые линкеры длиной от GS или GG до $(GGGGG)_3$ (SEQ ID NO: 34) или $(GGGGS)_3$(SEQ ID NO: 35). Другие подходящие линкеры описаны в данном документе в другом месте.

[0244] Вектор или векторная система могут включать один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более нацеливающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент, кодирующий полинуклеотиды, может быть включен в вектор или векторную систему, такую как вирусная векторная система, таким образом, что они экспрессируются внутри и/или на продуцируемой вирусной частице(-ах), так что вирусные частицы могут быть нацелены на конкретные клетки, ткани, органы и т. д. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие нацеливающий фрагмент, могут быть включены в вектор или векторную систему таким образом, чтобы сконструированный(-ые) полинуклеотид(-ы) по настоящему изобретению (например, полинуклеотид(-ы) сконструированного вирусного (например, AAV) капсида) и/или продукты, экспрессируемые из него, включают нацеливающий фрагмент и могут быть нацелены на определенные клетки, ткани, органы и т. д. В некоторых вариантах осуществления, таких как невирусные носители, нацеливающий фрагмент может быть присоединен к носителю (например, полимеру, липиду, неорганической молекуле и т. д.) и может быть способен нацеливаться на носитель и любой присоединенный или ассоциированный сконструированный(-ые) полинуклеотид(-ы) по настоящему изобретению, сконструированные полипептиды или другие композиции по настоящему изобретению, описанные в данном документе, на конкретные клетки, ткани, органы и т.д. В некоторых вариантах осуществления конкретные клетки представляют собой мышечные клетки.

Бесклеточная экспрессия вектора и полинуклеотида

[0245] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид(-ы), кодирующий n-мерный мотив по настоящему изобретению, может быть экспрессирован из вектора или подходящего полинуклеотида в бесклеточной системе in vitro. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий один или более признаков системы сконструированных капсидов AAV, может быть экспрессирован из вектора или подходящего полинуклеотида в бесклеточной системе in vitro. Другими словами, полинуклеотид может быть транскрибирован и необязательно транслирован in vitro. Системы транскрипции/трансляции in vitro и соответствующие векторы в целом известны в данной области техники и коммерчески доступны. Как правило, системы транскрипции и трансляции in vitro воспроизводят процессы синтеза РНК и белка, соответственно, вне клеточной среды. Векторы и подходящие полинуклеотиды для транскрипции in vitro могут включать T7, SP6, T3, промоторные регуляторные последовательности, которые могут быть распознаны и воздействовать на соответствующую полимеразу для транскрипции полинуклеотида или вектора.

[0246] Трансляция in vitro может быть автономной (например, трансляция очищенного полирибонуклеотида) или быть связанной/соединенной с транскрипцией. В некоторых вариантах осуществления бесклеточная (или in vitro) система трансляции может включать экстракты ретикулоцитов кролика, зародышей пшеницы и/или E.coli. Экстракты могут включать различные макромолекулярные фрагменты, необходимые для трансляции экзогенной РНК (например, 70S или 80S рибосомы, тРНК, аминоацил-тРНК, синтетазы, факторы инициации, элонгации, терминации и т. д.). Другие фрагменты могут быть включены или добавлены во время реакции трансляции, включая, но не ограничиваясь ими, аминокислоты, источники энергии (АТФ, ГТФ), системы регенерации энергии (креатинфосфат и креатинфосфокиназа (эукариотические системы)) (фосфоенолпируват и пируваткиназа для бактериальных систем) и другие кофакторы (Mg2+, K+ и др.). Как упоминалось ранее, трансляция in vitro может быть основана на исходном материале РНК или ДНК. Некоторые системы трансляции могут использовать матрицу РНК в качестве исходного материала (например, лизаты ретикулоцитов и экстракты зародышей пшеницы). Некоторые системы трансляции могут использовать матрицу ДНК в качестве исходного материала (например, системы на основе E coli). В этих системах транскрипция и трансляция связаны, и ДНК сначала транскрибируется в РНК, которая затем транслируется. Подходящие стандартные и комбинированные бесклеточные системы трансляции в целом известны в данной области техники и коммерчески доступны.

Оптимизация кодонов векторных полинуклеотидов

[0247] Как описано в других местах данного документа, полинуклеотид, кодирующий n-мерный мотив по настоящему изобретению, и/или другие полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть кодон-оптимизированы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды системы сконструированных капсидов AAV, описанной в данном документе, могут быть кодон-оптимизированы. В некоторых вариантах осуществления один или более полинуклеотидов, содержащихся в векторе («векторные полинуклеотиды»), описанные в данном документе, в дополнение к полинуклеотиду, необязательно кодон-оптимизированному, кодирующему n-мерный мотив, включая, но не ограничиваясь ими, варианты осуществления системы сконструированных капсидов AAV, описанной в данном документе, могут быть кодон-оптимизированы. В общем, оптимизация кодонов относится к процессу модификации последовательность нуклеиновой кислоты для улучшения экспрессии в представляющих интерес клетках-хозяевах путем замены по меньшей мере одного кодона (например, около или более чем около 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов) нативной последовательности кодонами, которые более часто или наиболее часто применяются в генах таких клетках-хозяевах, при этом сохраняя нативную аминокислотную последовательность. Различные виды проявляют особенные отклонения в отношении определенных кодонов конкретных аминокислот. Предпочтение кодонов (различия в использовании кодонов между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая, в свою очередь, как полагают, зависит, среди прочего, от свойств транслируемых кодонов и доступности конкретных молекул транспортной РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке, как правило, является отражением кодонов, наиболее часто используемых в синтезе пептидов. Соответственно, можно конструировать гены для оптимальной экспрессии генов в данном организме на основе оптимизации кодонов. Таблицы частот использования кодонов находятся в общем доступе, например, в «Базе данных частот использования кодонов», доступной на www.kazusa.orjp/codon/, и эти таблицы можно адаптировать в ряде способов. См. Nakamura, Y., et al. “Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000” Nucl. Acids Res. 28:292 (2000). Компьютерные алгоритмы для оптимизации кодонов конкретной последовательности для экспрессии в конкретной клетке-хозяине также доступны, например, Gene Forge (Aptagen; г. Джакобус, штат Пенсильвания). В некоторых вариантах осуществления один или более кодонов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более или все кодоны) в последовательности, кодирующей белок Cas, нацеливающий ДНК/РНК соответствует наиболее часто используемому кодону для конкретной аминокислоты. Что касается использования кодонов в дрожжах, делается ссылка на онлайновую базу данных генома дрожжей, доступную по адресу http://www.yeastgenome.org/community/codon_usage.shtml, или Codon selection in yeast, Bennetzen and Hall, J Biol Chem. 1982 Mar 25;257(6):3026-31. Что касается использования кодонов в растениях, включая водоросли, делается ссылка на Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria, Campbell and Gowri, Plant Physiol. 1990 Jan; 92(1): 1–11.; а также Codon usage in plant genes, Murray et al, Nucleic Acids Res. 1989 Jan 25;17(2):477-98; или Selection on the codon bias of chloroplast and cyanelle genes in different plant and algal lineages, Morton BR, J Mol Evol. 1998 Apr;46(4):449-59.

[0248] Векторный полинуклеотид может быть кодон-оптимизирован для экспрессии в конкретном типе клеток, типе ткани, типе органа и/или типе субъекта. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная последовательность представляет собой последовательность, оптимизированную для экспрессии у эукариот, например, человека (т.е. оптимизированную для экспрессии в клетке человека или человека), или у другого эукариота, такого как другое животное (например, млекопитающее или птицу), как описано в другом месте данном документа. Такие кодон-оптимизированные последовательности с учетом приведенного в данном документе описания находятся в пределах компетенции обычного специалиста. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодон-оптимизирован для определенного типа клеток. Такие типы клеток могут включать, но не ограничиваются ими, эпителиальные клетки (включая клетки кожи, клетки, выстилающие желудочно-кишечный тракт, клетки, выстилающие другие полые органы), нервные клетки (нервы, клетки головного мозга, клетки позвоночного столба, вспомогательные клетки нервной ткани (например, астроциты, глиальные клетки, шванновские клетки и т. д.), мышечные клетки (например, сердечную мышцу, клетки гладкой мускулатуры и клетки скелетных мышц), клетки соединительной ткани (клетки жировой ткани и других мягких тканей, остеоциты, клетки сухожилий, клетки хрящей), клетки крови, стволовые клетки и другие клетки-предшественники, клетки иммунной системы, зародышевые клетки и их комбинации. Такие кодон-оптимизированные последовательности с учетом приведенного в данном документе описания находятся в пределах компетенции обычного специалиста. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодон-оптимизирован для определенного типа ткани. Такие типы тканей могут включать, но не ограничиваются ими, мышечную ткань, соединительную ткань, нервную ткань и эпителиальную ткань. Такие кодон-оптимизированные последовательности с учетом приведенного в данном документе описания находятся в пределах компетенции обычного специалиста. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодон-оптимизирован для конкретного органа. Такие органы включают, но не ограничиваются ими, мышцы, кожу, кишечник, печень, селезенку, головной мозг, легкие, желудок, сердце, почки, желчный пузырь, поджелудочную железу, мочевой пузырь, щитовидную железу, кости, кровеносные сосуды, кровь и их комбинации. Такие кодон-оптимизированные последовательности с учетом приведенного в данном документе описания находятся в пределах компетенции обычного специалиста.

[0249] В некоторых вариантах осуществления векторный полинуклеотид кодон-оптимизирован для экспрессии в конкретных клетках, таких как прокариотические или эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут представлять собой клетки, полученные из конкретного организма, такого как растение или млекопитающее, включая, но не ограничиваясь этим, человека, или от отличного от человека эукариота или животного, как обсуждается в данном документе, например, мыши, крысы, кролика, собаки, сельскохозяйственного животного или отличного от человека млекопитающего или примата.

Невирусные векторы и носители

[0250] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой невирусный вектор или носитель. В некоторых вариантах осуществления невирусные векторы могут иметь преимущество(-а) в виде пониженной токсичности, и/или иммуногенности, и/или повышенной биологической безопасности по сравнению с вирусными векторами. Термины «невирусные векторы и носители» и используемые в данном контексте в данном контексте относятся к молекулам и/или композициям, которые не основаны на одном или более фрагментах вируса или вирусного генома (за исключением любого нуклеотида, доставляемый и/или экспрессируемый невирусным вектором), которые могут быть способны присоединяться, включаться, связываться и/или иным образом взаимодействовать с полинуклеотидом сконструированного капсида (например, полинуклеотидом сконструированного капсида AAV) или другой композицией по настоящему изобретению, описанной в данном документе, и могут быть способны переносить полинуклеотид в клетку и/или экспрессировать полинуклеотид. Следует понимать, что это не исключает включения в состав доставляемого полинуклеотида на основе вируса. Например, если доставляемая нРНК направлена против вирусного фрагмента и она вставлена или иным образом соединена с невирусным вектором или носителем, это не делает указанный вектор «вирусным вектором». Невирусные векторы и носители включают «голые» полинуклеотиды, носители на основе химических веществ, векторы на основе полинуклеотидов (невирусных) и носители на основе частиц. Следует понимать, что термин «вектор», используемый в контексте невирусных векторов и носителей, относится к полинуклеотидным векторам, а «носители», используемые в этом контексте, относятся к молекуле или композиции ненуклеиновой кислоты или полинуклеотида, которые присоединяются к или иным образом взаимодействуют с доставляемым полинуклеотидом, таким как полинуклеотид сконструированного капсида AAV по настоящему изобретению.

Голые полинуклеотиды

[0251] В некоторых вариантах осуществления один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV или других полинуклеотидов по настоящему изобретению, описанных в других местах данного документа, могут быть включены в «голый» полинуклеотид. В контексте данного документа термин «голый полинуклеотид» относится к полинуклеотидам, которые не связаны с другой молекулой (например, белками, липидами и/или другими молекулами), которые часто могут помочь защитить их от факторов окружающей среды и/или деградации. В контексте данного документа термин «ассоциированный с» включает, но не ограничивается ими, «связанный с», «прикрепленный к», «адсорбированный», «заключенный внутри», «заключенный в или внутри», «смешанный с» и т.п. Голые полинуклеотиды, которые включают один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV или других полинуклеотидов по настоящему изобретению, описанных в данном документе, могут быть доставлены непосредственно в клетку-хозяина и необязательно экспрессированы в ней. Незащищенные полинуклеотиды могут иметь любые подходящие двумерные и трехмерные конфигурации. В качестве неограничивающих примеров «голые» полинуклеотиды могут быть одноцепочечными молекулами, двухцепочечными молекулами, кольцевыми молекулами (например, плазмидами и искусственными хромосомами), молекулами, которые содержат одноцепочечные и двухцепочечные части (например, рибозимы), и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления «голый» полинуклеотид содержит только полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV или другие полинуклеотиды по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления «голый» полинуклеотид может содержать другие нуклеиновые кислоты и/или полинуклеотиды в дополнение к полинуклеотиду(-ам) сконструированного капсида AAV или другим полинуклеотидам по настоящему изобретению, описанным в другом месте данного документа. Голые полинуклеотиды могут включать один или более элементов системы транспозонов. Транспозоны и их система более подробно описаны в другом месте данного документа.

Невирусные полинуклеотидные векторы

[0252] В некоторых вариантах осуществления один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV или других полинуклеотидов по настоящему изобретению могут быть включены в невирусный полинуклеотидный вектор. Подходящие невирусные полинуклеотидные векторы включают, но не ограничиваются ими, транспозонные векторы и векторные системы, плазмиды, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, плазмиды без AR (антибиотикорезистентности), и миниплазмиды, кольцевые ковалентно замкнутые векторы (например, миникольца, минивекторы, миниузлы), линейные ковалентно замкнутые векторы («гантелеобразные»), векторы MIDGE (вектор для минималистичной, иммунологически определенной генной экспрессии), векторы MiLV (линейные микровекторы), минити, мини-интронные плазмиды, системы PSK (система уничтожения после сегрегации), плазмиды ORT (система титрования оператора-репрессора) и т.п . См., например, Hardee et al. 2017. Genes. 8(2):65.

[0253] В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор может иметь условную точку начала репликации. В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор может представлять собой плазмиду ORT. В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор может иметь минималистичную, иммунологически определенную генную экспрессию. В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор может иметь один или более генов системы уничтожения после сегрегации. В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор представляет собой вектор без AR. В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор представляет собой минивектор. В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор включает сигнал ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор может включать один или более CpG-мотивов. В некоторых вариантах осуществления невирусные полинуклеотидные векторы могут включать одну или несколько областей прикрепления каркаса/матрикса (S/MAR). См., например, Mirkovitch et al. 1984. Cell. 39:223-232, Wong et al. 2015. Adv. Genet. 89:113-152, способы и векторы из которых могут быть адаптированы для использования в настоящем изобретении. S/MAR представляют собой AT-богатые последовательности, которые играют роль в пространственной организации хромосом посредством прикрепления оснований петли ДНК к ядерному матриксу. S/MAR часто находятся рядом с регуляторными элементами, такими как промоторы, энхансеры и точки начала репликации ДНК. Включение одного из S/MAR может способствовать репликации один раз на клеточный цикл для поддержания невирусного полинуклеотидного вектора в качестве эписомы в дочерних клетках. В вариантах осуществления последовательность S/MAR расположена по ходу транскрипции от активно транскрибируемого полинуклеотида (например, одного или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV или других полинуклеотидов или молекул по настоящему изобретению), включенных в невирусный полинуклеотидный вектор. В некоторых вариантах осуществления S/MAR может представлять собой S/MAR из кластера генов бета-интерферона. См., например, Verghese et al. 2014. Nucleic Acid Res. 42:e53; Xu et al. 2016. Sci. China Life Sci. 59:1024-1033; Jin et al. 2016. 8:702-711; Koirala et al. 2014. Adv. Exp. Med. Biol. 801:703-709; и Nehlsen et al. 2006. Gene Ther. Mol. Biol. 10:233-244, способы и векторы из которых могут быть адаптированы для использования в настоящем изобретении.

[0254] В некоторых вариантах осуществления невирусный вектор представляет собой транспозонный вектор или его систему. В контексте данного документа термин «транспозон» (также называемый мобильным генетическим элементом) относится к полинуклеотидной последовательности, которая способна перемещаться из одного генома в другой. Выделяют несколько классов транспозонов. Транспозоны включают ретротранспозоны и ДНК-транспозоны. Ретротранспозонам необходима транскрипция перемещаемого (или транспонируемого) полинуклеотида для того, чтобы транспонировать полинуклеотид в новый геном или полинуклеотид. ДНК-транспозоны представляют собой те, которые не требуют обратной транскрипции перемещаемого (или транспонируемого) полинуклеотида для того, чтобы транспонировать полинуклеотид в новый геном или полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор может представлять собой ретротранспозонный вектор. В некоторых вариантах осуществления ретротранспозонный вектор включает длинные концевые повторы. В некоторых вариантах осуществления ретротранспозонный вектор не содержит длинные концевые повторы. В некоторых вариантах осуществления невирусный полинуклеотидный вектор может представлять собой ДНК-транспозонный вектор. ДНК-транспозонные вектора могут включать полинуклеотидную последовательность, кодирующую транспозазу. В некоторых вариантах осуществления транспозонный вектор сконфигурирован как неавтономный транспозонный вектор, что означает, что транспозиция не происходит спонтанно сама по себе. В некоторых из этих вариантов осуществления в транспозонном векторе отсутствует одна или более полинуклеотидных последовательностей, кодирующих белки, необходимые для транспозиции. В некоторых вариантах осуществления в неавтономных транспозонных векторах отсутствует один или более Ac-элементов.

[0255] В некоторых вариантах осуществления невирусная полинуклеотидная транспозонная векторная система может включать первый полинуклеотидный вектор, который содержит полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV или другие полинуклеотиды, или молекулы по настоящему изобретению, фланкированные на 5'- и 3'-

концах концевыми инвертированными повторами транспозона (TIR), и второй полинуклеотидный вектор, который включает полинуклеотид, способный кодировать транспозазу, соединенную с промотором для управления экспрессией транспозазы. Когда оба экспрессируются в одной и той же клетке, транспозаза может экспрессироваться из второго вектора и может транспонировать материал между TIR первого вектора (например, полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV или другие полинуклеотиды или молекулы по настоящему изобретению) и интегрировать его в одно или более положений в геноме клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления транспозонный вектор или его система могут быть сконфигурированы как генная ловушка. В некоторых вариантах осуществления TIR могут быть сконфигурированы так, чтобы фланкировать сильный сайт акцептора сплайсинга, за которым следует репортер и/или другой ген (например, один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV или других полинуклеотидов или молекул по настоящему изобретению) и сильный поли(A)-хвост. Когда транспозиция происходит при использовании этого вектора или его системы, транспозон может вставляться в интрон гена, и вставленный репортерный или другой ген может стимулировать процесс неправильного сплайсинга, в результате чего активируется захваченный ген.

[0256] Можно использовать любую подходящую систему транспозонов. Подходящие транспозоны и их системы могут включать систему транспозонов Sleeping Beauty (суперсемейство Tc1/mariner) (см., например, Ivics et al. 1997. Cell. 91(4): 501-510), piggyBac (суперсемейство piggyBac) (см., например, Li et al. 2013 110(25): E2279-E2287 и Yusa et al. 2011. PNAS. 108(4): 1531-1536), Tol2 (суперсемейство hAT), Frog Prince (суперсемейство Tc1/mariner) (см., например., Miskey et al. 2003 Nucleic Acid Res. 31(23):6873-6881) и их варианты.

Химические носители

[0257] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV или другие полинуклеотиды или другие молекулы по настоящему изобретению, описанные в данном документе, могут быть связаны с химическим носителем. Химические носители, которые могут быть подходящими для доставки полинуклеотидов, можно разделить на следующие классы: (i) неорганические частицы, (ii) на липидной основе, (iii) на полимерной основе и (iv) на пептидной основе. Их можно разделить на (1) те, которые могут образовывать конденсированные комплексы с полинуклеотидом (таким как полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV по настоящему изобретению), (2) те, которые способны нацеливаться на конкретные клетки, (3) те, которые способны увеличивать доставку полинуклеотида или других молекул (таких как полинуклеотид(ы) капсида AAV по настоящему изобретению) в ядро или цитозоль клетки-хозяина, (4) те, которые способны распадаться на ДНК/РНК в цитозоле клетки-хозяина, и (5) те, которые способны к устойчивому или контролируемому высвобождению. Следует понимать, что любой данный химический носитель может включать признаки из нескольких категорий. В контексте данного документа термин «частица» относится к частицам любого подходящего размера для доставки композиций (включая частицы, полипептиды, полинуклеотиды и другие композиции, описанные в данном документе) по настоящему изобретению, описанных в данном документе. Подходящие размеры включают частицы макро-, микро- и наноразмеров.

[0258] В некоторых вариантах осуществления невирусный носитель может представлять собой неорганическую частицу. В некоторых вариантах осуществления неорганическая частица может представлять собой наночастицу. Неорганические частицы могут быть сконфигурированы и оптимизированы путем изменения размера, формы и/или пористости. В некоторых вариантах осуществления неорганические частицы оптимизированы для выхода из ретикуло-эндотелиальной системы. В некоторых вариантах осуществления неорганические частицы могут быть оптимизированы для защиты захваченной молекулы от деградации. Подходящие неорганические частицы, которые можно использовать в качестве невирусных носителей в этом контексте, могут включать, но не ограничиваться ими, фосфат кальция, диоксид кремния, металлы (например, золото, платину, серебро, палладий, родий, осмий, иридий, рутений, ртуть, медь, рений, титан, ниобий, тантал и их комбинации), магнитные соединения, частицы и материалы (например, супермагнитный оксид железа и магнетит), квантовые точки, фуллерены (например, углеродные наночастицы, нанотрубки, наноструны и тому подобное) и их комбинации. Другие подходящие неорганические невирусные носители обсуждаются в другом месте данного документа.

[0259] В некоторых вариантах осуществления невирусный носитель может быть на липидной основе. Подходящие носители на липидной основе также описаны в данном документе более подробно. В некоторых вариантах осуществления носитель на липидной основе включает катионный липид или амфифильный липид, который способен связывать или иным образом взаимодействовать с отрицательным зарядом на полинуклеотиде, подлежащем доставке, (например, такой как полинуклеотид сконструированного капсида AAV по настоящему изобретению). В некоторых вариантах осуществления химические невирусные системы-носители могут включать полинуклеотид (например, полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV или другую композицию или молекулу по настоящему изобретению) и липид (такой как катионный липид). Их также называют в данной области техники липоплексами. Другие варианты осуществления липоплексов описаны в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления невирусный носитель на липидной основе может представлять собой липидную наноэмульсию. Липидные наноэмульсии могут быть образованы диспергированием несмешиваемой жидкости в другом стабилизированном эмульгаторе и могут иметь частицы размером около 200 нм, состоящие из липида, воды и поверхностно-активного вещества, которые могут содержать полинуклеотид, подлежащий доставке, (например, полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV по настоящему изобретению). В некоторых вариантах осуществления невирусный носитель на липидной основе может представлять собой твердую липидную частицу или наночастицу.

[0260] В некоторых вариантах осуществления невирусный носитель может быть на пептидной основе. В некоторых вариантах осуществления невирусный носитель на пептидной основе может включать одну или более катионных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления от 35 до 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100 % аминокислот являются катионными. В некоторых вариантах осуществления пептидные носители можно использовать в комбинации с другими типами носителей (например, носителями на полимерной основе и носителями на липидной основе для функционализации этих носителей). В некоторых вариантах осуществления функционализация направлена на клетку-хозяина. Подходящие полимеры, которые могут быть включены в невирусный носитель на полимерной основе, могут включать, но не ограничиваются ими, полиэтиленимин (PEI), хитозан, поли(DL-лактид) (PLA), поли(DL-лактид-ко-гликозид) (PLGA), дендримеры (см., например, публикацию патента США 2017/0079916, методы и композиции из которых могут быть адаптированы для использования с полинуклеотидами сконструированного капсида AAV по настоящему изобретению), полиметакрилат и их комбинации.

[0261] В некоторых вариантах осуществления невирусный носитель может быть сконфигурирован для высвобождения полинуклеотида сконструированной системы доставки, который связан с невирусным носителем или присоединен к нему, в ответ на внешний раздражитель, такой как pH, температура, осмолярность, концентрация специфичной молекулы или композиции (например, кальций, NaCl и т.п.), давление и т.п. В некоторых вариантах осуществления невирусный носитель может представлять собой частицу, конфигурация которой включает один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV или других композиций по настоящему изобретению, описанных в данном документе, и элемент ответа на триггер-сигнал окружающей среды, и, необязательно, триггер-сигнал. В некоторых вариантах осуществления частица может включать полимер, который может быть выбран из группы полиметакрилатов и полиакрилатов. В некоторых вариантах осуществления невирусная частица может включать один или более вариантов осуществления композиций микрочастиц, описанных в публикациях патентов США №№ 20150232883 и 20050123596, способы и композиции которых могут быть адаптированы для использования в настоящем изобретении.

[0262] В некоторых вариантах осуществления невирусный носитель может представлять собой носитель на полимерной основе. В некоторых вариантах осуществления полимер является катионным или преимущественно катионным, так что он может взаимодействовать заряд-зависимым образом с доставляемым отрицательно заряженным полинуклеотидом (таким как полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV по настоящему изобретению). Системы на полимерной основе более подробно описаны в другом месте данного документа.

Вирусные векторы

[0263] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. Термин «вирусный вектор» в данном контексте относится к векторам на основе полинуклеотидов, которые содержат один или более элементов из или основаны на одном или более элементах вируса, которые могут быть способны экспрессировать и упаковывать полинуклеотид, такой как полинуклеотид сконструированного капсида, карго или другую композицию или молекулу AAV по настоящему изобретению в вирусную частицу и продуцирующий указанную вирусную частицу при использовании отдельно или с одним или более другими вирусными векторами (например, в системе вирусных векторов). Вирусные векторы и их системы можно использовать для получения вирусных частиц для доставки, и/или экспрессии, и/или создания одной или более композиций по настоящему изобретению, описанных в данном документе (включая, но не ограничиваясь этим, любую вирусную частицу и ассоциированное с ней карго). Вирусный вектор может быть частью системы вирусных векторов, содержащей множество векторов. В некоторых вариантах осуществления системы, содержащие несколько вирусных векторов, могут повышать безопасность этих систем. Подходящие вирусные векторы могут включать векторы на основе аденовируса, аденоассоциированные векторы, хелпер-зависимые аденовирусные (HdAd) векторы, гибридные аденовирусные векторы и т.п. Другие варианты осуществления вирусных векторов и вирусных частиц, полученных из них, описаны в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы сконфигурированы так, чтобы продуцировать некомпетентные к репликации вирусные частицы для повышения безопасности этих систем.

Аденовирусные векторы, хелпер-зависимые аденовирусные векторы и гибридные *аденовирусные векторы*

[0264] В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой аденовирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления аденовирусный вектор может включать такие элементы, что вирусная частица, полученная с использованием вектора или его системы, может быть серотипа 2, 5 или 9. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, который должен быть доставлен через аденовирусную частицу, может иметь до 8 т.п.н. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления аденовирусный вектор может включать в доставляемый полинуклеотид ДНК, размер которого может варьироваться от около 0,001 т.п.н. до около 8 т.п.н. Аденовирусные векторы успешно использовались в нескольких вариантах (см., например, Teramato et al. 2000. Lancet. 355:1911-1912; Lai et al. 2002. DNA Cell. Biol. 21:895-913; Flotte et al., 1996. Hum. Gene. Ther. 7:1145-1159; и Kay et al. 2000. Nat. Genet. 24:257-261. Сконструированные капсиды AAV могут быть включены в аденовирусный вектор для получения аденовирусных частиц, содержащих указанные сконструированные капсиды AAV.

[0265] В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой хелпер-зависимый аденовирусный вектор или его систему. Они также упоминаются в данной области техники как «безкишечные» или «выпотрошенные» векторы и представляют собой модифицированное поколение аденовирусных векторов (см., например, Thrasher et al. 2006. Nature. 443:E5-7). В вариантах осуществления хелпер-зависимой аденовирусной векторной системы один вектор (хелпер) может содержать все вирусные гены, необходимые для репликации, но содержит условный дефект гена в упаковочном домене. Второй вектор системы может содержать только концы вирусного генома, один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV и сигнал узнавания нативной упаковки, который может обеспечивать селективное упакованное высвобождение из клеток (см., например, Cideciyan et al. 2009. N Engl J Med. 361:725-727). Системы хелпер-зависимых аденовирусных векторов оказались успешными для доставки генов в нескольких контекстах (см., например, Simonelli et al. 2010. J Am Soc Gene Ther. 18:643-650; Cideciyan et al. 2009. N Engl J Med. 361:725-727; Crane et al. 2012. Gene Ther. 19(4):443-452; Alba et al. 2005. Gene Ther. 12:18-S27; Croyle et al. 2005. Gene Ther. 12:579-587; Amalfitano et al. 1998. J. Virol. 72:926-933; и Morral et al. 1999. PNAS. 96:12816-12821). Методы и векторы, описанные в этих публикациях, могут быть адаптированы для включения и доставки полинуклеотидов сконструированного капсида AAV, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, который должен быть доставлен через вирусную частицу, полученную из хелпер-зависимого аденовирусного вектора или его системы, может иметь размер до около 38 т.п.н. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления аденовирусный вектор может включать в доставляемый полинуклеотид ДНК, размер которого может варьироваться от около 0,001 т.п.н. до около 37 т.п.н. (см., например, Rosewell et al. 2011. J. Genet. Syndr. Gene Ther. Suppl. 5:001).

[0266] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой гибридный аденовирусный вектор или его систему. Гибридные аденовирусные векторы сочетают в себе высокую эффективность трансдукции аденовирусного вектора с удаленным геном и долгосрочный потенциал интеграции генома адено-ассоциированных вирусов, ретровирусов, лентивирусов и переноса генов на основе транспозонов. В некоторых вариантах осуществления такие гибридные векторные системы могут приводить к стабильной трансдукции и ограниченному сайту интеграции. См., например, Balague et al. 2000. Blood. 95:820-828; Morral et al. 1998. Hum. Gene Ther. 9:2709-2716; Kubo and Mitani. 2003. J. Virol. 77(5): 2964-2971; Zhang et al. 2013. PloS One. 8(10) e76771; и Cooney et al. 2015. Mol. Ther. 23(4):667-674), методы и векторы из которых, описанные в нем, могут быть модифицированы и адаптированы для использования в системе сконструированных капсидов AAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления гибридный аденовирусный вектор может иметь один или более признаков ретровируса и/или аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах осуществления гибридный аденовирусный вектор может иметь один или более признаков ретровируса Spumavirus или пенящего вируса (FV). См., например, Ehrhardt et al. 2007. Mol. Ther. 15:146-156 и Liu et al. 2007. Mol. Ther. 15:1834-1841, методы и векторы из которых, описанные в нем, могут быть модифицированы и адаптированы для использования в системе сконструированных капсидов AAV по настоящему изобретению. Преимущества использования одного или более признаков FV в гибридном аденовирусном векторе или его системе могут включать способность полученных из него вирусных частиц инфицировать широкий спектр клеток, большую пакующую емкость по сравнению с другими ретровирусами и способность сохраняться в покоящихся (неделящихся) клетках. См., например, также Ehrhardt et al. 2007. Mol. Ther. 156:146-156 и Shuji et al. 2011. Mol. Ther. 19:76-82, методы и векторы из которых, описанные в нем, могут быть модифицированы и адаптированы для использования в системе сконструированных капсидов AAV по настоящему изобретению.

Векторы на основе аденоассоциированных вирусов

[0267] В одном варианте осуществления сконструированный вектор или его система могут представлять собой аденоассоциированный вектор (AAV). См., например, West et al., Virology 160:38-47 (1987); патент США № 4797368; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); и Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994). Хотя AAV схожи с аденовирусными векторами по некоторым своим характеристикам, они имеют некоторые недостатки в их репликации и/или патогенности и, таким образом, могут быть более безопасными, чем аденовирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления AAV может интегрироваться в определенный сайт на хромосоме 19 клетки человека без наблюдаемых побочных эффектов. В некоторых вариантах осуществления емкость вектора AAV, его системы и/или частиц AAV может составлять около до 4,7 т.п.н. Вектор AAV или его система могут включать один или более сконструированных капсидных полинуклеотидов, описанных в данном документе.

[0268] Вектор AAV или его система могут включать одну или более регуляторных молекул. В некоторых вариантах осуществления регуляторные молекулы могут быть промоторами, энхансерами, репрессорами и т.п., которые более подробно описаны в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV или его система могут включать один или более полинуклеотидов, которые могут кодировать один или более регуляторных белков. В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных белков могут быть выбраны из Rep78, Rep68, Rep52, Rep40, их вариантов и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть тканеспецифичным промотором, как обсуждалось ранее. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор может управлять экспрессией сконструированного капсидного полинуклеотида AAV, описанного в данном документе.

[0269] Вектор AAV или его система могут включать один или более полинуклеотидов, которые могут кодировать один или более капсидных белков, таких как сконструированные капсидные белки AAV, описанные в другом месте данного документа. Сконструированные капсидные белки могут быть способны собираться в белковую оболочку (сконструированный капсид) вирусной частицы AAV. Сконструированный капсид может обладать специфичным для клеток, тканей и/или органов тропизмом.

[0270] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV или его система могут включать один или более хелперных факторов аденовируса или полинуклеотидов, которые могут кодировать один или более хелперных факторов аденовируса. Такие хелперные факторы аденовируса могут включать, но не ограничиваться ими, РНК E1A, E1B, E2A, E4ORF6 и VA. В некоторых вариантах осуществления продуцирующая линия клеток-хозяев экспрессирует один или более хелперных факторов аденовируса.

[0271] Вектор AAV или его система могут быть сконфигурированы для получения частиц AAV, имеющих определенный серотип. В некоторых вариантах осуществления серотип может представлять собой AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-8, AAV-9 или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления AAV может представлять собой AAV1, AAV-2, AAV-5, AAV-9 или любую их комбинацию. Можно выбрать AAV из AAV в отношении целевых клеток; например, можно выбрать серотипы 1, 2, 5, 9 AAV или гибридный капсид AAV-1, AAV-2, AAV-5, AAV-9 или любую их комбинацию для нацеливания на клетки головного мозга и/или нервные клетки; и можно выбрать AAV-4 для нацеливания на сердечную ткань; и можно выбрать AAV-8 для доставки в печень. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вектор AAV или его система, способные продуцировать частицы AAV, способные нацеливаться на клетки головного мозга и/или нервные клетки, могут быть сконфигурированы для получения частиц AAV, имеющих серотипы 1, 2, 5, или гибридного капсида AAV-1, AAV-2, AAV-5 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV или его система, способные продуцировать частицы AAV, способные нацеливаться на сердечную ткань, могут быть сконфигурированы для получения частицы AAV, имеющей серотип AAV-4. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV или его система, способные продуцировать частицы AAV, способные нацеливаться на печень, могут быть сконфигурированы для получения AAV, имеющего серотип AAV-8. См. также Srivastava. 2017. Curr. Opin. Virol. 21:75-80.

[0272] Следует понимать, что хотя разные серотипы могут обеспечивать определенный уровень специфичности для клеток, тканей и/или органов, каждый серотип по-прежнему является мультитропным и, таким образом, может приводить к тканевой токсичности при использовании этого серотипа для нацеливания на ткань, трансдукция которой менее эффективна. Таким образом, в дополнение к достижению некоторой способности нацеливания на ткани посредством выбора AAV определенного серотипа, следует понимать, что тропизм серотипа AAV может быть изменен с помощью сконструированного капсида AAV, описанного в данном документе. Как описано в другом месте данного документа, варианты AAV дикого типа любого серотипа могут быть получены с помощью описанного в данном документе способа и определены как имеющие конкретный специфичный для клеток тропизм, который может быть таким же или отличным от такового у эталонного серотипа AAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеточная, тканевая специфичность и/или специфичность серотипа дикого типа может быть усилена (например, повышена селективность или специфичность для определенного типа клеток, к которому серотип уже предрасположен). Например, AAV-9 дикого типа направлен в сторону мышц и головного мозга у людей (см., например, Srivastava. 2017. Curr. Opin. Virol. 21:75-80). Путем включения разработанного капсида AAV и/или варианта капсидного белка дикого типа AAV-9, как описано в данном документе, смещение в сторону, например, мозга может быть уменьшено или устранено и/или специфичность в отношении мышц увеличена таким образом, что специфичность в отношении мозга кажется уменьшенной по сравнению со специфичностью в отношении мозга, таким образом, повышая специфичность в отношении мышц по сравнению с AAV-9 дикого типа. Как упоминалось ранее, включение сконструированного капсида и/или варианта капсидного белка серотипа AAV дикого типа может иметь тропизм, отличный от эталонного серотипа AAV дикого типа. Например, сконструированный капсид AAV и/или вариант капсидного белка AAV-9 может обладать специфичностью в отношении тканей, отличных от мышц или головного мозга человека.

[0273] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV представляет собой гибридный вектор AAV или его систему. Гибридные AAV представляют собой AAV, которые включают геномы с элементами одного серотипа, которые упакованы в капсид, полученный как минимум из одного другого серотипа. Например, если должен быть получен rAAV2/5, и если метод получения основан на методе транзиентном трансфекции без хелперов, описанном выше, 1-я плазмида и 3-я плазмида (адено-хелперная плазмида) будут так же, как обсуждалось для продукции rAAV2. Однако вторая плазмида, pRepCap, будет другой. В этой плазмиде, названной pRep2/Cap5, ген Rep по-прежнему получен из AAV2, тогда как ген Cap получен из AAV5. Схема получения аналогична вышеупомянутому подходу для получения AAV2. Полученный rAAV называется rAAV2/5, в котором геном основан на рекомбинантном AAV2, а капсид основан на AAV5. Предполагается, что клеточный или тканевой тропизм, проявляемый этим гибридным вирусом AAV2/5, должен быть таким же, как у AAV5. Следует отметить, что гибридные частицы AAV дикого типа имеют те же проблемы со специфичностью, что и негибридные серотипы дикого типа, рассмотренные ранее.

[0274] Преимущества, достигаемые с помощью гибридных систем AAV на основе дикого типа, могут быть объединены с повышенной и настраиваемой клеточной специфичностью, которая может быть достигнута с помощью сконструированных капсидов AAV, которые могут быть объединены путем создания гибридного AAV, который может включать сконструированный капсид AAV, описанный в другом месте данного документа. Следует понимать, что гибридные AAV могут содержать сконструированный капсид AAV, содержащий геном с элементами серотипа, отличного от эталонного серотипа дикого типа, вариантом которого является сконструированный капсид AAV. Например, может быть получен гибридный AAV, который включает сконструированный капсид AAV, представляющий собой вариант серотипа AAV-9, который используется для упаковки генома, содержащего фрагменты (например, элементы rep) из серотипа AAV-2. Как и в случае ранее обсуждавшихся гибридных AAV на основе вируса дикого типа, тропизм полученной частицы AAV будет таким же, как и у сконструированного капсида AAV.

[0275] Таблицу некоторых серотипов AAV дикого типа в отношении этих клеток можно найти в Grimm, D. et al, J. Virol. 82: 5887-5911 (2008) воспроизведенной ниже в виде **таблицы 1**. Более подробную информацию о тропизме можно найти в Srivastava. 2017. Curr. Opin. Virol. 21:75-80 как обсуждалось ранее.

Таблица 1								
Клеточная линия	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9
Huh-7	13	100	2,5	0,0	0,1	10	0,7	0,0
HEK293	25	100	2,5	0,1	0,1	5	0,7	0,1
HeLa	3	100	2,0	0,1	6,7	1	0,2	0,1
HepG2	3	100	16,7	0,3	1,7	5	0,3	Н/Д
Hep1A	20	100	0,2	1,0	0,1	1	0,2	0,0
911	17	100	11	0,2	0,1	17	0,1	Н/Д
CHO	100	100	14	1,4	333	50	10	1,0
COS	33	100	33	3,3	5,0	14	2,0	0,5
MeWo	10	100	20	0,3	6,7	10	1,0	0,2
NIH3T3	10	100	2,9	2,9	0,3	10	0,3	Н/Д
A549	14	100	20	Н/Д	0,5	10	0,5	0,1
HT1180	20	100	10	0,1	0,3	33	0,5	0,1
Моноциты	1111	100	Н/Д	Н/Д	125	1429	Н/Д	Н/Д
Незрелые DC	2500	100	Н/Д	Н/Д	222	2857	Н/Д	Н/Д
Зрелые DC	2222	100	Н/Д	Н/Д	333	3333	Н/Д	Н/Д

[0276] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV или его система представляет собой AAV rh.74 или AAV rh.10.

[0277] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV или его система сконфигурированы как «безкишечный» вектор, аналогичный вектору, описанному в связи с ретровирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления «безкишечный» вектор AAV или его система могут содержать цис-действующие элементы вирусной ДНК, участвующие в амплификации и упаковке генома, в связи с представляющими интерес гетерологичными последовательностями (например, полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV).

Конструкция вектора

[0278] Описанные в данном документе векторы могут быть сконструированы с использованием любого подходящего процесса или методики. В некоторых вариантах осуществления один или более подходящих методов или методик рекомбинации и/или клонирования могут быть использованы для вектора(-ов), описанного в данном документе. Подходящие методы или методики рекомбинации и/или клонирования могут включать, но не ограничиваться ими, способы, описанные в публикации заявки США № US 2004-0171156 A1. Другие подходящие методы и методики описаны в другом месте данного документа.

[0279] Конструирование рекомбинантных векторов AAV описано в ряде публикаций, в том числе в патенте США № 5173414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); и Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989). Любая из методик и/или методов может быть использована и/или адаптирована для конструирования AAV или другого вектора, описанного в данном документе. Векторы AAV обсуждаются в другом месте данного документа.

[0280] В некоторых вариантах осуществления вектор может иметь один или более сайтов вставки, таких как последовательность узнавания рестрикционной эндонуклеазой (также называемую «сайтом клонирования»). В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов вставки (например, около или более чем около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов вставки) расположены против хода транскрипции и/или по ходу транскрипции от одного или более элементов последовательности одного или более векторов.

[0281] Средства доставки, векторы, частицы, наночастицы, составы и их фрагменты для экспрессии одного или более элементов системы сконструированных капсидов AAV, описанной в данном документе, используются в предшествующих документах, например, в международной публикации патентной заявки WO 2014/093622 (PCT/US2013 /074667) и более подробно обсуждаются в данном документе.

Получение вирусных частиц из вирусных векторов

<u>Получение частиц AAV</u>

[0282] Существуют две основные стратегии получения частиц AAV из векторов AAV и их систем, таких как описанные в данном документе, которые зависят от способа обеспечения хелперных факторов аденовируса (хелперные факторы против свободных хелперных факторов). В некоторых вариантах осуществления способ получения частиц AAV из векторов AAV и их систем может включать заражение аденовирусом линий клеток, в которых стабильно поддерживается репликация и кодирующие капсид AAV полинуклеотиды, а также вектор AAV, содержащий полинуклеотид, который будет упакован и доставлен полученной частицей AAV (например, полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV). В некоторых вариантах осуществления способ получения частиц AAV из векторов AAV и их систем может быть «бесхелперным» способом, который включает совместную трансфекцию соответствующей продуцирующей линии клеток тремя векторами (например, плазмидными векторами): (1) вектор AAV, который содержит представляющий интерес полинуклеотид (например, полинуклеотид(-ы) сконструированного капсида AAV) между 2 ITR; (2) вектор, который несет полинуклеотиды, кодирующие Rep-Cap AAV; и (хелперные полинуклеотиды. Специалист в данной области техники оценит различные способы и их вариации, как свободные от хелперов, так и включающие хелперы, а также различные преимущества каждой системы.

[0283] Сконструированные векторы AAV и их системы, описанные в данном документе, могут быть получены любым из этих способов.

Доставка векторных и вирусных частиц

[0284] Вектор (включая невирусные носители), описанный в данном документе, может быть введен в клетки-хозяева для получения таким образом транскриптов, белков или пептидов, включая слитые белки или пептиды, кодируемые нуклеиновыми кислотами, как описано в данном документе (например, транскрипты, белки, ферменты системы сконструированных капсидов AAV, их мутантные формы, их слитые белки и т.д.) и вирусные частицы (например, из вирусных векторов и их систем).

[0285] Один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV могут быть доставлены с использованием аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса или других типов плазмидных или вирусных векторов, как описано ранее, в частности, с использованием составов и доз, например, из патентов США № 8454972 (составы, дозы для аденовируса), 8404658 (составы, дозы для AAV) и 5846946 (составы, дозы для ДНК-плазмид), а также из клинических испытаний и публикаций, касающихся клинических испытаний с применением лентивируса, AAV и аденовируса. Например, для AAV способ введения, состав и доза могут быть такими же, как в патенте США № 8454972 и как в клинических испытаниях с применением AAV. Для аденовируса способ введения, состав и доза могут быть такими же, как в патенте США № 8404658 и как в клинических испытаниях с применением аденовируса.

[0286] Для доставки плазмиды способ введения, состав и доза могут быть такими же, как в патенте США № 5846946 и как в клинических исследованиях с применением плазмид. В некоторых вариантах осуществления дозы могут быть основаны или экстраполированы на человека со средней массой тела 70 кг (например, взрослый мужчина) и могут быть скорректированы для пациентов, субъектов, млекопитающих разной массы и видов. Частота введения находится в компетенции практикующего врача или ветеринара (например, терапевта, ветеринара) в зависимости от обычных факторов, включая возраст, пол, общее состояние здоровья, другие состояния пациента или субъекта и конкретное состояние или симптомы, на которые направлено лечение. Вирусные векторы можно инъецировать или иным образом доставлять в представляющую интерес ткань или клетку.

[0287] С точки зрения доставки in vivo, AAV имеет преимущество перед другими вирусными векторами по нескольким причинам, таким как низкая токсичность (это может быть связано с методом очистки, не требующим ультрацентрифугирования частиц клеток, которые могут активировать иммунный ответ) и низкая вероятность инсерционного мутагенеза, поскольку он не интегрируется в геном хозяина.

[0288] Вектор(-ы) и вирусные частицы, описанные в данном документе, могут быть доставлены в клетку-хозяин in vitro, in vivo и/или ex vivo. Доставка может осуществляться любым подходящим методом, включая, помимо прочего, физические методы, химические методы и биологические методы. Физические методы доставки представляют собой такие методы, в которых используется физическая сила для противодействия мембранному барьеру клеток для облегчения внутриклеточной доставки вектора. Подходящие физические методы включают, но не ограничиваются ими, иглы (например, инъекции), баллистические полинуклеотиды (например, бомбардировку частицами, баллистическую трансфекцию и генную пушку), электропорацию, сонопорацию, фотопорацию, магнитофекцию, гидропорацию и механическое воздействие. Химические методы представляют собой такие методы, в которых используется химическое вещество, вызывающее изменение проницаемости клеточной мембраны или других характеристик для облегчения проникновения вектора в клетку. Например, можно изменить pH окружающей среды, что может вызвать изменение проницаемости клеточной мембраны. Биологические методы представляют собой те, которые основаны на биологических процессах или биологических характеристиках клетки-хозяина и используют их для облегчения транспорта вектора (с носителем или без него) в клетку. Например, вектор и/или его носитель могут стимулировать эндоцитоз или аналогичный процесс в клетке, чтобы облегчить поглощение вектора клеткой.

[0289] Доставка фрагментов системы сконструированных капсидов AAV (например, полинуклеотидов, кодирующих сконструированный капсид AAV и/или белки капсида) в клетки с помощью частиц. В контексте данного документа термин «частица» относится к частицам любого подходящего размера для доставки фрагментов системы сконструированных капсидов AAV, описанных в данном документе. Подходящие размеры включают частицы макро-, микро- и наноразмеров. В некоторых вариантах осуществления любой из фрагментов системы сконструированных капсидов AAV (например, полипептиды, полинуклеотиды, векторы и их комбинации, описанные в данном документе) может быть присоединен, связан, интегрирован с, иным образом связан с одной или более частицами или их фрагментами, как описан в данном документе. Частицы, описанные в данном документе, затем можно вводить в клетку или организм соответствующим путем и/или методом. В некоторых вариантах осуществления может быть выбрана доставка частиц, которая может быть предпочтительной для доставки фрагментов полинуклеотида или вектора. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления доставка частиц также может быть полезной для других молекул системы сконструированных капсидов и составов, описанных в другом месте данного документа.

Сконструированные вирусные частицы, включающие сконструированный вирусный (например, AAV) капсид

[0290] В данном документе также описаны сконструированные вирусные частицы (также называемые в данном документе и в других местах «сконструированными вирусными частицами»), которые могут содержать сконструированный вирусный капсид (например, капсид AAV, называемый «сконструированными частицами AAV»), как подробно описано в других местах данного документа. Следует понимать, что сконструированные частицы AAV могут быть частицами на основе аденовируса, частицами на основе хелперного аденовируса, частицами на основе AAV или гибридными частицами на основе аденовируса, которые содержат по меньшей мере один сконструированный капсидный белок AAV, как описано ранее. Сконструированный капсид AAV представляет собой капсид, который содержит один или более сконструированных капсидных белков AAV, как описано в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления сконструированные частицы AAV могут включать от 1 до 60 сконструированных капсидных белков AAV, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированные частицы AAV могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, или 60 сконструированных капсидных белков. В некоторых вариантах осуществления сконструированные частицы AAV могут содержать от 0 до 59 капсидных белков AAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления сконструированные частицы AAV могут содержать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, или 59 капсидных белков AAV дикого типа. Таким образом, сконструированные частицы AAV могут включать один или более n-мерных мотивов, как описано ранее.

[0291] Сконструированная частица AAV может включать один или более полинуклеотидов-карго. Полинуклеотиды-карго обсуждаются более подробно в другом месте данного документа. Способы получения сконструированных частиц AAV из вирусных и невирусных векторов описаны в другом месте данного документа. Составы, содержащие сконструированные вирусные частицы, описаны в другом месте данного документа.

Полинуклеотиды-карго

[0292] Карго также описаны в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления карго представляет собой полинуклеотид-карго, который можно упаковать в сконструированную вирусную частицу и впоследствии доставить в клетку. В некоторых вариантах осуществления доставка специфична для мышц. Полинуклеотиды сконструированного вирусного (например, AAV) капсида, другой вирусный (например, AAV) полинуклеотид(-ы) и/или векторные полинуклеотиды могут содержать один или более полинуклеотидов-карго. В некоторых вариантах осуществления один или более полинуклеотидов-карго могут быть функционально связаны с полинуклеотидами сконструированного вируса (например, AAV) капсида и могут быть частью сконструированного вирусного (например, AAV) генома вирусной (например, AAV) системы по настоящему изобретению . Полинуклеотиды-карго могут быть упакованы в сконструированную вирусную (например, AAV) частицу, которая может быть доставлена, например, в клетку. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид-карго может быть способен модифицировать полинуклеотид (например, ген или транскрипт) клетки, в которую он доставляется. В контексте данного документа термин «ген» может относиться к наследственной единице, соответствующей последовательности ДНК, которая занимает определенное место в хромосоме и содержит генетическую инструкцию для характеристик(-и) или признаков(-а) в организме. Термин «ген» может относиться к транслируемым и/или нетранслируемым областям генома. «Ген» может относиться к конкретной последовательности ДНК, которая транскрибируется в РНК-транскрипт, который может быть транслирован в полипептид или представлять собой каталитическую молекулу РНК, включая, но не ограничиваясь этим, тРНК, киРНК, пиРНК, миРНК, длинную некодирующую РНК и кшРНК. Модификация полинуклеотидов, генов, транскриптов и т.д. включает все методы генной инженерии, включая, но не ограничиваясь ими, редактирование генов, а также обычные методы рекомбинационной модификации генов (например, вставка, делеция и мутагенез (например, инсерционный и делеционный мутагенез).

[0293] В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой полинуклеотид, который кодирует или может кодировать вакцину. В некоторых вариантах осуществления вакцина может стимулировать иммунный ответ против злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления вакцина может стимулировать иммунный ответ против колоректального рака или рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления вакцина может создавать нестабильную среду для клеток, продуцирующих hCG, таких как раковые клетки, продуцирующие hCG.

Генная модификация полинуклеотидов-карго

[0294] В некоторых вариантах осуществления молекула карго может представлять собой полинуклеотид или полипептид, который может сам по себе или при доставке в составе системы, независимо от того, доставлен он с другими фрагментами системы или нет, функционировать для модификации генома, эпигенома и/или транскриптома клетки, в которую он доставлен. Такие системы включают, но не ограничиваются ими, системы CRISPR-Cas. Другие системы модификации генов, например, TALEN, нуклеазы с цинковыми пальцами, Cre-Lox, морфолин и т. д., являются другими неограничивающими примерами систем модификации генов, один или более фрагментов которых могут быть доставлены сконструированными вирусными (например, AAV) частицами, описанными в данном документе .

[0295] В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой систему редактирования генов или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой молекулу системы CRISPR-Cas или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой полинуклеотид, кодирующий один или более фрагментов системы модификации генов (например, системы CRISPR-Cas). В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой нРНК.

[0296] В некоторых вариантах осуществления молекула карго может представлять собой полинуклеотид или полипептид, который может сам по себе или при доставке в составе системы, независимо от того, доставлен он с другими фрагментами системы или нет, функционировать для модификации генома, эпигенома и/или транскриптома клетки, в которую он доставлен, таким образом, что лечит или предотвращает заболевание, нарушение или симптом мышечного или скелетного нарушения, неврологическое заболевание или нарушение, и/или вирусы (например, одноцепочечные РНК-вирусы). В некоторых вариантах осуществления молекула карго, независимо от того, доставлена ли она вместе с другими фрагментами системы или нет, функционирует для модификацию генома, эпигенома и/или транскриптома клетки, в которую она доставлена, таким образом, что она лечит или предотвращает прогероидное заболевание (например, прогероидную ламинопатию), болезнь накопления гликогена, иммунное нарушение (например, аутоиммунное заболевание), злокачественное новообразование, мышечную дистрофию Дюшенна (DMD), 6 конечностно-поясных мышечных дистрофий (LGMD), болезнь Шарко-Мари-Тута (CMT), МПС IIIA, болезнь Помпе или другие заболевания, связанные с ЦНС, такие как болезнь Гентингтона и другие болезни экспансии тринуклеотидных повторов.

[0297] В некоторых вариантах осуществления молекула карго, независимо от того, доставляется она вместе с другими фрагментами системы или нет, функционирует для модификации генома, эпигенома и/или транскриптома клетки, в которую она доставляется, так что она может модифицировать ген GAA, например, как любой из описанных в публикации заявки на патент США 20190284555, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки, как если бы она была представлена в полном объеме, и может быть адаптирована для применения с настоящим изобретением.

[0298] В некоторых вариантах осуществления молекула карго включает олигонуклеотид, связанный с промотором MHCK7, CK8 или другим специфичным для мышц промотором.

[0299] В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой олигонуклеотид микродистрофина, который содержит только выбранные области гена дистрофина, оптимизированные для функционирования белка. В некоторых вариантах осуществления выбранные области включают спектрин-подобные повторы 1, 2, 3 и 24. См., например, Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. Nat Med. 2002;8(3):253-261. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид микродистрофина доставляется агентом rAAV, известным как ген микродистрофина AAVrh74.MHCK7 или SRP-9001, который проходит клинические испытания NCT03375164 и NCT03769116. Эта генная конструкция микродистрофина включает NT-H1-R1-R2-R3-H2-R24-H4-CR-CT. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина включает ABD-H1-R1-R2-R3-H2-R24-H4-CR-CT. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина включает H, обозначающий шарнирную область. England SB, et al. Nature. 1990;343(6254):180-182; Wells DJ, et al. Hum Mol Genet. 1995;4(8):1245-1250, Salva MZ, et al. Mol Ther. 2007;15(2):320-329; Mendell JR, et al. Neurosci Lett. 2012;527(2):90-99; Rodino-Klapac LR, et al. Hum Mol Genet. 2013;22(24):4929-4937; Velazquez VM, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2017;4:159-168; Harper SQ, et al. Nat Med. 2002;8(3):253-261; Nelson DM, et al. Hum Mol

Genet. 2018;27(12):2090-2100. В некоторых вариантах осуществления выбранные области включают по меньшей мере спектрин-подобные повторы 2 и 3. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина содержит домен nNOS. В некоторых вариантах осуществления домен nNOS состоит из спектрин-подобных повторов 16 и/или 17. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина включает спектрин-подобные повторы 16 и 17. В некоторых вариантах осуществления домен nNOS состоит из спектрин-подобных повторов R1, R16, R17, R23 и R24. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина соединен со специфичным для мышц промотором. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид микродистрофина связан с промотором MHCK7, CK8, SNP18, SP0033, SP0051, SP0173, tmCK или другим специфичным для мышц промотором.

[0300] В некоторых вариантах осуществления карго-микродистрофин включает ABD (актин-связывающий домен), одну или более шарнирных областей (например, H1, H2, H3, H4) и один или более спектрин-подобных повторов (например, R1, R1', R2, R3, R16, R17, R20, R21, R22, R23, R24, R24' и необязательно дисстрогликан-связывающий домен (DBD). В некоторых вариантах осуществления микродистрофин состоит из ABD-H1-R1-R16-R17-R23-R24-H4-DBD. В некоторых вариантах осуществления микродистрофин состоит из ABD-H1-R1-R2-R3-H2-R24-H4-CR. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина включает ABD-H1-R1-R2-R3-H2-R24-H4-CR-CT. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина включает ABD-H1-R1’-R24’-H4-CR-CT.

[0301] В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой полинуклеотид, который может кодировать ген микродистрофина, где ген микродистрофина содержит спектрин-подобные повторы, R1, R16, R17, R23 и R24. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина содержит шарнирную область (H) 4 и/или H1. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина содержит N-концевой актин-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина содержит C-концевой дистрогликан-связывающий домен человеческого полноразмерного белка дистрофина. Ген микродистрофина может содержать домен nNOS. В некоторых вариантах осуществления домен nNOS состоит из спектрин-подобных повторов 16 и/или 17. В некоторых вариантах осуществления ген микродистрофина включает спектрин-подобные повторы 16 и 17. Ген микродистрофина может быть таким, как описано в WO 2019118806A1 и WO 2016/115543, которые включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были представлены в полном объеме, и могут быть адаптированы для применения с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид-карго может кодировать белок микродистрофина с 5 повторами, который содержит от N-конца к C-концу N-концевой актин-связывающий домен, шарнирную область 1 (H1), спектрин-подобные повторы R1, R16, R17, R23 и R24, шарнирную область 4 (H4) и C-концевой дистрогликан-связывающий домен человеческого полноразмерного белка дистрофина. Белковая последовательность этого микродистрофина с 5 повторами и родственного минигена дистрофина описаны в WO 2016/115543. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид-карго может соответствовать гену микродистрофина, который является частью агента, известного как SGT001, который в настоящее время проходит клиническое испытание и имеет идентификационный номер NCT03368742.

[0302] В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой ген или вектор минидистрофина. В некоторых вариантах осуществления ген или вектор минидистрофина может состоять из ABD-H1-R1-R2-R3-R16-R17-H3-R20-R21; ABD-H1-R1-R2-R3-R16-R17-H3-R20-R21-R22-R23-R24-H4-CR; или H3-R20-R21-R22-R23-R24-H4-CR-CT.

[0303] В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой кДНК SCGB. В некоторых вариантах осуществления кДНК SGCB связана с промотором MHCK7, CK8, промотором SNP18, промотором SP0033, промотором SP0051, SP0173, промотором tmCK или другим специфичным для мышц промотором. В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой кДНК бета-саркогликана, кДНК альфа-саркогликана, кДНК дисферлина, кДНК гамма-саркогликана, кДНК кальпина-3, кДНК SGSH (например, LYS-SAF302), кДНК нейтропина 3, кДНК аноктамина-5 или любую их комбинацию.

[0304] В некоторых вариантах осуществления молекула карго, независимо от того, доставляется она вместе с другими фрагментами системы или нет, функционирует для модификации генома, эпигенома и/или транскриптома клетки, в которую она доставляется, таким образом, чтобы лечить, предотвращать и/или модифицировать ген или генный продукт, связанный с болезнью экспансии тринуклеотидных повторов, такой как болезнь Гентингтона, как описано в публикации заявки на патент США № 20190100755, патент США 10066228, содержание которых включено в данный документ посредством ссылок, как если бы оно было представлено в полном объеме, и может быть адаптировано для применения с настоящим изобретением.

[0305] В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой молекулу антисмыслового олигомера или РНК, например, которые описаны в публикациях заявок на патент США №№ US20160251398, US20150267202, US20190015440, US20140287983, US20180216111, WO/2017/062835, US20190177723, US20170051278, US20180271893, WO/2016/14965, пат. США 10076536, WO/2018/00580, WO/2018/11866, WO/2019/059973, содержание которых включено в данный документ посредством ссылок, как если бы оно было представлено в полном объеме, и может быть адаптировано для применения с настоящим изобретением.

[0306] В некоторых вариантах осуществления молекула карго, независимо от того, доставляется она с другими фрагментами системы или нет, функционирует для модификации генома, эпигенома и/или транскриптома клетки, в которую она доставляется, таким образом, что она лечит или предотвращает развитие инфекции, вызванной одноцепочечными РНК-вирусами, такими как грипп, вирус Западного Нила, атипичную пневмонию, гепатит С, лихорадку денге, лихорадку Эбола, лихорадку Марбург и/или калицивирус. В некоторых вариантах осуществления молекула карго может представлять собой антисмысловое противовирусное соединение, такое как любое из соединений, описанных в US 8703735B2, содержание которой включено в данный документ посредством ссылок, как если бы оно было представлено в полном объеме, и может быть адаптировано для применения с настоящим изобретением.

[0307] Дополнительные иллюстративные генетические и связанные с генами заболевания и гены, которые могут быть модифицированы молекулой карго, описанной в данном документе, перечислены в других местах данного документа, см., например, **таблицы 4-5**.

[0308] В некоторых вариантах осуществления молекула карго может добавлять или модифицировать ген GALGT2. Вместо того, чтобы пополнять недостающий дистрофин, терапия гена GALGT2 укрепляет структурную целостность мышц таким образом, чтобы компенсировать отсутствие дистрофина за счет увеличения экспрессии белков, не мутировавших или утраченных при заболевании. GALGT2 предлагает потенциал для лечения DMD независимо от конкретной мутации дистрофина, а также может быть полезен при других мышечных дистрофиях.

[0309] В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой морфолин, например, в публикациях заявок на патент США US 2018/0161359 и US 2019/0054113, содержание которой включено в данный документ посредством ссылок, как если бы оно было представлено в полном объеме, и может быть адаптировано для применения с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления морфолин представляет собой морфолиновый олигомер (PMO) или морфолиновый PPMO, связанный пептидом. Платформы на основе PMO можно использовать для лечения генетических заболеваний путем изменения транскрипции мРНК. PMO представляют собой синтетические химические структуры, созданные по образцу природного каркаса РНК.

Хотя PMO имеют те же основания нуклеиновых кислот, что и РНК, они связаны с шестисторонними морфолиновыми кольцами вместо пятисторонних рибозных колец. Кроме того, морфолиновые кольца связаны друг с другом фосфородиамидатными связями вместо фосфодиэфирных связей, обнаруженных в РНК. PMO и PPMO можно использовать для пропуска экзонов и подавления трансляции.

[0310] В некоторых вариантах осуществления молекула карго может представлять собой конъюгат пептид-олигомер, как описано, например, в публикации международной патентной заявки WO2017106304A1, содержание которой включено в данный документ посредством ссылок, как если бы оно было представлено в полном объеме, и может быть адаптировано для применения с настоящим изобретением.

[0311] В некоторых вариантах осуществления морфолин представляет собой морфолин, обнаруженный в этеплирсене, которое может эффективно воздействовать на экзон 51 мРНК дистрофина. В некоторых вариантах осуществления молекула карго может генерировать пропуск экзонов в контексте DMD, например, описанный, например, в US Patent Application Pub. US2014/0315977A1 и US2018/010581, содержание которых включено в данный документ посредством ссылок, как если бы оно было представлено в полном объеме, и может быть адаптировано для применения с настоящим изобретением.

Пропуск экзона

[0312] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности могут кодировать нуклеиновые кислоты, способные индуцировать пропуск экзона. Такие кодируемые нуклеиновые кислоты могут представлять собой антисмысловые олигонуклеотиды или системы антисмысловых нуклеотидов. В контексте данного документа термин «пропуск экзона» относится к модификации сплайсинга пре-мРНК путем нацеливания на сайты донора и/или акцептора сплайсинга в пре-мРНК с помощью одного или более комплементарных антисмысловых олигонуклеотидов (AON). Блокируя доступ сплайсосомы к одному или более сайтам донора или акцептора сплайсинга, AON может предотвратить реакцию сплайсинга, тем самым приводя к делеции одного или более экзонов из полностью процессированной мРНК. Пропуск экзона может быть достигнут в ядре в процессе созревания пре-мРНК. В некоторых примерах пропуск экзона может включать маскирование ключевых последовательностей, участвующих в сплайсинге экзонов-мишеней, с помощью антисмысловых олигонуклеотидов (AON), которые комплементарны донорным последовательностям сплайсинга в пре-мРНК.

[0313] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности кодируют антисмысловые олигонуклеотиды или антисмысловые нуклеотидные системы, способные индуцировать пропуск экзона в мРНК дистрофина. Например, нонсенс-мутация или мутация со сдвигом рамки считывания в экзоне x гена дистрофина приводит к укороченному на карбокси-конце нефункциональному белку дистрофина. Экспрессия зрелого транскрипта мРНК может дать функциональный белок дистрофина, который удален в аминокислотах, кодируемых экзоном x, но включает аминокислоты дистрофина как N-концевые, так и C-концевые по отношению к удаленным аминокислотам.

[0314] Нуклеотидные последовательности могут кодировать антисмысловые олигонуклеотиды или антисмысловые нуклеотидные системы, способные индуцировать пропуск экзона в экзонах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 45, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, или любой их комбинации. Нуклеотидные последовательности могут кодировать антисмысловые олигонуклеотиды или антисмысловые нуклеотидные системы, способные индуцировать пропуск экзона в экзонах 43, 44, 50, 51, 52, 55 или любую их комбинацию.

Молекулы карго системы CRISPR-Cas

[0315] В некоторых вариантах осуществления сконструированные вирусные (например, AAV) или другие частицы, описанные в данном документе, могут включать одну или более молекул системы CRISPR-Cas, которые могут представлять собой полинуклеотиды или полипептиды. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды могут кодировать одну или более молекул системы CRISPR-Cas. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует белок Cas, каскадный белок CRISPR, нРНК или их комбинацию. Другие молекулы системы CRISPR-Cas обсуждаются в другом месте данного документа и могут быть доставлены либо в виде полипептида, либо в виде полинуклеотида.

[0316] В целом система CRISPR-Cas или CRISPR, используемая в данном документе и таких документах, как WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667), совокупно относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или управлении активностью CRISPR-ассоциированных генов («Cas»), включая последовательности, кодирующие ген Cas, последовательность tracr (транс-активирующую CRISPR) (например, tracrРНК или активную часть tracrРНК), сопряженную с tracr последовательность (включающую «прямой повтор» и tracrРНК-процессируемый частичный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющую последовательность (также называемую «спейсером» в контексте эндогенной системы CRISPR) или «РНК» в контексте применения этого термина в данном документе (например, РНК для направления Cas, такую как Cas9, например, РНК CRISPR и трансактивирующую (tracr) РНК или одиночную направляющую РНК (онРНК) (химерную РНК)) или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR. В общем, система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR в сайте целевой последовательности (также называемом протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR). См., например, Shmakov et al. (2015) “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems”, Molecular Cell, DOI: dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008.

[0317] В определенных вариантах осуществления прилегающий к протоспейсеру мотив (PAM, англ. «protospacer adjacent motif») или PAM-подобный мотив управляет связыванием комплекса эффекторного белка, раскрытого в данном документе, с представляющим интерес целевым локусом. В некоторых вариантах осуществления PAM может представлять собой 5’ PAM (т. е. располагаться против хода транскрипции от 5’-конца протоспейсера). В других вариантах осуществления PAM может представлять собой 3’ PAM (т. е. располагаться ниже 5’-конца протоспейсера). Термин «PAM» может взаимозаменяемо использоваться с термином «PFS» или «фланкирующий протоспейсер сайт» или «фланкирующая протоспейсер последовательность».

[0318] В предпочтительном варианте осуществления эффекторный белок CRISPR может распознавать 3’ PAM. В конкретных вариантах осуществления эффекторный белок CRISPR может распознавать 3’-PAM, который представляет собой 5’H, где H представляет собой A, C или U.

[0319] В контексте формирования комплекса CRISPR термин «целевая последовательность» относится к последовательности, для которой разработана комплементарная направляющая последовательность, при этом гибридизация между целевой последовательностью и направляющей последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Целевая последовательность может содержать полинуклеотиды РНК. Термин «целевая РНК» относится к полинуклеотиду РНК, который представляет собой или содержит целевую последовательность. Другими словами, целевая РНК может представлять собой полинуклеотид РНК или часть полинуклеотида РНК, с которыми имеет комплементарность сконструированная нРНК, т. е. направляющая последовательность, и на которые направлена эффекторная функция, опосредованная комплексом, содержащим эффекторный белок CRISPR и нРНК. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность расположена в ядре или цитоплазме клетки.

[0320] В определенных примерах осуществления эффекторный белок CRISPR может быть доставлен с использованием молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей эффекторный белок CRISPR. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая эффекторный белок CRISPR, предпочтительно может быть кодон-оптимизированным эффекторным белком CRISPR. Примером кодон-оптимизированной последовательности в данном случае является последовательность, оптимизированная для экспрессии у эукариот, например, человека (т.е. оптимизированная для экспрессии у людей) или у другого эукариота, животного или млекопитающего, как обсуждается в данном документе; см., например, кодон-оптимизированную последовательность SaCas9 человека в публикации международной патентной заявки WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667). Хотя этот вариант является предпочтительным, следует понимать, что возможны и другие примеры, и известна оптимизация кодонов для видов-хозяев, отличных от человека, или оптимизация кодонов для конкретных органов. В некоторых вариантах осуществления кодирующая фермент последовательность, кодирующая эффекторный белок CRISPR, является кодон-оптимизированной для экспрессии в конкретных клетках, таких как эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут представлять собой клетки, полученные из конкретного организма, такого как растение или млекопитающее, включая, но не ограничиваясь этим, человека, или от отличного от человека эукариота или животного, как обсуждается в данном документе, например, мыши, крысы, кролика, собаки, сельскохозяйственного животного или отличного от человека млекопитающего или примата. В некоторых вариантах осуществления могут исключаться процессы модификации генетической идентичности эмбриональной линии человека и/или процессы модификации генетической идентичности животных, которые, вероятно, вызовут их страдания без какой-либо существенной медицинской пользы для человека или животного, а также животных, получаемых в результате таких процессов. В общем, оптимизация кодонов относится к процессу модификации последовательность нуклеиновой кислоты для улучшения экспрессии в представляющих интерес клетках-хозяевах путем замены по меньшей мере одного кодона (например, около или более чем около 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов) нативной последовательности кодонами, которые более часто или наиболее часто применяются в генах таких клетках-хозяевах, при этом сохраняя нативную аминокислотную последовательность. Различные виды проявляют особенные отклонения в отношении определенных кодонов конкретных аминокислот. Предпочтение кодонов (различия в использовании кодонов между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая, в свою очередь, как полагают, зависит, среди прочего, от свойств транслируемых кодонов и доступности конкретных молекул транспортной РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке, как правило, является отражением кодонов, наиболее часто используемых в синтезе пептидов. Соответственно, можно конструировать гены для оптимальной экспрессии генов в данном организме на основе оптимизации кодонов. Таблицы частот использования кодонов находятся в общем доступе, например, в «Базе данных частот использования кодонов» («Codon Usage Database»), доступной на kazusa.orjp/codon/, и эти таблицы можно адаптировать в ряде способов. См. Nakamura, Y., et al. “Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000” Nucl. Acids Res. 28:292 (2000). Компьютерные алгоритмы для оптимизации кодонов конкретной последовательности для экспрессии в конкретной клетке-хозяине также доступны, например, Gene Forge (Aptagen; г. Джакобус, штат Пенсильвания). В некоторых вариантах осуществления один или более кодонов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более, или все кодоны) в последовательности, кодирующей Cas, соответствуют наиболее часто используемым кодонам для конкретной аминокислоты.

[0321] В определенных вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, могут включать получение трансгенной клетки Cas, в которую вводят или вводят одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих одну или более направляющих РНК, функционально связанных в клетке с регуляторным элементом, содержащим промотор одного или более представляющих интерес генов. В контексте данного документа термин «Cas-трансгенная клетка» относится к клетке, такой как эукариотическая клетка, в геном которой был интегрирован ген Cas. Природа, тип или происхождение клетки никаким конкретным образом не ограничены в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, способ введения трансгена Cas в клетку может варьироваться и может представлять собой любой способ, известный в данной области техники. В определенных вариантах осуществления трансгенную клетку Cas получают путем введения трансгена Cas в выделенную клетку. В определенных других вариантах осуществления Cas-трансгенную клетку получают путем выделения клеток из Cas-трансгенного организма. В качестве примера и без ограничения, называемая в данном документе Cas-трансгенная клетка может быть получена из Cas-трансгенного эукариота, такого как эукариот с нокином Cas. Ссылка сделана на публикацию международной патентной заявки WO 2014/093622 (PCT/US13/74667), включенную в данный документ посредством ссылки. Способы по патентным публикациям США № 20120017290 и 20110265198, права на которые переданы Sangamo BioSciences, Inc., относящиеся к нацеливанию на локус Rosa, можно модифицировать для применения системы CRISPR Cas по настоящему изобретению. Способы по патентной публикации США № 20130236946, права на которую переданы Cellectis, относящиеся к нацеливанию на локус Rosa, также можно модифицировать для применения системы CRISPR Cas по настоящему изобретению. С помощью дополнительных примеров делается ссылка на Platt et. al. (Cell; 159(2):440-455 (2014)), описывающую мышь с нокаутом Cas9, которая включена в данный документ посредством ссылки. Трансген Cas может дополнительно содержать кассету Lox-Stop-polyA-Lox(LSL), тем самым создавая экспрессию Cas, индуцируемую рекомбиназой Cre. В альтернативных вариантах Cas-трансгенную клетку могут получать путем внесения трансгена Cas в выделенную клетку. Системы доставки трансгенов хорошо известны в данной области техники. Например, трансген Cas может быть доставлен, например, в эукариотическую клетку с помощью вектора (например, AAV, аденовируса, лентивируса) и/или доставки с помощью частиц и/или наночастиц, как также описано в другом месте данного документа. Лентивирусные и ретровирусные системы, а также невирусные системы для доставки фрагментов системы CRISPR-Cas широко известны в данной области техники. Системы на основе AAV и аденовирусов для фрагментов системы CRISPR-Cas, как правило, известны в данной области техники, а также описаны в данном документе, (например, сконструированные AAV по настоящему изобретению).

[0322] Специалисту в данной области техники понятно, что клетка, такая как Cas-трансгенная клетка в контексте данного документа, может содержать дополнительные геномные изменения помимо интегрированного гена Cas или мутации, возникающие вследствие специфичного воздействия Cas на последовательность при образовании комплекса с РНК, способной направлять Cas к целевому локусу.

[0323] В определенных вариантах осуществления изобретение включает векторы, например, для доставки или введения в клетку Cas и/или РНК, способных направлять Cas в целевой локус (т.е. направляющую РНК), а также для размножения этих фрагментов (например, в прокариотических клетках). Это может быть дополнением к доставке одного или более фрагментов CRISPR-Cas или другого фрагмента системы модификации генов, который еще не доставляется с помощью сконструированной частицы AAV, описанной в данном документе. В контексте данного документа термин «вектор» представляет собой инструмент, который позволяет или облегчает перенос объекта из одной среды в другую. Он представляет собой репликон, такой как плазмида, фаг или космида, в который может вставляться сегмент другой ДНК таким образом, чтобы обеспечить репликацию вставленного сегмента. В общем, вектор способен к репликации, когда он связан с соответствующими регуляторными элементами. В общем, термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Векторы включают, но не ограничиваются ими, молекулы нуклеиновых кислот, которые являются одноцепочечными, двухцепочечными или частично двухцепочечными; молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат один или более свободных концов, не имеют свободных концов (например, кольцевые); молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат ДНК, РНК или и то, и другое; и другие разновидности полинуклеотидов, известные в данной области техники. Одним типом вектора является «плазмида», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК, например, с помощью стандартных методов молекулярного клонирования. Другим типом вектора является вирусный вектор, причем в векторе присутствуют вирусные последовательности ДНК или РНК для упаковки в вирус (например, ретровирусы, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы, дефектные по репликации аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы (AAV)). Вирусные векторы также включают полинуклеотиды, переносимые вирусом для трансфекции в клетку-хозяина. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации и эписомные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, нэписомальные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «векторами экспрессии». Обычные векторы экспрессии, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид.

[0324] Рекомбинантные экспрессионные векторы могут содержать нуклеиновую кислоту по изобретению в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные экспрессионные векторы содержат один или более регуляторных элементов, которые могут быть выбраны на основании клеток-хозяев, используемых для экспрессии, то есть, функционально связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, предназначенной для экспрессии. В пределах рекомбинантного экспрессионного вектора термин «функционально связанный» предназначен для обозначения представляющей интерес нуклеотидной последовательность, связанной с регуляторным(-и) элементом(-ами) таким способом, который обеспечивает экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в системе транскрипции/трансляции in vitro или в клетке-хозяине, когда вектор введен в клетку-хозяина). Что касается методов рекомбинации и клонирования, то упоминается публикация заявки на патент США 2004/0171156, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Таким образом, раскрытые в данном документе варианты осуществления также могут включать трансгенные клетки, содержащие эффекторную систему CRISPR. В определенных примерах вариантов осуществления трансгенная клетка может функционировать как отдельный дискретный объем. Другими словами, образцы, содержащие маскирующую конструкцию, можно доставлять в клетку, например, в подходящей везикуле для доставки, и, если в везикуле для доставки присутствует мишень, происходит активация эффектора CRISPR и генерация обнаруживаемого сигнала.

[0325] Вектор(-ы) может содержать регуляторный(-е) элемент(-ы), например, промоторы. Вектор(-ы) может содержать кодирующие Cas последовательности и/или кодирующие одну, но возможно также 3 или 8, или 16, или 32, или 48, или 50 направляющих РНК (например, онРНК) последовательности, например, 1–2, 1–3, 1–4 1–5, 3–6, 3–7, 3–8, 3–9, 3–10, 3–8, 3–16, 3–30, 3–32, 3–48, 3–50 РНК (например, онРНК). В одном векторе, может находиться промотор для каждой РНК (например, онРНК), преимущественно может находиться до около 16 РНК; и, когда один вектор предоставляет более чем 16 РНК, один или более промоторов может управлять экспрессией более чем одной РНК, например, когда имеется 32 РНК, каждый промотор может управлять экспрессией двух РНК, и когда имеются 48 РНК, каждый промотор может управлять экспрессией трех РНК. С помощью простой арифметики и общепринятых протоколов, а также информации в этом описании, специалист в данной области техники может легко реализовать на практике данное изобретение в отношении РНК для подходящего типового вектора, такого как AAV, и подходящего промотора, такого как промотор U6. Например, предельный размер для упаковки у AAV составляет ~4,7 т.п.н. Длина одиночной U6-нРНК (плюс сайты рестрикции для клонирования) составляет 361 п. о. Следовательно, специалист может легко поместить около 12–16, например, 13 кассет U6-нРНК, в один вектор. Сборку можно проводить любыми подходящими способами, такими как стратегия золотых ворот, используемая для сборки TALE (genome-engineering.org/taleffectors/). Специалист также может использовать стратегию тандемных направляющих для увеличения числа U6-нРНК приблизительно в 1,5 раза, например, для увеличения числа от 12–16, например, 13, до приблизительно 18–24, например, около 19 U6-нРНК. Следовательно, специалист в данной области может легко получить приблизительно 18–24, например, около 19 последовательностей промотор-РНК, например, U6-нРНК в одном векторе, например, AAV-векторе. Дополнительным способом увеличения числа промоторов и РНК в векторе является использование одного промотора (например, U6) для экспрессии массива РНК, разделенных расщепляемыми последовательностями. И еще одним дополнительным способом увеличения числа промотор-РНК в векторе является экспрессия массива последовательностей промотор-РНК, разделенных расщепляемыми последовательностями, в интроне кодирующей последовательности или гена; и в этом случае предпочтительно использовать промотор полимеразы II, который может характеризоваться повышенной экспрессией и обеспечивать транскрипцию длинных РНК тканеспецифичным образом (см., например, nar.oxfordjournals.org/content/34/7/e53.short and nature.com/mt/journal/v16/n9/abs/mt2008144a.html). В преимущественном варианте осуществления AAV может упаковывать U6 тандемную нРНК, нацеливающуюся на вплоть до около 50 генов. Соответственно, используя знания данной области техники и идеи этого раскрытии, специалист легко может создавать и использовать вектор(-ы), например, одиночный вектор, экспрессирующий множество РНК или направляющих молекул, находящихся под управлением или функциональным образом или функционально связанных с одним или более промоторами, в особенности ряд РНК или направляющих молекул, описанных в данном документе, без проведения ненужных экспериментов.

[0326] Кодирующие направляющие РНК последовательности или кодирующие Cas последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными элементами и, следовательно, регуляторные элементы управляют экспрессией. Промотор(-ы) может (могут) представлять собой конститутивный(-ые) промотор(-ы) и/или обусловленный(-ые) промотор(-ы), и/или индуцибельный(-е) промотор(-ы), и/или тканеспецифичный(-ие) промотор(-ы). Промотор может быть выбран из группы, состоящей из промоторов РНК-полимераз, pol I, pol II, pol III, T7, U6, H1, ретровирусного промотора ДКП вируса саркомы Рауса (RSV), промотора цитомегаловируса (CMV), промотора SV40, промотора дигидрофолатредуктазы, промотора β-актина, промотора фосфоглицеринкиназы (PGK) и промотора EF1α. Преимущественным промотором является промотор U6.

[0327] Дополнительные эффекторы для применения в соответствии с изобретением можно идентифицировать по их близости к генам cas1, например, но не ограничиваясь этим, в пределах области в 20 т.п.н. от начала гена cas1 и 20 т.п.н. от конца гена cas1. В определенных вариантах осуществления эффекторный белок содержит по меньшей мере один домен HEPN и по меньшей мере 500 аминокислот, и при этом эффекторный белок C2c2 естественным образом присутствует в прокариотическом геноме на 20 т.п.н. против или по ходу транскрипции от гена Cas или массива CRISPR. Неограничивающие примеры белков Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известный как Csn1 и Csx12), Cas10, Cas 12, Cas 12a, Cas 13a, Cas 13b, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, их гомологи или их модифицированные версии. В определенных примерах вариантов осуществления эффекторный белок C2c2 естественным образом присутствует в прокариотическом геноме в пределах 20 т.п.н. против или по ходу транскрипции от гена Cas 1. Термины «ортолог» (также называемый в данном документе «ортолог») и «гомолог» (также называемый в данном документе «гомолог») хорошо известны в данной области техники. В качестве дополнительного пояснения, «гомолог» белка, используемый в данном документе, представляет собой белок того же вида, который выполняет ту же или подобную функцию, что и белок, гомологом которого он является. Гомологичные белки могут, но не обязательно, быть структурно родственными, или же являются только частично структурно родственными. Используемый в данном документе «ортолог» белка представляет собой белок отличного вида, который имеет такую же или сходную функцию, что и белок, ортологом которого он является. Ортологичные белки могут, но не обязательно, быть структурно родственными, или же являются только частично структурно родственными.

[0328] В некоторых вариантах осуществления один или более нацеленных на нуклеиновые кислоты элементов системы получен из конкретного организма, содержащего эндогенную РНК-нацеленную систему CRISPR. В определенных вариантах осуществления система нацеливания на РНК CRISPR обнаружена у *Eubacterium* и *Ruminococcus*. В определенных вариантах осуществления эффекторный белок обладает направленной и сопутствующей активностью по расщеплению оцРНК. В определенных вариантах осуществления эффекторный белок содержит двойные домены HEPN. В определенных вариантах осуществления в эффекторном белке отсутствует аналог домена Helical-1 Cas13a. В определенных вариантах осуществления эффекторный белок меньше, чем ранее охарактеризованные эффекторы CRISPR класса 2, со средним размером 928 АК. Этот медианный размер на 190 АК (17%) меньше, чем у Cas13c, более чем на 200 АК (18 %) меньше, чем у Cas13b, и более чем на 300 АК (26 %) меньше, чем у Cas13a. В определенных вариантах осуществления эффекторный белок не требует наличия фланкирующей последовательности (например, PFS, PAM).

[0329] В определенных вариантах осуществления структуры локуса эффекторного белка включают домен WYL, содержащий вспомогательный белок (обозначенный таким образом после трех аминокислот, которые были сохранены в первоначально идентифицированной группе этих доменов; см., например, домен WYL IPR026881). В определенных вариантах осуществления вспомогательный белок домена WYL содержит по меньшей мере один ДНК-связывающий домен спираль-поворот-спираль (HTH) или лента-спираль-спираль (RHH). В определенных вариантах осуществления домен WYL, содержащий вспомогательный белок, увеличивает как направленную, так и побочную активность расщепления одноцепочечной РНК РНК-нацеливающим эффекторным белком. В определенных вариантах осуществления домен WYL, содержащий вспомогательный белок, содержит N-концевой домен RHH, а также структуру преимущественно гидрофобных консервативных остатков, включая инвариантный тирозин-лейциновый дублет, соответствующий исходному мотиву WYL. В определенных вариантах осуществления домен WYL, содержащий вспомогательный белок, представляет собой WYL1. WYL1 представляет собой белок с одним доменом WYL, ассоциированный в основном с *Ruminococcus*.

[0330] В других примерах осуществления фермент Cas, нацеливающий на РНК типа VI, представляет собой Cas 13d. В определенных вариантах осуществления Cas13d представляет собой *Eubacterium siraeum* DSM 15702 (EsCas13d) или *Ruminococcus* sp. N15.MGS-57 (RspCas13d) (см., например, Yan et al., Cas13d Is a Compact RNA-Targeting Type VI CRISPR Effector Positively Modulated by a WYL-Domain-Containing Accessory Protein, Molecular Cell (2018), doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.028). RspCas13d и EsCas13d не имеют требований к фланкирующей последовательности (например, PFS, PAM).

[0331] Способы, системы и инструменты, представленные в настоящем документе, могут быть разработаны для использования с белками CRISPR класса 1, которые могут быть белками Cas типа I, типа III или типа IV, как описано у Makarova *et al.*, The CRISPR Journal, v. 1, n., 5 (2018); DOI: 10.1089/crispr.2018.0033, полностью включенный в данный документ посредством ссылки, и, в частности, как описано на Фиг. 1, с. 326. В системах класса 1 обычно используется мультибелковый эффекторный комплекс, который в некоторых вариантах осуществления может включать вспомогательные белки, такие как один или более белков в комплексе, называемом CRISPR-ассоциированным комплексом для противовирусной защиты (каскад), один или больше адаптационных белков (например, Cas1, Cas2, РНК-нуклеазы) и/или один или более вспомогательных белков (например, Cas 4, ДНК-нуклеаза), белки, содержащие CRISPR-ассоциированный домен с укладкой Россмана (CARF), и/или РНК-транскриптазу. Хотя системы класса 1 имеют ограниченное сходство последовательностей, системные белки класса 1 можно идентифицировать по сходной архитектуре, включая одну или более субъединиц семейства загадочных белков, ассоциированных с повторами (RAMP), например, Cas 5, Cas6, Cas7. Белки RAMP характеризуются наличием одного или более доменов в виде мотивов распознавания РНК. Большие субъединицы (например, cas8 или cas10) и малые субъединицы (например, cas11) также типичны для систем класса 1. См., например, Фиг. 1 и 2. Koonin EV, Makarova KS. 2019 Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. Phil. Trans. R. Soc. B 374: 20180087, DOI: 10.1098/rstb.2018.0087. В одном варианте осуществления системы класса 1 характеризуются характерным белком Cas3. Каскад, в частности белки класса 1, может включать специальный комплекс из нескольких белков Cas, который связывает пре-crРНК и рекрутирует дополнительный белок Cas, например, Cas6 или Cas5, который представляет собой нуклеазу, непосредственно ответственную за процессинг пре-crРНК. В одном варианте осуществления белок CRISPR типа I содержит эффекторный комплекс, включающий одну или более субъединиц Cas5 и две или более субъединиц Cas7. Подтипы класса 1 включают тип I-A, I-B, I-C, I-U, I-D, I-E и I-F, тип IV-A и IV-B, а также тип III-A, III-D, III-C и III-B. Системы класса 1 также включают варианты CRISPR-Cas, включая варианты типа I-A, I-B, I-E, I-F и I-U, которые могут включать варианты, переносимые транспозонами и плазмидами, включая варианты подтипа I-F, кодируемые большим семейством Tn7-подобных транспозонов и меньшими группами Tn7-подобных транспозонов, которые кодируют аналогично деградированные системы подтипа I-B. Peters *et al.*, PNAS 114 (35) (2017); DOI: 10.1073/pnas.1709035114; *см. также* Makarova et al, the CRISPR Journal, v. 1, n5, Figure 5.

Молекулы Cas

[0332] В некоторых вариантах осуществления молекула карго может представлять собой или включать полипептид Cas и/или полинуклеотид, который может кодировать полипептид Cas или его фрагмент. Любая молекула Cas может быть молекулой карго. В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой полипептид Cas системы CRISPR-Cas класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула карго представляет собой полипептид Cas системы CRISPR-Cas класса II. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas представляет собой полипептид Cas I типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas представляет собой полипептид Cas типа II. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas представляет собой полипептид Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas представляет собой полипептид Cas типа IV. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas представляет собой полипептид Cas типа V. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas представляет собой полипептид Cas типа VI. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas представляет собой полипептид Cas типа VII. Неограничивающие примеры белков Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известный как Csn1 и Csx12), Cas10, Cas 12, Cas 12a, Cas 13a, Cas 13b, Cas 13c, Cas 13d, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, их гомологи или их модифицированные версии.

Направляющие последовательности

[0333] В контексте данного документа термины «направляющая последовательность» и «направляющая молекула» в контексте системы CRISPR-Cas включают любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты для гибридизации с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты и направленного специфичного для последовательности связывания комплекса, нацеленного на нуклеиновую кислоту, с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты. Направляющие последовательности, полученные с использованием описанных в данном документе способов, могут представлять собой полноразмерную направляющую последовательность, укороченную направляющую последовательность, полноразмерную последовательность онРНК, укороченную последовательность онРНК или последовательность E+F онРНК. Каждая нРНК может разрабатываться для включения в себя множества сайтов распознавания связывания (например, аптамеров), специфичных к одному и тому же или отличающемуся адаптерному белку. Каждая нРНК может разрабатываться для связывания с промоторной областью -1000 - +1 нуклеиновых кислот против хода транскрипции от сайта инициации транскрипции (т. е. TSS), предпочтительно положения -200 нуклеиновых кислот. Это позиционирование улучшает функциональные домены, которые влияют на активацию генов (например, активаторы транскрипции) или ингибирование генов (например, репрессоры транскрипции). Модифицированная нРНК может представлять собой одну или более модифицированных нРНК, нацеленных на один или более целевых локусов (например, по меньшей мере 1 нРНК, по меньшей мере 2 нРНК, по меньшей мере 5 нРНК, по меньшей мере 10 нРНК, по меньшей мере 20 нРНК, по меньшей мере 30 нРНК, по меньшей мере 50 нРНК), включенных в композицию. Указанное множество последовательностей нРНК могут тандемно упорядочивать и предпочтительно разделять прямым повторов.

[0334] В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности направляющей последовательности заданной целевой последовательности при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет около или более около 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, или более. В определенных примерах осуществления направляющая молекула содержит направляющую последовательность, которая может иметь по меньшей мере одно несовпадение с целевой последовательностью, так что между направляющей последовательностью и целевой последовательностью образуется дуплекс РНК. Соответственно, степень комплементарности предпочтительно составляет менее 99%. Например, когда направляющая последовательность состоит из 24 нуклеотидов, степень комплементарности составляет, в частности, около 96% или менее. В конкретных вариантах осуществления направляющая последовательность разработана так, чтобы иметь участок из двух или более соседних несовпадающих нуклеотидов, так что степень комплементарности всей направляющей последовательности дополнительно снижается.

Например, когда направляющая последовательность состоит из 24 нуклеотидов, степень комплементарности составляет более конкретно около 96% или менее, более конкретно около 92% или менее, более конкретно около 88% или менее, более конкретно около 84% или менее, более конкретно около 80% или менее, более конкретно около 76% или менее, более конкретно около 72% или менее, в зависимости от того, включает ли участок из двух или более несовпадающих нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов и т. д., В некоторых вариантах осуществления, помимо удлинения одного или более несовпадающих нуклеотидов, степень комплементарности при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет около или более около 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более. Оптимальное выравнивание можно определять, используя любой подходящий алгоритм для выравнивания последовательностей, неограничивающие примеры которых включают алгоритм Смита — Уотермана, алгоритм Нидлмана — Вунша, алгоритмы на основании преобразования Барроуза — Уилера (например, выравниватель Барроуза — Уилера), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies; доступно на www.novocraft.com), ELAND (Illumina, San Diego, CA), SOAP (доступно на soap.genomics.org.cn) и Maq (доступно на maq.sourceforge.net). Способность направляющей последовательности (в пределах нацеливаемой на нуклеиновые кислоты направляющей РНК) направлять специфичное для последовательности связывание комплекса, нацеливаемого на нуклеиновые кислоты, на последовательность целевой нуклеиновой кислоты можно оценивать любым подходящим анализом. Например, фрагменты нацеливаемой на нуклеиновые кислоты системы CRISPR, достаточные для образования комплекса нацеленного на нуклеиновую кислоту комплекса, включая направляющую последовательность, подлежащую исследованию, можно вносить в клетку-хозяина, имеющую соответствующую целевую последовательность нуклеиновой кислоты, например, с помощью трансфекции векторами, кодирующими фрагменты нацеленного на нуклеиновую кислоту комплекса, с последующей оценкой преимущественного нацеливания (например, расщепления) в пределах последовательности целевой нуклеиновой кислоты, например, с помощью анализа Surveyor, описанного в данном документе. Аналогично, расщепление целевой последовательности нуклеиновой кислоты (или последовательности вблизи нее) можно оценить в пробирке путем предоставления целевой последовательности нуклеиновой кислоты, фрагментов нацеленного на нуклеиновую кислоту комплекса, включая направляющую последовательность, которая подлежит тестированию, и контрольную направляющую последовательность, отличную от тестируемой направляющей последовательности, и сравнение связывания или скорости расщепления в целевой последовательности или вблизи нее между реакциями с тестируемой и контрольной направляющей последовательностями. Возможны и другие анализы, и это будет понятно специалистам в данной области техники. Направляющая последовательность и, следовательно, направляющая РНК, нацеленная на нуклеиновую кислоту, может быть выбрана для нацеливания на любую последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

[0335] В контексте данного документа термин «crРНК», или «направляющая РНК», или «одиночная направляющая РНК», или «онРНК», или «один или более фрагментов нуклеиновой кислоты» эффекторного белка локуса CRISPR-Cas типа V или типа VI включает любую полинуклеотидную последовательность. обладающие достаточной комплементарностью с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты для гибридизации с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты и направленного специфичного для последовательности связывания комплекса нуклеиновая кислота-мишень с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет около или более около 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, или более. Оптимальное выравнивание можно определять, используя любой подходящий алгоритм для выравнивания последовательностей, неограничивающие примеры которых включают алгоритм Смита — Уотермана, алгоритм Нидлмана — Вунша, алгоритмы на основании преобразования Барроуза — Уилера (например, выравниватель Барроуза — Уилера), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies; доступно на www.novocraft.com), ELAND (Illumina, San Diego, CA), SOAP (доступно на soap.genomics.org.cn) и Maq (доступно на maq.sourceforge.net). Способность направляющей последовательности (в пределах нацеленной на нуклеиновые кислоты направляющей РНК) направлять специфичное для последовательности связывание комплекса, нацеливаемого на нуклеиновые кислоты, на последовательность целевой нуклеиновой кислоты можно оценивать любым подходящим анализом. Например, фрагменты нацеливаемой на нуклеиновые кислоты системы CRISPR, достаточные для образования нацеленного на нуклеиновую кислоту комплекса, включая направляющую последовательность, подлежащую исследованию, можно вносить в клетку-хозяина, имеющую соответствующую целевую последовательность нуклеиновой кислоты, например, с помощью трансфекции векторами, кодирующими фрагменты нацеленного на нуклеиновую кислоту комплекса, с последующей оценкой преимущественного нацеливания (например, расщепления) в пределах последовательности целевой нуклеиновой кислоты, например, с помощью анализа Surveyor, описанного в данном документе. Аналогично, расщепление последовательности целевой нуклеиновой кислоты можно оценивать в анализируемой пробирке путем внесения последовательности целевой нуклеиновой кислоты, фрагментов нацеленного на нуклеиновую кислоту комплекса, включая направляющую последовательность, подлежащую исследованию, и контрольную направляющую последовательность, отличающуюся от исследуемой направляющей последовательности, и сравнения связывания или скорости расщепления у целевой последовательности среди реакций исследуемой и контрольной направляющих последовательностей. Возможны и другие анализы, и это будет понятно специалистам в данной области техники. Направляющая последовательность и, следовательно, направляющая молекула, нацеленная на нуклеиновую кислоту, может быть выбрана для нацеливания на любую последовательность целевой нуклеиновой кислоты. Целевая последовательность может представлять собой ДНК. Целевая последовательность может представлять собой любую последовательность РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может представлять собой последовательность в пределах молекулы РНК, выбранной из группы, состоящей из матричной РНК (мРНК), пре-мРНК, рибосомальной РНК (рРНК), транспортной РНК (тРНК), микро-РНК (микроРНК), малой интерферирующей РНК (миРНК), малой ядерной РНК (мяРНК), малой ядрышковой РНК (мякРНК), двухцепочечной РНК (дцРНК), некодирующей РНК (нкРНК), длинной некодирующей РНК (днкРНК) и малой цитоплазматической РНК (мцРНК). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления целевая последовательность может представлять собой последовательность в пределах молекулы РНК, выбранной из группы, состоящей из мРНК, пре-мРНК и рРНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления целевая последовательность может представлять собой последовательность в пределах молекулы РНК, выбранной из группы, состоящей из мяРНК и мякРНК. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления целевая последовательность может представлять собой последовательность в пределах молекулы мРНК или молекулы пре-мРНК.

[0336] В некоторых вариантах осуществления нацеленная на нуклеиновые кислоты направляющая молекула выбрана так, чтобы снижать степень присутствия вторичной структуры в нацеленной на нуклеиновые кислоты направляющей. В некоторых вариантах осуществления около или менее около 75%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% или меньше нуклеотидов нацеленной на нуклеиновую кислоту направляющей молекулы участвуют в самокомплементарном спаривании оснований при оптимальном сворачивании. Оптимальное сворачивание можно определять с помощью любого подходящего алгоритма сворачивания полинуклеотидов. В основе некоторых программ лежит вычисление минимальной свободной энергии Гиббса. Примером одного из таких алгоритмов является mFold, описанный Zuker и Stiegler (Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133-148). Другим примером алгоритма сворачивания является онлайн веб-сервер RNAfold, разработанный в Институте теоретической химии Венского университета, с использованием алгоритма предсказания центра тяжести структуры (см., например, A.R. Gruber et al., 2008, Cell 106(1): 23-24; and PA Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27(12): 1151-62).

[0337] В определенных вариантах осуществления направляющая РНК или crРНК могут содержать, состоять преимущественно из или состоять из последовательности прямого повтора (ПП) и направляющей последовательности или спейсерной последовательности. В определенных вариантах осуществления направляющая РНК или crРНК могут содержать, состоять преимущественно из или состоять из последовательности прямого повтора, слитой или связанной с направляющей последовательностью или спейсерной последовательностью. В определенных вариантах осуществления последовательность прямого повтора может располагаться против хода транскрипции (т. е. 5’) от направляющей последовательности или спейсерной последовательности. В других вариантах осуществления последовательность прямого повтора может располагаться ниже (т. е. 3’) направляющей последовательности или спейсерной последовательности.

[0338] В определенных вариантах осуществления crРНК содержит структуру типа «стебель-петля», предпочтительно одну структуру типа «стебель-петля». В определенных вариантах осуществления последовательность прямого повтора образует структуру типа «петля-на-стебле», предпочтительно одну структуру типа «петля-на-стебле».

[0339] В определенных вариантах осуществления длина спейсера направляющей РНК составляет от 15 до 35 нт. В определенных вариантах осуществления длина спейсера направляющей РНК составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина спейсера составляет от 15 до 17 нт, например, 15, 16 или 17 нт, от 17 до 20 нт, например, 17, 18, 19 или 20 нт, от 20 до 24 нт, например, 20, 21, 22, 23 или 24 нт, от 23 до 25 нт, например, 23, 24 или 25 нт, от 24 до 27 нт, например, 24, 25, 26 или 27 нт, от 27 до 30 нт, например, 27, 28, 29 или 30 нт, от 30 до 35 нт, например, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 нт, или 35 нт или более.

[0340] Последовательность «tracrРНК» или аналогичные термины включает любую полинуклеотидную последовательность, которая имеет достаточную комплементарность с последовательностью crРНК с целью гибридизации. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между последовательностью tracrРНК и последовательностью crРНК вдоль длины более короткой из двух последовательностей при их оптимальном выравнивании составляет около или более чем около 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или выше. В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr представляет собой в длину около или более чем около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и последовательность crPHK содержатся в пределах одного транскрипта, так что гибридизация между ними двумя продуцирует транскрипт, имеющий вторичную структуру, такую как шпилька. В варианте осуществления изобретения транскрипт или транскрибированная полинуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере две или более шпилек. В предпочтительных вариантах осуществления транскрипт содержит две, три, четыре или пять шпилек. В дополнительном варианте осуществления изобретения транскрипт содержит не более пяти шпилек. В шпилечной структуре часть последовательности 5' конечного «N» и против хода транскрипции от петли соответствует сопряженной с tracr последовательности, и часть последовательности 3' петли соответствует последовательности tracr.

[0341] В целом, степень комплементарности согласуется с эталоном по оптимальному выравниванию последовательности sca и последовательности tracr вдоль длины более короткой из этих двух последовательностей. Оптимальное выравнивание может определяться любым подходящим алгоритмом выравнивания, и могут дополнительно учитываться вторичные структуры, такие как самокомплементарность в пределах любой последовательности sca или последовательности tracr. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между последовательностью tracr и последовательностью sca вдоль длины более короткой из этих двух последовательностей, при оптимальном выравнивании, составляет около или более чем около 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или выше.

[0342] Как правило, система CRISPR-Cas, CRISPR-Cas9 или CRISPR может использоваться в вышеуказанных документах, как WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667), совокупно относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или управлении активностью CRISPR-ассоциированных генов («Cas»), включая последовательности, кодирующие ген Cas, в частности ген Cas9 в случае CRISPR-Cas9, tracr (транс-активирующую CRISPR) (например, tracrPHK или активную часть tracrPHK), сопряженную с tracr последовательность (включающую «прямой повтор» и tracrPHK-процессируемый частичный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющую последовательность (также называемую «спейсером» в контексте эндогенной системы CRISPR) или «PHK» в контексте применения этого термина в данном документе (например, PHK для направления Cas9, например, PHK CRISPR и трансактивирующую (tracr) PHK или одиночную направляющую PHK (онPHK) (химерную PHK)) или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR. В общем, система

CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR в сайте целевой последовательности (также называемого протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR). В контексте формирования комплекса CRISPR термин «целевая последовательность» относится к последовательности, для которой разработана комплементарная направляющая последовательность, при этом гибридизация между целевой последовательностью и направляющей последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Подразделение направляющей последовательности, посредством которой комплементарность с целевой последовательностью оказывается важной для активности расщепления, обозначается в данном документе как затравочная последовательность. Целевая последовательность может содержать любой полинуклеотид, такой как полинуклеотиды ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность расположена в ядре или цитоплазме клетки и может содержать нуклеиновые кислоты вводимые в митохондрии, органеллы, везикулы, липосомы или частицы, присутствующие внутри клетки, или полученные из них. В некоторых вариантах осуществления, особенно для неядерных применений, ПЯЛ не являются предпочтительными. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR содержит один или более сигналов ядерного экспорта (СЯЭ). В некоторых вариантах осуществления система CRISPR содержит одну или более ПЯЛ и одну или более СЯЭ. В некоторых вариантах осуществления прямые повторы могут быть идентифицированы in silico путем поиска повторяющихся мотивов, которые удовлетворяют любому или всем из следующих критериев: 1. обнаружены в окне геномной последовательности размером 2 т.п.н., фланкирующей локус CRISPR типа II; 2. имеют диапазон от 20 до 50 п.н.; и 3. перемежаются с интервалом от 20 до 50 п.н. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться 2 из этих критериев, например,, 1 и 2, 2 и 3 или 1 и 3. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться все 3 критерия.

[0343] В вариантах осуществления изобретения термины «направляющая последовательность» и «направляющая РНК», т. е. РНК, способная направлять Cas к геномному локусу-мишени, используются взаимозаменяемо, как и в упомянутых выше документах, таких как публикация международной патентной заявки WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667). В общем случае направляющая последовательность представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с целевой полинуклеотидной последовательностью для гибридизации с целевой последовательностью и последовательность-специфичного связывания комплекса CRISPR с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью, при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания, составляет около или более чем около 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более. Оптимальное выравнивание можно определять, используя любой подходящий алгоритм для выравнивания последовательностей, неограничивающие примеры которых включают алгоритм Смита — Уотермана, алгоритм Нидлмана — Вунша, алгоритмы на основании преобразования Барроуза — Уилера (например, выравниватель Барроуза — Уилера), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies; доступно на www.novocraft.com), ELAND (Illumina, San Diego, CA), SOAP (доступно на soap.genomics.org.cn) и Maq (доступно на maq.sourceforge.net). В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность может содержать около или более чем около 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или более нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит в длину менее чем около 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12 или менее нуклеотидов. Предпочтительно направляющая последовательность имеет длину 10–30 нуклеотидов. Способность направляющей последовательности направлять последовательность-специфичное связывание комплекса CRISPR на целевую последовательность можно оценивать любым подходящим анализом. Например, фрагменты системы CRISPR, достаточные для образования комплекса CRISPR, включая направляющую последовательность, подлежащую исследованию, можно вносить в клетку-хозяина, имеющую соответствующую целевую последовательность, например, путем трансфекции векторами, кодирующими фрагменты последовательности CRISPR, с последующей оценкой преимущественного расщепления в целевой последовательности, например, с помощью анализа Surveyor, описанного в данном документе. Аналогично, расщепление последовательности целевого полинуклеотида можно оценивать в анализируемой пробирке путем внесения целевой последовательности, фрагментов комплекса CRISPR, включая направляющую последовательность, подлежащую исследованию, и контрольную направляющую последовательность, отличающуюся от исследуемой направляющей последовательности, и сравнения связывания или скорости расщепления у целевой последовательности среди реакций исследуемой и контрольной направляющих последовательностей. Для специалистов в данной области возможны другие анализы, и анализы, которые появятся.

[0344] В некоторых вариантах осуществления систем CRISPR-Cas степень комплементарности между направляющей последовательностью и ее соответствующей целевой последовательностью может составлять около или более чем около 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, или 100%; направляющая или РНК или онРНК может иметь длину около или более чем около 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75, или более нуклеотидов; или направляющая или РНК или онРНК может иметь длину менее чем около 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12 или менее нуклеотидов; и преимущественно tracrРНК имеет длину 30 или 50 нуклеотидов. Однако вариант осуществления изобретения заключается в уменьшении нецелевых взаимодействий, например, уменьшении взаимодействия направляющей с целевой последовательностью, имеющей низкую комплементарность. Действительно, в примерах показано, что в изобретение включены мутации, которые приводят к получению системы CRISPR-Cas, способной различать целевые и нецелевые последовательности, которые имеют более чем от 80% до около 95% комплементарности, например, 83%-84% или 88-89%, или 94-95% комплементарности (к примеру, различать целевую последовательность, имеющую 18 нуклеотидов, и нецелевую последовательность из 18 нуклеотидов, имеющую 1, 2 или 3 несовпадения). Соответственно, в контексте настоящего изобретения степень комплементарности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью выше чем 94,5% или 95% или 95,5% или 96% или 96,5% или 97% или 97,5% или 98% или 98,5% или 99% или 99,5% или 99,9% или 100%. Нецелевая последовательность имеет менее 100% или 99,9% или 99,5% или 99% или 99% или 98,5% или 98% или 97,5% или 97% или 96,5% или 96% или 95,5% или 95% или 94,5% или 94% или 93% или 92% или 91% или 90% или 89% или 88% или 87% или 86% или 85% или 84% или 83% или 82% или 81% или 80% комплементарности между этой последовательностью и направляющей молекулой, с тем преимуществом, что нецелевая последовательность имеет 100% или 99,9% или 99,5% или 99% или 99% или 98,5% или 98% или 97,5% или 97% или 96,5% или 96% или 95,5% или 95% или 94,5% комплементарности между этой последовательностью и направляющей.

[0345] В особенно предпочтительных вариантах осуществления изобретения направляющая РНК (способная направлять Cas к целевому локусу) может содержать (1) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевым геномным локусом в эукариотической клетке; (2) последовательность tracr; и (3) сопряженную с tracr последовательность. Все последовательности от (1) до (3) могут находиться в одной РНК, т. е. онРНК (упорядоченной в ориентации от 5’ до 3’), или tracrРНК может быть другой РНК, отличающейся от РНК, содержащей направляющую последовательность и последовательность tracr. Последовательность tracr гибридизируется с сопряженной с tracr последовательностью и направляет комплекс CRISPR/Cas на целевую последовательность. Когда tracr РНК располагается на другой РНК, отличающейся от РНК, содержащей направляющую последовательность или последовательность tracr, длина каждой РНК может быть оптимизирована для укорачивания относительно соответствующим своим нативным величинам длины, и каждая может быть независимо химически модифицирована для защиты от разрушения клеточной РНКазой или для увеличения стабильности иным образом.

[0346] Способы согласно изобретению, описанные в данном документе, включают индукцию одной или более мутаций в эукариотической клетке (in vitro, т.е. в выделенной эукариотической клетке), как обсуждается в данном документе, включая доставку в клетку вектора, обсуждаемого в данном документе. Мутация(-и) может (могут) включать в себя введение, делецию или замену одного или более нуклеотидов в каждой целевой последовательности клетки (клеток) посредством направляющей(-их) РНК или онРНК. Мутации могут включать в себя введение, делецию или замену 1-75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток) посредством направляющей(-их) РНК или онРНК. Мутации могут включать в себя введение, делецию или замену 1, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или 75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток) посредством направляющей(-их) РНК или онРНК. Мутации могут включать в себя введение, делецию или замену 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или 75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток) посредством направляющей(-их) РНК или онРНК. Мутации могут включать в себя введение, делецию или замену 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или 75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток) посредством направляющей(-их) РНК или онРНК. Мутации могут включать в себя введение, делецию или замену 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или 75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток) посредством направляющей(-их) РНК или онРНК. Мутации могут включать в себя введение, делецию или замену 40, 45, 50, 75, 100, 200, 300, 400 или 500 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток) посредством направляющей(-их) РНК или онРНК.

[0347] Для минимизации токсичности и нецелевого воздействия, может быть важным контролировать концентрацию доставляемых Cas мРНК и направляющей РНК. Оптимальные концентрации мРНК Cas и направляющей РНК могут определять тестированием различных концентраций в клеточной модели или животной модели отличного от человека эукариота и с использованием глубокого секвенирования для анализа степени модификации в потенциальных нецелевых геномных локусах.

Альтернативно, для минимизации уровня токсичности и нецелевого воздействия мРНК никазы Cas (например, S. pyogenes Cas9 с мутацией D10A) можно вводить с парой направляющих РНК, нацеливаемых на представляющий интерес сайт. Направляющие последовательности и стратегии для минимизации токсичности нецелевых воздействий могут быть такими как в WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667); или изменяться посредством мутации, как в данном документе.

[0348] Как правило, в контексте эндогенной системы CRISPR образование комплекса CRISPR (содержащего направляющую последовательность, гибридизованную с целевой последовательностью и образующую комплекс с одним или более белками Cas) приводит к расщеплению одной или обеих цепей в или возле целевой последовательности (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований от нее). Без ограничения какой-либо теорией, последовательность tracr, которая может содержать или состоять из всех или части последовательности tracr дикого типа (например, около или более чем около 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 или более нуклеотидов последовательности tracr дикого типа), также может образовывать часть комплекса CRISPR, например, путем гибридизации вдоль по меньшей мере части последовательности tracr со всей или частью сопряженной с tracr последовательностью, которая функционально связана с направляющей последовательностью.

[0349] В определенных вариантах осуществления направляющие по изобретению содержат неприродные нуклеиновые кислоты и/или неприродные нуклеотиды, и/или аналоги нуклеотидов, и/или химические модификации. Не встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты могут включать в себя, например, смеси встречающихся и не встречающихся в природе нуклеотидов. Не встречающиеся в природе нуклеотиды и/или нуклеотидные аналоги могут модифицироваться по рибозе, фосфату и/или фрагменту основания. В варианте осуществления изобретения направляющая нуклеиновая кислота содержит рибонуклеотиды и нерибонуклеотиды. В одном таком варианте осуществления направляющая молекула содержит один или более рибонуклеотидов и один или более дезоксирибонуклеотидов. В варианте осуществления изобретения направляющая молекула содержит один или более неприродных нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, таких как нуклеотид с тиофосфатной связью, боранофосфатной связью, нуклеотиды замкнутых нуклеиновых кислот (LNA), содержащих метиленовый мостик между углеродами 2' и 4' рибозного кольца, пептид-нуклеиновые кислоты (PNA) или мостиковые нуклеиновые кислоты (BNA). Другие примеры модифицированных нуклеотидов включают 2'-O-метильные аналоги, 2'-дезокси аналоги, 2-тиоуридиновые аналоги, N6-метиладенозиновые аналоги или 2'-фтор аналоги. Дополнительные примеры модифицированных нуклеотидов включают связь химических фрагментов в положении 2’, включающую, но ограничивающуюся ими, пептиды, последовательности ядерной локализации (ПЯЛ), пептид-нуклеиновую кислоту (PNA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), триэтиленгликоль или тетраэтиленгликоль (ТЭГ). Дополнительные примеры модифицированных оснований включают, но не ограничиваются ими, 2-аминопурин, 5-бромуридин, псевдоуридин (Ψ), N^1-метилпсевдоуридин ($me^1Ψ$), 5-метоксиуридин (5moU), инозин, 7-метилгуанозин. Примеры направляющих химических модификаций РНК включают, без ограничений, включение 2’-O-метил (M), 2’-O-метил-3’-тиофосфата (MS), тиофосфата (PS), S-затрудненного этила (cEt), 2’-O-метил-3’-тиоPACE (MSP) или 2’-O-метил-3’-фосфоноацетата (MP) в один или более концевых нуклеотидов. Такие химически модифицированные направляющие молекулы могут включать увеличенную стабильность и увеличенную активность по сравнению с немодифицированными направляющими молекулами, хотя зависимость целевой по сравнению с нецелевой специфичностью не предсказуема. (См., Hendel, 2015, Nat Biotechnol. 33(9):985-9, doi: 10.1038/nbt.3290, published online 29 June 2015; Ragdarm et al., 0215, PNAS, E7110-E7111; Allerson et al., J. Med. Chem. 2005, 48:901-904; Bramsen et al., Front. Genet., 2012, 3:154; Deng et al., PNAS, 2015, 112:11870-11875; Sharma et al., MedChemComm., 2014, 5:1454-1471; Hendel et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33(9): 985-989; Li et al., Nature Biomedical Engineering, 2017, 1, 0066 DOI:10.1038/s41551-017-0066; Ryan et al., Nucleic Acids Res. (2018) 46(2): 792-803). В некоторых вариантах осуществления 5’- и/или 3’-концы направляющей РНК модифицированы различными функциональными фрагментами, включая флуоресцентные красители, полиэтиленгликоль, холестерин, белки или метки для обнаружения. (См. Kelly et al., 2016, J. Biotech. 233:74-83). В определенных вариантах осуществления направляющая молекула содержит рибонуклеотиды в области, которая связывается с целевой ДНК, и один или более дезоксирибонуклеотидов и/или нуклеотидных аналогов в области, которая связывается с Cas9, Cpf1 или C2c1. В варианте осуществления изобретения дезоксирибонуклеотиды и/или нуклеотидные аналоги включены в сконструированные направляющие структуры, такие как, без ограничений, 5’- и/или 3’-концы, области структуры типа «петля-на-стебле» и затравочную область. В определенных вариантах осуществления модификация не находится в 5’-группе прикрепления областей структуры типа «петля-на-стебле». Химическая модификация в 5’-группе прикрепления области структуры типа «петля-на-стебле» направляющей молекулы может прекращать ее функционирование (см. Li, et al., Nature Biomedical Engineering, 2017, 1:0066). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или 75 нуклеотидов направляющей молекулы являются химически модифицированными. В некоторых вариантах осуществления 3-5 нуклеотидов на либо 3’-, либо 5’-конце направляющей молекулы являются химически модифицированными. В некоторых вариантах осуществления в затравочную область вводят только минорные модификации, такие как 2’-F модификации. В некоторых вариантах осуществления 2’-F модификацию вводят на 3’-конец направляющей молекулы. В определенных вариантах осуществления от трех до пяти нуклеотидов на 5’- и/или 3’-конце направляющей молекулы химически модифицированы с помощью 2’-O-метил (M), 2’-O-метил-3’-тиофосфата (MS), S-затрудненного этила (cEt), 2’-O-метил-3’-тиоPACE (MSP) или 2’-O-метил-3’-фосфоноацетата (MP). Такая модификация может повысить эффективность редактирования генома (см. Hendel et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33(9): 985-989; Ryan et al., Nucleic Acids Res. (2018) 46(2): 792-803). В определенных вариантах осуществления все фосфодиэфирные связи направляющей молекулы замещены тиофосфатами (PS) для усиления уровней разрушения генов. В определенных вариантах осуществления более пяти нуклеотидов на 5’- и/или 3’-конце направляющей молекулы химически модифицированы 2’-O-Me, 2’-F или S-затрудненным этилом (cEt). Такая химически модифицированная направляющая молекула может опосредовать усиленные уровни нарушения генов (см. Ragdarm et al., 0215, PNAS, E7110-E7111). В варианте осуществления изобретения направляющая молекула модифицирована с целью включать химический фрагмент на своем 3’- и/или 5’-конце. Такие фрагменты включают в себя, но не ограничивается ими, амин, азид, алкин, тио, дибензоциклооктин (DBCO), родамин, пептиды, последовательность ядерной локализации (ПЯЛ), пептид-нуклеиновую кислоту (PNA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), триэтиленгликоль или тетраэтиленгликоль (ТЭГ). В определенном варианте осуществления химический фрагмент конъюгирован с направляющей молекулой линкером, таким как алкильная цепь. В определенных вариантах осуществления химический фрагмент модифицированной направляющей молекулы могут применять для присоединения направляющей молекулы к другой молекуле, такой как ДНК, РНК, белок или наночастицы. Такую химически модифицированную направляющую молекулу могут применять для идентификации или обогащения клеток, генетически отредактированных системой CRISPR (см. Lee et al., eLife, 2017, 6:e25312, DOI:10.7554). В некоторых вариантах осуществления химически модифицированы 3 нуклеотида на каждом из 3’- и 5’-концов. В конкретном варианте осуществления модификации содержат 2’-O-метильные или тиофосфатные аналоги. В конкретном варианте осуществления 12 нуклеотидов в тетрапетле и 16 нуклеотидов в области структуры типа «петля-на-стебле» заменены 2’-O-метильным аналогом. Такие химические модификации улучшают редактирование и стабильность in vivo (см. Finn et al., Cell Reports (2018), 22: 2227-2235). В некоторых вариантах осуществления более 60 или 70 нуклеотидов направляющей молекулы химически модифицированы. В некоторых вариантах осуществления эта модификация содержит замещение нуклеотидов 2’-О-метильными или 2’-фтор нуклеотидными аналогами или тиофосфатную (PS) модификацию фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация включает 2'-О-метильную или 2'-фтор модификацию нуклеотидов направляющей молекулы, выходящих за пределы нуклеазного белка при образовании комплекса CRISPR, или модификацию PS от 20 до 30 или более нуклеотидов 3'-конца направляющей молекулы. В конкретном варианте осуществления химическая модификация дополнительно включает 2’-О-метильные аналоги на 5’ конце направляющей молекулы или 2’-фтор аналоги в затравочной и концевой областях. Такие химические модификации улучшают устойчивость к деградации нуклеазами и поддерживают или усиливают активность или эффективность редактирования генома, но модификация всех нуклеотидов может устранить функцию направляющей молекулы (см. Yin et al., Nat. Biotech. (2018), 35(12): 1179-1187). Такие химические модификации могут основываться на знании структуры комплекса CRISPR, включая знание об ограниченном количестве взаимодействий нуклеазы и 2'-OH РНК (см. Yin et al., Nat. Biotech. (2018), 35(12): 1179-1187). В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов направляющей РНК могут заменяться нуклеотидами ДНК. В некоторых вариантах осуществления вплоть до 2, 4, 6, 8, 10 или 12 нуклеотидов РНК 5’-конца концевой/затравочной области направляющей молекулы заменены нуклеотидами ДНК. В определенных вариантах осуществления большинство нуклеотидов РНК направляющей молекулы на 3’-конце заменены нуклеотидами ДНК. В конкретных вариантах осуществления 16 нуклеотидов РНК направляющей молекулы на 3’-конце заменены нуклеотидами ДНК. В конкретных вариантах осуществления 8 нуклеотидов РНК направляющей молекулы 5’-конца концевой/затравочной области и 16 нуклеотидов РНК на 3’-конце заменены нуклеотидами ДНК. В конкретных вариантах осуществления нуклеотиды РНК направляющей молекулы, которых выходят за пределы нуклеазного белка, когда образуется комплекс CRISPR, заменены нуклеотидами ДНК. Такая замена множества нуклеотидов РНК на нуклеотиды ДНК приводит к уменьшению нецелевой активности, но сохранению аналогичной целевой активности по сравнению с немодифицированной направляющей молекулой; однако замена всех нуклеотидов РНК на 3’-конце может прекращать функционирование направляющей молекулы (см. Yin et al., Nat. Chem. Biol. (2018) 14, 311-316). Такие модификации могут основываться на знании структуры комплекса CRISPR, включая знание об ограниченном количестве взаимодействий нуклеазы и 2'-OH РНК (см. Yin et al., Nat. Chem. Biol. (2018) 14, 311-316).

[0350] В одном варианте осуществления изобретения направляющая молекула включает модифицированную crРНК для Cpf1, имеющую 5'-группу прикрепления и направляющий сегмент, дополнительно содержащий затравочную область и 3'-конец. В некоторых вариантах осуществления модифицированную направляющую молекулу могут применять с Cpf1 из любого из Cpf1 Acidaminococcus sp. BV3L6 (AsCpf1); Cpf1 Francisella tularensis subsp. Novicida U112 (FnCpf1); Cpf1 L. bacterium MC2017 (Lb3Cpf1); Cpf1 Butyrivibrio proteoclasticus (BpCpf1); Cpf1 Parcubacteria bacterium GWC2011_GWC2_44_17 (PbCpf1); Cpf1 Peregrinibacteria bacterium GW2011_GWA_33_10 (PeCpf1); Cpf1 Leptospira inadai (LiCpf1); Cpf1 Smithella sp. SC_K08D17 (SsCpf1); Cpf1 L. bacterium MA2020 (Lb2Cpf1); Cpf1 Porphyromonas creviorieanis (PcCpf1); Cpf1 Porphyromonas macacae (PmCpf1); Cpf1 Candidatus Methanoplasma termitum (CMtCpf1); Cpf1 Eubacterium eligens (EeCpf1); Cpf1 Moraxella bovoculi 237 (MbCpf1); Cpf1 Prevotella disiens (PdCpf1); или Cpf1 L. bacterium ND2006 (LbCpf1).

[0351] В некоторых вариантах осуществления модификация в направляющей молекуле представляет собой химическую модификацию, вставку, делецию или расщепление. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация включает, но не ограничивается этим, включение 2'-O-метильных (M) аналогов, 2'-дезокси аналогов, 2-тиоуридиновых аналогов, N6-метиладенозиновых аналогов, 2'-фтор аналогов, 2-аминопурина, 5-бромуридина, псевдоуридина (Ψ), N^1-метилпсевдоуридина ($me^1\Psi$), 5-метоксиуридина (5moU), инозина, 7-метилгуанозина, 2'-O-метил-3'-фосфотиоата (MS), S-затрудненного этила (cEt), фосфоротиоата (PS), 2'-O-метил-3'-тиоPACE (MSP) или 2'-O-метил-3'-фосфоноацетата (MP). В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула содержит одну или более тиофосфатных модификаций. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 нуклеотидов направляющей молекулы химически модифицированы. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды химически модифицированы. В определенных вариантах осуществления один или более нуклеотидов в затравочной области химически модифицированы. В определенных вариантах осуществления один или более нуклеотидов на 3'-конце химически модифицированы. В определенных вариантах осуществления ни один из нуклеотидов на 5'-группе прикрепления не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация в затравочной области является минорной модификацией, такой как включение 2'-фтор аналога. В конкретном варианте осуществления один нуклеотид затравочной области заменен 2'-фтор аналогом. В некоторых вариантах осуществления 5 или 10 нуклеотидов на 3'-конце химически модифицированы. Такие химические модификации на 3'-конце crРНК Cpf1 улучшают эффективность разрезания генов (см. Li, et al., Nature Biomedical

Engineering, 2017, 1:0066). В конкретном варианте осуществления 5 нуклеотидов на 3'-конце заменены 2'-фтор аналогами. В конкретном варианте осуществления 10 нуклеотидов на 3'-конце заменены 2'-фтор аналогами. В конкретном варианте осуществления 5 нуклеотидов на 3'-конце заменены 2'-О-метильными (M) аналогами. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированы 3 нуклеотида на каждом из 3'- и 5'-концов. В конкретном варианте осуществления модификации содержат 2'-О-метильные или тиофосфатные аналоги. В конкретном варианте осуществления 12 нуклеотидов в тетрапетле и 16 нуклеотидов в области структуры типа «петля-на-стебле» заменены 2'-О-метильным аналогом. Такие химические модификации улучшают редактирование и стабильность in vivo (см. Finn et al., Cell Reports (2018), 22: 2227-2235).

[0352] В некоторых вариантах осуществления петля 5'-группы прикрепления направляющей молекулы модифицирована. В некоторых вариантах осуществления петля 5'-группы прикрепления направляющей молекулы модифицирована, чтобы иметь делецию, вставку, расщепление или химические модификации. В определенных вариантах осуществления петля содержит 3, 4 или 5 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления петля содержит последовательность UCUU, UUUU, UAUU или UGUU. В некоторых вариантах осуществления направляющая молекула образует структуру типа «петля-на-стебле» с разделением нековалентно связанной последовательности, которая может быть ДНК или РНК.

Синтетически связанная направляющая молекула

[0353] В одном аспекте направляющая молекула содержит последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность, которые химически связаны или конъюгированы посредством нефосфодиэфирной связи. В одном аспекте направляющая молекула содержит последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность, которые химически связаны или конъюгированы посредством ненуклеотидной петли. В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженная с tracr последовательность соединены посредством нефосфодиэфирного ковалентного линкера. Примеры ковалентного линкера включают, но не ограничиваются ими, химический фрагмент, выбранный из группы, состоящей из карбаматов, простых эфиров, сложных эфиров, амидов, иминов, амидинов, аминотризинов, гидрозона, дисульфидов, тиоэфиров, сложных тиоэфиров, фосфоротиоатов, фосфородитиоатов, сульфонамидов, сульфонатов, фульфонов, сульфоксидов, мочевин, тиомочевин, гидразида, оксима, триазола, фотолабильных связей, группы, образующих связи C-C, таких как пары циклоприсоединения Дильса-Альдера или пары реакции обмена с замыканием кольца, и пары реакции Михаэля.

[0354] В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность сначала синтезируют с использованием стандартного протокола синтеза фосфорамидита (Herdewijn, P., ed., Methods in Molecular Biology Col 288, Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, Humana Press, New Jersey (2012)). В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность могут функционализировать так, чтобы содержать соответствующую функциональную группу для лигирования с использованием стандартного протокола, известного в данной области техники (Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press (2013)). Примеры функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, гидроксил, амин, карбоновую кислоту, галогенид карбоновой кислоты, активный сложный эфир карбоновой кислоты, альдегид, карбонил, хлоркарбонил, имидазолилкарбонил, гидразид, семикарбазид, тиосемикарбазид, тиол, малеимид, галогеналкил, сульфонил, аллил, пропагил, диен, алкин и азид. Сразу после функционализации последовательности tracr и сопряженной с tracr последовательности может образовываться ковалентная химическая связь или соединение между двумя олигонуклеотидами. Примеры химических связей включают в себя, но не ограничиваются теми, которые основаны на карбаматах, эфирах, сложных эфирах, амидах, иминах, амидинах, аминотризинах, гидразонах, дисульфидах, тиоэфирах, сложных тиоэфирах, тиофосфатах, дитиофосфатах, сульфонамидах, сульфонатах, фульфонах, сульфоксидах, мочевинах, тиомочевинах, гидразиде, оксиме, триазоле, фотолабильных связях, группах, образующих связи C-C, таких как пары циклоприсоединения Дильса-Альдера или пары реакции обмена с замыканием кольца, и пары реакции Михаэля.

[0355] В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность могут быть синтезированы химическим путем. В некоторых вариантах осуществления в химическом синтезе используются автоматизированные устройства для твердофазного синтеза олигонуклеотидов с использованием 2'-ацетоксиэтилортоэфира (2'-ACE) (Scaringe et al., J. Am. Chem. Soc. (1998) 120: 11820-11821; Scaringe, Methods Enzymol. (2000) 317: 3-18) или химического метода с 2'-тионокарбаматом (2'-TC) (Dellinger et al., J. Am. Chem. Soc. (2011) 133: 11540-11546; Hendel et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33:985-989).

[0356] В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность могут ковалентно соединять с использованием различных реакций биоконъюгации, петлей, мостиков и ненуклеотидных связей посредством модификаций сахара, межнуклеотидных фосфодиэфирных связей, пуриновых и пиримидиновых остатков. Sletten et al., Angew. Chem. Int. Ed. (2009) 48:6974-6998;

Manoharan, M. Curr. Opin. Chem. Biol. (2004) 8: 570-9; Behlke et al., Oligonucleotides (2008) 18: 305-19; Watts, et al., Drug. Discov. Today (2008) 13: 842-55; Shukla, et al., ChemMedChem (2010) 5: 328-49.

[0357] В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность могут ковалентно соединять с использованием методов клик-химии. В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность могут ковалентно соединять с использованием триазольного линкера. В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность могут ковалентно соединять с использованием реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения Хьюсгена, в которой участвует алкин и азид с получением высокостабильного триазольного линкера (He et al., ChemBioChem (2015) 17: 1809-1812; WO 2016/186745). В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженная с tracr последовательность ковалентно соединены путем лигирования 5'-гексин tracrРНК и 3'-азид crРНК. В некоторых вариантах осуществления либо одна, либо обе из 5'-гексин tracrРНК и 3'-азид crРНК могут защищать с помощью 2'-ацетоксиэтилортоэфирной (2'-ACE) группы, которая может впоследствии удаляться с применением протокола Dharmacon (Scaringe et al., J. Am. Chem. Soc. (1998) 120: 11820-11821; Scaringe, Methods Enzymol. (2000) 317: 3-18).

[0358] В некоторых вариантах осуществления последовательность tracr и сопряженную с tracr последовательность могут ковалентно соединять посредством линкера (например, ненуклеотидной петли), которая содержит фрагмент, такой как спейсеры, присоединения, биоконъюгаты, хромофоры, репортерные группы, меченые красителем РНК и неприродные нуклеотидные аналоги. Более конкретно, подходящие спейсеры для целей данного изобретения включают, но не ограничиваются ими, полиэфиры (например, полиэтиленгликоли, полиспирты, полипропиленгликоль или смеси этилен- и полипропиленгликолей), группу полиаминов (например, спермин, спермидин и их полимерные производные), сложные полиэфиры (например, поли(этилакрилат)), фосфодиэфиры, алкилены, и их комбинации. Подходящие присоединения включают в себя любой фрагмент, который возможно добавлять к линкеру для придания линкеру дополнительных свойств, таких как, но не ограничиваясь, флуоресцентная метка. Подходящие биоконъюгаты включают в себя, но не ограничиваются ими, пептиды, гликозиды, липиды, холестерин, фосфолипиды, диацилглицерины и диалкилглицерины, жирные кислоты, углеводороды, ферментные субстраты, стероиды, биотин, дигоксигенин, углеводы, полисахариды. Подходящие хромофоры, репортерные группы и меченые красителем РНК включают в себя, но не ограничиваются ими, флуоресцентные красители, такие как флуоресцеин и родамин, хемилюминесцентные, электрохемилюминесцентные и биолюминесцентные маркерные соединения. Дизайн примерных линкеров, конъюгирующих два РНК-фрагмента, также описан в публикации международной патентной заявки WO 2004/015075.

[0359] Линкер (например, ненуклеотидная петля) может быть любой длины. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину эквивалентную примерно 0-16 нуклеотидам. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину, эквивалентную приблизительно 0-8 нуклеотидам. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину, эквивалентную приблизительно 0-4 нуклеотидам. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину, эквивалентную приблизительно 2 нуклеотидам. Пример конструкции линкера также описан в публикации международной патентной заявки WO2011/008730.

[0360] Типичная онРНК Cas9 типа II включает (в направлении от 5' к 3'): направляющую последовательность, поли-U-тракт, первый комплементарный участок («повтор»), петлю (тетрапетлю), второй комплементарный участок («антиповтор», являющийся комплементарным повтору), стебель и дополнительные структуры «петля-на-стебле» и поли-А-хвост (часто поли-U в РНК) (терминатор). В предпочтительных вариантах осуществления некоторые варианты осуществления архитектуры направляющих молекул сохраняются, некоторые варианты осуществления архитектуры направляющих молекул могут быть изменены, например, путем добавления, удаления или замены признаков, тогда как некоторые другие варианты осуществления архитектуры направляющих молекул сохраняются. Предпочтительные положения сконструированных модификаций онРНК, включающих, но ограничивающихся ими, вставки, делеции и замены, включают в себя направляющие концы и области онРНК, которые подвергаются взаимодействию, когда образуется комплекс с белком и/или мишенью CRISPR, например, тетрапетлю и/или петлю 2.

[0361] В определенных вариантах осуществления направляющие молекулы по данному изобретению включают сайты специфичного связывания (например, аптамеры) для адаптерных белков, которые могут включать один или более функциональных доменов (например, посредством слитого белка). Когда такие направляющие молекулы образуют комплекс CRISPR (т. е. фермент CRISPR связывается с направляющей молекулой и мишенью), связываются адаптерные белки, и функциональный домен, ассоциированный с адаптерным белком, располагается в пространственной ориентации, которая является преимущественной для приведения в действие свойственной ему функции. Например, если функциональный домен представляет активатор транскрипции (например, VP64 или p65), то этот активатор транскрипции помещается в пространственную ориентацию, которая позволяет ему влиять на транскрипцию мишени. Аналогичным образом, репрессор транскрипции будет преимущественно располагаться в положении, влияющем на транскрипцию мишени, и нуклеаза (например, FokI) будет преимущественно располагаться в положении, расщепляющем или частично расщепляющем мишень.

[0362] Специалист поймет, что модификации направляющей молекулы, которые позволяют связывать адаптер + функциональный домен, но не обеспечивают надлежащее позиционирование адаптера + функционального домена (например, из-за стерических помех в трехмерной структуре комплекса CRISPR), являются модификациями, которые не предусмотрены. Одна или более модифицированных направляющих молекул могут быть модифицированы в тетрапетле, структуре типа «петля-на-стебле» 1, структуре типа «петля-на-стебле» 2 или структур типа «петля-на-стебле» 3, описанные в данном документе, предпочтительно либо в тетрапетле, либо в структуре типа «петля-на-стебле» 2, и наиболее предпочтительно как в тетрапетле, так и в структуре типа «петля-на-стебле» 2.

[0363] Дуплекс повтор: антиповтор будет очевиден из вторичной структуры онРНК. Как правило, первый комплементарный участок после (в направлении от 5' к 3') поли-U-тракта и перед тетрапетлей; и второй комплементарный участок после (в направлении от 5' к 3') тетрапетли и перед поли-A-трактом. Первый комплементарный участок (повтор) является комплементарным второму комплементарному участку (антиповтор). Таким образом, они образуют дуплекс дцРНК при сворачивании друг относительно друга, образуя пару оснований Уотсона-Крика. По существу, последовательность антиповтора является комплементарной последовательностью повтора и в условиях спаривания оснований A-U или C-G, но также в условиях того факта, что антиповтор находится в обратной ориентации из-за тетрапетли.

[0364] В одном варианте осуществления изобретения модификация архитектуры направляющей молекулы включает замену оснований в структуре типа «петля-на-стебле» 2. Например, в некоторых вариантах осуществления основания «actt» («acuu» в РНК) и «aagt» («aagu» в РНК) в структуре типа «петля-на-стебле» 2 заменены на «cgcc» и «gcgg». В некоторых вариантах осуществления основания «actt» и «aagf» в структуре типа «петля-на-стебле» 2 заменены комплементарными GC-богатыми областями из 4 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления комплементарные GC-богатые области из 4 нуклеотидов представляют собой «cgcc» и «gcgg» (обе в направлении от 5' к 3'). В некоторых вариантах осуществления комплементарные GC-богатые области из 4 нуклеотидов представляют собой «gcgg» и «cgcc» (обе в направлении от 5' к 3'). Другая комбинация C и G в комплементарных GC-богатых областях из 4 нуклеотидов очевидно будут включать в себя CCCC и GGGG.

[0365] В одном варианте осуществления структура типа «петля-на-стебле» 2, например, «ACTTgtttAAGT» (SEQ ID NO: 36), может быть заменена любой «XXXXgtttYYYY» (SEQ ID NO: 37), например, где XXXX и YYYY представляют любые комплементарные наборы нуклеотидов, которые вместе будут образовывать пары оснований друг с другом для создания стебля.

[0366] В одном варианте осуществления также рассматриваются стебель, содержащий по меньшей мере около 4 п.н., содержащих комплементарные последовательности X и Y, хотя стебли из более, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 или менее, например, 3, 2, пар оснований. Таким образом, могут подразумевать, например, X2-12 и Y2-12 (где X и Y представляют любой комплементарный набор нуклеотидов). В одном аспекте стебель, составленный из нуклеотидов X и Y, вместе с «gttt», будет образовывать полную шпильку в общей вторичной структуре; и это может быть преимуществом, а количество пар оснований может представлять собой любое количество, образующее полную шпильку. В одном варианте осуществления любая дополнительная последовательность основания X: Y-основания (например, длины) допускается, до тех пор, пока сохраняется вторичная структура всей онРНК. В одном варианте осуществления стебель может представлять собой форму спаривания оснований X:Y, которая не нарушает вторичную структуру всей онРНК, поскольку она имеет дуплекс DR:tracr и 3 структуры «петля-на-стебле». В одном варианте осуществления тетрапетля "gttt", которая соединяет ACTT и AAGT (или любой альтернативный стебель, состоящий из пар оснований X:Y), может представлять собой любую последовательность такой же длины (например, 4 пары оснований) или более длинную, которая не нарушает общую вторичную структуру онРНК. В одном варианте осуществления петля-на-стебле может быть чем-то, что дополнительно удлиняет петлю-на-стебле 2, например, может быть аптамером MS2. В одном варианте осуществления петля-на-стебле 3 «GGCACCGagtCGGTGC» (SEQ ID NO: 38) также может принимать форму «XXXXXXXagtYYYYYYY» (SEQ ID NO: 39), например, где X7 и Y7 представляют любые комплементарные наборы нуклеотидов, которые вместе будут образовывать пары оснований друг с другом для создания стебля. В одном варианте осуществления стебель содержит около 7 пар оснований, содержащих комплементарные последовательности X и Y, хотя также рассматриваются стебли из большего или меньшего количества пар оснований. В одном варианте осуществления стебель, состоящий из нуклеотидов X и Y, вместе с «agt» образует полную шпильку в общей вторичной структуре. В одном варианте осуществления допускается любая комплементарная последовательность пар оснований X:Y, при условии сохранения вторичной структуры всей онРНК. В одном варианте осуществления стебель может представлять собой форму спаривания оснований X:Y, которая не нарушает вторичную структуру всей онРНК в том смысле, что она имеет дуплекс DR:tracr и 3 структуры «петля-на-стебле». В одном варианте осуществления последовательность «agt» структуры «петля-на-стебле» 3 может быть расширена или заменена аптамером, например, аптамером MS2 или последовательностью, которая в остальном обычно сохраняет архитектуру структуры «петля-на-стебле» 3. В одном варианте осуществления для альтернативных структур «петля-на-стебле» 2 и/или 3 каждая пара X и Y может относиться к любой паре оснований. В одном варианте осуществления рассматривается спаривание оснований, отличное от спаривания по Уотсону-Крику, где такое спаривание в остальном, как правило, сохраняет архитектуру структуры «петля-на-стебле» в этом положении.

[0367] В одном варианте осуществления дуплекс DR:tracrРНК может быть заменен формой: gYYYYag(N)NNNNxxxxNNNN(AAN)uuRRRRu (SEQ ID NO: 40) (с использованием стандартной номенклатуры IUPAC для нуклеотидов), где (N) и (AAN) представляют собой часть выпуклости в дуплексе, а «xxxx» представляет собой линкерную последовательность. NNNN в прямом повторе может быть любым, если он образует пару оснований с соответствующей NNNN частью tracrРНК. В одном варианте осуществления дуплекс DR:tracrРНК может быть соединен линкером любой длины (xxxx...), любого состава оснований, если это не изменяет общую структуру.

[0368] В одном варианте осуществления структурное требование к онРНК состоит в том, чтобы иметь дуплекс и 3 структуры «петля-на-стебле». В большинстве вариантов осуществления фактические требования к последовательности многих конкретных оснований являются нестрогими, в том смысле, что архитектура дуплекса DR:tracrРНК должна быть сохранена, но последовательность, которая создает архитектуру, т.е. стебли, петли, выпуклости и т.д., может быть изменена.

Аптамеры

[0369] Одна направляющая молекула с первой парой аптамер/РНК-связывающий белок может соединяться или сливаться с активатором, причем вторая направляющая молекула со второй парой аптамер/РНК-связывающий белок может соединяться или сливаться с репрессором. Направляющие предназначены для разных мишеней (локусов), что позволяет активировать один ген и репрессировать другой. Например, на следующей схеме показан такой подход:

[0370] Направляющая молекула 1– аптамер MS2 ------- РНК-связывающий белок MS2 ------- активатор VP64; и

[0371] Направляющая молекула 2 – аптамер PP7 ------- РНК-связывающий белок PP7 --

----- репрессор SID4x.

[0372] Настоящее изобретение также относится к ортогональному нацеливанию на гены PP7/MS2. В этом примере нацеливание онРНК на различные локусы модифицированы с помощью различных петель РНК с целью рекрутировать MS2-VP64 или PP7-SID4X, которые активируют и репрессируют их целевые локусы, соответственно. PP7 представляет собой РНК-связывающий белок оболочки бактериофага Pseudomonas. Подобно MS2, он связывает специфичную последовательность и вторичную структуру РНК. Мотив PP7 РНК-распознавания отличается от такого мотива MS2. Поэтому PP7 и MS2 могут мультиплексировать для опосредования различных влияний на разные геномные локусы одновременно. Например, онРНК, нацеленная на локус A, может быть модифицирована петлями MS2, рекрутируя активаторы MS2-VP64, а другая онРНК, нацеленная на локус B, может быть модифицирована петлями PP7, рекрутируя репрессорные домены PP7-SID4X. Таким образом dCas9 в той же самой клетке может опосредовать ортогональные локус-специфичные модификации. Этот принцип может распространяться на включение других ортогональных РНК-связывающих белков, таких как Q-бета.

[0373] Альтернативный вариант для ортогональной репрессии включает включение в направляющую молекулу некодирующих РНК петель с трансактивной репрессивной функцией (либо в аналогичных положениях по отношению к петлям MS2/PP7, интегрированным в направляющую молекулу или в 3'-конец направляющей молекулы). К примеру, направляющие молекулы были сконструированы с петлями некодирующей РНК (но известно, что они репрессорные) (например, с использованием репрессора Alu (в РНК), который взаимодействует с РНК-полимеразой II в клетках млекопитающих). Последовательность РНК Alu была расположена: вместо последовательностей РНК MS2, используемых в данном документе, (например, в тетрапетле и/или петле-на-стебле 2); и/или на 3'-конце направляющей молекулы. Это дает возможные комбинации MS2, PP7 или Alu в положениях тетрапетли и/или петли-на-стебле 2, а также, необязательно, добавление Alu на 3' конец направляющей молекулы (с линкером или без него).

[0374] Использование двух разных аптамеров (разных РНК) позволяет использовать слитый белок активатор-адаптер и слитый белок репрессор-адаптер с разными направляющими молекулами для активации экспрессии одного гена при репрессии другого. Они, в мультиплексном подходе, наряду с их различными направляющими молекулами могут вводиться вместе, или по существу вместе. Большое количество таких модифицированных направляющих молекул могут применять все одновременно, например, 10 или 20 или 30 и так далее, тогда как доставляться должен только один (или по меньшей мере минимальное количество) Cas9, так как сравнительно небольшое количество Cas9 может применяться с большим количеством модифицированных направляющих молекул. Адаптерный белок может быть ассоциированным (предпочтительно соединенным или слитым) с одним или более активаторами или одним или более репрессорами. Например, адаптерный белок может быть ассоциированным с первым активатором и вторым активатором. Первый и второй активаторы могут быть одинаковыми, но они предпочтительно являются различными активаторами. Например, один может представлять собой VP64, тогда как другой может представлять собой p65, хотя они являются всего лишь примерами, предполагаются и другие транскрипционные активаторы. Можно использовать три или более или даже четыре или более активаторов (или репрессоров), но размер упаковки может ограничивать количество, превышающее 5 различных функциональных доменов. Когда два или более функциональных домена связаны с адаптерным белком, предпочтительно использовать линкеры вместо прямого слияния с адаптерным белком. Подходящие линкеры могут включать линкер GlySer.

[0375] Также предполагается, что комплекс фермент-направляющая молекула в целом может быть связан с двумя или более функциональными доменами. Например, может быть два или более функциональных доменов, ассоциированных с ферментом, или может быть два или более функциональных доменов, ассоциированных с направляющей молекулой (посредством одного или более адаптерных белков), или может быть один или более функциональных доменов, ассоциированных с ферментом, и один или более функциональных доменов, ассоциированных с направляющей молекулой (посредством одного или более адаптерных белков).

[0376] Слияние между адаптерным белком и активатором или репрессором может включать линкер. Например, можно использовать Gly-Ser линкеры GGGS. Они могут быть использованы в 3 ($(GGGGS)_3$(SEQ ID NO: 35)) или 6, 9 или даже 12 или более повторах, чтобы обеспечить подходящую длину, по мере необходимости. Линкеры могут применяться между РНК-связывающим белком и функциональным доменом (активатором или репрессором), или между ферментом CRISPR (Cas9) и функциональным доменом (активатором или репрессором). С помощью линкеров пользователь может обеспечить соответствующую степень «механической гибкости».

Неактивные направляющие молекулы

[0377] В одном аспекте в изобретении предлагаются направляющие последовательности, которые модифицированы таким образом, что позволяют формировать комплекс CRISPR с мишенью и успешно связываться с мишенью, но в то же время не позволяют успешно проявлять нуклеазную активность (т. е. без нуклеазной активности / без инсерционно-делеционной активности). С целью объяснения таких модифицированных направляющих последовательностей, они называются «неактивными направляющими молекулами» или «неактивными направляющими последовательностями». Эти неактивные направляющие молекулы или неактивные направляющие последовательности могут понимать как каталитически неактивные или конформационно неактивные в отношении нуклеазной активности. Нуклеазную активность могут измерять с использованием анализа Surveyor или глубокого секвенирования, как традиционно применяют в данной области техники, при этом предпочтителен анализ Surveyor. Аналогичным образом, неактивные направляющие последовательности могут недостаточно вовлекаться в продуктивное спаривание оснований применительно к способности стимулировать каталитическую активность или различать целевую и нецелевую активность связывания. Вкратце, в анализе surveyor используется очистка и амплификация целевого сайта CRISPR для гена и образование гетеродуплексов с праймерами, амплифицирующими этот целевой сайт CRISPR. После отжига продукты обрабатывают нуклеазой SURVEYOR и энхансером S SURVEYOR (Transgenomics), в соответствии с протоколами, рекомендованными производителем, анализируются на гелях и количественно оцениваются на основе относительной интенсивности полос.

[0378] Следовательно, в родственном варианте осуществления в изобретении предлагается неприродная или сконструированная композиция системы Cas9 CRISPR-Cas, содержащая функциональный Cas9, описанный в данном документе, и направляющую РНК (нРНК), причем нРНК содержит неактивную направляющую последовательность, при этом нРНК способна к гибридизации с целевой последовательностью таким образом, что система Cas9 CRISPR-Cas направляется в клетке на представляющий интерес геномный локус без выявляемой инсерционно-делеционной активности, возникающей в результате нуклеазной активности немутантного фермента Cas9 данной системы, при выявлении с помощью анализа SURVEYOR. Для цели сокращения, нРНК содержит неактивную направляющую последовательность, при этом нРНК способна к гибридизации с целевой последовательностью таким образом, что система Cas9 CRISPR-Cas направляется в клетке на представляющий интерес геномный локус без выявляемой инсерционно-делеционной активности, возникающей в результате нуклеазной активности немутантного фермента Cas9 данной системы, при выявлении анализом SURVEYOR, в данном документе она называется «неактивная нРНК». Должно быть понятно, что любые из нРНК, в соответствии с данным изобретением, как описано в другом месте настоящего документа, могут применяться как неактивные нРНК / нРНК, содержащие неактивную направляющую последовательность, как описано ниже в данном документе. Любые из способов, продуктов, композиций и применений, описанных в другом месте данного документа, в равной мере применимы с неактивными нРНК / нРНК, содержащими неактивную направляющую последовательность, как более подробно описано ниже. В качестве дополнительного руководства предложены следующие конкретные аспекты и варианты осуществления.

[0379] Способность неактивной направляющей последовательности направлять специфичное к последовательности связывание комплекса CRISPR с целевой последовательностью можно оценить с помощью любого подходящего анализа. Например, фрагменты системы CRISPR, достаточные для образования комплекса CRISPR, включая неактивную направляющую последовательность, подлежащую исследованию, можно вносить в клетку-хозяина, имеющую соответствующую целевую последовательность, например, путем трансфекции векторами, кодирующими фрагменты последовательности CRISPR, с последующей оценкой преимущественного расщепления в целевой последовательности, например, с помощью анализа Surveyor, описанного в данном документе. Аналогично, расщепление последовательности целевого полинуклеотида можно оценивать в анализируемой пробирке путем внесения целевой последовательности, фрагментов комплекса CRISPR, включая неактивную направляющую последовательность, подлежащую исследованию, и контрольную направляющую последовательность, отличающуюся от исследуемой неактивной направляющей последовательности, и сравнения связывания или скорости расщепления у целевой последовательности среди реакций исследуемой и контрольной направляющих последовательностей. Возможны и другие анализы, и это будет понятно специалистам в данной области техники. Неактивная направляющая последовательность может быть выбрана для нацеливания на любую целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность представляет собой последовательность в пределах генома клетки.

[0380] Как далее поясняется в данном документе, некоторые структурные параметры обеспечивают правильный каркас для достижения таких неактивных направляющих молекул. Неактивные направляющие последовательности короче соответствующих направляющих последовательностей, что приводит к активному образованию Cas9-специфичных инсерций-делеций. Неактивные направляющие молекулы являются 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% короче соответствующих направляющих молекул, направленных на тот же Cas9, приводя к активному образованию Cas9-специфичных инсерций-делеций.

[0381] Как поясняется ниже и известно в данной области техники, один вариант реализации специфичности нРНК-Cas9 заключается в последовательности прямого повтора, который должен быть соответствующим образом соединен с такими направляющими молекулами. В частности, это подразумевает, что последовательности прямого повтора конструируют в зависимости от происхождения Cas9. Таким образом, могут применять доступные структурные данные для валидированных неактивных направляющих последовательностей для конструирования специфичных эквивалентов Cas9. Структурное сходство между, например, ортологичными нуклеазными доменами RuvC двух или более эффекторных белков Cas9 могут использовать для переноса разработанных эквивалентов неактивных направляющих молекул. Таким образом, неактивную направляющую молекулу настоящего документа могут соответственно модифицировать по длине и последовательности, чтобы отображать такие специфичные эквиваленты Cas9, обеспечивая образование комплекса CRISPR и успешное связывание с мишенью, при этом одновременно не допуская эффективной нуклеазной активности.

[0382] Применение неактивные направляющих молекул в контексте данного документа, а также уровня техники обеспечивает удивительную и неожиданную платформу для сетевой биологии и/или системной биологии в условиях in vitro, ex vivo и in vivo, позволяя осуществлять мультиплексное нацеливание генов, и в частности двунаправленное мультиплексное нацеливание генов. Перед применением неактивных направляющих молекул, было сложно и, в некоторых случаях, невозможно оказывать воздействие на множество мишеней, например, для активации, репрессии и/или сайленсинга активности генов. С применением неактивных направляющих молекул можно оказывать воздействие на множество мишеней и, таким образом, множество видов активности, например, в одной и той же клетке, в одном и том же животном, или у одного и того же пациента. Такое мультиплексирование может происходить одновременно или ступенчато на протяжении желаемого временного интервала.

[0383] Например, неактивные направляющие молекулы позволяют использовать нРНК в качестве средства для нацеливания на гены, без последствий проявления нуклеазной активности, и в то же время являются направленными средствами для активации или репрессии. Направляющую РНК, включающую неактивную направляющую молекулу, могут модифицировать для дополнительного включения элементов таким образом, который обеспечивает активацию или репрессию активности генов, в частности белковые адаптеры (например, аптамеры), описанные в другом месте данного документа, обеспечивают функциональную замену эффекторов генов (например, активаторов или репрессоров активности генов). Одним из примеров является включение аптамеров, как описано в данном документе и в уровне техники. Путем конструирования нРНК, содержащей неактивную направляющую молекулу для включения взаимодействующих с белком аптамеров (Konermann et al., “Genome-scale transcription activation by an engineered

CRISPR-Cas9 complex,” doi:10.1038/nature14136, включенный в данный документ посредством ссылки), можно собрать синтетический комплекс активации транскрипции, состоящий из нескольких различных эффекторных доменов. Такой комплекс может моделироваться после природных процессов активации транскрипции. Например, аптамер, который селективно связывается с эффектором (например, активатором или репрессором; димеризованные белки оболочки бактериофага MS2 в виде слитых белков с активатором или репрессором), или белок, который сам связывает эффектор (например, активатор или репрессор), может присоединяться к неактивной тетрапетле нРНК и/или структуре «петля-на-стебле» 2. В случае MS2 слитый белок MS2-VP64 связывается с тетрапетлей и/или структурой «петля-на-стебле» 2 и, в свою очередь, опосредует повышающую регуляцию транскрипции, например, для Neurog2. Другие транскрипционные активаторы представляют собой, например, VP64, P65, HSF1 и MyoD1. В качестве простого примера этой концепции, замена петель-на-стебле MS2 с помощью PP7-взаимодействующих петель-на-стебле могут применять для рекрутирования репрессивных элементов.

[0384] Таким образом, один вариант осуществления представляет собой нРНК по изобретению, которая содержит неактивную направляющую молекулу, при этом нРНК дополнительно содержит модификации, которые обеспечивают активацию или репрессию гена, как описано в данном документе. Неактивная нРНК может включать в себя один или более аптамеров. Аптамер может быть специфичным к эффекторам генов, активаторам генов или репрессоров генов. Альтернативно, аптамер может быть специфичным для белка, который, в свою очередь, является специфичным по отношению к специфичным эффекторам генов, активаторам генов или репрессоров генов и рекрутирует / связывает их. Если существует множество сайтов для рекрутирования активатора или репрессора, то предпочтительно, чтобы эти сайты были специфичными или к активаторам, или к репрессорам. Если существует множество сайтов для рекрутирования активатора или репрессора, то эти сайты могут быть специфичными к одним и тем же активаторам, или одним и тем же репрессорам. Сайты также могут быть специфичными к различным активаторам или различным репрессорам. Эффекторы генов, активаторы генов или репрессоры генов могут присутствовать в форме слитых белков.

[0385] В варианте осуществления изобретения неактивная нРНК, описанная в данном документе, или комплекса Cas9 CRISPR-Cas, описанного в данном документе, включает неприродную или сконструированную композицию, содержащую два или более адаптерных белков, причем каждый белок ассоциирован с одним или более функциональными доменами, и при этом адаптерный белок связывается с отличающейся(-имися) последовательностью(-ями) РНК, вставленными в по меньшей мере одну петлю неактивной нРНК.

[0386] Следовательно, в аспекте предложены неприродная или сконструированная композиция, содержащая направляющую РНК (нРНК), содержащую неактивную направляющую последовательность, способную гибридизироваться с целевой последовательностью в клетке в представляющем интерес геномном локусе, причем неактивная направляющая последовательность является такой, как определена в данном документе, Cas9 необязательно содержит по меньшей мере одну или более последовательностей ядерной локализации, причем Cas9 необязательно содержит по меньшей мере одну мутацию, при этом по меньшей мере одна петля неактивной нРНК модифицирована вставкой отличающейся(-имися) последовательностью(-ями) РНК, которая(-ые) связывается(-ются) с одним или более адаптерными белками, и при этом адаптерный белок ассоциирован с один или более функциональными доменами; или, причем неактивная нРНК модифицирована так, чтобы иметь по меньшей мере одну некодирующую функциональную петлю, и где композиция включает два или более адаптерных белков, где каждый белок связан с одним или более функциональными доменами.

[0387] В определенных вариантах осуществления адаптерный белок представляет собой слитый белок, содержащий функциональный домен, при этом слитый белок необязательно содержит линкер между адаптерным белком и функциональным доменом, при этом линкер необязательно включает Gly-Ser линкер.

[0388] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна петля неактивной нРНК не модифицируется путем вставки отдельных последовательностей РНК, которые связываются с двумя или более адаптерными белками.

[0389] В определенных вариантах осуществления один или более функциональных доменов, связанных с адаптерным белком, представляют собой домен активации транскрипции.

[0390] В определенных вариантах осуществления один или более функциональных доменов, связанных с адаптерным белком, представляют собой домен активации транскрипции, содержащий VP64, p65, MyoD1, HSF1, RTA или SET7/9.

[0391] В определенных вариантах осуществления один или более функциональных доменов, связанных с адаптерным белком, представляют собой домен репрессии транскрипции.

[0392] В определенных вариантах осуществления домен репрессора транскрипции представляет собой домен KRAB.

[0393] В определенных вариантах осуществления домен репрессора транскрипции представляет собой домен NuE, домен NcoR, домен SID или домен SID4X.

[0394] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из одного или более функциональных доменов, связанных с адаптерным белком, обладает одной или более активностями, включая метилазную активность, деметилазную активность, активность активации транскрипции, активность репрессии транскрипции, активность фактора высвобождения транскрипции, активность модификации гистонов, активность интеграции ДНК активность расщепления РНК, активность расщепления ДНК или активность связывания нуклеиновых кислот.

[0395] В определенных вариантах осуществления активность расщепления ДНК обусловлена нуклеазой Fok1.

[0396] В определенных вариантах осуществления неактивная нРНК модифицируется таким образом, что после связывания неактивная нРНК с адаптерным белком и дальнейшего связывания с Cas9 и мишенью функциональный домен имеет пространственную ориентацию, позволяющую функциональному домену выполнять предписанную ему функцию.

[0397] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна петля неактивная нРНК представляет собой тетрапетлю и/или петлю2. В определенных вариантах осуществления тетрапетля и петля 2 неактивной нРНК модифицированы путем вставки отличающейся(-ихся) последовательности(-ей) РНК.

[0398] В определенных вариантах осуществления вставка отличающейся(-ихся) последовательности(-ей) РНК, которая(-ые) связывается(-ются) с одним или более адаптерными белками представляет собой последовательность аптамера. В определенных вариантах осуществления аптамерная последовательность представляет собой две или более аптамерных последовательностей, специфичных к тому же адаптерному белку. В определенных вариантах осуществления аптамерная последовательность представляет собой две или более аптамерных последовательностей, специфичных к отличающемуся адаптерному белку.

[0399] В определенных вариантах осуществления адаптерный белок включает MS2, PP7, Qβ, F2, GA, fr, JP501, M12, R17, BZ13, JP34, JP500, KU1, M11, MX1, TW18, VK, SP, FI, ID2, NL95, TW19, AP205, ϕCb5, ϕCb8r, ϕCb12r, ϕCb23r, 7s, PRR1.

[0400] В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку. В определенных вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку мыши. В определенных вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку человека.

[0401] В определенных вариантах осуществления первый адаптерный белок связан с доменом p65, а второй адаптерный белок связан с доменом HSF1.

[0402] В определенных вариантах осуществления композиция содержит комплекс Cas9 CRISPR-Cas, имеющий по меньшей мере три функциональных домена, по меньшей мере один из которых связан с Cas9 и по меньшей мере два из которых связаны с неактивной нРНК.

[0403] В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит вторую нРНК, при этом вторая нРНК представляет собой активную нРНК, способную к гибридизации со второй целевой последовательностью так, что вторая система Cas9 CRISPR-Cas направляется в клетке на представляющий интерес второй геномный локус с выявляемой инсерционно-делеционной активностью во втором геномном локусе, возникающей в результате нуклеазной активности фермента Cas9 данной системы.

[0404] В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит множество неактивных нРНК и/или множество активных нРНК.

[0405] Один вариант осуществления изобретения заключается в использовании преимущества модульности и настраиваемости остова нРНК для создания серии остовов нРНК с различными сайтами связывания (в частности, аптамерами) для рекрутирования различных типов эффекторов ортогональным образом. И еще раз, для целей примера и иллюстрации более широкой концепции, замена петель-на-стебле MS2 с помощью PP7-взаимодействующих петлей-на-стебле может использоваться для связывания / рекрутирования репрессорных элементов, позволяющих обеспечивать мультиплексный двусторонний транскрипционный контроль. Таким образом, в целом, нРНК, содержащая неактивную направляющую последовательность может применяться для обеспечения мультиплексного транскрипционного контроля, а предпочтительно двустороннего транскрипционного контроля. Этот транскрипционный контроль является наиболее предпочтительным для генов. Например, одна или более нРНК, содержащие неактивную(-ые) направляющую(-ие) последовательность(-и), могут применяться в нацеливании активации одного или более целевых генов. Одновременно одна или более нРНК, содержащие неактивную(-ые) направляющую(-ие) последовательность(-и), могут применяться в нацеливании репрессии одного или более целевых генов. Такая последовательность может реализовываться во множестве различных комбинаций, например, целевые гены сначала репрессируют, а затем через соответствующий период времени активируют другие мишени, или выбранные гены репрессируют одновременно с активацией выбранных генов, с последующей дополнительной активацией и/или репрессией. В результате преимущественным образом могут вместе регулироваться множество фрагментов одной или более биологических систем.

[0406] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает молекулу(-ы) нуклеиновой кислоты, кодирующую неактивную нРНК или комплекс Cas9 CRISPR-Cas, или композицию, описанную в данном документе.

[0407] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает векторную систему, содержащую: молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую неактивную направляющую РНК, как определено в данном документе. В определенных вариантах осуществления векторная система дополнительно содержит молекулу(-ы) нуклеиновой кислоты, кодирующую(-ие) Cas9. В определенных вариантах осуществления векторная система дополнительно содержит молекулу(-ы) нуклеиновой кислоты, кодирующую(-ие) (активную) нРНК. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или вектор дополнительно содержит регуляторный(-ые) элемент(-ы), способные функционировать в эукариотической клетке, функционально связанные с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей направляющую последовательность (нРНК), и/или молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей Cas9 и/или необязательную(-ые) последовательность(-и) ядерной локализации.

[0408] В еще одном варианте осуществления структурный анализ также может быть использован для изучения взаимодействий между неактивной направляющей молекулой и активной нуклеазой Cas9, которые обеспечивают связывание ДНК, но не разрезания ДНК. Таким образом определяют важные аминокислоты для нуклеазной активности Cas9. Модификация таких аминокислот позволяет улучшать ферменты Cas9, используемые для редактирования генов.

[0409] Еще один вариант осуществления сочетает применение неактивных направляющих молекул, как описано в данном документе, с другими применениями CRISPR, как описано в данном документе, а также известными в данной области техники. Например, нРНК, содержащая неактивную(-ые) направляющую(-ие) последовательность(-и) для нацеленной мультиплексной активации или репрессии генов или нацеленной мультиплексной двусторонней активации/репрессии генов, можно комбинировать с нРНК, содержащей направляющие молекулы, которые поддерживают нуклеазную активность, как объяснено в данном документе. Такие нРНК, включающие направляющие молекулы, которые поддерживают нуклеазную активность, могут дополнительно включать или не включать модификации, позволяющие подавлять активность гена, (например, аптамеры). Такие нРНК, включающие направляющие молекулы, которые поддерживают нуклеазную активность, могут дополнительно включать или не включать модификации, позволяющие активировать активность гена, (например, аптамеры). Таким образом, вводится дополнительное средство для мультиплексного контроля генов (например, может обеспечиваться мультиплексная нацеленная на гены активация без нуклеазной активности / без инсерционно-делеционной активности одновременно или в комбинации с нацеленной на гены репрессией с нуклеазной активностью).

[0410] Например, 1) с использованием одной или более нРНК (например, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, предпочтительно 1-10, более предпочтительно 1-5), включающих неактивную(-ые) направляющую(-ие) молекулу(-ы), нацеленные на один или более генов и дополнительно модифицированные соответствующими аптамерами для рекрутирования генных активаторов; 2) могут быть объединены с одной или более нРНК (например, 1–50, 1–40, 1–30, 1–20, предпочтительно 1–10, более предпочтительно 1–5), включающими неактивную(-ые) направляющую(-ие) молекулу(-ы), нацеленные на один или более генов и дополнительно модифицированные соответствующими аптамерами для рекрутирования репрессоров генов. 1) и/или 2) затем можно комбинировать с 3) одной или более нРНК (например, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, предпочтительно 1-10, более предпочтительно 1-5), нацеленными на один или более генов. Затем эту комбинацию можно поочередно проводить с 1) + 2) + 3) с 4) одной или более нРНК (например, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, предпочтительно 1-10, предпочтительнее 1-5), нацеленными на один или более генов и дополнительно модифицированными соответствующими аптамерами для рекрутирования активаторов генов. Затем эту комбинацию можно поочередно проводить с 1) + 2) + 3) + 4) с 5) одной или более нРНК (например, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, предпочтительно 1-10, предпочтительнее 1-5), нацеленными на один или более генов и дополнительно модифицированными соответствующими аптамерами для рекрутирования репрессоров генов. В результате в изобретение включены различные применения и комбинации. Например, комбинация 1) + 2); комбинация 1) + 3); комбинация 2) + 3); комбинация 1) + 2) + 3); комбинация 1) + 2) +3) +4); комбинация 1) + 3) + 4); комбинация 2) + 3) +4); комбинация 1) + 2) + 4); комбинация 1) + 2) +3) +4) + 5); комбинация 1) + 3) + 4) +5); комбинация 2) + 3) +4) +5); комбинация 1) + 2) + 4) +5); комбинация 1) + 2) +3) + 5); комбинация 1) + 3) +5); комбинация 2) + 3) +5); комбинация 1) + 2) +5).

[0411] В аспекте в изобретении предложен алгоритм конструирования, оценивания или выбора нацеливающей последовательности неактивной направляющей РНК (неактивной нацеливающей последовательности) для направления системы Cas9 CRISPR-Cas к целевому генному локусу. В частности, было определено, специфичность неактивной направляющей РНК зависима и может оптимизироваться варьированием i) содержания GC и ii) длины направляющей последовательности. В аспекте в изобретении предлагается алгоритм конструирования или оценивания нацеливающей последовательности неактивной РНК, которая минимизирует нецелевое связывание или взаимодействие неактивной направляющей РНК. В варианте осуществления изобретения алгоритм выбора нацеливающей последовательности неактивной направляющей РНК для направления системы CRISPR на генный локус в организме включает a) локализацию одного или более мотивов CRISPR в генном локусе, анализ последовательности из 20 нт ниже каждого мотива CRISPR путем i) определения содержания GC данной последовательности; и ii) определения наличия нецелевых совпадений 15 расположенных ниже нуклеотидов, ближайших к мотиву CRISPR в геноме организма, и c) выбора последовательности из 15 нуклеотидов для применения в неактивной направляющей РНК, если содержание GC в данной последовательности составляет 70% или менее и нет выявленных нецелевых совпадений. В варианте осуществления последовательность выбрана для нацеливающей последовательности, если содержание GC составляет 60% или менее. В определенных вариантах осуществления последовательность выбрана для нацеливающей последовательности, если содержание GC составляет 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, или 30% или менее. В варианте осуществления анализируют две или более последовательностей генного локуса и выбирают последовательность, содержащую наименьшее содержание GC или следующее наименьшее содержание GC, или следующее наименьшее содержание GC. В варианте осуществления последовательность выбрана для нацеливающей последовательности, если в геноме организма не выявлено нецелевых совпадений. В варианте осуществления нацеливающая последовательность выбрана, если в регуляторных последовательностях генома не выявлено нецелевых совпадений.

[0412] В одном варианте осуществления изобретение относится к способу выбора направляющей последовательности неактивной направляющей РНК для направления функционализированной системы CRISPR на генный локус в организме, который включает: a) локализацию одного или более мотивов CRISPR в генном локусе; b) анализ последовательности из 20 нт ниже каждого мотива CRISPR путем: i) определения содержания GC данной последовательности; и ii) определения наличия нецелевых совпадений первых 15 нт последовательности в геноме организма; c) выбора последовательности для применения в направляющей РНК, если содержание GC в последовательности составляет 70% или менее и нет выявленных нецелевых совпадений. В варианте осуществления последовательность выбрана, если содержание GC составляет 50% или менее. В варианте осуществления последовательность выбрана, если содержание GC составляет 40% или менее. В варианте осуществления последовательность выбрана, если содержание GC составляет 30% или менее. В варианте осуществления анализируют две или более последовательностей и выбирают последовательность, содержащую наименьшее содержание GC. В варианте осуществления определяют нецелевые совпадения в регуляторных последовательностях организма. В варианте осуществления генный локус представляет собой регуляторную область. Вариант осуществления обеспечивает неактивную направляющую РНК, содержащую нацеливающую последовательность, выбранную в соответствии с вышеупомянутыми способами.

[0413] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает неактивную направляющую РНК для нацеливания функционализированной системы CRISPR на генный локус в организме. В варианте осуществления изобретения неактивная направляющая РНК содержит нацеливающую последовательность, причем содержание CG в целевой последовательности составляет 70% или менее, и первые 15 нт нацеливающей последовательности не соответствует нецелевой последовательности по ходу транскрипции от мотива CRISPR в регуляторной последовательности другого генного локуса в организме. В определенных вариантах осуществления содержание GC нацеливающей последовательности 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее или 30% или менее. В определенных вариантах осуществления содержание GC нацеливающей последовательности составляет от 70% до 60% или от 60% до 50%, или от 50% до 40%, или от 40% до 30%. В варианте осуществления нацеливающая последовательность имеет наименьшее содержание CG среди потенциальных нацеливающих последовательностей на локус.

[0414] В варианте осуществления изобретения первые 15 нуклеотидов неактивной направляющей молекулы соответствуют целевой последовательности. В еще одном варианте осуществления первые 14 нт неактивной направляющей последовательности соответствуют целевой последовательности. В еще одном варианте осуществления первые 13 нт неактивной направляющей последовательности соответствуют целевой последовательности. В еще одном варианте осуществления первые 12 нт неактивной направляющей последовательности соответствуют целевой последовательности. В еще одном варианте осуществления первые 11 нуклеотидов неактивной направляющей молекулы соответствуют целевой последовательности. В еще одном варианте осуществления первые 10 нт неактивной направляющей молекулы соответствуют целевой последовательности. В варианте осуществления изобретения первые 15 нт неактивной направляющей молекулы не соответствуют нецелевой последовательности по ходу транскрипции от мотива CRISPR в регуляторной области другого генного локуса. В других вариантах осуществления первые 14 нт или первые 13 нт неактивной направляющей последовательности, или первые 12 нт направляющей последовательности, или первые 11 нт неактивной направляющей последовательности, или первые 10 нт неактивной направляющей последовательности, не соответствуют нецелевой последовательности по ходу транскрипции от мотива CRISPR в регуляторной области другого генного локуса. В других вариантах осуществления первые 15 нт или 14 нт, или 13 нт, или 12 нт, или 11 нт неактивной направляющей последовательности не соответствуют нецелевой последовательности по ходу транскрипции от мотива CRISPR в геноме.

[0415] В определенных вариантах осуществления неактивная направляющая РНК включает дополнительные нуклеотиды на 3'-конце, которые не соответствуют целевой последовательности. Таким образом, неактивная направляющая РНК, которая включает в себя первые 15 нт, или 14 нт, или 13 нт, или 12 нт, или 11 нт ниже мотива CRISPR, может продлеваться в длину на 3'-конце до 12 нт, 13 нт, 14 нт, 15 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт или более.

[0416] В изобретении предложен способ направления системы Cas9 CRISPR-Cas, включая, помимо прочего, систему неактивной Cas9 (dCas9) или функционализированной Cas9 (которая может содержать функционализированную Cas9 или функционализированую направляющую последовательность) в генный локус. В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ выбора нацеливающей последовательности направляющей РНК, и направления функционализированной системы CRISPR на генный локус в организме. В одном варианте осуществления изобретение относится к способу выбора нацеливающей последовательности направляющей РНК, и осуществления генной регуляции целевого генного локуса с помощью функционализированной системы Cas9 CRISPR-Cas. В определенных вариантах осуществления способ применяется для влияния на регуляцию целевого гена при минимизации нецелевых эффектов. В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ выбора двух или более нацеливающих последовательностей неактивной направляющей РНК и осуществления генной регуляции двух или более целевых генных локусов с помощью функционализированной системы Cas9 CRISPR-Cas. В определенных вариантах осуществления способ применяется для влияния на регуляцию двух или более целевых генных локусов при минимизации нецелевых эффектов.

[0417] В варианте осуществления в изобретении предложен способ выбора нацеливающей последовательности неактивной направляющей РНК для направления функционализированного Cas9 на генный локус в организме, который включает a) локализацию одного или более мотивов CRISPR в генном локусе, b) анализ последовательности ниже каждого мотива CRISPR путем i) выбора от 10 до 15 нт, прилегающих к мотиву CRISPR, ii) определения содержания GC данной последовательности; и c) выбора последовательности из от 10 до 15 нт в качестве нацеливающей последовательности для применения в направляющей РНК, если содержание GC в данной последовательности составляет 40% или более. В варианте осуществления последовательность выбрана, если содержание GC составляет 50% или более. В варианте осуществления последовательность выбрана, если содержание GC составляет 60% или более. В варианте осуществления последовательность выбрана, если содержание GC составляет 70% или более. В варианте осуществления анализируют две или более последовательностей и выбирают последовательность, имеющую наибольшее содержание GC. В варианте осуществления способ дополнительно включает в себя добавление нуклеотидов к 3'-концу выбранной последовательности, которые не соответствуют последовательности ниже мотива CRISPR. Вариант осуществления обеспечивает неактивную направляющую РНК, содержащую нацеливающую последовательность, выбранную в соответствии с вышеупомянутыми способами.

[0418] В варианте осуществления в изобретении предложена неактивная направляющая РНК для направления функционализированной системы CRISPR на генный локус в организме, причем нацеливающая последовательность неактивной направляющей РНК состоит из от 10 до 15 нуклеотидов, прилегающих к мотиву CRISPR генного локуса, при этом содержание CG в целевой последовательности составляет 50% или более. В определенных вариантах осуществления неактивная направляющая РНК дополнительно содержит нуклеотиды, добавленные к 3'-концу нацеливающей последовательности, которые не соответствуют последовательности по ходу транскрипции от мотива CRISPR генного локуса.

[0419] В варианте осуществления в изобретении предложен один эффектор, предназначенных для направления на один или более, или два или более генных локусов. В определенных вариантах осуществления эффектор ассоциирован с Cas9, и один или более, или два или более выбранных неактивных направляющих РНК применяются для направления Cas9-ассоциированного эффектора на один или более, или два или более выбранных целевых генных локусов. В определенных вариантах осуществления эффектор ассоциирован с одной или более, или двумя или более выбранными неактивными направляющими РНК, каждая выбранная неактивная направляющая РНК, при образовании комплекса с ферментом Cas9, вызывающим локализацию ее ассоциированного эффектора к мишени неактивной направляющей РНК. Один неограничивающий пример таких систем CRISPR модулирует активность одного или более, или двух или более генных локусов субъекта для регуляции тем же фактором транскрипции.

[0420] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает два или более эффекторов, направленных на один или более генных локусов. В определенных вариантах осуществления применяют две или более неактивных направляющих РНК, причем каждый из двух или более эффекторов ассоциирован с выбранной неактивной направляющей РНК, и с помощью каждого из двух или более эффекторов локализируется на выбранную мишень своей неактивной направляющей РНК. Один неограничивающий пример таких систем CRISPR модулирует активность одного или более, или двух или более генных локусов субъекта для регуляции различными факторами транскрипции. Таким образом, в одном неограничивающем варианте осуществления два или более факторов транскрипции локализируются на различных регуляторных последовательностях одного гена. В еще одном неограничивающем варианте осуществления два или более факторов транскрипции локализируются на различных регуляторных последовательностях разных генов. В определенных вариантах осуществления один фактор транскрипции представляет собой активатор. В определенных вариантах осуществления один фактор транскрипции представляет собой ингибитор. В определенных вариантах осуществления один фактор транскрипции представляет собой активатор, а другой фактор транскрипции представляет собой ингибитор. В определенных вариантах осуществления регулируются генные локусы, экспрессирующие различные фрагменты того же регуляторного пути. В определенных вариантах осуществления регулируются генные локусы, экспрессирующие фрагменты различных регуляторных путей.

[0421] В варианте осуществления в изобретении также предложен способ и алгоритм конструирования и выбора неактивных направляющих РНК, которые специфичны в отношении расщепления целевой ДНК или связыванию мишени и регуляции генов, опосредованной активной системы Cas9 CRISPR-Cas. В определенных вариантах осуществления системы Cas9 CRISPR-Cas обеспечивает ортогональный контроль генов с использованием активного Cas9, который расщепляет целевую ДНК в одном генном локусе, при этом одновременно связывается и стимулирует регуляцию другого генного локуса.

[0422] В варианте осуществления в изобретении предложен способ выбора нацеливающей последовательности неактивной направляющей РНК для направления функционализированного Cas9 на генный локус в организме без расщепления, который включает a) локализацию одного или более мотивов CRISPR в генном локусе, b) анализ последовательности ниже каждого мотива CRISPR путем i) выбора от 10 до 15 нт, прилегающих к мотиву CRISPR, ii) определения содержания GC данной последовательности; и c) выбора последовательности из от 10 до 15 нт в качестве нацеливающей последовательности для применения в направляющей РНК, если содержание GC в данной последовательности составляет 30%, 40% или более. В определенных вариантах осуществления изобретения содержание GC нацеливающей последовательности составляет 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, или 70% или более. В определенных вариантах осуществления содержание GC нацеливающей последовательности составляет от 30% до 40% или от 40% до 50% или от 50% до 60% или от 60% до 70%. В варианте осуществления изобретения анализируют две или более последовательностей и выбирают последовательность, имеющую наибольшее содержание GC.

[0423] В варианте осуществления изобретения часть нацеливающей последовательности, в которой оценивается содержание GC, составляет от 10 до 15 смежных нуклеотидов из 15 целевых нуклеотидов, ближайших к PAM. В варианте осуществления изобретения часть направляющей последовательности, в которой содержание GC считается равным от 10 до 11 нуклеотидов или от 11 до 12 нуклеотидов, или от 12 до 13 нуклеотидов, или 13, или 14, или 15 последовательных нуклеотидов из 15 нуклеотидов, ближайших к PAM.

[0424] В варианте осуществления в изобретении дополнительно предлагается алгоритм идентификации неактивных направляющих РНК, которые стимулируют расщепление системой CRISPR генного локуса, при этом избегая функциональной активации или ингибирования. Отмечается, что увеличенное содержание GC в неактивных направляющих РНК из 16-20 нуклеотидов совпадает с увеличением расщепления ДНК и снижением функциональной активации.

[0425] В некоторых вариантах осуществления эффективность функционализированного Cas9 можно повысить путем добавления нуклеотидов к 3'-концу направляющей РНК, которые не соответствуют целевой последовательности ниже мотива CRISPR. Например, для неактивной направляющей РНК длиной от 11 до 15 нуклеотидов более короткие направляющие могут с меньшей вероятностью способствовать расщеплению мишени, но также менее эффективны в обеспечении связывания системы CRISPR и функционального контроля. В определенных вариантах осуществления добавление нуклеотидов, которые не соответствуют целевой последовательности на 3’-конце неактивной направляющей РНК, увеличивают эффективность активации, при этом не увеличивая нежелательное расщепление мишени. В одном варианте осуществления в изобретении также предложены способ и алгоритм для идентификации улучшенных неактивных направляющих РНК, которые эффективно способствуют функционированию системы CRISPRP в связывании ДНК и регуляции генов, не стимулируя при этом расщепление ДНК. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в изобретении предложена неактивная направляющая РНК, которая содержит первых 15 нт или 14 нт, или 13 нт, или 12 нт, или 11 нт ниже мотива CRISPR и продолжается в длину на 3'-конце нуклеотидами, которые не соответствуют мишени по 12 нт, 13 нт, 14 нт, 15 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт или более.

[0426] В варианте осуществления в изобретении предложен способ осуществления селективного ортогонального контроля генов. Как будет понятно из описания в данном документе, выбор неактивных направляющих молекул в соответствии с данным изобретением, учитывающий длину направляющих молекул и содержание GC, обеспечивает эффективный и селективный транскрипционный контроль благодаря функциональной системе Cas9 CRISPR-Cas, например, для регуляции транскрипции генного локуса путем активации или ингибирования и минимизации нецелевых эффектов. Соответственно, изобретение также обеспечивает эффективную ортогональную регуляцию двух или более целевых локусов посредством обеспечения эффективной регуляции отдельных целевых локусов.

[0427] В определенных вариантах осуществления ортогональный контроль генов осуществляется путем активации или ингибирования двух или более целевых локусов. В определенных вариантах осуществления ортогональный контроль генов осуществляется активацией или ингибированием одного или более целевых локусов и расщеплением одного или более целевых локусов.

[0428] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает клетку, содержащую неприродную систему Cas9 CRISPR-Cas, содержащую одну или более неактивных направляющих РНК, описанных или полученных в соответствии с описанным в данном документе способом или алгоритмом, в которой изменена экспрессия одного или более генных продуктов. В варианте осуществления изобретения была изменена экспрессия двух или более генных продуктов в клетке. В изобретении также предложена линия клеток из таких клеток.

[0429] В одном варианте осуществления в изобретении предложен многоклеточный организм, содержащий одну или более клеток, содержащих неприродную систему Cas9 CRISPR-Cas, содержащую одну или более неактивных направляющих РНК, описанных или полученных согласно способу или алгоритму, описанным в данном документе. В одном варианте осуществления в изобретении предложен продукт из клетки, линии клеток или многоклеточного организма, содержащих одну или более клеток, содержащих неприродную систему Cas9 CRISPR-Cas, содержащую одну или более неактивных направляющих РНК, описанных или полученных согласно способу или алгоритму, описанным в данном документе.

[0430] В дополнительном варианте осуществления данного изобретения предложено применение нРНК, содержащей неактивную(-ые) направляющую(-ие) молекулу(-ы), как описано в данном документе, необязательно в комбинации с нРНК, содержащим направляющую(-ие) молекулу(-ы), как описано в данном документе, или в уровне техники, в сочетании с системами, например, клетками, трансгенными животными, трансгенными мышами, индуцибельными трансгенными животными, индуцибельными трансгенными мышами), которые сконструированы либо для сверхэкспрессии Cas9, либо, предпочтительно, для нокина Cas9. В результате единственная система (например, трансгенное животное, клетка) может служить в качестве основы для мультиплексной модификации генов в системах / сетевой биологии. Благодаря неактивным направляющим последовательностям, в настоящее время это становится возможным как in vitro, ex vivo, так и in vivo.

[0431] Например, сразу после обеспечения Cas9 одна или более неактивных нРНК могут предоставляться для прямой мультиплексной регуляции генов, и предпочтительно двусторонней мультиплексной регуляции генов. Может предоставляться одна или более неактивных нРНК пространственным и временным соответствующим способом, если необходимо или требуется (например, тканеспецифичная индукция экспрессии Cas9). Благодаря предоставленному трансгенному / индуцибельному Cas9 (например, экспрессированному) в представляющих интерес клетке, ткани, животном, как нРНК, содержащие неактивные направляющие молекулы, так и нРНК, содержащие направляющие молекулы, являются одинаково эффективными. Таким же образом, еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения является применение нРНК, содержащей неактивную(-ые) направляющую(-е) молекулу(-ы), как описано в данном документе, необязательно в комбинации с нРНК, содержащей направляющую(-е) молекулу(-ы), как описано в данном документе, или в соответствии с уровнем техники, в комбинации с системами (например, клетками, трансгенными животными, трансгенными мышами, индуцибельными трансгенными животными, индуцибельными трансгенными мышами), которые сконструированы для нокаута Cas9 CRISPR-Cas.

[0432] В результате комбинация неактивных направляющих молекул, как описано в данном документе, с применением CRISPR, описанным в данном документе, и применением CRISPR, известным в данной области техники, обеспечивает высокоэффективный и точный способ для мультиплексного скрининга систем (например, сетевой биологии). Такой скрининг позволяет, например, идентифицировать специфичные комбинации генных активностей для идентификации генов, ответственных за заболевания (например, комбинаций включения/выключения), в частности связанных с заболеваниями генов. Предпочтительным применением такого скрининга является рак. Аналогичным образом, скрининг для лечения таких заболеваний включен в данное изобретение. Клетки или животные могут подвергаться аномальным состояниям, возникающим в результате заболевания или болезненных влияний. Могут предоставляться потенциально пригодные композиции и проходить скрининг на влияние в требуемой мультиплексной среде. Например, раковые клетки пациента можно подвергнуть скринингу на предмет того, какие комбинации генов приведут к их гибели, а затем использовать эту информацию для создания соответствующей терапии.

[0433] В одном варианте осуществления в изобретении предложен набор, содержащий один или более фрагментов, описанных в данном документе. Набор может содержать неактивные направляющие молекулы, описанные в данном документе, с направляющими молекулами или без них, как описано в данном документе.

[0434] Структурная информация, представленная в данном документе, позволяет исследовать взаимодействие неактивной нРНК с ДНК-мишенью и Cas9, допуская конструирование или изменение структуры неактивной нРНК для оптимизации функциональности всей системы Cas9 CRISPR-Cas. Например, петли неактивной нРНК могут проходить, без сталкивания с белком Cas9 путем вставки адаптерных белков, которые могут связываться с РНК. Эти адаптерные белки могут дополнительно рекрутировать эффекторные белки или слияния, которые содержат один или более функциональных доменов.

[0435] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления функциональный домен представляет собой домен активации транскрипции, предпочтительно VP64. В некоторых вариантах осуществления функциональный домен представляет собой домен репрессии транскрипции, предпочтительно KRAB. В некоторых вариантах осуществления домен репрессии транскрипции представляет собой SID или конкатемеры SID (например, SID4X). В некоторых вариантах осуществления функциональный домен представляет собой эпигенетический модифицирующий домен, так что обеспечивается эпигенетический модифицирующий фермент. В некоторых вариантах осуществления функциональный домен представляет собой домен активации, которым может быть домен активации P65.

[0436] Вариант осуществления изобретения заключается в том, что указанные выше элементы входят в состав одной композиции или входят в состав отдельных композиций. Эти композиции могут преимущественно применяться для хозяина, который должен испытывать функциональное влияние на геномном уровне.

[0437] Как правило, неактивные нРНК модифицируют таким образом, чтобы обеспечить специфичные сайты связывания (например, аптамеры) для связывания адаптерных белков, содержащих один или более функциональных доменов (например, через слитый белок). Модифицированная неактивная нРНК модифицируется таким образом, что после того, как неактивная нРНК образует комплекс CRISPR (т. е. Cas9 связывается с неактивной нРНК и мишенью), связываются адаптерные белки, и функциональный домен на адаптерном белке располагается в пространственной ориентации, которая является оптимальной для эффективного осуществления свойственной ему функции. Например, если функциональный домен представляет активатор транскрипции (например, VP64 или p65), то этот активатор транскрипции помещается в пространственную ориентацию, которая позволяет ему влиять на транскрипцию мишени. Аналогичным образом, репрессор транскрипции будет преимущественно располагаться в положении, влияющем на транскрипцию мишени, и нуклеаза (например, Fokl) будет преимущественно располагаться в положении, расщепляющем или частично расщепляющем мишень.

[0438] Специалист поймет, что модификации неактивной нРНК, которые позволяют связывать адаптер + функциональный домен, но не обеспечивают надлежащее позиционирование адаптера + функционального домена (например, из-за стерических помех в трехмерной структуре комплекса CRISPR), являются модификациями, которые не предусмотрены. Одна или более модифицированных неактивных нРНК могут быть модифицированы в тетрапетле, петле-на-стебле 1, петле-на-стебле 2 или петле-на-стебле 3, описанные в данном документе, предпочтительно либо в тетрапетле, либо в петле-на-стебле 2, и наиболее предпочтительно как в тетрапетле, так и в петле-на-стебле 2.

[0439] Как поясняется в данном документе, функциональные домены могут быть, например, одним или более доменами с активностью из группы, состоящей из метилазной активности, деметилазной активности, активности активации транскрипции, активности репрессии транскрипции, активности высвобождаемого фактора транскрипции, активности модификации гистонов, активности расщепления РНК, активности расщепления ДНК, активности связывания нуклеиновых кислот и молекулярных переключателей (например, индуцируемых светом). В некоторых случаях преимуществом является предоставление дополнительно по меньшей мере одного ПЯЛ. В некоторых случаях преимуществом является положение ПЯЛ на N-конце. Если включается более одного функционального домена, то функциональные домены могут быть одинаковыми или различными.

[0440] Неактивная нРНК может разрабатываться для включения множества сайтов распознавания связывания (например, аптамеров), специфичных к одному и тому же или отличающемуся адаптерному белку. Неактивная нРНК может разрабатываться для связывания с промоторной областью -1000 - +1 нуклеиновых кислот против хода транскрипции от сайта инициации транскрипции (т. е. TSS), предпочтительно положения -200 нуклеиновых кислот. Это позиционирование улучшает функциональные домены, которые влияют на активацию генов (например, активаторы транскрипции) или ингибирование генов (например, репрессоры транскрипции). Модифицированная неактивная нРНК может представлять собой одну или более модифицированных неактивных нРНК, нацеленных на один или более целевых локусов (например, по меньшей мере 1 нРНК, по меньшей мере 2 нРНК, по меньшей мере 5 нРНК, по меньшей мере 10 нРНК, по меньшей мере 20 нРНК, по меньшей мере 30 нРНК, по меньшей мере 50 нРНК), включенных в композицию.

[0441] Адаптерный белок может представлять собой любое количество белков, которые связываются с аптамером или сайтом распознавания, введенным в модифицированную неактивную нРНК, и который обеспечивает правильное позиционирование одного или более функциональных доменов, как только неактивная нРНК была включена в комплекс CRISPR для воздействия на мишень с помощью свойственной ей функции. Как поясняется подробно в этой заявке, такие белки могут быть белками оболочки, предпочтительно белками оболочки бактериофагов. Функциональные домены, ассоциированные с такими адаптерными белками (например, в форме слитого белка) могут включать, например, один или более доменов с активностью из группы, состоящей из метилазной активности, деметилазной активности, активности активации транскрипции, активности репрессии транскрипции, активности высвобождаемого фактора транскрипции, активности модификации гистонов, активности расщепления РНК, активности расщепления ДНК, активности связывания нуклеиновых кислот и молекулярных переключателей (например, индуцируемых светом). Предпочтительные домены представляют собой Fok1, VP64, P65, HSF1, MyoD1. В том случае, когда функциональный домен представляет собой активатор транскрипции или репрессор транскрипции, преимущество заключается в предоставлении дополнительного по меньшей мере одного ПЯЛ, и предпочтительно на N-конце. Если включается более одного функционального домена, то функциональные домены могут быть одинаковыми или различными. В адаптерном белке могут применять известные линкеры для присоединения таких функциональных доменов.

[0442] Таким образом, модифицированная неактивная нРНК, (инактивированная) Cas9 (с функциональными доменами или без них) и связывающий белок с одним или более функциональными доменами могут быть включены в композицию и введены хозяину по отдельности или все вместе. Альтернативно, эти фрагменты могут предоставляться в единственной композиции для введения хозяину. Введение хозяину может осуществляться посредством вирусных векторов, известных специалисту в данной области, или описанных в данном документе для доставки хозяину (например, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, вектор AAV). Как объясняется в данном документе, использование различных маркеров селекции (например, для селекции лентивирусной нРНК) и концентрации нРНК (например, в зависимости от того, используется ли несколько нРНК) может быть выгодным для получения улучшенного эффекта.

[0443] Исходя из этой концепции, для того чтобы инициировать событие в геномном локусе, можно использовать несколько вариантов, включая расщепление ДНК, активацию гена или деактивацию гена. С использованием предложенных композиций, специалист в данной области может преимущественно и специфично нацеливаться на единственный или множество локусов в том же или различных функциональных доменах для инициации одного или более геномных локусных событий. Композиции могут применяться в самых разнообразных способах скрининга в библиотеках клеток и функционального моделирования in vivo (например, активация генов длинной промежуточной некодирующей РНК и идентификация их функции; моделирование мутации с приобретением функции; моделирование мутации с потерей функции; использование композиции по изобретению для создания линий клеток и трансгенных животных в целях оптимизации и скрининга).

[0444] Настоящее изобретение охватывает применение композиций по настоящему изобретению для установления и использования обусловленных или индуцибельных CRISPR-трансгенных клеток/животных, которые не считаются предшествующими уровню настоящего изобретения или заявки. Например, целевая клетка содержит Cas9 обусловлено или индуцибельно (например, в форме Cre-зависимой конструкции) и/или адаптерный белок обусловлено или индуцибельно и, при экспрессии вектора, введенного в данную целевую клетку, вектор обеспечивает экспрессию, что индуцирует или дает повышение состояния экспрессии Cas9 и/или экспрессии адаптера в целевой клетке. Путем применения идей и композиций настоящего изобретения с известным способом создания комплекса CRISPR, индуцируемые геномные события, на которые влияют функциональные домены, также являются вариантом осуществления настоящего изобретения. Одним примером этого является обеспечение CRISPR нокина / обусловленного трансгенного животного (например, мыши, имеющей, например, кассету Lox-стоп-полиA-Lox(LSL)) и последующая доставка одной или более композиций, предоставляющих одну или более модифицированных неактивных нРНК (например, -200 нуклеотидов до TSS представляющего интерес целевого гена для целей активации генов), описанных в данном документе (например, модифицированная неактивная нРНК с одним или более аптамерами, распознаваемыми белками оболочки, например, MS2), одного или более адаптерных белков, описанных в данном документе, (связывающий MS2 белок, связанный с одним или более VP64), и предназначенных для индуцирования обусловленного животного (например, Cre-рекомбиназа для придания экспрессии Cas9 индуцибельности). Альтернативно, адаптерный белок может предлагаться как обусловленный или индуцибельный элемент с обусловленным или индуцибельным Cas9 для предоставления эффективной модели для целей скрининга, которая преимущественно требует только минимальной разработки и введение специфичных неактивных нРНК для широкого круга применений.

[0445] В еще одном аспекте неактивные направляющие молекулы дополнительно модифицированы для улучшения специфичности. Могут синтезироваться защищенные неактивные направляющие молекулы, в которых вторичная структура внедрена в 3' конец неактивной направляющей молекулы для улучшения ее специфичности. Защищенная направляющая РНК (знРНК) содержит направляющую последовательность, способную гибридизироваться с целевой последовательностью в представляющем интерес геномном локусе в клетке, и протекторную цепь, причем протекторная цепь необязательно комплементарна направляющей последовательности, и при этом направляющая последовательность может, частично, быть способной к гибридизации с протекторной цепью. знРНК необязательно включает в себя удлиняющую последовательность. Термодинамика гибридизации знРНК-целевая ДНК определяется количеством оснований, комплементарных между направляющей РНК и целевой ДНК. Путем применения «термодинамической защиты» может улучшаться специфичность неактивной нРНК посредством добавления протекторной последовательности. Например, в одном способе добавляется комплементарная протекторная цепь изменяющейся длины к 3' концу направляющей последовательность в пределах неактивной нРНК. В результате протекторная цепь связывается с по меньшей мере частью неактивной нРНК и обеспечивает защищенную нРНК (знРНК). В свою очередь, неактивные эталонные нРНК в данном документе могут легко защищать с использованием описанных вариантов осуществления, приводя к получению знРНК. Протекторная цепь может быть либо отдельным транскриптом РНК, либо цепью или химерной версии, соединенной с 3' концом последовательности неактивной направляющей нРНК.

Тандемные направляющие молекулы и их применения в мультиплексном (тандемном) подходе к нацеливанию

[0446] Авторы изобретения показали, что ферменты CRISPR, как определено в данном документе, могут использовать более одной направляющей РНК без потери активности. Это дает возможность применять ферменты, системы или комплексы CRISPR, как определено в данном документе, для нацеливания множества мишеней ДНК, генов или генных локусов, с помощью единственного фермента, системы или комплекса, как определено в данном документе. Направляющие РНК могут упорядочиваться тандемно, необязательно разделенные такой нуклеотидной последовательностью, как прямой повтор, определенный в данном документе. Положение различных направляющих РНК представляет собой тандем, который не влияет на их активность. Следует отметить, что термины «система CRISPR-Cas», «комплекс CRISP-Cas», «комплекс CRISPR» и «система CRISPR» применяют взаимозаменяемо. Термины «фермент CRISPR», «фермент Cas» или «фермент CRISPR-Cas» могут применять взаимозаменяемо. В предпочтительных вариантах осуществления указанный фермент CRISPR, фермент CRISP-Cas или фермент Cas представляет собой Cas9, или любой из его модифицированных или мутировавших вариантов, описанных в другом месте данного документа.

[0447] В одном варианте осуществления изобретение относится к неприродному или сконструированному ферменту CRISPR, предпочтительно ферменту CRISPR класса 2, предпочтительно ферменту CRISPR типа V или VI, как описано в данном документе, например, без ограничения, Cas9, как описано в данном документе в другом месте, используемому для тандемного или мультиплексного нацеливания. Должно быть понятно, что в таком подходе могут применять любые из ферментов, комплексов или систем CRISPR (или CRISPR-Cas или Cas), в соответствии с данным изобретением, как описано в другом месте настоящего документа. Любые из способов, продуктов, композиций и применений, описанных в другом месте данного документа, в равной мере применимы с неактивными мультиплексным или тандемным нацеливанием, как более подробно описано ниже. В качестве дополнительного руководства предложены следующие конкретные аспекты и варианты осуществления.

[0448] В одном варианте осуществления в изобретении предложено применение фермента, комплекса или системы Cas9, как определено в данном документе для нацеливания множества генных локусов. В одном варианте осуществления это может устанавливаться использованием множества (тандемных или мультиплексных) последовательностей направляющей РНК (нРНК).

[0449] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способы применения одного или более элементов фермента, комплекса или системы Cas9, как определено в данном документе, для тандемного или мультиплексного нацеливания, где указанная система CRISP содержит несколько последовательностей направляющей РНК. Предпочтительно, указанные последовательности нРНК разделены нуклеотидной последовательностью, такой как прямой повтор, как определено в другом месте данного документа.

[0450] Фермент, система или комплекс Cas9, как определено в данном документе, обеспечивают эффективное средство для модификации множества целевых полинуклеотидов. Фермент, система или комплекс Cas9, определенные в данном документе, обладают широким разнообразием применимости, включающим модификацию (например, делецию, вставку, транслокацию, инактивацию, активацию) одного или более целевых полинуклеотидов во многих типах клеток. По существу фермент, система или комплекс Cas9, определенные в данном документе, обладают широким спектром применения, например, в генной терапии, скрининге лекарственных средств, диагностировании и прогнозировании заболеваний, включая нацеливание на множество генных локусов в пределах единственной системы CRISPR.

[0451] В одном варианте осуществления в изобретении предложен фермент, система или комплекс Cas9, определенные в данном документе, т. е. комплекса Cas9 CRISPR-Cas, содержащий белок Cas9, имеющий по меньшей мере один ассоциированный с ним домен дестабилизации, и множество направляющих РНК, которые нацеливаются на множество молекул нуклеиновых кислот, таких как молекулы ДНК, при этом каждая из указанных многочисленных направляющих РНК специфично нацеливается на соответствующую ей молекулу нуклеиновой кислоты, например, молекулу ДНК. Каждая мишень молекулы нуклеиновой кислоты, например, молекула ДНК, может кодировать генный продукт или охватывать генный локус. Следовательно использование множества направляющих РНК дает возможность нацеливания многочисленных генных локусов или многочисленных генов. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 может расщеплять молекулу ДНК, кодирующую генный продукт. В некоторых вариантах осуществления экспрессия генного продукта изменена. Белок Cas9 и направляющие РНК не встречаются в природе вместе. В данном изобретении подразумеваются направляющие РНК, включающие тандемно упорядоченные направляющие последовательности. В изобретении дополнительно подразумеваются кодирующие последовательности для белка Cas9, являющиеся кодон-оптимизированные для экспрессии в эукариотических клетках. В предпочтительном варианте осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего, клетку растения или клетку дрожжей, и в более предпочтительном варианте осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. Экспрессия генного продукта может быть снижена. Фермент Cas9 может образовывать часть системы или комплекса CRISPR, которая дополнительно содержит тандемно упорядоченные направляющие РНК (нРНК), включающие наборы из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 25, 25, 30 или более 30 направляющих последовательностей, каждая способная специфично гибридизироваться с целевой последовательностью в представляющем интерес геномном локусе в клетке. В некоторых вариантах осуществления функциональной системы или комплекса Cas9 CRISPR связывается с множеством целевых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления функциональные система или комплекс CRISPR могут редактировать множество целевых последовательностей, например, целевых последовательностей, могут включать геномный локус, и в некоторых вариантах осуществления может существовать изменение генной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления функциональные система или комплекс CRISPR могут включать в себя дополнительные функциональные домены. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предлагается способ изменения или модификации экспрессии множества генных продуктов. Способ может включать в себя введение в клетку, содержащую указанные целевые нуклеиновые кислоты, например, молекулы ДНК, или содержащие и экспрессирующие целевую нуклеиновую кислоту, например, молекулу ДНК; к примеру целевые нуклеиновые кислоты могут кодировать генные продукты или предоставлять экспрессию генных продуктов (например, регуляторных последовательностей).

[0452] В предпочтительных вариантах осуществления фермент CRISPR, применяемый для мультиплексного нацеливания, представляет собой Cas9, или система или комплекс CRISPR содержит Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR, применяемый для мультиплексного нацеливания, представляет собой AsCas9, или система или комплекс CRISPR, применяемые для мультиплексного нацеливания, содержат AsCas9. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR представляет собой LbCas9, или система или комплекс CRISPR содержат LbCas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 применяемый для мультиплексного нацеливания, расщепляет обе цепи ДНК для создания двухцепочечного разрыва (DSB). В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR, применяемый для мультиплексного нацеливания, представляет собой никазу. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9, применяемый для мультиплексного нацеливания, представляет собой двойную никазу. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9, применяемый для мультиплексного нацеливания, представляет собой фермент Cas9, такой как фермент DD-Cas9, как определено в другом месте данного документа.

[0453] В некоторых общих вариантах осуществления фермент Cas9, используемый для мультиплексного нацеливания, связан с одним или более функциональными доменами. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR, применяемый для мультиплексного нацеливания, представляет собой неактивную Cas9, как определено в другом месте данного документа.

[0454] В варианте осуществления в настоящем изобретении предложено средство для доставки фермента, системы или комплекса Cas9 для применения во множественном нацеливании, определенном в данном документе, или в полинуклеотидах, определенных в данном документе. Неограничивающие примеры таких средств доставки означает, например, частицу(-ы) доставляемого(-ых) фрагмента(-ов) комплекса, вектор(-ы), содержащие полинуклеотид(-ы), обсуждаемые в данном документе, (например, кодирующие фермент CRISPR, предоставляющие нуклеотиды, кодирующие комплекс CRISPR). В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой плазмиду или вирусный вектор, такой как AAV или лентивирус. Транзиентная трансфекция плазмидами, например, в клетки HEK, может быть выгодной, особенно с учетом ограничений размера AAV и того, что, хотя Cas9 подходит для AAV, можно достичь верхнего предела с дополнительными направляющими РНК.

[0455] Также предлагается модель, которая конститутивно экспрессирует фермент, комплекс или систему Cas9, используемые в данном документе, для применения в мультиплексном нацеливании. Организм может быть трансгенным и может быть трансфицирован с помощью настоящих векторов или может быть потомством таким образом трансфицированного организма. В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены композиции, содержащие фермент, систему и комплекс CRISPR, определенные в данном документе, или полинуклеотиды или векторы, описанные в данном документе. Также предложены являются системы или комплексы Cas9 CRISPR, содержащие множество направляющих РНК, предпочтительно в тандемно упорядоченном формате. Указанные различные направляющие РНК могут разделяться такими нуклеотидными последовательностями, как прямой повтор.

[0456] Также предложен способ лечения субъекта, например, нуждающегося в этом субъекта, включающий индуцирование редактирования гена путем трансформирования субъекта с помощью полинуклеотида, кодирующего систему или комплекс Cas9 CRISPR, или любой из полинуклеотидов или векторов, описанных в данном документе, и введение их субъекту. Может также предлагаться подходящая репарационная матрица, например, поставляемая вектором, содержащим указанную репарационную матрицу. Также предлагается способ лечения субъекта, например, нуждающегося в этом субъекта, включающий индуцирование транскрипционной активации или репрессии множества целевых генных локусов путем трансформирования субъекта с помощью полинуклеотидов или векторов, описанных в данном документе, причем указанный полинуклеотид или вектор кодирует или содержит фермент, комплекс или систему Cas9, содержащую множество направляющих РНК, предпочтительно тандемно упорядоченных. Когда лечение происходит ex vivo, например, в клеточной культуре, то следует учитывать, что термин «субъект» может заменяться фразой «клетка или клеточная культура».

[0457] Предложены также композиции, содержащие фермент, комплекс или систему Cas9, содержащие множество направляющих РНК, предпочтительно тандемно упорядоченных, или полинуклеотид или вектор, кодирующий или содержащий указанные фермент, комплекс или систему Cas9, включающую множество направляющих РНК, предпочтительно тандемно упорядоченных, для применения в способе лечения, как определено в другом месте данного документа. Может предлагаться набор из частей, включающих такие композиции. Применение указанной композиции в производстве лекарственного препарата для таких способов лечения также предлагаются. Настоящее изобретение также предусматривает применение системы Cas9 CRISPR для скрининга, например, скрининга мутаций с приобретением функции. Клетки, которые искусственно инициированы сверхэкспрессировать ген, способны со временем снижать экспрессия гена (восстанавливая равновесие), например, с помощью петель отрицательной обратной связи. К моменту начала скрининга нерегулируемый ген может снова восстанавливаться. Использование индуцибельного активатора Cas9 позволяет специалисту индуцировать транскрипцию непосредственно перед скринингом и поэтому минимизировать вероятность получения ложноотрицательных результатов. Соответственно, путем применения настоящего изобретения для скрининга, например, скрининга мутации с приобретением функции, вероятность получения ложноотрицательных результатов может быть минимизирована.

[0458] В одном варианте осуществления в изобретении предложена сконструированная неприродная система CRISPR, содержащая белок Cas9 и множество направляющих РНК, каждая из которых специфично нацелена на молекулу ДНК, кодирующую генный продукт в клетке, в результате чего каждая из множества направляющих РНК нацеливается на свою специфичную молекулу ДНК, кодирующую генный продукт, и белок Cas9 расщепляет целевую молекулу ДНК, кодирующую генный продукт, в результате чего экспрессия генного продукта изменяется; и, при этом белок CRISPR и направляющие РНК не встречаются вместе в природе. В изобретении подразумевается множество направляющих РНК, включающих множество направляющих последовательностей, предпочтительно разделенных нуклеотидной последовательностью, такой как прямой повтор, и необязательно слитой с последовательностью tracr. В варианте осуществления изобретения белок CRISPR представляет собой белок CRISPR-Cas типа V или VI, и в более предпочтительном варианте осуществления белок CRISPR представляет собой белок Cas9. В изобретении дополнительно подразумевается белок Cas9, кодон-оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В предпочтительном варианте осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего, и в более предпочтительном варианте осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. В дополнительном варианте осуществления изобретения экспрессия генного продукта снижена.

[0459] В еще одном варианте осуществления в изобретении предложена сконструированная неприродная векторная система, включающая один или более векторов, содержащих первый регуляторный элемент, функционально связанный с несколькими направляющими РНК системы Cas9 CRISPR, каждая из которых специфично нацелена на молекулу ДНК, кодирующую генный продукт, и второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующим белком CRISPR. Оба регуляторных элемента могут быть расположены на том же векторе или на различных векторах системы. Множество направляющих РНК нацеливаются на множество молекул ДНК, кодирующих в клетке множество генных продуктов, и белок CRISPR может расщеплять множество молекул ДНК, кодирующих генный продукт (он может расщеплять одну или обе цепи, или по существу не иметь нуклеазной активности), в результате чего изменяется экспрессия множества генных продуктов; и при этом белок CRISPR и множество направляющих РНК не встречаются в природе вместе. В предпочтительном варианте осуществления белок CRISPR представляет собой Cas9 белок, необязательно кодон-оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В предпочтительном варианте осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего, клетку растения или клетку дрожжей, и в более предпочтительном варианте осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. В дополнительном варианте осуществления изобретения экспрессия каждого из множества генных продуктов изменена, предпочтительно уменьшена.

[0460] В одном варианте осуществления в изобретении предложена векторная система, включающая один или более векторов. В некоторых вариантах осуществления система содержит: (a) первый регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью прямого повтора, и один или более инсерционных сайтов для вставки одной или более направляющих последовательностей по ходу или против хода транскрипции (в зависимости от применимости) от последовательности прямого повтора, причем при экспрессии одна или более направляющих последовательностей направляет последовательность-специфичное связывание комплекса CRISPR с одной или более целевыми последовательностями в эукариотической клетке, при этом комплекс CRISPR содержит фермент Cas9, образующий комплекс с одной или более направляющими последовательностями, которые гибридизируются с одной или более целевыми последовательностями; и (b) второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей указанный фермент Cas9, предпочтительно включающий по меньшей мере одну последовательность ядерной локализации и/или по меньшей мере одну СЯЭ; при этом фрагменты (a) и (b) расположены на одном и том же или различных векторах системы. Если применимо, может также предлагаться последовательность tracr. В некоторых вариантах осуществления фрагмент (a) дополнительно содержит две или более направляющих последовательностей, функционально связанных с первым регуляторным элементом, причем при экспрессии, каждая из двух или более направляющих последовательностей направляет последовательность-специфичное связывание комплекса Cas9 CRISPR с отличающейся целевой последовательностью в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR содержит одну или более последовательностей ядерной локализации и/или одну или более СЯЭ достаточной силы для управления накопления указанного комплекса Cas9 CRISPR в выявляемом количестве в ядре или вне ядра эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления первый регуляторный элемент представляет собой промотор полимеразы III. В некоторых вариантах осуществления второй регуляторный элемент представляет собой промотор полимеразы II. В некоторых вариантах осуществления каждая из направляющих последовательностей содержит в длину по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 25 нуклеотидов или между 16-30, или между 16-25, или между 16-20 нуклеотидами.

[0461] Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать полинуклеотиды, кодирующие фермент, систему или комплекс Cas9 для применения во множественном нацеливании, определенном в данном документе, в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные векторы экспрессии содержат один или более регуляторных элементов, которые могут быть выбраны на основании клеток-хозяев, которые будут использоваться для экспрессии, которые функционально связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии.

[0462] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин транзиентно или нетранзиентно трансфицирована одним или более векторами, содержащими полинуклеотиды, которые кодируют фермент, систему или комплекс Cas9, для применения во множественном нацеливании, как определено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетку трансфицируют, как это происходит у субъекта естественным образом. В некоторых вариантах осуществления клетка, которую трансфицируют, отобрана у субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка получена из клеток, взятых у субъекта, например, линии клеток. В данной области техники известно и приведено в других примерах широкое разнообразие линий клеток для культуры тканей. Линии клеток доступны из различных источников, известных специалистам в данной области техники (см., например, Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (г. Манассас, штат Вирджиния, США)). В некоторых вариантах осуществления клетка, трансфицированная одним или более векторами, содержащими полинуклеотиды, кодирующие фермент, систему или комплекс Cas9 для применения во множественном нацеливании, как определено в данном документе, используется для получения новой клеточной линии, содержащей одну или более происходящих из векторов последовательностей. В некоторых вариантах осуществления клетка, временно трансфицирована фрагментами системы или комплекса Cas9 CRISPR для применения во множественном нацеливании, как описано в данном документе (например, транзиентной трансфекцией одним или более векторами, или трансфекцией РНК), и модифицирована посредством активности системы или комплекса Cas9 CRISPR, используется для получения новой клеточной линии, включающей клетки, содержащие модификацию, но не содержащей любую другую экзогенную последовательность. В некоторых вариантах осуществления клетки, транзиентно или нетранзиентно трансфицированные одним или более векторами, содержащими полинуклеотиды, кодирующие фермент, систему или комплекс Cas9, для применения во множественном нацеливании, как определено в данном документе, или линии клеток, полученные из таких клеток, используют для оценки одного или более исследуемых соединений.

[0463] Термин «регуляторный элемент» определен в другом месте данного документа.

[0464] Преимущественные векторы включает лентивирусы и аденоассоциированные вирусы, и типы таких векторов также могут выбирать для нацеливания конкретных типов клеток.

[0465] В одном варианте осуществления в изобретении предложена эукариотическая клетка-хозяин, содержащая: (a) первый регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью прямого повтора, и один или более инсерционных сайтов для вставки одной или более последовательностей направляющих РНК по ходу или против хода транскрипции (в зависимости от применимости) от последовательности прямого повтора, причем при экспрессии направляющая(-ие) последовательность(-и) направляет(-ют) последовательность-специфичное связывание комплекса Cas9 CRISPR с соответствующей(-ими) целевой(-ыми) последовательностью(-ями) в эукариотической клетке, при этом комплекс Cas9 CRISPR содержит фермент Cas9, образующий комплекс с одной или более направляющими последовательностями, которые гибридизируются с соответствующей(-ими) целевой(-ыми) последовательностью(-ями); и/или (b) второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей указанный фермент Cas9, предпочтительно включающий по меньшей мере одну последовательность ядерной локализации и/или СЯЭ. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит фрагменты (a) и (b). Если применимо, может также предлагаться последовательность tracr. В некоторых вариантах осуществления фрагмент (a), фрагмент (b) или фрагменты (a) и (b) стабильно интегрированы в геном эукариотической клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления фрагмент (a) дополнительно содержит две или более направляющих последовательностей, функционально связанных с первым регуляторным элементом, и необязательно разделенных прямым повтором, причем при экспрессии каждая из двух или более направляющих последовательностей направляет последовательность-специфичное связывание комплекса Cas9 CRISPR к отличающейся целевой последовательности в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 содержит одну или более последовательностей ядерной локализации и/или последовательностей ядерного экспорта или СЯЭ достаточной силы для управления накоплением указанного фермента CRISPR в выявляемом количестве в ядре и/или вне ядра эукариотической клетки.

[0466] В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 представляет собой фермент системы CRISPR типа V или VI. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 представляет собой фермент Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 получен из Francisella tularensis 1, Francisella tularensis subsp. novicida, Prevotella albensis, Lachnospiraceae bacterium MC2017 1, Butyrivibrio proteoclasticus, Peregrinibacteria bacterium GW2011_GWA2_33_10, Parcubacteria bacterium GW2011_GWC2_44_17, Smithella sp. SCADC, Acidaminococcus sp. BV3L6, Lachnospiraceae bacterium MA2020, Candidatus Methanoplasma termitum, Eubacterium eligens, Moraxella bovoculi 237, Leptospira inadai, Lachnospiraceae bacterium ND2006, Porphyromonas crevioricanis 3, Prevotella disiens или Porphyromonas macacae Cas9, и может включать в себя дополнительные изменения или мутации Cas9, как определено в другом месте данного документа, и может представлять собой химерный Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 является кодон-оптимизированным для экспрессии в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR направляет расщепление одной или двух цепей в положении целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления первый регуляторный элемент представляет собой промотор полимеразы III. В некоторых вариантах осуществления второй регуляторный элемент представляет собой промотор полимеразы II. В некоторых вариантах осуществления одна или более направляющих последовательностей представляют собой (каждая состоит из) в длину по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 25 нуклеотидов или между 16-30, или между 16-25, или между 16-20 нуклеотидами. Когда используются множество направляющих РНК, они предпочтительно разделены последовательностью прямого повтора.

[0467] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ модификации нескольких целевых полинуклеотидов в клетке-хозяине, такой как эукариотическая клетка. В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение связывания комплекса Cas9CRISPR со множеством целевых полинуклеотидов, например, для воздействия на расщепление указанного множества целевых полинуклеотидов, тем самым модифицируя множество целевых полинуклеотидов, причем комплекс Cas9CRISPR содержит фермент Cas9, образующий комплекс со множеством направляющих последовательностей, каждая гибридизируется со специфичной целевой последовательностью в пределах указанного целевого полинуклеотида, при этом указанное множество направляющих последовательностей связаны с последовательностью прямого повтора. В соответствующих случаях также может быть предусмотрена последовательность tracr (например, для обеспечения одной направляющей РНК, онРНК). В некоторых вариантах осуществления указанное расщепление включает расщепление одной или двух цепей в расположении каждой из целевой последовательности указанным ферментом Cas9. В некоторых вариантах осуществления указанное расщепление приводит к уменьшению транскрипции множества целевых генов. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает репарацию одного или более из указанных расщепляемых целевых полинуклеотидов гомологичной рекомбинацией с экзогенным матричным полинуклеотидом, причем указанная репарация приводит к мутации, включающей инсерцию, делецию или замену одним или более нуклеотидами из одного или более указанных целевых полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления указанная мутация приводит к одной или более аминокислотным заменам в белке, экспрессированном из гена, содержащего одну или более целевых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает доставку одного или более векторов к указанной эукариотической клетке, причем один или более векторов управляют экспрессией одного или более из: фермента Cas9 и множества последовательностей направляющих РНК, связанных с последовательностью прямого повтора. Если применимо, может также предлагаться последовательность tracr. В некоторых вариантах осуществления указанные вектор доставляются к эукариотической клетке у субъекта. В некоторых вариантах осуществления указанная модификация происходит в указанной эукариотической клетке в культуре клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение указанной эукариотической клетки от субъекта перед указанной модификацией. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает возвращение указанному субъекту указанной эукариотической клетки и/или клеток, полученных от него.

[0468] В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ модификации экспрессии множества полинуклеотидов в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение связывания комплекса Cas9 CRISPR со множеством полинуклеотидов, так что указанное связывание приводит к увеличению или уменьшению экспрессии указанных полинуклеотидов, причем комплекс Cas9 CRISPR содержит фермент Cas9, образующий комплекс с множеством направляющих последовательностей, каждая специфично гибридизируется со своей целевой последовательностью в пределах указанного полинуклеотида, при этом указанные направляющие последовательности связаны с последовательностью прямого повтора. Если применимо, может также предлагаться последовательность tracr. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает доставку одного или более векторов к указанным эукариотическим клеткам, причем один или более векторов управляют экспрессией одного или более из: фермента Cas9 и множества направляющих последовательностей, связанных с последовательностями прямого повтора. Если применимо, может также предлагаться последовательность tracr.

[0469] В одном варианте осуществления в изобретении предложен рекомбинантный полинуклеотид, содержащий множество последовательностей направляющих РНК выше или ниже (в зависимости от применимости) последовательности прямого повтора, причем каждая из направляющих последовательностей при экспрессии направляет последовательность-специфичное связывание комплекса Cas9CRISPR к соответствующей ему целевой последовательности, присутствующей в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность представляет собой вирусную последовательность, присутствующую в эукариотической клетке. Если применимо, может также предлагаться последовательность tracr. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность представляет собой прото-онкоген или онкоген.

[0470] Вариант осуществления изобретения охватывает неприродную или сконструированную композицию, которая может включать направляющую РНК (нРНК), содержащую направляющую последовательность, способную гибридизироваться с целевой последовательностью в представляющем интерес геномном локусе в клетке, и фермент Cas9, как определено в данном документе, что может включать по меньшей мере одну или более последовательностей ядерной локализации.

[0471] Вариант осуществления изобретения охватывает способы модификации представляющих интерес геномных локусов для изменения генной экспрессии в клетке путем введения в клетку любой из композиций, описанных в данном документе.

[0472] Вариант осуществления изобретения заключается в том, что указанные выше элементы входят в состав одной композиции или входят в состав отдельных композиций. Эти композиции могут преимущественно применяться для хозяина, который должен испытывать функциональное влияние на геномном уровне.

Сконструированные клетки и организмы, экспрессирующие указанные сконструированные капсиды AAV

[0473] В данном документе описаны сконструированные клетки, которые могут включать один или более сконструированных капсидных полинуклеотидов, полипептидов, векторов и/или векторных систем AAV. В некоторых вариантах осуществления один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV могут быть экспрессированы в сконструированных клетках. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки могут быть способны продуцировать сконструированные капсидные белки AAV и/или сконструированные капсидные частицы AAV, которые описаны в другом месте данного документа. Также в данном документе описаны модифицированные или сконструированные организмы, которые могут включать одну или более сконструированных клеток, описанных в данном документе. Сконструированные клетки могут быть сконструированы так, чтобы экспрессировать молекулу карго (например, полинуклеотид-карго) зависимо или независимо от полинуклеотида сконструированного капсида AAV, как описано в другом месте данном документа.

[0474] Большое разнообразие животных, растений, водорослей, грибов, дрожжей и т. д., а также систем животных, растений, водорослей, грибов, дрожжевых клеток или тканей может быть сконструировано для экспрессии одной или более конструкций нуклеиновых кислот системы сконструированных капсидов AAV, описанной в данном документе, с использованием различные способы трансформации, упомянутые в других местах данного документа. Это может привести к получению организмов, которые могут продуцировать сконструированные капсидные частицы AAV, например, для производственных целей, дизайна и/или получения сконструированного капсида AAV, и/или модельных организмов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид(-ы), кодирующий один или более фрагментов системы сконструированных капсидов AAV, описанной в данном документе, могут быть стабильно или временно включены в одну или более клеток растения, животного, водоросли, гриба и/или дрожжей или системы тканей. В некоторых вариантах осуществления один или более системы сконструированных капсидных полинуклеотидов AAV геномно включены в одну или более клеток растения, животного, водоросли, гриба и/или дрожжей или системы тканей. Другие варианты осуществления модифицированных организмов и систем описаны в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов системы сконструированных капсидов AAV, описанной в данном документе, экспрессируются в одной или более клетках растений, животных, водорослей, грибов, дрожжей или систем тканей.

Сконструированные клетки

[0475] В данном документе описаны различные варианты осуществления сконструированных клеток, которые могут включать один или более полинуклеотидов, полипептидов, векторов и/или векторных систем системы сконструированных капсидов AAV, описанных в других местах данного документа. В некоторых вариантах осуществления клетки могут экспрессировать один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV и могут продуцировать одну или более сконструированных капсидных частиц AAV, которые более подробно описаны в данном документе. Такие клетки также упоминаются в данном документе как «клетки-продуценты». Следует понимать, что эти сконструированные клетки отличаются от «модифицированных клеток», описанных в других местах данного документа, тем, что модифицированные клетки не обязательно являются клетками-продуцентами (т. е. они не продуцируют сконструированные частицы для доставки GTA), если только они не включают один или более полинуклеотидов сконструированного капсида AAV, векторов сконструированных капсидных AAV или других векторов, описанные в данном документе, которые делают клетки способными продуцировать сконструированные капсидные частицы AAV. Модифицированные клетки могут быть клетками-реципиентами сконструированных капсидных частиц AAV и в некоторых вариантах осуществления могут быть модифицированы сконструированными капсидными частицами AAV и/или полинуклеотидом-карго, доставленным в реципиентную клетку. Модифицированные клетки обсуждаются более подробно в другом месте данного документа. Термин «модификация» может быть использован в связи с модификацией клетки, которая не зависит от того, является ли она клеткой-реципиентом. Например, выделенные клетки можно модифицировать перед получением сконструированной молекулы капсида AAV.

[0476] В одном варианте осуществления изобретение относится к эукариотическому организму, отличному от человека; например, многоклеточный эукариотический организм, включая эукариотическую клетку-хозяина, содержащую один или более фрагментов сконструированной системы доставки, описанной в данном документе, в соответствии с любым из описанных вариантов осуществления. В других вариантах осуществления в изобретении предложен эукариотический организм; предпочтительно многоклеточный эукариотический организм, содержащий эукариотическую клетку-хозяина, содержащую один или более фрагментов сконструированной системы доставки, описанной в данном документе, в соответствии с любым из описанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления организм является хозяином AAV.

[0477] В конкретных вариантах осуществления полученные растения, водоросли, грибы, дрожжи и т.д., клетки или их части представляют собой трансгенные растения, содержащие экзогенную последовательность ДНК, включенную в геном всех или части клеток.

[0478] Сконструированная клетка может быть прокариотической клеткой. Прокариотическая клетка может быть бактериальной клеткой. Прокариотическая клетка может быть клеткой археи. Бактериальная клетка может быть любой подходящей бактериальной клеткой. Подходящие бактериальные клетки могут быть из рода Escherichia, Bacillus, Lactobacillus, Rhodococcus, Rodhobacter, Synechococcus, Synechoystis, Pseudomonas, Psedoaltermonas, Stenotrophamonas и Streptomyces. Подходящие бактериальные клетки включают, но не ограничиваются ими, клетки Escherichia coli, клетки Caulobacter crescentus, клетки Rodhobacter sphaeroides, клетки Psedoaltermonas haloplanktis. Подходящие штаммы бактерий включают, но не ограничиваются ими, BL21(DE3), DL21(DE3)-pLysS, BL21 Star-pLysS, BL21-SI, BL21-AI, Tuner, Tuner pLysS, Origami, Origami B pLysS, Rosetta, Rosetta pLysS, Rosetta-gami-pLysS, BL21 CodonPlus, AD494, BL2trxB, HMS174, NovaBlue(DE3), BLR, C41(DE3), C43(DE3), Lemo21(DE3), Shuffle T7, ArcticExpress и ArticExpress (DE3).

[0479] Сконструированная клетка может быть эукариотической клеткой. Эукариотические клетки могут представлять собой клетки, полученные из конкретного организма, такого как растение или млекопитающее, включая, но не ограничиваясь этим, человека, или от отличного от человека эукариота или животного, как обсуждается в данном документе, например, мыши, крысы, кролика, собаки, сельскохозяйственного животного или отличного от человека млекопитающего или примата. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка может представлять собой линию клеток. Примеры линий клеток включают, но не ограничиваются ими, C8161, CCRF-CEM, MOLT, mIMCD-3, NHDF, HeLa-S3, Huh1, Huh4, Huh7, HUVEC, HASMC, HEKn, HEKa, MiaPaCell, Panc1, PC-3, TF1, CTLL-2, C1R, Rat6, CV1, RPTE, A10, T24, J82, A375, ARH-77, Calu1, SW480, SW620, SKOV3, SK-UT, CaCo2, P388D1, SEM-K2, WEHI-231, HB56, TIB55, Jurkat, J45.01, LRMB, Bcl-1, BC-3, IC21, DLD2, Raw264.7, NRK, NRK-52E, MRC5, MEF, Hep G2, HeLa B, HeLa T4, COS, COS-1, COS-6, COS-M6A, эпителиальные клетки почки обезьяны BS-C-1 фибробласты эмбриона мыши BALB/ 3T3, 3T3 Swiss, 3T3-L1, фибробласты плода человека 132-d5; фибробласты мыши 10.1, 293-T, 3T3, 721, 9L, A2780, A2780ADR, A2780cis, A172, A20, A253, A431, A-549, ALC, B16, B35, клетки BCP-1, BEAS-2B, bEnd.3, BHK-21, BR 293, BxPC3, C3H-10T1/2, C6/36, Cal-27, CHO, CHO-7, CHO-IR, CHO-K1, CHO-K2, CHO-T, CHO Dhfr -/-, COR-L23, COR-L23/CPR, COR-L23/5010, COR-L23/R23, COS-7, COV-434, CML T1, CMT, CT26, D17, DH82, DU145, DuCaP, EL4, EM2, EM3, EMT6/AR1, EMT6/AR10.0, FM3, H1299, H69, HB54, HB55, HCA2, HEK-293, HeLa, Hepa1c1c7, HL-60, HMEC, HT-29, Jurkat, клетки JY, клетки K562, Ku812, KCL22, KG1, KYO1, LNCap, Ma-Mel 1-48, MC-38, MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, MDCK II, MDCK II, MOR/0.2R, MONO-MAC 6, MTD-1A, MyEnd, NCI-H69/CPR, NCI-H69/LX10, NCI-H69/LX20, NCI-H69/LX4, NIH-3T3, NALM-1, NW-145, линии клеток OPCN / OPCT, Peer, PNT-1A / PNT 2, RenCa, RIN-5F, RMA/RMAS, клетки Saos-2, Sf-9, SkBr3, T2, T-47D, T84, линию клеток THP1, U373, U87, U937, VCaP, клетки Vero, WM39, WT-49, X63, YAC-1, YAR, и их трансгенные вариации. Линии клеток доступны из различных источников, известных специалистам в данной области техники (см., например, Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (г. Манассас, штат Вирджиния, США)).

[0480] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой мышечную клетку (например, сердечной мышцы, скелетной мышцы и/или гладкой мышцы), костную клетку, клетку крови, иммунную клетку (включая, помимо прочего, В-клетки, макрофаги, Т-клетки, CAR-T-клетки и т.п.), клетки почек, клетки мочевого пузыря, клетки легких, клетки сердца, клетки печени, клетки головного мозга, нейроны, клетки кожи, клетки желудка, вспомогательные клетки нервной ткани, клетки кишечника, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, стволовые или другие клетки-предшественники, клетки надпочечников, клетки хрящевой ткани и их комбинации.

[0481] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка может представлять собой клетку гриба. В контексте данного документа термин «клетка гриба» относится к любому типу эукариотической клетки из царства грибов. Типы в царстве грибов включают Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia и Neocallimastigomycota. Клетки грибов могут включать дрожжи, плесень и нитчатые грибы. В некоторых вариантах осуществления клетка гриба представляет собой дрожжевую клетку.

[0482] В контексте данного документа термин «дрожжевая клетка» относится к любой клетке гриба в пределах типов Ascomycota и Basidiomycota. Дрожжевые клетки могут включать почкующиеся дрожжевые клетки, делящиеся дрожжевые клетки и клетки плесени. Не ограничиваясь этими организмами, многие типы дрожжей, используемые в лабораторных и промышленных условиях, относятся к типу Ascomycota. В некоторых вариантах осуществления клетка дрожжей представляет собой клетку S. cerevisiae, Kluyveromyces marxianus или Issatchenkia orientalis. Другие дрожжевые клетки могут включать, но не ограничиваясь этим, Candida spp. (например, Candida albicans), Yarrowia spp. (например, Yarrowia lipolytica), Pichia spp. (например, Pichia pastoris), Kluyveromyces spp. (например, Kluyveromyces lactis и Kluyveromyces marxianus), Neurospora spp. (например, Neurospora crassa), Fusarium spp. (например, Fusarium oxysporum) и Issatchenkia spp. (например, Issatchenkia orientalis, также известный как Pichia kudriavzevii и Candida acidothermophilum). В некоторых вариантах осуществления клетка гриба представляет собой клетку нитчатого гриба. В контексте данного документе термин «клетка нитчатого гриба» относится к любому типу клетки гриба, которая растет в виде нитей, т.е. гифам или мицелиям. Примеры клеток нитчатых грибов могут включать, но не ограничиваясь этим, Aspergillus spp. (например, Aspergillus niger), Trichoderma spp. (например, Trichoderma reesei), Rhizopus spp. (например, Rhizopus oryzae) и Mortierella spp. (например, Mortierella isabellina).

[0483] В некоторых вариантах осуществления клетка гриба представляет собой промышленный штамм. В контексте данного документа термин «промышленный штамм» относится к любому штамму клетки гриба, используемому или выделенному в промышленном процессе, например, при производстве продукта в коммерческом или промышленном масштабе. Промышленный штамм может относиться к виду гриба, который, как правило, используется в промышленном процессе, или может относиться к изоляту вида гриба, который также может использоваться в непромышленных целях (например, в лабораторных исследованиях). Примеры промышленных процессов могут включать ферментацию (например, при производстве продуктов питания или напитков), дистилляцию, производство биотоплива, производство соединения и производство полипептида. Примеры промышленных штаммов могут включать, но не ограничиваясь этим, JAY270 и ATCC4124.

[0484] В некоторых вариантах осуществления клетка гриба представляет собой полиплоидную клетку. В контексте данного документа термин «полиплоидная» клетка может относиться к любой клетке, чей геном присутствует более чем в одной копии. Полиплоидная клетка может относиться к типу клеток, которые естественным образом обнаруживаются в полиплоидном состоянии, или к клетке, которая была индуцирована для существования в полиплоидном состоянии, (например, посредством специфичной регуляции, изменения, инактивации, активации или изменения мейоза, цитокинеза или репликации ДНК). Полиплоидная клетка может относиться к клетке, весь геном которой является полиплоидной, или может относиться к клетке, которая является полиплоидной в конкретном представляющем интерес геномном локусе.

[0485] В некоторых вариантах осуществления клетка гриба представляет собой диплоидную клетку. В контексте данного документа термин «диплоидная» клетка может относиться к любой клетке, чей геном присутствует в двух копиях. Диплоидная клетка может относиться к типу клеток, которые естественным образом обнаруживаются в диплоидном состоянии, или к клетке, которая была индуцирована для существования в диплоидном состоянии, (например, посредством специфичной регуляции, изменения, инактивации, активации или изменения мейоза, цитокинеза или репликации ДНК). Например, штамм S. cerevisiae S228C можно поддерживать в гаплоидном или диплоидном состоянии. Диплоидная клетка может относиться к клетке, весь геном которой является диплоидной, или может относиться к клетке, которая является диплоидной в конкретном представляющем интерес геномном локусе. В некоторых вариантах осуществления клетка гриба представляет собой гаплоидную клетку. В контексте данного документа термин «гаплоидная» клетка может относиться к любой клетке, чей геном присутствует в одной копии. Гаплоидная клетка может относиться к типу клеток, которые естественным образом обнаруживаются в гаплоидном состоянии, или к клетке, которая была индуцирована для существования в гаплоидном состоянии, (например, посредством специфичной регуляции, изменения, инактивации, активации или изменения мейоза, цитокинеза или репликации ДНК). Например, штамм S. cerevisiae S228C можно поддерживать в гаплоидном или диплоидном состоянии. Гаплоидная клетка может относиться к клетке, весь геном которой является гаплоидным, или может относиться к клетке, которая является гаплоидной в конкретном представляющем интерес геномном локусе.

[0486] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой клетку, полученную от субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект является здоровым или небольным субъектом. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъект с желаемой физиологической и/или биологической характеристикой, так что при получении сконструированной капсидной частицы AAV она может упаковывать один или более полинуклеотидов-карго, которые могут быть связаны с желаемой физиологической и/или биологической характеристикой, и/или способны модифицировать желаемую физиологическую и/или биологическую характеристику. Таким образом, полинуклеотиды-карго полученной сконструированной капсидной частицы AAV могут быть способны передавать желаемую характеристику реципиентной клетке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды-карго способны модифицировать полинуклеотид сконструированной клетки таким образом, чтобы сконструированная клетка имела желаемые физиологические и/или биологические характеристики.

[0487] В некоторых вариантах осуществления клетку, трансфицированную одним или более векторами, описанными в данном документе, используют для получения новой линии клеток, содержащей одну или более последовательностей, полученных из вектора.

[0488] Сконструированные клетки можно использовать для получения полинуклеотидов, векторов и/или частиц сконструированного вирусного (например, AAV) капсида. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, векторы и/или частицы сконструированного вирусного (например, AAV) капсида получают, собирают и/или доставляют нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки доставляют субъекту. Другие применения сконструированных клеток описаны в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки могут быть включены в составы и/или наборы, описанные в другом месте данного документа.

[0489] Сконструированные клетки можно хранить краткосрочно или долгосрочно для использования в дальнейшем. Подходящие способы хранения, как правило, известны в данной области техники. Кроме того, способы восстановления сохраненных клеток для использования (такие как оттаивание, восстановление и иная стимуляция метаболизма в сконструированной клетке после хранения) в более позднее время также широко известны в данной области техники.

Составы

[0490] Композиции, полинуклеотиды, полипептиды, частицы, клетки, векторные системы и их комбинации, описанные в данном документе, могут содержаться в составе, таком как фармацевтический состав. В некоторых вариантах осуществления составы могут быть использованы для создания полипептидов и других частиц, которые включают одну или более специфичных для мышц нацеливающих молекул, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления составы могут быть доставлены нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления фрагмент(-ы) системы сконструированных капсидов AAV, сконструированные клетки, сконструированные капсидные частицы AAV и/или их комбинации, описанные в данном документе, могут быть включены в состав, который может быть доставлен субъекту или в клетку. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой фармацевтический состав. Один или несколько полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, могут быть предоставлены нуждающемуся в этом субъекту, или клетке отдельно или в качестве активного ингредиента, например, в фармацевтическом составе. Таким образом, в данном документе также описаны фармацевтические составы, содержащие некоторое количество одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток или их комбинаций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав может содержать эффективное количество одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе. Описанные в данном документе фармацевтические составы можно вводить нуждающемуся в этом субъекту или в клетку.

[0491] В некоторых вариантах осуществления количество одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток, вирусных частиц, наночастиц, других частиц для доставки и их комбинаций, описанных в данном документе, содержащихся в фармацевтическом составе, может составлять от около 1 пг/кг до около 10 мг/кг, исходя из массы тела нуждающегося в этом субъекта или средней массы тела конкретной популяции пациентов, которым может быть введен фармацевтический состав. Количество одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, в фармацевтическом составе может варьироваться от около 1 пг до около 10 г, от около 10 нл до около 10 мл. В вариантах осуществления, где фармацевтический состав содержит одну или более клеток, количество может варьироваться от около 1 клетки до 1 x 10^2, 1 x 10^3, 1 x 10^4, 1 x 10^5, 1 x 10^6, 1 x 10^7, 1 x 10^8, 1 x 10^9, 1 x 10^{10} или более клеток. В вариантах осуществления, где фармацевтический состав содержит одну или более клеток, количество может варьироваться от около 1 клетки до 1 x 10^2, 1 x 10^3, 1 x 10^4, 1 x 10^5, 1 x 10^6, 1 x 10^7, 1 x 10^8, 1 x 10^9, 1 x 10^{10} или более клеток на нл, мкл, мл или л.

[0492] В вариантах осуществления, если в состав включены сконструированные частицы капсида AAV, состав может содержать от 1 до 1 x 10^1, 1 x 10^2, 1 x 10^3, 1 x 10^4, 1 x 10^5, 1 x 10^6, 1 x 10^7, 1 x 10^8, 1 x 10^9, 1 x 10^{10}, 1 x 10^{11}, 1 x 10^{12}, 1 x 10^{13}, 1 x 10^{14}, 1 x 10^{15}, 1 x 10^{16}, 1 x 10^{17}, 1 x 10^{18}, 1 x 10^{19}, или 1 x 10^{20} трансдуцирующих единиц (TE) / мл сконструированных капсидных частиц AAV. В некоторых вариантах осуществления состав может иметь объем от 0,1 до 100 мл и может содержать от1 до 1 x 10^1, 1 x 10^2, 1 x 10^3, 1 x 10^4, 1 x 10^5, 1 x 10^6, 1 x 10^7, 1 x 10^8, 1 x 10^9, 1 x 10^{10}, 1 x 10^{11}, 1 x 10^{12}, 1 x 10^{13}, 1 x 10^{14}, 1 x 10^{15}, 1 x 10^{16}, 1 x 10^{17}, 1 x 10^{18}, 1 x 10^{19}, или 1 x 10^{20} трансдуцирующих единиц (TE) / мл сконструированных капсидных частиц AAV.

Фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные ингредиенты и агенты

[0493] В вариантах осуществления фармацевтический состав, содержащий некоторое количество одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток, вирусных частиц, наночастиц, других частиц для доставки и их комбинаций, описанных в данном документе, может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, воду, растворы солей, спирты, гуммиарабик, растительные масла, бензиловые спирты, полиэтиленгликоли, желатин, углеводы, например, лактозу, амилозу или крахмал, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, парфюмерное масло, сложные эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу и поливинилпирролидон, которые не вступают во вредные реакции с активной композицией.

[0494] Фармацевтические составы можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными агентами, такими как смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, смачивающие агенты, эмульгаторы, соли для воздействия на осмотическое давление, буферы, красители, пищевые ароматизаторы и/или ароматические вещества и т.п. которые не вступают во вредные реакции с активной композицией.

[0495] В дополнение к количеству одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток, сконструированных капсидных частиц AAV, наночастиц, других частиц для доставки и их комбинаций, описанных в данном документе, фармацевтический состав может также включать эффективное количество вспомогательного активного агента, включая, но не ограничиваясь, полинуклеотиды, аминокислоты, пептиды, полипептиды, антитела, аптамеры, рибозимы, гормоны, иммуномодуляторы, жаропонижающие средства, анксиолитики, нейролептики, анальгетики, спазмолитики, противовоспалительные средства, антигистаминные средства, противоинфекционные средства, химиотерапевтические средства, и их комбинации.

[0496] Подходящие гормоны включают, но не ограничиваются ими, гормоны, полученные из аминокислот (например, мелатонин и тироксин), небольшие пептидные гормоны и белковые гормоны (например, тиреотропин-рилизинг-гормон, вазопрессин, инсулин, гормон роста, лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий гормон и тиреостимулирующий гормон), эйкозаноиды (например, арахидоновая кислота, липоксины и простагландины) и стероидные гормоны (например, эстрадиол, тестостерон, тетрагидротестостерон кортизол). Подходящие иммуномодуляторы включают, но не ограничиваются ими, преднизолон, азатиоприн, 6-MP, циклоспорин, такролимус, метотрексат, интерлейкины (например, IL-2, IL-7 и IL-12), цитокины (например, интерфероны (например, IFN-a, IFN-β, IFN-ε, IFN-K, IFN-ω и IFN-γ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и имиквимод), хемокины (например, CCL3, CCL26 и CXCL7), цитозинфосфат-гуанозин, олигодезоксинуклеотиды, глюканы, антитела и аптамеры).

[0497] Подходящие жаропонижающие средства включают, помимо прочего, нестероидные противовоспалительные средства (например, ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), аспирин и родственные салицилаты (например, салицилат холина, салицилат магния и салицилат натрия), парацетамол/ацетаминофен, метамизол, набуметон, феназон и хинин.

[0498] Подходящие анксиолитики включают, но не ограничиваются ими, бензодиазепины (например, алпразолам, бромазепам, хлордиазепоксид, клоназепам, клоразепат, диазепам, флуразепам, лоразепам, оксазепам, темазепам, триазолам и тофизопам), серотонинергические антидепрессанты (например, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, трициклические антидепрессанты и ингибиторы моноаминоксидазы), мебикар, фабомотизол, селанк, бромантан, эмоксипин, азапироны, барбитураты, гидроксизин, прегабалин, валидол и бета-блокаторы.

[0499] Подходящие нейролептики включают, но не ограничиваются ими, бенперидол, бромперидол, дроперидол, галоперидол, моперон, пипамперон, тимиперон, флуспирилен, пенфлуридол, пимозид, ацепромазин, хлорпромазин, циамемазин, диксиразин, флуфеназин, левомепромазин, мезоридазин, перазин, перициазин, перфеназин, пипотиазин, прохлорперазин, промазин, прометазин, протипендил, тиопроперазин, тиоридазин, трифлуоперазин, трифлупромазин, хлорпротиксен, клопентиксол, флупентиксол, тиотиксен, зуклопентиксол, клотиапин, локсапин, протипендил, карпипрамин, клокапрамин, молиндон, мосапрамин, сульпирид, вералиприд, амисульприд, амоксапин, арипипразол, азенапин, клозапин, блонсансерин, илоперидон, лурасидон, мельперон, немонаприд, оланзапин, палиперидон, пероспирон, кветиапин, ремоксиприд, рисперидон, сертиндол, тримипрамин, зипрасидон, зотепин, Alstonia, бифепрунокс, битопертин, брекспипразол, каннабидиол, карипразин, пимавансерин, помаглуметад метионил, вабиказерин, ксаномелин и зикронапин.

[0500] Подходящие анальгетики включают, но не ограничиваются ими, парацетамол/ацетаминофен, нестероидные противовоспалительные средства (например, ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), ингибиторы ЦОГ-2 (например, рофекоксиб, целекоксиб и эторикоксиб), опиоиды (например, морфин, кодеин, оксикодон, гидрокодон, дигидроморфин, петидин, бупренорфин), трамадол, норадреналин, флупиртин, нефопам, орфенадрин, прегабалин, габапентин, циклобензаприн, скополамин, метадон, кетобемидон, пиритрамид, аспирин и родственные салицилаты (например, холина салицилат, салицилат магния и салицилат натрия).

[0501] Подходящие спазмолитики включают, но не ограничиваются ими, мебеверин, папаверин, циклобензаприн, каризопродол, орфенадрин, тизанидин, метаксалон, метокарбамол, хлорзоксазон, баклофен, дантролен, баклофен, тизанидин и дантролен. Подходящие противовоспалительные средства включают, но не ограничиваются ими, преднизолон, нестероидные противовоспалительные средства (например, ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), ингибиторы ЦОГ-2 (например, рофекоксиб, целекоксиб и эторикоксиб) и иммуноселективные противовоспалительные производные (например, пептид-T поднижнечелюстной железы и его производные)

[0502] Подходящие антигистаминные препараты включают, но не ограничиваются ими, антагонисты H1-рецепторов (например, акривастин, азеластин, биластин, бромфенирамин, буклизин, бромдифенгидрамин, карбиноксамин, цетиризин, хлорпромазин, циклизин, хлорфенирамин, клемастин, ципрогептадин, дезлоратадин, дексбромфенирамин, дексхлорфенирамин, дименгидринат, диметинден, дифенгидрамин, доксиламин, эбастин, эмбрамин, фексофенадин, гидроксизин, левоцетиризин, лоратадин, меклизин, миртазапин, олопатадин, орфенадрин, фениндамин, фенирамин, фенилтолоксамин, прометазин, пириламин, кветиапин, рупатадин, трипеленнамин и трипролидин), антагонисты H2-рецепторов (например, циметидин, фамотидин, лафутидин, низатидин, ранитидин и роксатидин), тритоквалин, катехин, кромогликат, недокромил и p2-адренергические агонисты.

[0503] Подходящие противоинфекционные средства включают, но не ограничиваются ими, амебициды (например, нитазоксанид, паромомицин, метронидазол, тинидазол, хлорохин, милтефозин, амфотерицин b и йодохинол), аминогликозиды (например, паромомицин, тобрамицин, гентамицин, амикацин, канамицин и неомицин), антигельминтные средства (например, пирантел, мебендазол, ивермектин, празиквантел, альбендазол, тиабендазол, оксамнихин), противогрибковые средства (например, азольные противогрибковые средства (например, итраконазол, флуконазол, парконазол, кетоконазол, клотримазол, миконазол и вориконазол), эхинокандины (например, каспофунгин, анидулафунгин и микафунгин), гризеофульвин, тербинафин, флуцитозин и полиены (например, нистатин и амфотерицин b), противомалярийные средства (например, пириметамин/сульфадоксин, артеметер/люмефантрин, атовакон/прогуанил, хинин, гидроксихлорохин, мефлохин, хлорохин, доксициклин, пириметамин и галофантрин), противотуберкулезные средства (например, аминосалицилаты (например, аминосалициловая кислота), изониазид/рифампицин, изониазид/пиразинамид/рифампин, бедаквилин, изониазид, этамбутол, рифампин, рифабутин, рифапентин, капреомицин и циклосерин), противовирусные препараты (например, амантадин, римантадин, абакавир/ламивудин, эмтрицитабин/тенофовир, кобицистат/эльвитегравир/эмтрицитабин/тенофовир, эфавиренз/эмтрицитабин/тенофовир, абакавир/ламивудин/зидовудин, ламивудин/зидовудин, эмтрицитабин/тенофовир, эмтрицитабин/лопинавир/ритонавир/тенофовир, интерферон альфа-2v/рибавирин, пегинтерферон альфа-2b, маравирок, ралтегравир, долутегравир, энфувиртид, фоскарнет, фомивирсен, осельтамивир, занамивир, невирапин, эфавиренз, этравирин, рилпивирин, делавирдин, невирапин, энтекавир, ламивудин, адефовир, софосбувир, диданозин, тенофовир, абакавир, зидовудин, ставудин, эмтрицитабин, зальцитабин, телбивудин, симепревир, боцепревир, телапревир, лопинавир/ритонавир, боцепревир, дарунавир, ритонавир, типранавир, атазанавир, нелфинавир, ампренавир, индинавир, саквинавир, саквинавир, рибавирин, валацикловир, ацикловир, фамцикловир, ганцикловир и валганцикловир), карбапенемы (например, дорипенем, меропенем, эртапенем и циластатин/имипенем), цефалоспорины (например, цефадроксил, цефрадин, цефазолин, цефалексин, цефепим, цефазолин, лоракарбеф, цефотетан), цефуроксим, цефпрозил, лоракарбеф, цефокситин, цефаклор, цефтибутен, цефтриаксон, цефотаксим, цефподоксим, цефдинир, цефиксим, цефдиторен, цефтизоксим и цефтазидим), гликопептидные антибиотики (например, ванкомицин, далбаванцин, оританцин и телаванцин), глицилциклины (например, тигециклин), лепростатики (например, клофазимин и талидомид), линкомицин и их производные (например, клиндамицин и линкомицин), макролиды и их производные (например, телитромицин, фидаксомицин, эритромицин, азитромицин, кларитромицин, диритромицин и тролеандомицин), линезолид, сульфаметоксазол/триметоприм, рифаксимин, хлорамфеникол, фосфомицин, метронидазол, азтреонам, бацитрацин, пенициллин (амоксициллин, ампициллин, бакампициллин, карбенициллин, пиперациллин, тикарциллин, амоксициллин/клавуланат, ампициллин/сульбактам, пиперациллин/тазобактам, клавуланат/тикарциллин, пенициллин, прокаин-пенициллин, оксациллин, диклоксациллин и нафциллин), хинолоны (например, ломефлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, гатифлоксацин, моксифлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, гемифлоксацин, моксифлоксацин, циноксацин, налидиксовую кислоту, эноксацин, грепафлоксацин, гатифлоксацин, тровафлоксацин и спарфлоксацин), сульфаниламиды (например, сульфаметоксазол/триметоприм, сульфасалазин и сульфизоксазол), тетрациклины (например, доксициклин, демеклоциклин, миноциклин, доксициклин/салициловую кислоту, доксициклин/омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты и тетрациклин), а также противоинфекционные средства для мочевыделительной системы (например, нитрофурантоин, метенамин, фосфомицин, циноксацин, налидиксовую кислоту, триметоприм и метиленовый синий).

[0504] Подходящие химиотерапевтические препараты включают, но не ограничиваются ими, паклитаксел, брентуксимаб ведотин, доксорубицин, 5-ФУ (фторурацил), эверолимус, пеметрексед, мелфалан, памидронат, анастрозол, экземестан, неларабин, офатумумаб, бевацизумаб, белиностат, тозитумомаб, кармустин, блеомицин, босутиниб, бусульфан, алемтузумаб, иринотекан, вандетаниб, бикалутамид, ломустин, даунорубицин, клофарабин, кабозантиниб, дактиномицин, рамуцирумаб, цитарабин, цитоксан, циклофосфамид, децитабин, дексаметазон, доцетаксел, гидроксимочевину, дакарбазин, лейпролид, эпирубицин, оксалиплатин, аспарагиназу, эстрамустин, цетуксимаб, висмодегиб, аспарагиназу Erwinia chrysanthemi, амифостин, этопозид, флутамид, торемифен, фулвестрант, летрозол, дегареликс, пралатрексат, метотрексат, флоксуридин, обинутузумаб, гемцитабин, афатиниб, иматиниб мезилат, кармустин, эрибулин, трастузумаб, алтретамин, топотекан, понатиниб, идарубицин, ифосфамид, ибрутиниб, акситиниб, интерферон альфа-2а, гефитиниб, ромидепсин, иксабепилон, руксолитиниб, кабазитаксел, адо-трастузумаб эмтанзин, карфилзомиб, хлорамбуцил, сарграмостим, кладрибин, митотан, винкристин, прокарбазин, мегестрол, траметиниб, месна, хлорид стронция-89, мехлорэтамин, митомицин, бусульфан, гемтузумаб озогамицин, винорелбин, филграстим, пегфилграстим, сорафениб, нилутамид, пентостатин, тамоксифен, митоксантрон, пегаспаргазу, денилейкин дифтитокс, алитретиноин, карбоплатин, пертузумаб, цисплатин, помалидомид, преднизон, альдеслейкин, меркаптопурин, золедроновую кислоту, леналидомид, ритуксимаб, октреотид, дазатиниб, регорафениб, гистрелин, сунитиниб, силтуксимаб, омацетаксин, тиогуанин (тиогуанин), дабрафениб, эрлотиниб, бексаротин, темозоломид, тиотепа, талидомид, бациллу Кальметта-Герена (БЦЖ), темсиролимус, бендамустина гидрохлорид, трипторелин, триоксид мышьяка, лапатиниб, вальрубицин, панитумумаб, винбластин, бортезомиб, третиноин, азацитидин, пазопаниб, тенипозид, лейковорин, кризотиниб, капецитабин, энзалутамид, ипилимумаб, гозерелин, вориностат, иделалисиб, церитиниб, абиратерон, эпотилон, тафлупозид, азатиоприн, доксифлуридин, виндезин и полностью транс ретиноевую кислоту.

[0505] В вариантах осуществления, где в фармацевтическом составе содержится вспомогательный активный агент в дополнение к одному или более полипептидам, полинуклеотидам, комплексам CRISPR-Cas, векторам, клеткам, вирусным частицам, наночастицам, другим частицам доставки и их комбинациям, описанным в данном документе, количество, такое как эффективное количество, вспомогательного активного агента будет варьироваться в зависимости от вспомогательного активного агента. В некоторых вариантах количество вспомогательного активного агента составляет от 0,001 микрограмма до около 1 миллиграмма. В других вариантах осуществления количество вспомогательного активного агента составляет от около 0,01 МЕ до около 1000 МЕ. В дополнительных вариантах осуществления количество вспомогательного активного агента находится в диапазоне от 0,001 мл до около 1 мл. В еще других вариантах осуществления количество вспомогательного активного агента находится в диапазоне от около 1% масс./масс. до около 50% масс./масс. от всего фармацевтического состава. В дополнительных вариантах осуществления количество вспомогательного активного агента составляет от около 1 % об./об. до около 50 % об./об. от всего фармацевтического состава. В других вариантах осуществления количество вспомогательного активного агента составляет от около 1% мас./об. до около 50% мас./об. от всего фармацевтического состава.

Дозированные формы

[0506] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе фармацевтические составы могут быть в дозированной форме. Лекарственные формы могут быть адаптированы для введения любым подходящим путем. Подходящие пути включают, в частности, пероральный (включая буккальный или сублингвальный), ректальный, эпидуральный, внутричерепной, внутриглазной, ингаляционный, интраназальный, местный (включая буккальный, сублингвальный или трансдермальный), вагинальный, интрауретральный, парентеральный, внутричерепной, подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутрибрюшинный, подкожный, внутрикостный, внутрисердечный, интраартикулярный, интракавернозный, интратекальный, интравитреальный, интрацеребральный, гингивальный, субгингивальный, интрацеребровентрикулярный и интрадермальный пути. Такие составы могут быть приготовлены любым методом, известным в данной области техники.

[0507] Дозированные формы, адаптированные для перорального введения, могут представлять собой дискретные дозированные единицы, такие как капсулы, шарики или таблетки, порошки или гранулы, растворы или суспензии в водных или неводных жидкостях; съедобные пены или хлопья, или жидкие эмульсии масло-в-воде или жидкие эмульсии вода-в-масле. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы, адаптированные для перорального введения, также включают один или более агентов, которые ароматизируют, обеспечивают консервацию, окрашивают или способствуют диспергированию фармацевтического состава. Дозированные формы, приготовленные для перорального введения, также могут быть в форме жидкого раствора, который может доставляться в виде пены, спрея или жидкого раствора. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма может содержать от около 1 нг до 1000 г фармацевтического состава, содержащего терапевтически эффективное количество или его соответствующую фракцию целевого эффекторного слитого белка и/или его комплекса, или композиции, содержащей один или более из полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинации, которые описаны в данном документе. Пероральная дозированная форма может быть введена нуждающемуся в этом субъекту.

[0508] При необходимости дозированные формы, описанные в данном документе, могут быть инкапсулированы в микрокапсулы.

[0509] Дозированная форма также может быть приготовлена для продления или поддержания высвобождения любого ингредиента. В некоторых вариантах осуществления один или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, могут быть ингредиентом, высвобождение которого является отсроченным. В других вариантах осуществления изобретения высвобождение необязательно включенного вспомогательного ингредиента отсрочено. Подходящие способы замедления высвобождения ингредиента включают, но не ограничиваются ими, покрытие или встраивание ингредиентов в материал из полимеров, воска, гелей и т.п. Лекарственные формы с отсроченным высвобождением можно приготовить, как описано в стандартных руководствах, таких как "Pharmaceutical dosage form tablets," eds. Liberman et. al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington - The science and practice of pharmacy", 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, и "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6th Edition, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995). Эти руководства содержат информацию об эксципиентах, материалах, оборудовании и способах приготовления таблеток и капсул и лекарственных форм с отсроченным высвобождением таблеток и пеллет, капсул и гранул. Отсрочка высвобождения может составлять от около часа до около 3 месяцев или более.

[0510] Примеры подходящих материалов покрытия включают, но не ограничиваются ими, полимеры целлюлозы, такие как целлюлоза ацетат фталат, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлозы фталат и гидроксипропилметилцеллюлозы ацетатсукцинат; поливинилацетата фталат, полимеры и сополимеры акриловой кислоты и метакриловые смолы, коммерчески доступные под торговой маркой EUDRAGIT® (Roth Pharma, Вестерштадт, Германия), зеин, шеллак и полисахариды.

[0511] Материалы для покрытия могут быть сформированы с различным соотношением водорастворимого полимера, водонерастворимых полимеров и/или pH-зависимых полимеров, с водонерастворимым/водорастворимым неполимерным эксципиентом или без него, для получения желаемого профиля высвобождения. Материал для покрытия наносится либо на дозированную форму (матричную или простую), которая включает, но не ограничивается ими, таблетки (спрессованные с гранулами с покрытием или без них), капсулы (с гранулами с покрытием или без них), гранулы, композиции частиц, «ингредиент как представляет собой», но не ограничиваясь этим, суспензионную форму или вскрываемую дозированную форму.

[0512] Дозированные формы, адаптированные для местного введения, могут быть приготовлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел. В некоторых вариантах осуществления для лечения глаз или других внешних тканей, например, полости рта или кожи, фармацевтические составы наносят в виде мази или крема для местного применения. При включении в состав мази один или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, могут быть соединены с парафиновой или смешиваемой с водой мазевой основы. В некоторых вариантах осуществления активный ингредиент может быть включен в состав крема на основе крема типа «масло-в-воде» или на основе типа «вода-в-масле». Дозированные формы, приспособленные для местного применения в ротовой полости, включают леденцы, пастилки и жидкости для полоскания рта.

[0513] Дозированные формы, приспособленные для назального или ингаляционного введения, включают аэрозоли, растворы, капли для суспензии, гели или сухие порошки. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более из описанных в данном документе полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций содержится в дозированной форме, приспособленной для ингаляции, в форме с уменьшенным размером частиц, полученной или достижимой путем микронизации. В некоторых вариантах осуществления размер частиц соединения с уменьшенным размером (например, микронизированного) или его соли или сольвата определяется значением D50 от около 0,5 до около 10 микрон, измеренным соответствующим методом, известным в данной области техники. Дозированные формы, приспособленные для введения путем ингаляции, также включают частицы пыли или аэрозоли. Подходящие дозированные формы, в которых носителем или эксципиентом является жидкость для введения в виде назального спрея или капель, включают водные или масляные растворы/суспензии активного ингредиента (например, одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, и/или вспомогательного активного агента), которые могут быть получены с помощью различных типов дозированных аэрозолей под давлением, небулайзеров или инсуффляторов.

[0514] В некоторых вариантах осуществления дозированные формы могут представлять собой аэрозольные составы, подходящие для введения путем ингаляции. В некоторых из этих вариантов осуществления аэрозольный состав может содержать раствор или тонкую суспензию одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый водный или неводный растворитель. Аэрозольные составы могут быть представлены в виде однократных или многодозовых доз в стерильной форме в герметичном контейнере. В некоторых из этих вариантов осуществления герметичный контейнер представляет собой однодозовый или многодозовый назальный или аэрозольный диспенсер, оснащенный дозирующим клапаном (например, дозированный аэрозольный ингалятор), который предназначен для удаления после того, как содержимое контейнера будет израсходовано.

[0515] Когда аэрозольная дозированная форма содержится в аэрозольном дозаторе, дозатор содержит подходящий пропеллент под давлением, такой как сжатый воздух, диоксид углерода или органический пропеллент, включая, но не ограничиваясь этим, гидрофторуглерод. Дозированные формы в виде аэрозольных составов в других вариантах осуществления содержатся в насосом-распылителе. Аэрозольный состав под давлением может также содержать раствор или суспензию одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе. В дополнительных вариантах осуществления аэрозольный состав может также содержать сорастворители и/или модификаторы, введенные для улучшения, например, стабильности, и/или вкуса, и/или массовых характеристик мелких частиц (количество и/или профиль) состава. Введение аэрозольного состава может осуществляться один раз в день или несколько раз в день, например, 2, 3, 4 или 8 раз в день, при этом каждый раз вводится 1, 2 или 3 дозы.

[0516] Для некоторых дозированных форм, подходящих и/или приспособленных для ингаляционного введения, фармацевтический состав представляет собой состав для ингаляции в виде сухого порошка. В дополнение к одному или более полипептидам, полинуклеотидам, векторам, клеткам и их комбинациям, описанным в данном документе, вспомогательному активному ингредиенту и/или их фармацевтически приемлемой соли, такая дозированная форма может содержать порошкообразную основу, такую как лактоза, глюкоза, трегалоза, маннит и/или крахмал. В некоторых из этих вариантов осуществления один или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, находятся в форме с уменьшенным размером частиц. В дополнительных вариантах осуществления модификатор активности, такой как L-лейцин или другая аминокислота, октаацетат целлобиозы и/или соли металлов стеариновой кислоты, такие как стеарат магния или кальция.

[0517] В некоторых вариантах осуществления аэрозольные дозированные формы могут быть расположены таким образом, что каждая отмеренная доза аэрозоля содержит заданное количество активного ингредиента, такого как один или более из одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе.

[0518] Дозированные формы, приспособленные для вагинального введения, могут быть представлены в виде пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев. Дозированные формы, приспособленные для ректального введения, включают суппозитории или клизмы.

[0519] Дозированные формы, адаптированные для парентерального введения и/или адаптированные для любого типа инъекции (например, внутривенной, внутрибрюшинной, подкожной, внутримышечной, внутрикожной, внутрикостной, эпидуральной, внутрисердечной, внутрисуставной, интракавернозной, гингивальной, субгингивальной, интратекальной, интравитреальной, интрацеребральной и интрацеребровентрикулярной) могут включать водные и/или неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, растворенные вещества, которые делают композицию изотонической по отношению к крови субъекта, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители. Дозированные формы, адаптированные для парентерального введения, могут быть представлены в однодозовых или многодозовых контейнерах, включая, но не ограничиваясь этим, запаянные ампулы или флаконы. Дозы можно лиофилизировать и ресуспендировать в стерильном носителе для восстановления дозы перед введением. Растворы для инъекций и суспензии для немедленного применения могут быть приготовлены в некоторых вариантах осуществления из стерильных порошков, гранул и таблеток.

[0520] Дозированные формы, адаптированные для глазного введения, могут включать водные и/или неводные стерильные растворы, которые необязательно могут быть адаптированы для инъекций и которые могут необязательно содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, растворенные вещества, которые делают композицию изотонической по отношению к глазу или жидкости, содержащейся в нем, или вокруг глаза субъекта, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители.

[0521] Для некоторых вариантов осуществления дозированная форма содержит предварительно определенное количество одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, на разовую дозу. Поэтому в некоторых вариантах осуществления заранее определенное количество таких стандартных доз можно вводить один или более раз в день. Такие фармацевтические составы могут быть приготовлены любым из способов, хорошо известных в данной области техники.

Наборы

[0522] Также в данном документе описаны наборы, которые содержат одну или более из одной или более композиций, полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток или других фрагментов, описанных в данном документе, и их комбинации, и фармацевтических составов, описанных в данном документе. В вариантах осуществления один или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций, описанных в данном документе, могут быть представлены в виде комбинированного набора. В контексте данного документа термины «комбинированный набор» или «набор частей» относятся к соединениям или составам и дополнительным фрагментам, которые используются для упаковки, скрининга, тестирования, продажи, маркетинга, доставки и/или введения комбинации элементов или одного элемента, такого как активный ингредиент, содержащийся в нем. Такие дополнительные фрагменты включают, но не ограничиваются ими, упаковки, шприцы, блистерные упаковки, флаконы и т.п. Комбинированный набор может содержать один или более фрагментов (например, один или более из одного или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток и их комбинаций), или их состав может быть представлен в виде одного состава (например, жидкость, лиофилизированный порошок и др.) или в виде отдельных составов. Отдельные фрагменты или составы могут содержаться в одной упаковке или в отдельных упаковках в наборе. Набор может также включать инструкции на материальном носителе, которые могут содержать информацию и/или указания относительно содержания содержащихся в нем фрагментов и/или составов, информацию о безопасности относительно содержания содержащихся в нем фрагмента(-ов) и/или состава(-ов), информацию о количестве, дозировках, показаниях к применению, методах скрининга, рекомендации и/или информацию о дизайне фрагментов, рекомендуемая(-ые) схема(-ы) лечения фрагмента(-ов) и/или составов, содержащихся в нем. В контексте данного документа термин «материальный носитель» относится к физически осязаемому или доступному носителю, который не является простой абстрактной мыслью или незаписанным произнесенным словом. «Материальный носитель» включает, помимо прочего, текст на целлюлозном или пластиковом материале или данные, хранящиеся в подходящей машиночитаемой форме памяти. Данные могут храниться на единичном устройстве, таком как флэш-накопитель или компакт-диск, или на сервере, к которому пользователь может получить доступ, например, через веб-интерфейс.

[0523] В одном варианте осуществления в изобретении предложен набор, содержащий один или более фрагментов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит векторную систему и инструкцию для использования набора. В некоторых вариантах осуществления векторная система включает регуляторный элемент, функционально связанный с одним или более сконструированными полинуклеотидами, такими как полинуклеотиды, содержащие специфичную для мышц молекулу, как описано в другом месте данном документа, и, необязательно, молекулу карго, которая необязательно может быть функционально связана с регуляторным элементом. Один или более сконструированных полинуклеотидов, таких как полинуклеотиды, содержащие молекулу, специфичную для мышц, как описано в другом месте данного документа, и могут быть включены в тот же или другой вектор, что и молекула карго, в вариантах осуществления, содержащих молекулу карго в наборе.

[0524] В некоторых вариантах осуществления набор содержит векторную систему и инструкцию для использования набора. В некоторых вариантах осуществления векторная система содержит: (a) первый регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью прямого повтора, и один или более инсерционных сайтов для вставки одной или более направляющих последовательностей выше или ниже (в зависимости от применимости) последовательности прямого повтора, причем при экспрессии направляющая последовательность направляет специфичное для последовательности связывание комплекса Cas9 CRISPR с целевой последовательностью в эукариотической клетке, при этом комплекс Cas9 CRISPR содержит фермент Cas9, образующий комплекс с направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью; и/или (b) второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей указанный фермент Cas9, содержащий последовательность ядерной локализации. Если применимо, может также предлагаться последовательность tracr. В некоторых вариантах осуществления набор содержит фрагменты (a) и (b), расположенные на одном и том же или различных векторах системы. В некоторых вариантах осуществления фрагмент (a) дополнительно содержит две или больше направляющие последовательности, функционально связанные с первым регуляторным элементом, причем при экспрессии каждая из двух или более направляющих последовательностей направляет последовательность-специфичное связывание комплекса CRISPR с отличающейся целевой последовательностью в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 содержит одну или более последовательностей ядерной локализации достаточной силы для управления накоплением указанного фермента CRISPR фермент в выявляемом количестве в ядре эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR представляет собой фермент системы CRISPR типа V или VI. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR представляет собой фермент Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 получен из Francisella tularensis 1, Francisella tularensis subsp. novicida, Prevotella albensis, Lachnospiraceae bacterium MC2017 1, Butyrivibrio proteoclasticus, Peregrinibacteria bacterium GW2011_GWA2_33_10, Parcubacteria bacterium GW2011_GWC2_44_17, Smithella sp. SCADC, Acidaminococcus sp. BV3L6, Lachnospiraceae bacterium MA2020, Candidatus Methanoplasma termitum, Eubacterium eligens, Moraxella bovoculi 237, Leptospira inadai, Lachnospiraceae bacterium ND2006, Porphyromonas crevioricanis 3, Prevotella disiens или Porphyromonas macacae Cas9 (например, модифицирован для получения или ассоциирован по меньшей мере одной DD), и может включать в себя дополнительное изменение или мутацию Cas9, и может представлять собой химерный Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент DD-CRISPR является кодон-оптимизированным для экспрессии в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления фермент DD-CRISPR направляет расщепление одной или двух цепей в месте расположения целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления фермент DD-CRISPR не обладает или обладает незначительной активностью расщепления цепей ДНК (например, не более 5% нуклеазной активности по сравнению с ферментом дикого типа или ферментом, не имеющим мутации или изменения, снижающего нуклеазную активность). В некоторых вариантах осуществления первый регуляторный элемент представляет собой промотор полимеразы III. В некоторых вариантах осуществления второй регуляторный элемент представляет собой промотор полимеразы II. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность имеет длину по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 25 нуклеотидов или между 16-30, или между 16-25, или между 16-20 нуклеотидами.

Способы применения

Общее обсуждение

[0525] Композиции, содержащие один или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, полинуклеотиды системы сконструированных капсидов AAV, полипептиды, вектор(-ы), сконструированные клетки, сконструированные капсидные частицы AAV, могут быть использованы, как правило, для упаковки и/или доставки одного или более карго в реципиентную клетку. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется специфичным к клеткам образом на основе специфичности нацеливающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления это обеспечивается тропизмом сконструированного капсида AAV, на который может влиять, по крайней мере частично, включение одного или n-мерных мотивов, описанных в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие одну или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, сконструированных капсидных частиц AAV, могут быть введены субъекту или в клетку, ткань и/или орган и способствовать переносу и/или интеграции карго в реципиентную клетку. В других вариантах осуществления сконструированные клетки, способные продуцировать композиции, такие как полипептиды и другие частицы (например, сконструированные капсиды AAV и вирусные частицы), содержащие один или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, могут быть получены с помощью полинуклеотидов, векторов и векторных систем и т.д., описанных в данном документе. Сюда входят, без ограничения, молекулы системы сконструированных капсидов AAV (например, полинуклеотиды, векторы и векторные системы и т. д.). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, векторы и векторные системы и т. д., описанные в данном документе, которые способны генерировать композиции, такие как полипептиды и другие частицы (например, сконструированные капсиды AAV и вирусные частицы), содержащие один или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, могут быть доставлены в клетку или ткань in vivo, ex vivo или in vitro. В некоторых вариантах осуществления при доставке субъекту композиция может трансформировать клетку субъекта in vivo или ex vivo с получением сконструированной клетки, способной продуцировать описанную в данном документе композицию, содержащую один или более из описанных специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, описанных в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, сконструированные капсидные частицы AAV, которые могут быть высвобождены из сконструированной клетки, и доставлять молекулы(-ы) карго в реципиентую клетку in vivo или продуцировать персонализированные сконструированные композиции (например, капсидные частицы AAV) для повторного введения субъекту, от которого была получена реципиентная клетка.

[0526] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка может быть доставлена субъекту, где она может высвобождать продуцируемые композиции по настоящему изобретению (включая, помимо прочего, сконструированные капсидные частицы AAV), так что они могут затем доставлять карго (например, полинуклеотид-карго) в реципиентную клетку. Эти общие способы могут быть использованы различными способами для лечения и/или предотвращения заболевания или его симптома у субъекта, создания модельных клеток, создания модифицированных организмов, обеспечения селекции клеток и скрининговых теста, в биопродукции и в других различных применениях.

[0527] В некоторых вариантах осуществления композиции, такие как полипептиды и другие частицы (например, сконструированные капсиды AAV и вирусные частицы), содержащие одну или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов), могут быть доставлены субъекту или в клетку, ткань и/или орган. Таким образом, их можно использовать для доставки любого карго, который они могут содержать или с которым они связаны, в мышечную клетку.

[0528] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды сконструированного капсида AAV, векторы и их системы можно использовать для создания библиотек сконструированных вариантов капсида AAV, из которых можно получать варианты с желаемой клеточной специфичностью. Представленное в данном документе описание, подкрепленное различными примерами, может продемонстрировать, что человек, имеющий в виду желательную клеточную специфичность, может использовать настоящее изобретение, как описано в данном документе, для получения капсида с желаемой клеточной специфичностью.

[0529] Объект изобретения может быть использован как часть исследовательской программы, в которой осуществляется передача результатов или данных. Компьютерная система (или цифровое устройство) может использоваться для приема, передачи, отображения и/или хранения результатов, анализа данных и/или результатов, и/или создания отчета о результатах и/или данных, и/или анализа. Под компьютерной системой можно понимать логическое устройство, которое может считывать инструкции с носителя (например, программного обеспечения) и/или сетевого порта (например, из интернета), которое может быть дополнительно подключено к серверу с несъемным носителем. Компьютерная система может содержать один или более процессоров, дисковые накопители, устройства ввода, такие как клавиатура и/или мышь, и дисплей (например, монитор). Передача данных, такая как передача инструкций или отчетов, может осуществляться через средство коммуникации на локальный или удаленный сервер. Средство коммуникации может включать любые средства передачи и/или приема данных. Например, средством коммуникации может быть сетевое соединение, беспроводное соединение или интернет-соединение. Такое соединение может обеспечивать связь через всемирную паутину. Предполагается, что данные, относящиеся к настоящему изобретению, могут передаваться по таким сетям или соединениям (или любым другим подходящим средствам для передачи информации, включая, помимо прочего, отправку физического отчета, такого как распечатка) для приема и/или для рассмотрения получателем. Получателем может быть, помимо прочего, физическое лицо или электронная система (например, один или более компьютеров и/или один или более серверов). В некоторых вариантах осуществления компьютерная система включает один или более процессоров. Процессоры могут быть связаны с одним или более контроллерами, вычислительными блоками и/или другими блоками компьютерной системы или встроены в микропрограмму по желанию. Если они реализованы в программном обеспечении, подпрограммы могут быть сохранены в любой машиночитаемой памяти, например, в ОЗУ, ПЗУ, флэш-памяти, магнитном диске, лазерном диске или другом подходящем носителе данных. Аналогично, это программное обеспечение может быть доставлено на вычислительное устройство любым известным способом доставки, включая, например, по каналу связи, такому как телефонная линия, Интернет, беспроводное соединение и т. д., или через переносной носитель, такой как машиночитаемый диск, флэш-накопитель и т. д. Различные этапы могут быть реализованы в виде различных блоков, операций, инструментов, модулей и методов, которые, в свою очередь, могут быть реализованы в аппаратных средствах, микропрограммах, программном обеспечении или любой комбинации аппаратных средств, микропрограмм и/или программном обеспечении. При аппаратной реализации некоторые или все блоки, операции, методы и т. д. могут быть реализованы, например, в заказной интегральной схеме (IC), интегральной схеме прикладной ориентации (ASIC), программируемой пользователем логической матрице (FPGA), программируемой логической матрице (PLA) и т.д. В вариантах осуществления изобретения можно использовать клиент-серверную архитектуру реляционной базы данных. Клиент-серверная архитектура представляет собой сетевую архитектуру, в которой каждый компьютер или процесс в сети является либо клиентом, либо сервером. Серверные компьютеры, как правило, представляют собой мощные компьютеры, предназначенные для управления дисковыми накопителями (файловые серверы), принтерами (серверы печати) или сетевым трафиком (сетевые серверы). Клиентские компьютеры включают в себя ПК (персональные компьютеры) или рабочие станции, на которых пользователи запускают приложения, а также примеры устройств вывода, как описано в данном документе. Клиентские компьютеры полагаются на серверные компьютеры в плане ресурсов, таких как файлы, устройства и даже вычислительная мощность. В некоторых вариантах осуществления изобретения компьютер-сервер выполняет все функции базы данных. На клиентском компьютере может быть установлено программное обеспечение, которое управляет всеми данными интерфейса, а также может получать вводимые данные от пользователей. Машиночитаемый носитель, содержащий исполняемый компьютером код, может принимать различные формы, включая, помимо прочего, материальный носитель, среду передачи на несущей волне или физическую среду передачи информации. Энергонезависимые носители данных включают, например, оптические или магнитные диски, такие как любое из запоминающих устройств в любом компьютере(-ах) и т.п., например, которые могут использоваться для реализации баз данных и т. д., показанных на фигурах. Энергонезависимые носители данных включают динамическую память, такую как основная память такой компьютерной платформы. Материальные носители включают коаксиальные кабели; медный провод и оптоволокно, включая провода, составляющие шину в компьютерной системе. Среда для передачи на несущей волне может принимать форму электрических или электромагнитных сигналов, акустических или световых волн, таких как те, которые генерируются во время радиочастотной (РЧ) и инфракрасной (ИК) передачи данных. Таким образом, распространенные формы машиночитаемых носителей включают, например: дискету, гибкий диск, жесткий диск, магнитную ленту, любой другой магнитный носитель, CD-ROM, DVD или DVD-ROM, любой другой оптический носитель, перфоленту, любой другой физический носитель данных с набором отверстий, RAM, ROM, PROM и EPROM, FLASH-EPROM, любую другую микросхему памяти или картридж, несущую волну, передающую данные или инструкции, кабели или линии, передающие такой несущую волну, или любой другой носитель, с которого компьютер может считывать программный код и/или данные. Многие из этих форм машиночитаемых носителей могут использоваться для переноса одной или более последовательностей одной или более инструкций в процессор для выполнения. Соответственно, изобретение охватывает выполнение любого способа, описанного в данном документе, и хранение и/или передачу данных и/или результатов и/или их анализа, а также продуктов, полученных в результате выполнения любого способа, описанного в данном документе, включая промежуточные продукты.

Терапевтические средства

[0530] В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие одну или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, описанных в данном документе, включая, помимо прочего, сконструированные капсидные частицы AAV, сконструированные клетки и/или их составы, описанные в данном документе, могут быть доставлены нуждающемуся в этом субъекту в качестве терапии одного или более заболеваний. В некоторых вариантах осуществления заболевание, подлежащее лечению, представляет собой генетическое или эпигенетическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание, подлежащее лечению, не является генетическим или эпигенетическим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления субъекту могут быть доставлены композиции, содержащие одну или более специфичных для мышц нацеливающих фрагментов, описанных в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, сконструированные капсидные частицы AAV, сконструированные клетки и/или их составы, описанные в данном документе. при необходимости в качестве лечения или профилактики (или в виде части лечения или профилактики) заболевания. Следует понимать, что конкретное заболевание, которое необходимо лечить и/или предотвращать посредством доставки композиции, состава, клетки и т.п. по настоящему изобретению, может зависеть от карго, связанного, присоединенного, содержащегося или иным образом связанного с композицией, составом, клеткой и т.п. по настоящему изобретению.

[0531] Генетические заболевания, которые можно лечить, более подробно обсуждаются в других разделах данного документа (см., например, обсуждение терапии на основе генной модификации ниже). Другие заболевания включают, но не ограничиваются, любое из следующего: злокачественное новообразование, инфекции, вызванные Acinetobacter, актиномикоз, африканскую сонную болезнь, СПИД/ВИЧ, амебиаз, анаплазмоз, ангиостронгилез, анизакиоз, сибирскую язву, инфекцию, вызванную Arcanobacterium haemolyticum, аргентинскую геморрагическую лихорадку, аскаридоз, аспергиллез, астровирусную инфекцию, бабезиоз, бактериальный менингит, бактериальную пневмонию, бактериальный вагиноз, инфекцию, вызванную Bacteroides, балантидиаз, бартонеллез, инфекцию, вызванную Baylisascaris, BK-вирусную инфекцию, черную пьедру, бластоцитоз, бластомикоз, боливийскую геморрагическую лихорадку, ботулизм, бразильскую геморрагическую лихорадку, бруцеллез, бубонную чуму, инфекцию, вызванную Burkholderia, язва Бурули, калицивирусную инфекцию, кампилобактериоз, кандидоз, капилляриоз, болезнь Карриона, болезнь кошачьих царапин, целлюлит, болезнь Шагаса, мягкий шанкр, ветряную оспа, лихорадку чикунгунья, хламидиоз, Chlamydia pneumoniae, холеру, хромобластомикоз, хитридиомикоз, клонорхоз, вызванный Clostridium difficile колит, кокцидиоидомикоз, колорадскую клещевую лихорадку, риновирусную/коронавирусную инфекцию (простуду), болезнь Крейтцфельдта-Якоба, конго-крымскую геморрагическую лихорадку, криптококкоз, криптоспоридиоз, мигрирующую кожную личинку (CLM), циклоспориоз, цистицеркоз, цитомегаловирусную инфекцию, лихорадка Денге, инфекцию, вызванную Desmodesmus, диентамебиаз, дифтерию, дифиллоботриоз, дракункулез, лихорадку Эбола, эхинококкоз, эрлихиоз, энтеробиоз, энтерококковую инфекцию, энтеровирусную инфекцию, эпидемический сыпной тиф, инфекционную эритему, внезапную экзантему, фасциолез, фасциопсиоз, смертельную семейную бессонницу, филяриатоз, инфекцию, вызванную Clostridium perfringens, инфекцию, вызванную Fusobacterium, газовую гангрену (клостридиальный мионекроз), геотрихоз, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, лямблиоз, сап, гнатостомоз, гонорею, паховую гранулему, инфекцию, вызванную стрептококками группы А, инфекцию, вызванную стрептококками группы В, инфекцию, вызванную Haemophilus influenzae, болезнь рук, ног и рта, хантавирусный легочный синдром, вирусную болезнь сердца, хеликобактерную инфекцию, геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, инфекцию, вызванную вирусом Хендра, гепатиты (все группы А, В, С, D, Е), простой герпес, гистоплазмоз, анкилостомоз, бокавирусную инфекцию человека, вызванный Е.

ewingii эрлихиоз человека, гранулоцитарный анаплазмоз человека, метапневмовирусную инфекцию человека, моноцитарный эрлихиоз человека, вирус папилломы человека, гименолепидоз, инфекцию, вызванную вирусом Эпштейна-Барр, мононуклеоз, грипп, изоспороз, болезнь Кавасаки, инфекцию, вызванную Kingella kingae, куру, лихорадку Ласса, легионеллез (болезнь легионеров и потомакскую лихорадку), лейшманиоз, проказу, лептоспироз, листериоз, болезнь Лайма, лимфатический филяриатоз, лимфоцитарный хориоменингит, малярию, Марбургскую геморрагическую лихорадку, корь, ближневосточный респираторный синдром, мелиоидоз, менингит, менингококковую инфекцию, метагонимоз, микроспоридоз, контагиозный моллюск, оспу обезьян, эпидемический паротит, мышиный тиф, микоплазменную пневмонию, инфекцию, вызванную Mycoplasma genitalium, мицетому, миаз, конъюнктивит, инфекцию, вызванную вирусом Нипах, норовирус, вариантную болезнь Крейцфельда-Якоба, нокардиоз, онхоцеркоз, описторхоз, паракокцидиоидомикоз, парагонимоз, пастереллез, головной педикулез, педикулез туловища, лобковый педикулез, воспалительные заболевания органов малого таза, коклюш, чуму, пневмококковую инфекцию, пневмоцистную пневмонию, пневмонию, полиомиелит, инфекцию, вызванную Prevotella, первичный амебный менигоэнцефалит, прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию, орнитоз, Ку-риккетсиоз, бешенство, возвратный тиф, инфекцию, вызванную респираторно-синцитиальным вирусом, риновирусную инфекцию, риккетсиозная инфекция, риккетсиоз, лихорадку долины Рифт, пятнистую лихорадку Скалистых гор, ротавирусную инфекцию, краснуху, сальмонеллез, атипичную пневмонию, чесотку, скарлатину, шистосомоз, сепсис, шигеллез, опоясывающий лишай, оспу, споротрихоз, стафилококковую инфекцию (включая MRSA), стронгилоидоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, сифилис, тениоз, столбняк, инфекцию, вызванную видами Trichophyton, токсокароз, токсоплазмоз, трахому, трихиноз, трихинеллез, туберкулез, туляремию, брюшной тиф, сыпной тиф, инфекцию, вызванную Ureaplasma urealyticum, пустынную лихорадку, венесуэльский конский энцефалит, венесуэльскую геморрагическую лихорадку, инфекцию, вызванную видами Vibrio, вирусную пневмонию, лихорадка Западного Нила, белую пьедру, Yersinia pseudotuberculosis, иерсиниоз, желтую лихорадку, Zeaspora, лихорадку Зика, зигомикоз и их комбинации.

[0532] Другие заболевания и нарушения, которые можно лечить с использованием вариантов осуществления настоящего изобретения, включают, помимо прочего, эндокринные заболевания (например, диабет типа I и типа II, гестационный диабет, гипогликемию, глюкагоному, зоб, гипертиреоз, гипотиреоз, тиреоидит, рак щитовидной железы, резистентность к гормонам щитовидной железы, заболевания паращитовидной железы, остеопороз, деформирующий остит, рахит, остеомаляцию, гипопитуитаризм, опухоли гипофиза и др.), кожные заболевания инфекционного и неинфекционного происхождения, заболевания глаз инфекционного или неинфекционного происхождения, желудочно-кишечные расстройства инфекционного или неинфекционного происхождения, сердечно-сосудистые заболевания инфекционного или неинфекционного происхождения, заболевания головного мозга и нейронов инфекционного или неинфекционного происхождения, заболевания нервной системы инфекционного или неинфекционного происхождения, заболевания мышц инфекционного или неинфекционного происхождения, заболевания костей инфекционного или неинфекционного происхождения, заболевания репродуктивной системы инфекционного или неинфекционного происхождения, заболевания почек инфекционного или неинфекционного происхождения, заболевания крови инфекционного или неинфекционного происхождения, заболевания лимфатической системы инфекционного или неинфекционного происхождения, заболевания иммунной системы инфекционного или неинфекционного происхождения, психические заболевания инфекционного или неинфекционного происхождения и т.п.

[0533] В некоторых вариантах осуществления заболевание, подлежащее лечению, представляет собой мышечное или связанное с мышцами заболевание или нарушение, например, генетическое мышечное заболевание или нарушение.

[0534] Другие заболевания и нарушения будут понятны специалистам в данной области техники.

Адоптивная клеточная терапия

[0535] Вообще говоря, адоптивный перенос клеток включает перенос клеток (аутологичных, аллогенных и/или ксеногенных) субъекту. Клетки могут быть модифицированы или не модифицированы и/или подвергнуты иным манипуляциям перед доставкой субъекту.

[0536] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, как описано в данном документе, может быть включена в терапию на основе адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, как описано в данном документе, может быть доставлена нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть выделена у субъекта, подвержена манипуляциям in vitro таким образом, чтобы она содержала и/или была способна вырабатывать композицию по настоящему изобретению, содержащую специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, описанный в другом месте данного документа (включая, но не ограничиваясь этим, сконструированную капсидную частицу AAV), описанную в данном документе, для получения сконструированной клетки и доставки обратно субъекту аутологичным способом или другому субъекту аллогенным или ксеногенным способом. Выделенная, подверженная манипуляциям и/или доставленная клетка может быть эукариотической клеткой. Выделенная, подверженная манипуляциям и/или доставленная клетка может быть стволовой клеткой. Выделенная, подверженная манипуляциям и/или доставленная клетка может быть дифференцированной клеткой. Выделенная, подверженная манипуляциям и/или доставленная клетка может быть иммунной клеткой, клеткой крови, эндокринной клеткой, почечной клеткой, экзокринной клеткой, клеткой нервной системы, клеткой сосудов, мышечной клеткой, клеткой мочевыделительной системы, костная клетка, клетка мягких тканей, сердечная клетка, нейрон или клетка системы покровов тела. Специалист в данной области техники сразу же оценит другие конкретные типы клеток.

[0537] В некоторых вариантах осуществления с выделенной клеткой можно подвергать манипуляциям таким образом, чтобы она стала сконструированной клеткой, как описано в другом месте данном документа (например, содержать и/или экспрессировать одну или более молекул или векторов сконструированной системы доставки, описанных в другом месте данном документа). Способы получения таких сконструированных клеток более подробно описаны в другом месте данного документа.

[0538] Введение клеток или популяции клеток по настоящему изобретению можно осуществлять любым удобным способом, включая аэрозольную ингаляцию, инъекцию, прием внутрь, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Клетки или популяцию клеток можно вводить пациенту подкожно, внутрикожно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной или внутрилимфатической инъекции или внутрибрюшинно. В одном варианте осуществления клеточные композиции по настоящему изобретению предпочтительно вводят путем внутривенной инъекции.

[0539] Введение клеток или популяции клеток может представлять собой или включать введение 10^4-10^9 клеток на кг массы тела, включая все целые значения количества клеток в этих диапазонах. В некоторых вариантах осуществления доставляется от 10^5 до 10^6 клеток/кг. Дозирование при адоптивной клеточной терапии может, например, включать введение от 10^6 до 10^9 клеток/кг с курсом лимфодеплеции или без него, например, циклофосфамидом. Клетки или популяцию клеток можно вводить одной или более дозами. В еще одном варианте осуществления эффективное количество клеток вводят в виде однократной дозы. В еще одном варианте осуществления эффективное количество клеток вводят в виде более чем одной дозы в течение периода времени. Время введения определяется лечащим врачом и зависит от клинического состояния пациента. Клетки или популяция клеток могут быть получены из любого источника, такого как банк крови или донор. Хотя индивидуальные потребности различаются, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств данного типа клеток для конкретного заболевания или патологического состояния находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Эффективное количество означает количество, которое обеспечивает терапевтический или профилактический эффект. Вводимая доза зависит от возраста, состояния здоровья и массы пациента, вида сопутствующего лечения, если таковое имеется, частоты лечения и характера желаемого эффекта.

[0540] В еще одном варианте осуществления эффективное количество клеток или композиции, содержащей эти клетки, вводят парентерально. Введение может быть внутривенным введением. Введение можно осуществлять непосредственно путем инъекции в ткань. В некоторых вариантах осуществления ткань может представлять собой опухоль.

[0541] Для защиты от возможных неблагоприятных реакций сконструированные клетки могут быть снабжены трансгенным защитным переключателем в форме трансгена, который делает клетки уязвимыми для воздействия определенного сигнала. Например, в этом качестве может быть использован ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (TK), например, путем введения в сконструированную клетку, аналогично тому, что обсуждалось в Greco, et al., Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. Front. Pharmacol. 2015; 6: 95. В таких клетках введение нуклеозидного пролекарства, такого как ганцикловир или ацикловир, вызывает гибель клеток. Альтернативные конструкции защитного переключателя включают индуцируемую каспазу 9, например, запускаемую введением низкомолекулярного димеризатора, который объединяет две нефункциональные молекулы icasp9 с образованием активного фермента. Было описано большое разнообразие альтернативных подходов к осуществлению контроля клеточной пролиферации (см. публикацию патента США № 20130071414; публикацию патента PCT WO 2011146862; публикацию патента PCT WO 2014011987; публикацию патента PCT WO 2013040371; Zhou et al. BLOOD, 2014, 123/25:3895 – 3905; Di Stasi et al., The New England Journal of Medicine 2011; 365:1673-1683; Sadelain M, The New England Journal of Medicine 2011; 365:1735-173; Ramos et al., Stem Cells 28(6):1107-15 (2010)).

[0542] Способы модификации выделенных клеток для получения сконструированных клеток с желаемыми свойствами описаны в данном документе в другом месте. В некоторых вариантах осуществления способы могут включать модификацию генома, включая, помимо прочего, редактирование генома с использованием системы CRISPR-Cas для модификации клетки. Это может быть дополнением к введению молекулы системы сконструированных капсидов AAV, описанной в другом месте данного документа.

[0543] Аллогенные клетки быстро отторгаются иммунной системой хозяина. Было продемонстрировано, что аллогенные лейкоциты, присутствующие в необлученных препаратах крови, сохраняются не более 5-6 дней (Boni, Muranski et al. 2008 Blood 1;112(12):4746-54). Таким образом, чтобы предотвратить отторжение аллогенных клеток, обычно необходимо до некоторой степени подавить иммунную систему хозяина. Однако в случае адоптивного переноса клеток применение иммунодепрессантов также оказывает неблагоприятное воздействие на введенные терапевтические клетки, такие как сконструированные клетки, описанные в данном документе. Таким образом, чтобы эффективно использовать подход адоптивной иммунотерапии в этих условиях, введенные клетки должны быть устойчивыми к иммуносупрессивному лечению. Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно включает стадию модификации сконструированных клеток, чтобы сделать их устойчивыми к иммунодепрессанту, предпочтительно путем инактивации по меньшей мере одного гена, кодирующего мишень для иммунодепрессанта. Иммунодепрессант представляет собой агент, который подавляет иммунную функцию одним из более механизмов действия. Иммунодепрессивным агентом может быть, но не ограничиваясь этим, ингибитор кальциневрина, мишень рапамицина, блокатор α-цепи рецептора интерлейкина-2, ингибитор инозинмонофосфатдегидрогеназы, ингибитор редуктазы дигидрофолиевой кислоты, кортикостероид или иммунодепрессантный антиметаболит. Настоящее изобретение позволяет придать иммуносупрессивную резистентность сконструированным клеткам для адоптивной клеточной терапии путем инактивации мишени иммуносупрессивного агента в сконструированных клетках. В качестве неограничивающих примеров мишенями для иммунодепрессанта могут быть рецепторы для иммунодепрессантов, такие как: CD52, глюкокортикоидный рецептор (GR), член семейства генов FKBP и член семейства генов циклофилина.

[0544] Иммунные контрольные точки представляют собой ингибирующие пути, которые замедляют или останавливают иммунные реакции и предотвращают чрезмерное повреждение тканей в результате неконтролируемой активности иммунных клеток. В определенных вариантах осуществления целевой иммунной контрольной точкой является ген белка запрограммированной гибели клеток-1 (PD-1 или CD279) (PDCD1). В других вариантах осуществления целевой иммунной контрольной точкой является ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген (CTLA-4). В дополнительных вариантах осуществления целевой иммунной контрольной точкой является другой член суперсемейства Ig CD28 и CTLA4, например, BTLA, LAG3, ICOS, PDL1 или KIR. В дополнительных вариантах осуществления целевой иммунной контрольной точкой является член суперсемейства TNFR, например, CD40, OX40, CD137, GITR, CD27 или TIM-3.

[0545] Дополнительные иммунные контрольные точки включают содержащую домен Src гомологии 2 протеинтирозинфосфатазу 1 (SHP-1) (Watson HA, et al., SHP-1: the next checkpoint target for cancer immunotherapy? Biochem Soc Trans. 2016 Apr 15;44(2):356-62). SHP-1 представляет собой широко экспрессируемую ингибирующую протеинтирозинфосфатазу (PTP). В Т-клетках она является негативным регулятором антигензависимой активации и пролиферации. Она представляет собой цитозольный белок, и поэтому она не поддается терапии с помощью антител, но ее роль в активации и пролиферации делает ее привлекательной мишенью для генетических манипуляций в стратегиях адоптивного переноса, таких как Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR). Иммунные контрольные точки могут также включать Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9) и VISTA (Le Mercier I, et al., (2015) Beyond CTLA-4 and PD-1, the generation Z of negative checkpoint regulators. Front. Immunol. 6:418).

[0546] WO 2014172606 относится к применению MT1 и/или ингибиторов MT1 для увеличения пролиферации и/или активности истощенных CD8+ Т-клеток и снижения истощения CD8+ Т-клеток (например, уменьшения функционально истощенных или невосприимчивых CD8+ иммунных клеток). В определенных вариантах осуществления металлотионеины нацелены на редактирование генов в адоптивно переносимых Т-клетках.

[0547] В определенных вариантах осуществления мишенью редактирования генов может быть по меньшей мере один целевой локус, участвующий в экспрессии белка иммунной контрольной точки. Такие мишени могут включать, но не ограничиваться этим, CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, ICOS (CD278), PDL1, KIR, LAG3, HAVCR2, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244 (2B4), TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBRII, TGFRBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, VISTA, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3, MT1, MT2, CD40, OX40, CD137, GITR, CD27, SHP-1 или TIM-3. В некоторых вариантах осуществления мишенью является генный локус, участвующий в экспрессии генов PD-1 или CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления мишенью являются комбинации генов, такие как, помимо прочего, PD-1 и TIGIT.

[0548] В некоторых вариантах осуществления редактируются по меньшей мере два гена. Пары генов могут включать, но не ограничиваются этим, PD1 и TCRα, PD1 и TCRβ, CTLA-4 и TCRα, CTLA-4 и TCRβ, LAG3 и TCRα, LAG3 и TCRβ, Tim3 и TCRα, Tim3 и TCRβ, BTLA и TCRα, BTLA и TCRβ, BY55 и TCRα, BY55 и TCRβ, TIGIT и TCRα, TIGIT и TCRβ, B7H5 и TCRα, B7H5 и TCRβ, LAIR1 и TCRα, LAIR1 и TCRβ, SIGLEC10 и TCRα, SIGLEC10 и TCRβ, 2B4 и TCRα, 2B4 и TCRβ.

[0549] До или после генетической или другой модификации сконструированных клеток (таких как сконструированные Т-клетки (например, выделенная клетка представляет собой Т-клетку), сконструированные клетки можно активировать и размножать, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и 7572631. Сконструированные клетки можно размножать in vitro или in vivo.

[0550] В некоторых вариантах осуществления способ включает редактирование сконструированных клеток ex vivo с помощью подходящего метода модификации генов, описанного в другом месте данного документа (например, редактирование генов с помощью системы CRISPR-Cas), для устранения потенциальных аллореактивных TCR или других рецепторов, чтобы сделать возможным аллогенный адоптивный перенос. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки редактируют ex vivo с помощью системы CRISPR-Cas или другого подходящего метода модификации генома для нокаута или нокдауна эндогенного гена, кодирующего TCR (например, αβ TCR) или другой соответствующий рецептор, чтобы избежать реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). В некоторых вариантах осуществления, где сконструированные клетки представляют собой Т-клетки, сконструированные клетки редактируют ex vivo с помощью CRISPR или другого подходящего метода модификации генов для мутации локуса TRAC. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки редактируют ex vivo с помощью системы CRISPR-Cas с использованием одной или более направляющих последовательностей, нацеленных на первый экзон TRAC. См. Liu et al., Cell Research 27:154-157 (2017). В некоторых вариантах осуществления первый экзон TRAC модифицируют с использованием другого подходящего метода модификации генов. В некоторых вариантах осуществления способ включает применение CRISPR или другого подходящего метода для нокаута экзогенного гена, кодирующего CAR или TCR, в локус TRAC с одновременным нокаутом эндогенного TCR (например, с помощью донорной последовательности, кодирующей саморасщепляющийся пептид P2A, после кДНК CAR). См. Eyquem et al., Nature 543:113-117 (2017). В некоторых вариантах осуществления экзогенный ген содержит беспромоторную последовательность, кодирующую CAR или кодирующую TCR, которая функционально встроена ниже эндогенного промотора TCR.

[0551] В некоторых вариантах осуществления способ включает редактирование сконструированной клетки, например, сконструированной Т-клетки, ex vivo с помощью системы CRISPR-Cas для нокаута или нокдауна эндогенного гена, кодирующего белок HLA-I, для минимизации иммуногенности отредактированных клеток, например, сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки можно редактировать ex vivo с помощью системы CRISPR-Cas для мутации локуса бета-2-микроглобулина (B2M). В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, например, сконструированные Т-клетки, редактируют ex vivo с помощью системы CRISPR-Cas с использованием одной или более направляющих последовательностей, нацеленных на первый экзон B2M. Первый экзон B2M также можно модифицировать с использованием другого подходящего метода модификации. См. Liu et al., Cell Research 27:154-157 (2017). Первый экзон B2M также можно модифицировать с использованием другого подходящего способа модификации, который будет понятен специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления способ включает использование системы CRISPR-Cas для нокаута экзогенного гена, кодирующего CAR или TCR, в локусе B2M с одновременным нокаутом эндогенного B2M (например, с помощью донорной последовательности, кодирующей саморасщепляющийся пептид P2A, после кДНК CAR). См. Eyquem et al., Nature 543:113-117 (2017). Это также может быть достигнуто с помощью другого подходящего метода модификации, который будет понятен специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления экзогенный ген содержит беспромоторную последовательность, кодирующую CAR или TCR, которая функционально вставлена ниже эндогенного промотора B2M.

[0552] В некоторых вариантах осуществления способ включает редактирование сконструированной клетки, например, сконструированной Т-клетки, ex vivo с помощью системы CRISPR-Cas для нокаута или нокдауна эндогенного гена, кодирующего антиген, на который направлен экзогенный CAR или TCR. Это также может быть выполнено с использованием другого подходящего способа модификации, который будет понятен специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки, редактируют ex vivo с помощью системы CRISPR-Cas для нокаута или нокдауна экспрессии опухолевого антигена, выбранного из теломеразной обратной транскриптазы человека (hTERT), сурвивина, гомолога 2 мышиного двойного микробелка (MDM2), цитохрома P450 1B 1 (CYP1B), HER2/neu, гена опухоли Вильмса 1 (WT1), ливина, альфафетопротеина (AFP), карциноэмбрионального антигена (CEA), муцина 16 (MUC16), MUC1, простатспецифичного мембранного антигена (PSMA), p53 или циклина (DI) (см., например, публикацию международной патентной заявки WO 2016/011210). Это также может быть выполнено с использованием другого подходящего способа модификации, который будет понятен специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки, редактируют ex vivo с помощью системы CRISPR-Cas для нокаута или нокдауна экспрессии антигена, выбранного из антигена созревания В-клеток (BCMA), трансмембранного активатора и партнера CAML (TACI) или рецептора фактора активации В-клеток (BAFF-R), CD38, CD138, CS-1, CD33, CD26, CD30, CD53, CD92, CD100, CD148, CD150, CD200, CD261, CD262 или CD362 (см., например, публикацию международной патентной заявки WO2017/011804). Это также может быть выполнено с использованием другого подходящего способа модификации, который будет понятен специалистам в данной области техники.

Генные драйвы

[0553] Настоящее изобретение также предусматривает применение композиций, содержащих специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, описанный в другом месте данном документа, их составов, их клеток, векторных систем и т.п. для обеспечения генного драйва посредством доставки одного или более полинуклеотидов-карго или получения композиции, содержащей специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, описанный в другом месте данном документа (включая, но не ограничиваясь ими, сконструированные капсидные частицы AAV), с одним или более полинуклеотидами-карго, способными вызывать генный драйв. В некоторых вариантах осуществления генный драйв может представлять собой Cas-опосредованный РНК-направляемый генный драйв, например, Cas- для обеспечения РНК-направляемого генного драйва, например, в системах, аналогичных генным драйвам, описанным в публикации международной патентной заявки WO 2015/105928. Системы такого типа могут, например, обеспечивать способы изменения эукариотических клеток зародышевой линии путем введения в клетку зародышевой линии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей направляемую РНК ДНК-нуклеазу и одну или более направляющих РНК. Направляющие РНК могут быть сконструированы таким образом, чтобы они были комплементарны одному или более целевым участкам геномной ДНК клетки зародышевой линии. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая направляющие РНК, могут быть представлены в конструкциях между фланкирующими последовательностями, причем промоторы расположены таким образом, что клетка зародышевой линии может экспрессировать РНК-направляемую ДНК-нуклеазу и направляющие РНК вместе с любыми желаемыми последовательностями, кодирующими карго, которые также расположены между фланкирующими последовательностями. Фланкирующие последовательности, как правило, включают последовательность, которая идентична соответствующей последовательности на выбранной хромосоме-мишени, так что фланкирующие последовательности работают с фрагментами, кодируемыми конструкцией, для облегчения вставки последовательностей конструкции чужеродной нуклеиновой кислоты в геномную ДНК в целевом сайте разреза с помощью таких механизмов, как гомологичная рекомбинация, чтобы сделать клетку зародышевой линии гомозиготной по чужеродной последовательности нуклеиновой кислоты. Таким образом, системы генного драйва способны интрогрессировать желаемые гены карго во всей размножающейся популяции (см., например, Gantz et al., 2015, Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi, PNAS 2015, published ahead of print November 23, 2015, doi:10.1073/pnas.1521077112; Esvelt et al., 2014, Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations eLife 2014;3:e03401). В отдельных вариантах осуществления могут быть выбраны целевые последовательности, которые имеют более потенциальных нецелевых сайтов в геноме. Нацеливание на несколько сайтов в целевом локусе с использованием нескольких направляющих РНК может увеличивать частоту разрезания и препятствовать эволюции аллелей, резистентных к драйву. Укороченные направляющие РНК могут уменьшить нецелевое разрезание. Вместо одной нуклеазы можно использовать парные никазы для дальнейшего повышения специфичности. Конструкции генного драйва (такие как конструкции сконструированной системы доставки генного драйва) могут включать последовательности карго, кодирующие регуляторы транскрипции, например, для активации генов гомологичной рекомбинации и/или репрессии негомологичного соединения концов. Сайты-мишени могут быть выбраны внутри основного гена, так что события негомологичного соединения концов могут приводить к летальности, а не создавать резистентный к драйву аллель. Конструкции генного драйва могут быть сконструированы таким образом, чтобы они функционировали у ряда хозяев при различных температурах (Cho et al. 2013, Rapid and Tunable Control of Protein Stability in Caenorhabditis elegans Using a Small Molecule, PLoS ONE 8(8): e72393. doi:10.1371/journal.pone.0072393).

Трансплантация и ксенотрансплантация

[0554] Композиции, содержащие специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, описанный в других разделах данного документа, их составы, их клетки, векторные системы и т.п., можно использовать для доставки полинуклеотидов-карго и/или иным образом вовлекать в модификацию тканей для трансплантации между двумя разными людьми (трансплантация) или между видами (ксенотрансплантация). Такие методики получения трансгенных животных описаны в данном документе в другом месте. Способы межвидовой трансплантации в целом известны в данной области техники. Например, РНК-направляемые ДНК-нуклеазы можно доставлять с помощью полинуклеотидов сконструированного капсида AAV, векторов, сконструированных клеток и/или сконструированных капсидных частиц AAV, описанных в данном документе, и их можно использовать для нокаута, нокдауна или нарушения выбранных генов в органе для трансплантации (например, ex vivo (например, после отбора, но перед трансплантацией) или in vivo (у донора или реципиента)), животному, такому как трансгенная свинья (например, трансгенная линия свиней с гемоксигеназой-1 человека), например, путем нарушения экспрессии генов, которые кодируют эпитопы, распознаваемые иммунной системой человека, т.е. гены ксеноантигенов. Гены-кандидаты свиньи для нарушения могут, например, включать гены α(1,3)-галактозилтрансферазы и гидроксилазы цитидинмонофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (см. патентную публикацию PCT WO 2014/066505). Кроме того, могут быть нарушены гены, кодирующие эндогенные ретровирусы, например, гены, кодирующие все эндогенные ретровирусы свиней, (см. Yang et al., 2015, Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs), Science 27 November 2015: Vol. 350 no. 6264 pp. 1101-1104). Кроме того, направляемые РНК ДНК-нуклеазы можно использовать для нацеливания на сайт интеграции дополнительных генов у животных-доноров ксенотрансплантата, таких как ген CD55 человека, для улучшения защиты от сверхострого отторжения.

[0555] Если речь идет о межвидовой трансплантации (например, от человека к человеку), композиции, содержащие специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, описанный в другом месте данного документа, (например, молекулу системы сконструированных капсидов AAV, векторы, сконструированные клетки и/или сконструированные частицы для доставки, описанные в данном документе), могут быть использованы для доставки полинуклеотидов-карго и/или иным образом задействованы для модификации трансплантируемой ткани. В некоторых вариантах осуществления модификация может включать модификацию одного или более антигенов HLA или других детерминант типа ткани таким образом, чтобы иммуногенный профиль был более похож или идентичен иммуногенному профилю реципиента, чем иммуногенному профилю донора, чтобы уменьшить вероятность отторжения реципиентом. Соответствующие детерминанты типа ткани известны в данной области техники (такие как те, которые используются для определения совместимости органов), и способы определения иммуногенного профиля (который состоит из сигнатуры экспрессии детерминант типа ткани) в целом известны в данной области техники.

[0556] В некоторых вариантах осуществления донор (например, перед отбором) или реципиент (после трансплантации) может получать одну или более композиций, содержащих специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, описанный в другом месте данном документа, их составы, их клетки, векторные системы, молекулы системы сконструированных капсидов AAV, векторы, сконструированные клетки и/или сконструированные частицы для доставки, описанные в данном документе, которые способны модифицировать иммуногенный профиль трансплантированных клеток, ткани и/или органа. В некоторых вариантах осуществления трансплантированные клетки, ткань и/или орган могут быть получены от донора и композиций, содержащих специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, описанный в другом месте данного документа, их составы, их клетки, векторные системы, молекулы системы сконструированных капсидов AAV, векторы, сконструированные клетки и/или сконструированные частицы для доставки, описанные в данном документе, способные модифицировать отобранные клетки, ткань и/или орган, чтобы они были, например, менее иммуногенными или были модифицированы таким образом, чтобы иметь некоторые специфичные характеристики при трансплантации реципиенту, могут быть доставлены в собранные клетки, ткань и/или орган ex vivo. После доставки клетки, ткани и/или органы могут быть трансплантированы донору.

Генная модификация и лечение заболеваний с генетическими или эпигенетическими нарушениями

Молекулы сконструированной системы доставки, векторы, сконструированные клетки и/или сконструированные частицы для доставки, описанные в данном документе, содержащие специфичный для мышц нацеливающий фрагмент, можно использовать для модификации генов или других полинуклеотидов и/или лечения заболеваний с генетическими и/или эпигенетическими нарушениями. Как описано в другом месте в данном документе, молекула карго может представлять собой полинуклеотид, который может быть доставлен в клетку и, в некоторых вариантах осуществления, интегрирован в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления молекула(-ы) карго может представлять собой один или более фрагментов системы CRISPR-Cas. В некоторых вариантах осуществления фрагменты CRISPR-Cas при доставке с помощью композиции или ее состава по настоящему изобретению, таким как сконструированные капсидные частицы AAV, описанные в данном документе, могут необязательно экспрессироваться в клетке-реципиенте и действовать для модификации генома клетки-реципиента специфичным для последовательности образом. В некоторых вариантах осуществления молекулы карго, которые могут быть упакованы и доставлены сконструированными капсидными частицами AAV или другими частицами и/или композициями, описанными в данном документе, могут способствовать/опосредовать модификацию генома с помощью метода, который не зависит от CRISPR-Cas. Такие системы для модификации генома, отличные от CRISPR-Cas, сразу же оценят специалисты в данной области техники, и они также, по крайней мере частично, описаны в другом месте данного документа. В некоторых вариантах осуществления модификация касается конкретной целевой последовательности. В других вариантах осуществления модификация происходит в местах, которые кажутся случайными по всему геному.

[0557] Примеры ассоциированных с заболеванием генов и полинуклеотидов, а также информацию о конкретных заболеваниях можно получить в Институте генетической медицины Маккьюсика-Натанса Университета Джона Хопкинса (Балтимор, штат Мэриленд) и в Национальном центре биотехнологической информации Национальной медицинской библиотеки (Бетесда, штат Мэриленд), доступных во Всемирной паутине. Любое из них может подходить для лечения одним или более способами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой мышечное заболевание или нарушение, нервно-мышечное заболевание или нарушение или кардиомиопатию. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение выбрано из любого одного или более из следующего:

(a) аутоиммунное заболевание;

(b) рак;

(c) мышечную дистрофию;

(d) нервно-мышечное заболевание;

(e) болезнь накопления сахара или гликогена;

(f) болезнь экспансии тринуклеотидных повторов;

(g) обусловленную доминантно-негативной мутацией болезнь;

(h) кардиомиопатию;

(i) вирусное заболевание;

(j) прогероидный синдром; или

(k) любую их комбинацию.

[0558] В некоторых вариантах осуществления болезнь экспансии тринуклеотидных повторов представляет собой болезнь Гентингтона, миотоническую дистрофию или лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию (FSHD). В некоторых вариантах осуществления мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, миотоническую дистрофию или FSHD. В некоторых вариантах осуществления миотоническая дистрофия относится к типу 1 или типу 2. В некоторых вариантах осуществления кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, кардиомиопатию, связанную с DMD, или болезнь Данона. В некоторых вариантах осуществления болезнь накопления сахара или гликогена представляет собой болезнь МПС типа III или болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления МПС типа III, представляет собой МПС типа IIIA, IIIB, IIIC или IIID. В некоторых вариантах осуществления нервно-мышечное заболевание представляет собой болезнь Шарко-Мари-Тута или атаксию Фридрейха.

[0559] В частности, мутации в этих генах и путях могут привести к выработке неправильных белков или белков в ненадлежащих количествах, которые влияют на функцию. Дополнительные примеры генов, заболеваний и белков включены посредством ссылки из предварительной заявки США 61/736527, поданной 12 декабря 2012 г. Такие гены, белки и пути могут быть целевыми полинуклеотидами комплекса CRISPR или другого способа модификации генов по настоящему изобретению. Примеры генов и полинуклеотидов, ассоциированных с заболеванием и/или функцией клетки, перечислены в **таблицах 4** и **5**. Дополнительные примеры обсуждаются в данном документе в другом месте.

Таблица 4. Иллюстративные генетические и другие заболевания и ассоциированные гены

Название болезни	**Основные пораженные ткани или системы**	**Дополнительные пораженные ткани/системы**	**Гены**
Ахондроплазия	Кости и мышцы		рецептор фактора роста фибробластов 3 (FGFR3)
Ахроматопсия	глаз		CNGA3, CNGB3, GNAT2, PDE6C, PDE6H, ACHM2, ACHM3,
Острое повреждение почек	почка		NFkappaB, AATF, p85-альфа, FAS, элементы каскада апоптоза (например, FASR, каспаза 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, AKT, TNF-альфа, IGF1, IGF1R, RIPK1), p53
Возрастная макулярная	глаз		Abcr; CCL2; CC2; CP (церулоплазмин); Timp3; катепсин D; VLDLR, CCR2

дегенерация			
СПИД	Иммунная система		KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1
Альбинизм (включая глазокожный альбинизм (типы 1-7) и глазной альбинизм)	Кожа, волосы, глаза,		TYR, OCA2, TYRP1, и SLC45A2, SLC24A5 и C10orf11
Алкаптонурия	Метаболизм аминокислот	Ткани/органы, в которых накапливается гомогентизиновая кислота, особенно хрящи (суставы), сердечные клапаны, почки	HGD
дефицит альфа-1-антитрипсина (AATD или A1AD)	Легкое	Печень, кожа, сосудистая система, почки, ЖКТ	Серпин A1, указанные в WO2017165862, аллель PiZ
БАС	ЦНС		SOD1; ALS2; ALS3; ALS5; ALS7;STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c); DPP6; NEFH, PTGS1, SLC1A2, TNFRSF10B, PRPH, HSP90AA1, CRIA2, IFNG, AMPA2 S100B, FGF2,

			AOX1, CS, TXN, RAPHJ1, MAP3K5, NBEAL1, GPX1, ICA1L, RAC1, MAPT, ITPR2, ALS2CR4, GLS, ALS2CR8, CNTFR, ALS2CR11, FOLH1, FAM117B, P4HB, CNTF, SQSTM1, STRADB, NAIP, NLR, YWHAQ, SLC33A1, TRAK2, SCA1, NIF3L1, NIF3, PARD3B, COX8A, CDK15, HECW1, HECT, C2, WW 15, NOS1, MET, SOD2, HSPB1, NEFL, CTSB, ANG, HSPA8, RNase A, VAPB, VAMP, SNCA, альфа HGF, CAT, ACTB, NEFM, TH, BCL2, FAS, CASP3, CLU, SMN1, G6PD, BAX, HSF1, RNF19A, JUN, ALS2CR12, HSPA5, MAPK14, APEX1, TXNRD1, NOS2, TIMP1, CASP9, XIAP, GLG1, EPO, VEGFA, ELN, GDNF, NFE2L2, SLC6A3, HSPA4, APOE, PSMB8, DCTN2, TIMP3, KIFAP3, SLC1A1, SMN2, CCNC, STUB1, ALS2, PRDX6, SYP, CABIN1, CASP1, GART, CDK5, ATXN3, RTN4, C1QB, VEGFC, HTT, PARK7, XDH, GFAP, MAP2, CYCS, FCGR3B, CCS, UBL5, MMP9m SLC18A3, TRPM7, HSPB2, AKT1, DEERL1, CCL2, NGRN, GSR, TPPP3, APAF1, BTBD10, GLUD1, CXCR4, S:C1A3, FLT1, PON1, AR, LIF, ERBB3, GA:S1, CD44, TP53, TLR3, GRIA1, GAPDH, AMPA, GRIK1, DES, CHAT, FLT4, CHMP2B, BAG1, CHRNA4, GSS, BAK1, KDR, GSTP1, OGG1, IL6
Болезнь Альцгеймера	Головной мозг		E1; CHIP; UCH; UBB; Tay; LRP; PICALM; CLU; PS1; SORL1; CR1; VLDLR; UBA1; UBA3; CHIP28; AQP1; UCHL1; UCHL3; APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, DCP1,

			ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3, ALAS2, ABCA1, BIN1, BDNF, BTNL8, C1ORF49, CDH4, CHRNB2, CKLFSF2, CLEC4E, CR1L, CSF3R, CST3, CYP2C, DAPK1, ESR1, FCAR, FCGR3B, FFA2, FGA, GAB2, GALP, GAPDHS, GMPB, HP, HTR7, IDE, IF127, IFI6, IFIT2, IL1RN, IL-1RA, IL8RA, IL8RB, JAG1, KCNJ15, LRP6, MAPT, MARK4, MPHOSPH1, MTHFR, NBN, NCSTN, NIACR2, NMNAT3, NTM, ORM1, P2RY13, PBEF1, PCK1, PICALM, PLAU, PLXNC1, PRNP, PSEN1, PSEN2, PTPRA, RALGPS2, RGSL2, SELENBP1, SLC25A37, SORL1, митоферрин-1, TF, TFAM, TNF, TNFRSF10C, UBE1C
Амилоидоз			APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB
Амилоидная невропатия			TTR, PALB
Анемия	Кровь		CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT
Синдром Ангельмана	Нервная система, головной мозг		UBE3A
Синдром дефицита внимания с гиперактивностью (ADHD)	Головной мозг		PTCHD1

Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром	Иммунная система		TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A
Аутизм, расстройства аутистического спектра (РАС), в том числе синдром Аспергера, и общая диагностическая категория, называемая «аутистическиподобные синдромы» (PDD)	Головной мозг		PTCHD1; Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; нейрексин 1; GLO1, RTT, PPMX, MRX16, RX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2, FMR1, FMR2; FXR1; FXR2; MGLUR5, ATP10C, CDH10, GRM6, MGLUR6, CDH9, CNTN4, NLGN2, CNTNAP2, SEMA5A, DHCR7, NLGN4X, NLGN4Y, DPP6, NLGN5, EN2, NRCAM, MDGA2, NRXN1, FMR2, AFF2, FOXP2, OR4M2, OXTR, FXR1, FXR2, PAH, GABRA1, PTEN, GABRA5, PTPRZ1, GABRB3, GABRG1, HIRIP3, SEZ6L2, HOXA1, SHANK3, IL6, SHBZRAP1, LAMB1, SLC6A4, SERT, MAPK3, TAS2R1, MAZ, TSC1, MDGA2, TSC2, MECP2, UBE3A, WNT2, см. также 20110023145
аутосомно-доминантная поликистозная болезнь почек (АДПБП) - (включает такие заболевания, как болезнь Гиппеля-Линдау и комплекс туберозного склероза)	почка	печень	PKD1, PKD2
Аутосомно-	почка	печень	PKDH1

рецессивная поликистозная болезнь почек (АРПБП)			
Атаксия-телеангиэктазия (также известная как синдром Луи-Бар)	Нервная система, иммунная система	различные	ATM
В-клеточная неходжкинская лимфома			BCL7A, BCL7
Синдром Барде-Бидля	Глаза, опорно-двигательный аппарат, почки, репродуктивные органы	Печень, ухо, желудочно-кишечный тракт, головной мозг	ARL6, BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BBS10, BBS12, CEP290, INPP5E, LZTFL1, MKKS, MKS1, SDCCAG8, TRIM32, TTC8
Синдром «голых» лимфоцитов	кровь		TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5
Синдром Барттера (типы I, II, III, IVA и B и V)	почка		SLC12A1 (тип I), KCNJ1 (тип II), CLCNKB (тип III), BSND (тип IV A), или оба гена CLCNKA CLCNKB (тип IV B), CASR (тип V).
Мышечная дистрофия Беккера	Мышца		DMD, BMD, MYF6
Болезнь Беста (вителиформная дистрофия 2	глаз		VMD2

типа)			
Нарушения свертываемости крови	кровь		TBXA2R, P2RX1, P2X1
Монохроматизм синего конуса	глаз		OPN1LW, OPN1MW, и LCR
Рак молочной железы	Ткань молочной железы		BRCA1, BRCA2, COX-2
Болезнь Брутона (также известная как X-сцепленная агаммаглобулинемия)	Иммунная система, особенно B-лимфоциты		BTK
Злокачественные новообразования (например, лимфома, хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), острый B-клеточный лимфоцитарный лейкоз (B-ОЛЛ), острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, неходжкинская лимфома (НХЛ), диффузная	Различные		FAS, BID, CTLA4, PDCD1, CBLB, PTPN6, TRAC, TRBC, описанные в WO2015048577

крупноклеточная лимфома (ДККЛ), множественная миелома, почечно-клеточная карцинома (ПКР), нейробластома, колоректальный рак, рак молочной железы, рак яичников, меланома, саркома, рак предстательной железы, рак легкого, рак пищевода, гепатоцеллюлярная карцинома, рак поджелудочной железы, астроцитома, мезотелиома, рак головы и шеи, и медуллобластома			
Сердечно-сосудистые заболевания	сердце	Сосудистая система	IL1B, XDH, TP53, PTGS, MB, IL4, ANGPT1, ABCGu8, CTSK, PTGIR, KCNJ11, INS, CRP, PDGFRB, CCNA2,

			PDGFB, KCNJ5, KCNN3, CAPN10, ADRA2B, ABCG5, PRDX2, CPAN5, PARP14, MEX3C, ACE, RNF, IL6, TNF, STN, SERPINE1, ALB, ADIPOQ, APOB, APOE, LEP, MTHFR, APOA1, EDN1, NPPB, NOS3, PPARG, PLAT, PTGS2, CETP, AGTR1, HMGCR, IGF1, SELE, REN, PPARA, PON1, KNG1, CCL2, LPL, VWF, F2, ICAM1, TGFB, NPPA, IL10, EPO, SOD1, VCAM1, IFNG, LPA, MPO, ESR1, MAPK, HP, F3, CST3, COG2, MMP9, SERPINC1, F8, HMOX1, APOC3, IL8, PROL1, CBS, NOS2, TLR4, SELP, ABCA1, AGT, LDLR, GPT, VEGFA, NR3C2, IL18, NOS1, NR3C1, FGB, HGF, IL1A, AKT1, LIPC, HSPD1, MAPK14, SPP1, ITGB3, CAT, UTS2, THBD, F10, CP, TNFRSF11B, EGFR, MMP2, PLG, NPY, RHOD, MAPK8, MYC, FN1, CMA1, PLAU, GNB3, ADRB2, SOD2, F5, VDR, ALOX5, HLA-DRB1, PARP1, CD40LG, PON2, AGER, IRS1, PTGS1, ECE1, F7, IRMN, EPHX2, IGFBP1, MAPK10, FAS, ABCB1, JUN, IGFBP3, CD14, PDE5A, AGTR2, CD40, LCAT, CCR5, MMP1, TIMP1, ADM, DYT10, STAT3, MMP3, ELN, USF1, CFH, HSPA4, MMP12, MME, F2R, SELL, CTSB, ANXA5, ADRB1, CYBA, FGA, GGT1, LIPG, HIF1A, CXCR4, PROC, SCARB1, CD79A, PLTP, ADD1, FGG, SAA1, KCNH2, DPP4, NPR1, VTN, KIAA0101, FOS, TLR2, PPIG, IL1R1, AR, CYP1A1, SERPINA1, MTR, RBP4, APOA4, CDKN2A, FGF2, EDNRB, ITGA2, VLA-2, CABIN1, SHBG, HMGB1,

			HSP90B2P, CYP3A4, GJA1, CAV1, ESR2, LTA, GDF15, BDNF, CYP2D6, NGF, SP1, TGIF1, SRC, EGF, PIK3CG, HLA-A, KCNQ1, CNR1, FBN1, CHKA, BEST1, CTNNB1, IL2, CD36, PRKAB1, TPO, ALDH7A1, CX3CR1, TH, F9, CH1, TF, HFE, IL17A, PTEN, GSTM1, DMD, GATA4, F13A1, TTR, FABP4, PON3, APOC1, INSR, TNFRSF1B, HTR2A, CSF3, CYP2C9, TXN, CYP11B2, PTH, CSF2, KDR, PLA2G2A, THBS1, GCG, RHOA, ALDH2, TCF7L2, NFE2L2, NOTCH1, UGT1A1, IFNA1, PPARD, SIRT1, GNHR1, PAPPA, ARR3, NPPC, AHSP, PTK2, IL13, MTOR, ITGB2, GSTT1, IL6ST, CPB2, CYP1A2, HNF4A, SLC64A, PLA2G6, TNFSF11, SLC8A1, F2RL1, AKR1A1, ALDH9A1, BGLAP, MTTP, MTRR, SULT1A3, RAGE, C4B, P2RY12, RNLS, CREB1, POMC, RAC1, LMNA, CD59, SCM5A, CYP1B1, MIF, MMP13, TIMP2, CYP19A1, CUP21A2, PTPN22, MYH14, MBL2, SELPLG, AOC3, CTSL1, PCNA, IGF2, ITGB1, CAST, CXCL12, IGHE, KCNE1, TFRC, COL1A1, COL1A2, IL2RB, PLA2G10, ANGPT2, PROCR, NOX4, HAMP, PTPN11, SLCA1, IL2RA, CCL5, IRF1, CF:AR, CA:CA, EIF4E, GSTP1, JAK2, CYP3A5, HSPG2, CCL3, MYD88, VIP, SOAT1, ADRBK1, NR4A2, MMP8, NPR2, GCH1, EPRS, PPARGC1A, F12, PECAM1, CCL4, CERPINA34, CASR, FABP2, TTF2, PROS1, CTF1, SGCB, YME1L1, CAMP, ZC3H12A, AKR1B1, MMP7, AHR, CSF1, HDAC9, CTGF,

			KCNMA1, UGT1A, PRKCA, COMT, S100B, EGR1, PRL, IL15, DRD4, CAMK2G, SLC22A2, CCL11, PGF, THPO, GP6, TACR1, NTS, HNF1A, SST, KCDN1, LOC646627, TBXAS1, CUP2J2, TBXA2R, ADH1C, ALOX12, AHSG, BHMT, GJA4, SLC25A4, ACLY, ALOX5AP, NUMA1, CYP27B1, CYSLTR2, SOD3, LTC4S, UCN, GHRL, APOC2, CLEC4A, KBTBD10, TNC, TYMS, SHC1, LRP1, SOCS3, ADH1B, KLK3, HSD11B1, VKORC1, SERPINB2, TNS1, RNF19A, EPOR, ITGAM, PITX2, MAPK7, FCGR3A, LEEPR, ENG, GPX1, GOT2, HRH1, NR112, CRH, HTR1A, VDAC1, HPSE, SFTPD, TAP2, RMF123, PTK2Bm NTRK2, IL6R, ACHE, GLP1R, GHR, GSR, NQO1, NR5A1, GJB2, SLC9A1, MAOA, PCSK9, FCGR2A, SERPINF1, EDN3, UCP2, TFAP2A, C4BPA, SERPINF2, TYMP, ALPP, CXCR2, SLC3A3, ABCG2, ADA, JAK3, HSPA1A, FASN, FGF1, F11, ATP7A, CR1, GFPA, ROCK1, MECP2, MYLK, BCHE, LIPE, ADORA1, WRN, CXCR3, CD81, SMAD7, LAMC2, MAP3K5, CHGA, IAPP, RHO, ENPP1, PTHLH, NRG1, VEGFC, ENPEP, CEBPB, NAGLU,. F2RL3, CX3CL1, BDKRB1, ADAMTS13, ELANE, ENPP2, CISH, GAST, MYOC, ATP1A2, NF1, GJB1, MEF2A, VCL, BMPR2, TUBB, CDC42, KRT18, HSF1, MYB, PRKAA2, ROCK2, TFP1, PRKG1, BMP2, CTNND1, CTH, CTSS, VAV2, NPY2R, IGFBP2, CD28, GSTA1, PPIA, APOH, S100A8, IL11,

			ALOX15, FBLN1, NR1H3, SCD, GIP, CHGB, PRKCB, SRD5A1,HSD11B2, CALCRL, GALNT2, ANGPTL4, KCNN4, PIK3C2A, HBEGF, CYP7A1, HLA-DRB5, BNIP3, GCKR, S100A12, PADI4, HSPA14, CXCR1, H19, KRTAP19-3, IDDM2, RAC2, YRY1, CLOCK, NGFR, DBH, CHRNA4, CACNA1C, PRKAG2, CHAT, PTGDS, NR1H2, TEK, VEGFB, MEF2C, MAPKAPK2, TNFRSF11A, HSPA9, CYSLTR1, MAT1A, OPRL1, IMPA1, CLCN2, DLD, PSMA6, PSMB8, CHI3L1, ALDH1B1, PARP2,STAR, LBP, ABCC6, RGS2, EFNB2, GJB6, APOA2, AMPD1, DYSF, FDFT1,EMD2, CCR6, GJB3, IL1RL1, ENTPD1, BBS4, CELSR2, F11R, RAPGEF3, HYAL1, ZNF259, ATOX1, ATF6, KHK, SAT1, GGH, TIMP4, SLC4A4, PDE2A, PDE3B, FADS1, FADS2, TMSB4X, TXNIP, LIMS1, RHOB, LY96, FOXO1, PNPLA2,TRH, GJC1, S:C17A5, FTO, GJD2, PRSC1, CASP12, GPBAR1, PXK, IL33, TRIB1, PBX4, NUPR1, 15-SEP, CILP2, TERC, GGT2, MTCO1, UOX, AVP, ANGPLT3
Катаракта	глаз		CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46,

			CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1
Дефицит CDKL-5 или опосредованные заболевания	Головной мозг, ЦНС		CDKL5
Болезнь Шарко-Мари-Тута (СМТ) (типы 1, 2, 3, 4)	Нервная система	Мышцы (дистрофия)	PMP22 (CMT1A и E), MPZ (CMT1B), LITAF (CMT1C), EGR2 (CMT1D), NEFL (CMT1F), GJB1 (CMT1X), MFN2 (CMT2A), KIF1B (CMT2A2B), RAB7A (CMT2B), TRPV4 (CMT2C), GARS (CMT2D), NEFL (CMT2E), GAPD1 (CMT2K), HSPB8 (CMT2L), DYNC1H1, CMT2O), LRSAM1 (CMT2P), IGHMBP2 (CMT2S), MORC2 (CMT2Z), GDAP1 (CMT4A), MTMR2 или SBF2/MTMR13 (CMT4B), SH3TC2 (CMT4C), NDRG1 (CMT4D), PRX (CMT4F), FIG4 (CMT4J), NT-3
Синдром Чедиака-Хигаси	Иммунная система	Кожа, волосы, глаза, нейроны	LYST
Хороидеремия			CHM, REP1,
Хориоретинальная атрофия	глаз		PRDM13, RGR, TEAD1
Хроническая гранулематозная болезнь	Иммунная система		CYBA, CYBB, NCF1, NCF2, NCF4
Хронический кожно-слизистый кандидоз	Иммунная система		AIRE, CARD9, CLEC7A IL12B, IL12B1, IL1F, IL17RA, IL17RC, RORC, STAT1, STAT3, TRAF31P2
Цирроз печени	печень		KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988

Рак толстой кишки (семейный аденоматозный полипоз (FAP) и наследственный неполипозный рак толстой кишки (HNPCC))	ЖКТ		FAP: APC HNPCC: MSH2, MLH1, PMS2, SH6, PMS1
Комбинированный иммунодефицит	Иммунная система		IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228
Колбочковая (палочковая) дистрофия	глаз		AIPL1, CRX, GUA1A, GUCY2D, PITPM3, PROM1, PRPH2, RIMS1, SEMA4A, ABCA4, ADAM9, ATF6, C21ORF2, C8ORF37, CACNA2D4, CDHR1, CERKL, CNGA3, CNGB3, CNNM4, CNAT2, IFT81, KCNV2, PDE6C, PDE6H, POC1B, RAX2, RDH5, RPGRIP1, TTLL5, RetCG1, GUCY2E
Врожденная стационарная ночная слепота	глаз		CABP4, CACNA1F, CACNA2D4, GNAT1, CPR179, GRK1, GRM6, LRIT3, NYX, PDE6B, RDH5, RHO, RLBP1, RPE65, SAG, SLC24A1, TRPM1,
Врожденная непереносимость фруктозы	Метаболизм		ALDOB
Болезнь Кори (болезнь накопления гликогена III типа)	Везде, где накапливается гликоген, особенно в печени, сердце,		AGL

	скелетных мышцах		
Помутнение и дистрофия роговицы	глаз		APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD
Врожденная плоская роговица			KERA, CNA2
Синдром кошачьего крика, также известный как синдром 5p и болезнь кошачьего крика			Делеции, затрагивающие только полосу 5p15.2 на всем коротком плече хромосомы 5, т.е. CTNND2, TERT,
Муковисцидоз (МВ)	Легкие и дыхательная система	Поджелудочная железа, печень, пищеварительная система, репродуктивная система, экзокринные железы,	CTFR, ABCC7, CF, MRP7, SCNN1A, описанные в WO2015157070
Диабетическая нефропатия	почка		Гремлин, 12/15- липоксигеназа, TIM44,
Синдром Дента (типы 1 и 2)	Почка		Тип 1: CLCN5, Тип 2: ORCL
Дентато-рубро-	ЦНС,		Атрофин-1 и Atn1

паллидо-льюисова атрофия (DRPLA) (также известная как синдром Хау-Ривер и болезнь Наито – Оянаги)	головной мозг, мышцы		
Синдром Дауна	различные		Трисомия по хромосоме 21
Наркотическая зависимость	Головной мозг		Prkce; Drd2; Drd4; ABAT; GRIA2;Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1
Синдром Дуэйна (типы 1, 2 и 3, включая подгруппы A, B и C). Другие названия этого состояния включают синдром ретракции Дуэйна (или синдром РД), синдром ретракции глаз, синдром ретракции, врожденный синдром ретракции и синдром Штиллинга–Тюрка–Дуэйна	глаз		CHN1, вставки на хромосомах 4 и 8
Мышечная	мышца	Сердечно-	DMD, BMD, ген дистрофина, интрон,

дистрофия Дюшенна (DMD)		сосудистая, дыхательная	фланкирующий экзон 51 гена DMD, мутации экзона 51 в гене DMD, см. также WO2013163628 и публикации патента США 20130145487
Синдром Эдвардса (трисомия 18)			Полная или частичная трисомия по хромосоме 18
Синдром Элерса-Данлоса (типы I-VI)	Различные в зависимости от типа: включая опорно-двигательный аппарат, глаз, сосудистую систему, иммунную систему и кожу		COL5A1, COL5A2, COL1A1, COL3A1, TNXB, PLOD1, COL1A2, FKBP14 и ADAMTS2
Мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса	мышца		LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A
Усиленный синдром S-конуса	глаз		NR2E3, NRL
Болезнь Фабри	Различные - включая кожу, глаза и желудочно-кишечный тракт, почки, сердце, мозг, нервную		GLA

	систему		
Плече-лопаточно-лицевая миопатия	мышцы		FSHMD1A, FSHD1A, FRG1,
Фактор H и подобный фактору H-белок 1	кровь		HF1, CFH, HUS
Тромбофилия, вызванная лейденской мутацией гена фактора V, и дефицит фактора V	кровь		Фактор V (F5)
Дефицит фактора V и фактора VII	кровь		MCFD2
Дефицит фактора VII	кровь		F7
Дефицит фактора X	кровь		F10
Дефицит фактора XI	кровь		F11
Дефицит фактора XII	кровь		F12, HAF
Дефицит фактора XIIIA	кровь		F13A1, F13A
Дефицит фактора XIIIB	кровь		F13B
Семейная гиперхолестеринемия	Сердечно-сосудистая система		APOB, LDLR, PCSK9

Семейная средиземноморская лихорадка (FMF), также называемая рецидивирующим полисерозитом или семейным пароксизмальным полисерозитом	Различные органы/ткани с серозными или синовиальными оболочками, кожа, суставы	Сердце, почки, головной мозг/ЦНС, репродуктивные органы	MEFV
Анемия Фанкони	Различные – кровь (анемия), иммунная система, когнитивные функции, почки, глаза, опорно-двигательный аппарат		FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCC, FANCG, RAD51, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BACH1, FANCJ, FANCB, FANCD1, FANCD2, FANCD, FAD, FANCE, FACE, FANCF, FANCI, ERCC4, FANCL, FANCM, PALB2, RAD51C, SLX4, UBE2T, FANCB, XRCC9, PHF9, KIAA1596
Синдром Фанкони Типы I (дебют в детстве) и II (дебют во взрослом возрасте)	почки		FRTS1, GATM
Синдром ломкой Х-хромосомы и связанные с ним нарушения	головной мозг		FMR1, FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5

Синдром умственной отсталости, сцепленной с ломкой хромосомой X, тип E (также известный как синдром Мартина-Белл)	Головной мозг, нервная система		FMR1
Атаксия Фридрейха (FRDA)	Головной мозг, нервная система	сердце	FXN/X25
Эндотелиальная дистрофия Фукса	Глаз		TCF4; COL8A2
Галактоземия	Нарушение углеводного обмена	Различные места накопления галактозы – печень, мозг, глаза	GALT, GALK1, и GALE
Эпителиальный рак желудочно-кишечного тракта, рак ЖКТ			CISH
Болезнь Гоше (типы 1, 2 и 3, а также другие необычные формы, которые могут не подпадать под	Нарушение жирового обмена	Различные - печень, селезенка, кровь, ЦНС, костная система	GBA

эти типы)			
Синдром Гришелли			
Глаукома	глаз		MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A, описанные в WO2015153780
Гломерулосклероз	почка		CC-хемокиновый лиганд 2
Болезни накопления гликогена типы I-VI — см. также болезнь Кори, болезнь Помпе, болезнь Мак-Ардля, болезнь Герса и болезнь Гирке	Нарушения обмена веществ		SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM, см. также болезнь Кори, болезнь Помпе, болезнь Мак-Ардля, болезнь Герса и болезнь Гирке
Дефицит гликолитических ферментов эритроцитов	кровь		любые мутации в гене фермента гликолитического пути, включая мутации в генах гексокиназ I и II, глюкокиназы, фосфоглюкозоизомеразы, фосфофруктокиназы, альдолазы B, триозофосфатизомеразы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, фосфоглицерокиназы, фосфоглицератмутазы, энолазы I, пируваткиназы
Болезнь Хартнупа	Синдром мальабсорбции	Различные - головной мозг, желудочно	SLC6A19

		- кишечный тракт, кожа,	
Потеря слуха	ухо		NOX3, Hes5, BDNF,
Гемохроматоз (HH)	Нарушение регуляции всасывания железа	Везде, где накапливается железо, в печени, сердце, поджелудочной железе, суставах, гипофизе	HFE и H63D
Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз	кровь		PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3
Геморрагические расстройства	кровь		PI, ATT, F5
Болезнь Герса (болезнь накопления гликогена, тип VI)	печень	мышца	PYGL
Наследственный ангионевротический отек (HAO)			каликреин B1
Наследственная геморрагическа	Кожа и слизистые		ACVRL1, ENG и SMAD4

я телеангиэктазия (синдром Ослера-Вебера-Рендю)	оболочки		
Наследственный сфероцитоз	кровь		NK1, EPB42, SLC4A1, SPTA1, и SPTB
Наследственная персистенция фетального гемоглобина	кровь		HBG1, HBG2, BCL11A, промоторная область HBG 1 и/или 2 (в CCAAT-боксе)
Гемофилия (гемофилия A (классическая), B (она же болезнь Кристмаса) и C)	кровь		A: FVIII, F8C, HEMA B: FVIX, HEMB, FIX C: F9, F11
Аденома печени	печень		TCF1, HNF1A, MODY3
Печеночная недостаточность, ранний дебют и неврологические расстройства	печень		SCOD1, SCO1
Дефицит печеночной липазы	печень		LIPC
Гепатобластома, рак и карциномы	печень		CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5
Синдром Германски-Пудлака	Кожа, глаза, кровь, легкие,		HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, HPS7, DTNBP1, BLOC1, BLOC1S2, BLOC3

	почки, кишечник		
Восприимчивость к ВИЧ или ВИЧ-инфекция	Иммунная система		IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCCKR5 (CCR5), указанные в WO2015148670A1
Голопрозэнцефалия (HPE) (алобарная, полудолевая и лобарная)	головной мозг		ACVRL1, ENG, SMAD4
Гомоцистинурия	Метаболическое заболевание	Различные - соединительная ткань, мышцы, ЦНС, сердечно-сосудистая система	CBS, MTHFR, MTR, MTRR, и MMADHC
HPV			HPV16 и HPV18 E6/E7
HSV1, HSV2, и сопутствующий кератит	глаз		Гены HSV1 (немедленные ранние и поздние гены HSV-1 (UL1, 1,5, 5, 6, 8, 9, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 26,5, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 42, 48, 49,5, 50, 52, 54, S6, RL2, RS1, описанные в WO2015153789, WO2015153791
Синдром Хантера (он же мукополисахаридоз II типа)	Лизосомная болезнь накопления	Различные - печень, селезенка, глаз, суставы, сердце, мозг, скелет	IDS

Болезнь Гентингтона (БГ) и нарушения, подобные БГ	Головной мозг, нервная система		HD, HTT, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17, PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; и TGM2, и описанные в WO2013130824, WO2015089354
Синдром Гурлер (также известный как мукополисахаридоз типа I H, МПС IH)	Лизосомная болезнь накопления	Различные - печень, селезенка, глаз, суставы, сердце, мозг, скелет	IDUA, α-L-идуронидаза
Синдром Гурлер-Шейе (он же мукополисахаридоз типа I H-S, МПС I H-S)	Лизосомная болезнь накопления	Различные - печень, селезенка, глаз, суставы, сердце, мозг, скелет	IDUA, α-L-идуронидаза
дефицит гиалуронидазы (также известный как МПС IX)	Мягкие и соединительные ткани		HYAL1
гипер-IgM-синдром	Иммунная система		CD40L
Вызванное гипертонией поражение почек	почка		Минералокортикоидный рецептор
Иммунодефициты	Иммунная система		CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4,

			TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACI
Врожденные нарушения метаболизма: в том числе нарушения цикла мочевины, органические ацидемии), дефекты окисления жирных кислот, аминоацидопатии, нарушения углеводов, митохондриальные нарушения	Нарушения обмена веществ, печень	Различные органы и клетки	См. также: нарушения углеводного обмена (например, галактоземия), нарушения метаболизма аминокислот (например, фенилкетонурия), метаболизм жирных кислот (например, дефицит MCAD), нарушения цикла мочевины (например, цитруллинемия), органические ацидемии (например, болезнь кленового сиропа), митохондриальные нарушения (например, MELAS), пероксисомные патологии (например, синдром Цельвегера)
Воспаление	Различные		IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL- 17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); II-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; NOD2/CARD15 для ВЗК; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3cl1
Воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона)	ЖКТ	Суставы, кожа	NOD2, IRGM, LRRK2, ATG5, ATG16L1, IRGM, GATM, ECM1, CDH1, LAMB1, HNF4A, GNA12, IL10, CARD9/15. CCR6, IL2RA, MST1, TNFSF15, REL, STAT3, IL23R, IL12B, FUT2
Интерстициаль	почка		Рецептор TGF-β типа II

ный почечный фиброз			
Синдром Джоба (также известный как гипер-IgE-синдром)	Иммунная система		STAT3, DOCK8
Ювенильный ретиношизис	глаз		RS1, XLRS1
Синдром Кабуки 1			MLL4, KMT2D
Болезнь Кеннеди (также известная как спинобульбарная мышечная атрофия)	Мышцы, мозг, нервная система		SBMA/SMAX1/AR
Синдром Клайнфельтера	Различные - особенно те, которые участвуют в развитии мужских признаков		Дополнительная X-хромосома у мужчин
Болезнь Лафора	Головной мозг, ЦНС		EMP2A и EMP2B
Врожденный амавроз Лебера	глаз		CRB1, RP12, CORD2, CRD, CRX, IMPDH1, OTX2, AIPL1, CABP4, CCT2, CEP290, CLUAP1, CRB1, CRX, DTHD1, GDF6, GUCY2D, IFT140, IQCB1, KCNJ13, LCA5, LRAT, NMNAT1, PRPH2, RD3, RDH12, RPE65, RP20, RPGRIP1, SPATA7, TULP1, LCA1, LCA4, GUC2D, CORD6, LCA3,

Синдром Леша—Найхана	Метаболическое заболевание	Различные – суставы, когнитивные функции, мозг, нервная система	HPRT1
Лейкопения и нарушения лейкоцитов	кровь		ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4
Лейкемия	Кровь		TAL1, TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMPS, AF10, ARHGEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, CEBPA, CEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, ZNF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B, AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR, CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN
конечностно-поясные мышечные дистрофии	мышца		LGMD
Синдром Лоу	головной мозг, глаза, почки		OCRL

Волчаночный гломерулонефрит	почка		MAPK1
Болезнь Мачадо-Джозефа (также известная как спиноцеребеллярная атаксия 3 типа)	Головной мозг, ЦНС, мышцы		ATX3
Макулярная дегенерация	глаз		ABC4, CBC1, CHM1, APOE, C1QTNF5, C2, C3, CCL2, CCR2, CD36, CFB, CFH, CFHR1, CFHR3, CNGB3, CP, CRP, CST3, CTSD, CX3CR1, ELOVL4, ERCC6, FBLN5, FBLN6, FSCN2, HMCN1, HTRA1, IL6, IL8, PLEKHA1, PROM1, PRPH2, RPGR, SERPING1, TCOF1, TIMP3, TLR3
Макулярная дистрофия	глаз		BEST1, C1QTNF5, CTNNA1, EFEMP1, ELOVL4, FSCN2, GUCA1B, HMCN1, IMPG1, OTX2, PRDM13, PROM1, PRPH2, RP1L1, TIMP3, ABCA4, CFH, DRAM2, IMG1, MFSD8, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2
Семейные доминантные друзы	глаз		EFEMP1, FBLN3
Болезнь кленового сиропа	Метаболическое заболевание		BCKDHA, BCKDHB, и DBT
Синдром Марфана	Соединительная ткань	Опорно-двигательный аппарат	FBN1

Синдром Марото-Лами (также известный как МПС VI)	Опорно-двигательный аппарат, нервная система	печень, селезенка	ARSB
Болезнь Мак-Ардля (болезнь накопления гликогена V типа)	Болезнь накопления гликогена	мышца	PYGM
Медуллярная кистозная болезнь почек	почка		UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2
Метахроматическая лейкодистрофия	Лизосомная болезнь накопления	Нервная система	ARSA
Метилмалоновая ацидемия (MMA)	Метаболическое заболевание		MMAA, MMAB, MUT, MMACHC, MMADHC, LMBRD1
Синдром Моркио (также известный как МПС IV A и B)	Соединительная ткань, кожа, кости, глаза	сердце	GALNS
Мукополисахаридозы (типы I H/S, I H, II, III A B и C, I S, IVA и B, IX, VII и VI)	Лизосомная болезнь накопления – поражает различные органы/ткани		См. также синдром Гурлер/Шейе, болезнь Гурлер, синдром Санфилиппо, синдром Шейе, синдром Моркио, дефицит гиалуронидазы, синдром Слая и синдром Марото-Лами
Мышечная атрофия	мышца		VAPB, VAPC, ALS8, SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1

Мышечная дистрофия	мышца		FKRP, MDC1C, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1D, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2A, LGMD2H, FKRP, MDC1C, LGMD2I, TTN, CMD1G, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1C, SEPN1, SELN, RSMD1, PLEC1, PLTN, EBS1
Миотоническая дистрофия (тип 1 и тип 2)	Мышцы	Глаза, сердце, эндокринная система	CNBP (тип 2) и DMPK (тип 1)
Неоплазия			PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR-альфа; PPAR гамма; WT1 (опухоль Вильмса); семейство рецепторов FGF члены (5 членов: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (ретинобластома); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (рецептор андрогена); TSG101; IGF; рецептор IGF; Igf1 (4 варианта); Igf2 (3 варианта); рецептор Igf 1; рецептор Igf 2; Bax; Bcl2; семейство каспаз (9 членов: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
Нейрофиброматоз	головной		NF1, NF2

оз (NF) (NF1, ранее NF Реклингхаузена и NF2)	мозг, спинной мозг, нервы и кожа		
Болезнь Ниманна-Пика (типы A, B и C)	Лизосомная болезнь накопления	Различные места накопления сфингомиелина, особенно селезенка, печень, кровь, ЦНС	Типы A и B: SMPD1; тип C: NPC1 или NPC2
синдром Нунан	Различные – опорно-двигательный аппарат, сердце, глаза, половые органы, кровь		PTPN11, SOS1, RAF1 и KRAS
Болезнь Норри или X-сцепленная семейная экссудативная витреоретинопатия	глаз		NDP
Макулярная дистрофия Северной Каролины	глаз		MCDR1
Несовершенны	кости,		COL1A1, COL1A2, CRTAP, P3H

й остеогенез (НО) (типы I, II, III, IV, V, VI, VII)	опорно-двигательный аппарат		
Osteopetrosis	кости		LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1
Синдром Патау (трисомия 13)	Головной мозг, сердце, костная система		Дополнительная копия хромосомы 13
Болезнь Паркинсона (БП)	Головной мозг, нервная система		SNCA (PARK1), UCHL1 (PARK 5), и LRRK2 (PARK8), (PARK3), PARK2, PARK4, PARK7 (PARK7), PINK1 (PARK6); х-синуклеин, DJ-1, Parkin, NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, NCAP, PRKN, PDJ, DBH, NDUFV2
Узорчатая дистрофия пигментного эпителия сетчатки	глаз		RDS/периферин
Фенилкетонурия (PKU)	Нарушение обмена веществ	Различные из-за накопления фенилаланина, фенилкетонов в тканях и ЦНС	PAH, PKU1, QDPR, DHPR, PTS
Поликистоз	Почки,		FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2,

почек и заболевания печени	печень		PKD4, PKDTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63
Болезнь Помпе	Болезнь накопления гликогена	Различные – сердце, печень, селезенка	GAA
Порфирия (на самом деле относится к группе различных заболеваний, каждая из которых имеет специфичное нарушение процесса синтеза гема)	Различные предшественники гема накапливаются		ALAD, ALAS2, CPOX, FECH, HMBS, PPOX, UROD, или UROS
задняя полиморфная дистрофия роговицы	глаза		TCF4; COL8A2
Первичная гипероксалурия (например, тип 1)	Различные – глаза, сердце, почки, костная система		LDHA (лактатдегидрогеназа A) и гидроксикислотная оксидаза 1 (HAO1)
Первичная открытоугольная глаукома (POAG)	глаза		MYOC
Первичный склерозирующи	Печень, желчный		TCF4; COL8A2

й холангит	пузырь		
Прогерия (также называемая синдромом прогерии Хатчинсона-Гилфорда)	Все		LMNA
Синдром Прадера-Вилли	Опорно-двигательный аппарат, головной мозг, репродуктивная и эндокринная системы		Делеция области короткого плеча хромосомы 15, включая UBE3A
Рак предстательной железы	предстательная железа		HOXB13, MSMB, GPRC6A, TP53
Дефицит пируватдегидрогеназы	Головной мозг, нервная система		PDHA1
Карцинома почки / почечная карцинома	почка		RLIP76, VEGF
Синдром Ретта	Головной мозг		MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, x-синуклеин, DJ-1
Пигментный ретинит (RP)	глаз		ADIPOR1, ABCA4, AGBL5, ARHGEF18, ARL2BP, ARL3, ARL6, BEST1, BBS1, BBS2, C2ORF71, C8ORF37, CA4, CERKL, CLRN1, CNGA1, CMGB1, CRB1, CRX, CYP4V2, DHDDS, DHX38, EMC1, EYS,

			FAM161A, FSCN2, GPR125, GUCA1B, HK1, HPRPF3, HGSNAT, IDH3B, IMPDH1, IMPG2, IFT140, IFT172, KLHL7, KIAA1549, KIZ, LRAT, MAK, MERTK, MVK, NEK2, NUROD1, NR2E3, NRL, OFD1, PDE6A, PDE6B, PDE6G, POMGNT1, PRCD, PROM1, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PRPH2, RPB3, RDH12, REEP6, RP39, RGR, RHO, RLBP1, ROM1, RP1, RP1L1, RPY, RP2, RP9, RPE65, RPGR, SAMD11, SAG, SEMA4A, SLC7A14, SNRNP200, SPP2, SPATA7, TRNT1, TOPORS, TTC8, TULP1, USH2A, ZFN408, ZNF513, см. также 20120204282
Синдром Шейе (также известный как мукополисахаридоз типа I S (МПС I-S))	Различные - печень, селезенка, глаз, суставы, сердце, мозг, скелет		IDUA, α-L-идуронидаза
Шизофрения	Головной мозг		Нейрегулин1 (Nrg1); Erb4 (рецептор нейрегулина); Комплексин1 (Cplx1); Tph1 триптофангидроксилаза; Tph2 Триптофангидроксилаза 2; нейрексин 1; GSK3; GSK3a; GSK3b; 5-HTT (Slc6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1); TCF4; COL8A2
Связанные с секретазой заболевания	Различные		APH-1 (альфа и бета); PSEN1; NCSTN; PEN-2; Nos1, Parp1, Nat1, Nat2, CTSB, APP, APH1B, PSEN2, PSENEN, BACE1, ITM2B, CTSD, NOTCH1, TNF, INS, DYT10, ADAM17, APOE, ACE, STN,

			TP53, IL6, NGFR, IL1B, ACHE, CTNNB1, IGF1, IFNG, NRG1, CASP3, MAPK1, CDH1, APBB1, HMGCR, CREB1, PTGS2, HES1, CAT, TGFB1, ENO2, ERBB4, TRAPPC10, MAOB, NGF, MMP12, JAG1, CD40LG, PPARG, FGF2, LRP1, NOTCH4, MAPK8, PREP, NOTCH3, PRNP, CTSG, EGF, REN, CD44, SELP, GHR, ADCYAP1, INSR, GFAP, MMP3, MAPK10, SP1, MYC, CTSE, PPARA, JUN, TIMP1, IL5, IL1A, MMP9, HTR4, HSPG2, KRAS, CYCS, SMG1, IL1R1, PROK1, MAPK3, NTRK1, IL13, MME, TKT, CXCR2, CHRM1, ATXN1,PAWR, NOTCJ2, M6PR, CYP46A1, CSNK1D, MAPK14, PRG2, PRKCA, L1 CAM, CD40, NR1I2, JAG2, CTNND1, CMA1, SORT1, DLK1, THEM4, JUP, CD46, CCL11, CAV3, RNASE3, HSPA8, CASP9, CYP3A4, CCR3, TFAP2A, SCP2, CDK4, JOF1A, TCF7L2, B3GALTL, MDM2, RELA, CASP7, IDE, FANP4, CASK, ADCYAP1R1, ATF4, PDGFA, C21ORF33, SCG5, RMF123, NKFB1, ERBB2, CAV1, MMP7, TGFA, RXRA, STX1A, PSMC4, P2RY2, TNFRSF21, DLG1, NUMBL, SPN, PLSCR1, UBQLN2, UBQLN1, PCSK7, SPON1, SILV, QPCT, HESS, GCC1
Селективный дефицит IgA	Иммунная система		Тип 1: MSH5; Тип 2: TNFRSF13B
Тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) и	Иммунная система		JAK3, JAKL, DCLRE1C, ARTEMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4, идентифицированные в публикациях

SCID-X1, и ADA-SCID			заявок на патенты США №№ 20110225664, 20110091441, 20100229252, 20090271881 и 20090222937;
Серповиднокле точная анемия	кровь		HBB, BCL11A, BCL11Ae, цис-регуляторные элементы локуса B-глобина, промотор HBG 1/2, дистальная область CCAAT-бокса HBG между -92 и -130 от сайта начала транскрипции HBG, описанные в WO2015148863, WO 2013/126794, публикации патента США № 20110182867
Синдром Слая (он же МПС VII)			GUSB
Спиноцеребелл ярные атаксии (типы SCA 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 и 17)			ATXN1, ATXN2, ATX3
Дистрофия глазного дна Сорсби	глаз		TIMP3
Болезнь Штаргардта	глаз		ABCR, ELOVL4, ABCA4, PROM1
Болезнь Тея-Сакса	Лизосомная болезнь накопления	Различные – ЦНС, головной мозг, глаз	HEX-A
Талассемия (альфа, бета, дельта)	кровь		HBA1, HBA2 (альфа), HBB (бета), HBB и HBD (дельта), LCRB, BCL11A, BCL11Ae, цис-регуляторные элементы локуса B-глобина, промотор HBG 1/2, описанные в WO 2015148860, публикации патента США № 20110182867, 2015/148860

Аплазия тимуса (синдром Ди Джорджи; синдром делеции 22q11.2)	Иммунная система, тимус		делеция от 30 до 40 генов в середине хромосомы 22 в месте, известном как 22q11.2, включая TBX1, DGCR8
Транстиретиновый амилоидоз (ATTR)	печень		TTR (транстиретин)
триметиламинурия	Метаболическое заболевание		FMO3
Болезни экспансии тринуклеотидных повторов (в целом)	Различные		HTT; SBMA/SMAX1/AR; FXN/X25 ATX3; ATXN1; ATXN2; DMPK; атрофин-1 и Atn1 (DRPLA Dx); CBP (Creb-BP - глобальная нестабильность); VLDLR; Atxn7; Atxn10; FEN1, TNRC6A, PABPN1, JPH3, MED15, ATXN1, ATXN3, TBP, CACNA1A, ATXN80S, PPP2R2B, ATXN7, TNRC6B, TNRC6C, CELF3, MAB21L1, MSH2, TMEM185A, SIX5, CNPY3, RAXE, GNB2, RPL14, ATXN8, ISR, TTR, EP400, GIGYF2, OGG1, STC1, CNDP1, C10ORF2, MAML3, DKC1, PAXIP1, CASK, MAPT, SP1, POLG, AFF2, THBS1, TP53, ESR1, CGGBP1, ABT1, KLK3, PRNP, JUN, KCNN3, BAX, FRAXA, KBTBD10, MBNL1, RAD51, NCOA3, ERDA1, TSC1, COMP, GGLC, RRAD, MSH3, DRD2, CD44, CTCF, CCND1, CLSPN, MEF2A, PTPRU, GAPDH, TRIM22, WT1, AHR, GPX1, TPMT, NDP, ARX, TYR, EGR1, UNG, NUMBL, FABP2, EN2, CRYGC,

			SRP14, CRYGB, PDCD1,HOXA1, ATXN2L, PMS2, GLA, CBL, FTH1, IL12RB2, OTX2, HOXA5, POLG2, DLX2, AHRR, MANF, RMEM158, см. также 20110016540
Синдром Тернера (XO)	Различные – репродуктивные органы и половые признаки, сосудистая сеть		Моносомия X
Туберозный склероз	ЦНС, сердце, почки		TSC1, TSC2
Синдром Ушера (типы I, II и III)	Уши, глаза		ABHD12, CDH23, CIB2, CLRN1, DFNB31, GPR98, HARS, MYO7A, PCDH15, USH1C, USH1G, USH2A, USH11A, описанные в WO2015134812A1
Велокардиофациальный синдром (также известный как синдром делеции 22q11.2, синдром Ди Джорджи, синдром конотрункальных аномалий лица (CTAF), синдром Шпринтцена или синдром Такао)	Различные – скелет, сердце, почки, иммунная система, головной мозг		Многие гены удалены, COM, TBX1 и другие связаны с симптомами

Болезнь Гирке (болезнь накопления гликогена I типа)	Болезнь накопления гликогена	Различные – печень, почки	G6PC и SLC37A4
Синдром фон Гиппеля-Линдау	Различные – нарушение регуляции роста клеток	ЦНС, почки, глаза, внутренние органы	VHL
Болезнь фон Виллебранда (типы I, II и III)	кровь		VWF
Болезнь Вильсона	Различные - Болезнь накопления меди	Печень, мозг, глаза и другие ткани, в которых накапливается медь	ATP7B
Синдром Вискотта-Олдрича	Иммунная система		WAS
Пигментная ксеродерма	Кожа	Нервная система	POLH
Синдром XXX	Эндокринная система, головной мозг		Трисомия по X-хромосоме

Таблица 5. Иллюстративные гены, контролирующие клеточные функции	
КЛЕТОЧНАЯ ФУНКЦИЯ	ГЕНЫ

Сигналинг PI3K/AKT	PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2; PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2; ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7; YWHAZ; ILK; TP53; RAF1; IKBKG; RELB; DYRK1A; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2; TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; HSP90AA1; RPS6KB1
Сигналинг ERK/MAPK	PRKCE; ITGAM; ITGA5; HSPB1; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1; PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN; EIF4EBP1; PPARG; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ; PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1; PAK3; ITGB3; ESR1; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK
Сигналинг глюкокортикоидного рецептора	RAC1; TAF4B; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1; MAPK1; SMAD3; AKT2; IKBKB; NCOR2; UBE2I; PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2; MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRIP1; KRAS; MAPK13; RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1; PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2; SERPINE1; NCOA3; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1; STAT1; IL6; HSP90AA1

Сигналинг аксонального поиска пути	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12; IGF1; RAC1; RAP1A; EIF4E; PRKCZ; NRP1; NTRK2; ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKCI; PTK2; CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11; PRKD1; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1; GLI1; WNT5A; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B; AKT3; PRKCA
Сигналинг рецептора эфрина Сигналинг актинового цитоскелета	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; GRK6; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2; DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14; CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4; AKT3; SGK
	ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6; ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8; F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; VAV3; SGK

Сигналинг при болезни Гентингтона	PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; TGM2; MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SP1; CAPN2; PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKCI; HSPA5; REST; GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKD1; GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2; HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A; HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1; PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX; ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3
Сигналинг апоптоза	PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1; BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB; CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2; CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2; BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK; CASP3; BIRC3; PARP1
Сигналинг В-клеточного рецептора	RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1; MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9; EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN; GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1
Сигналинг при диапедезе	ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA; RAC1; RAP1A; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11; MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB; MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK; MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2; CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK; CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9

Сигналинг интегрина	ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAP1A; TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2; CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2; CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3
Сигналинг при ответе острой фазы	IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1; TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN; AKT3; IL1R1; IL6
Сигналинг PTEN	ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11; MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA; CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1; MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR; RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1; NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2; GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1
Сигналинг p53 Сигналинг арил-углеводородного рецептора	PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A; BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1; PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9; CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A; HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1; SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN; SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3

	HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; SP1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1; SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1; MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1; SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF; CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1; CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1; HSP90AA1
Сигналинг метаболизм ксенобиотиков	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ALDH1A1; MAPK3; NRIP1; KRAS; MAPK13; PRKCD; GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1A; MAPK14; TNF; RAF1; CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1; NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1; HSP90AA1
Сигналинг SAPK/JNK	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1; GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; FADD; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; SGK
Сигналинг PPAr/RXR	PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN; RXRA; MAPK1; SMAD3; GNAS; IKBKB; NCOR2; ABCA1; GNAQ; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8; IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1A; NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1; ADIPOQ

Сигналинг NF-KB	IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2; KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF; INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFKB1; TLR2; BCL10; GSK3B; AKT3; TNFAIP3; IL1R1
Сигналинг нейрегулина	ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI; CDKN1B; STAT5B; PRKD1; MAPK3; ITGA1; KRAS; PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2; ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3; EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL; AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1
Сигналинг Wnt и бета-катенина	CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1E; GJA1; SMO; AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A; WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK; LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1; PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFBR1; CCND1; GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; SOX2
Сигналинг рецептора инсулина	PTEN; INS; EIF4E; PTPN1; PRKCZ; MAPK1; TSC1; PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1; SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; RPS6KB1
Сигналинг IL-6	HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3; MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6

Печеночный холестаз	PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA; RXRA; IKBKB; PRKCI; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBKG; RELB; MAP3K7; IL8; CHUK; NR1H2; TJP2; NFKB1; ESR1; SREBF1; FGFR4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6
Сигналинг IGF-1	IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2; PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A; YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3; FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1
Ответ на опосредованный NRF2 окислительный стресс	PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1; NQO1; PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1; GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1
Фиброз печени/активация Звездчатых клеток печени	EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF; SMAD3; EGFR; FAS; CSF1; NFKB2; BCL2; MYH9; IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8; PDGFRA; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; VEGFA; BAX; IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9
Сигналинг PPAR	EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKBKB; NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK3; NRIP1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2; PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA; MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1
Сигналинг Fc-эпсилон RI	PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD; MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3; VAV3; PRKCA

Сигналинг сопряженного с G-белком рецептора	PRKCE; RAP1A; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; GNAQ; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3; PRKCA
Метаболизм инозитолфосфата	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
Сигналинг PDGF	EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC; PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2; PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC; JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2
Сигналинг VEGF	ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF; AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN; RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN; VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA
Сигналинг натуральных клеток-киллеров	PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11; KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6; PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3; VAV3; PRKCA
Клеточный цикл: регуляция контрольной точки G1/S	HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC; ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RB1; HDAC11; HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1; E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1; GSK3B; RBL1; HDAC6

Сигналинг Т-клеточного рецептора	RAC1; ELK1; MAPK1; IKBKB; CBL; PIK3CA; FOS; NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10; JUN; VAV3
Сигналинг рецептора гибели клетки	CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKBKB; FADD; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8; DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBKG; RELB; CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3; BIRC3
Сигналинг FGF	RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4; AKT3; PRKCA; HGF
Сигналинг GM-CSF	LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3; ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3; STAT1
Сигналинг при боковом амиотрофическом склерозе	BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2; PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1; PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5A; CASP1; APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3
Сигналинг JAK/Stat	PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3; STAT1
Метаболизм никотината и никотинамида	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2; MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK

Сигналинг хемокина	CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ; CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13; RHOA; CCR3; SRC; PPP1CC; MAPK14; NOX1; RAF1; MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA
Сигналинг IL-2	ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2; JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3
Долговременная потенциация синаптической передачи	PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS; PRKCI; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3; KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA; YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA
Сигналинг эстрогенового рецептора	TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2; SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1; HDAC3; PPARGC1A; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP; MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2
Путь убиквитинирования белка	TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4; CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7; USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8; USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3
Сигналинг IL-10	TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SP1; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF; IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1; JUN; IL1R1; IL6
Активация VDR/RXR	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1; NCOR2; SP1; PRKCI; CDKN1B; PRKD1; PRKCD; RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1; LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA
Сигналинг TGF-бета	EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5
Сигналинг Toll-подобных рецепторов	IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13;

	RELA; TLR4; MAPK14; IKBKG; RELB; MAP3K7; CHUK; NFKB1; TLR2; JUN
Сигналинг p38 MAPK	HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS; CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2; MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFBR1; MYC; ATF4; IL1R1; SRF; STAT1
Сигналинг нейротрофина/TRK	NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; CDC42; JUN; ATF4
Активация FXR/RXR	INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8; APOB; MAPK10; PPARG; MTTP; MAPK9; PPARGC1A; TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1
Долговременная потенциация синаптической передачи	PRKCE; RAP1A; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1; PRKCI; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; ATF4; PRKCA
Кальциевый сигналинг	RAP1A; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1; CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11; HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4; HDAC6
Сигналинг EGF	ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1
Сигналинг гипоксии в сердечно-сосудистой системе	EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE2I; CREB1; ARNT; HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM; VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1
Опосредованное LPS/IL-1 ингибирование функции RXR	IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1; MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1
Активация LXR/RXR	FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA; NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1; SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9

Процессинг амилоидов	PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2; CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1; PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP
Сигналинг IL-4	AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1; PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; FRAP1; AKT3; RPS6KB1
Клеточный цикл: регуляция контрольной точки повреждения ДНК G2/M	EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC; CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A
Сигнализация оксида азота в сердечно-сосудистой системе	KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; CAV1; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1; VEGFA; AKT3; HSP90AA1
Метаболизм пуринов	NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4; PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C; NT5E; POLD1; NME1
цАМФ-опосредованный сигналинг	RAP1A; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3; SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4
Митохондриальная дисфункция Notch-сигналинг	SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9; CASP9; PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3 HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2; PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4
Путь стресса эндоплазматического ретикулума Метаболизм пиримидинов	HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4; EIF2AK3; CASP3 NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B; NT5E; POLD1; NME1
Сигналинг при болезни Паркинсона	UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7; PARK2; CASP3
Сердечный и бета-адренергический сигналинг	GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C

Гликолиз/глюконеогенез	HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1
Сигналинг интерферона	IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3
Сигналинг Sonic Hedgehog	ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1B
Метаболизм глицерофосфолипидов	PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2
Деградация фосфолипидов	PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2
Метаболизм триптофана	SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1
Деградация лизина	SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C
Путь эксцизионной репарации нуклеотидов	ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1
Метаболизм крахмала и сахарозы	UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1
Метаболизм аминосахаров	NQO1; HK2; GCK; HK1
Метаболизм арахидоновой кислоты	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
Сигналинг циркадного ритма	CSNK1E; CREB1; ATF4; NR1D1
Система коагуляции	BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3
Сигналинг дофаминового рецептора	PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C
Метаболизм глутатиона	IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1
Метаболизм глицеролипидов	ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2

Метаболизм линолевой кислоты	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
Метаболизм метионина	DNMT1; DNMT3B; AHCY; DNMT3A
Метаболизм пирувата	GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA
Метаболизм аргинина и пролина	ALDH1A1; NOS3; NOS2A
Сигналинг эйкозаноидов	PRDX6; GRN; YWHAZ
Метаболизм фруктозы и маннозы	HK2; GCK; HK1
Метаболизм галактозы	HK2; GCK; HK1
Биосинтез стильбена, кумарина и лигнина	PRDX6; PRDX1; TYR
Путь презентации антигена	CALR; B2M
Биосинтез стероидов	NQO1; DHCR7
Метаболизм бутаноата	ALDH1A1; NLGN1
Цитратный цикл	IDH2; IDH1
Метаболизм жирных кислот	ALDH1A1; CYP1B1
Метаболизм глицерофосфолипидов	PRDX6; CHKA
Метаболизм гистидина	PRMT5; ALDH1A1
Метаболизм инозитола	ERO1L; APEX1
Метаболизм ксенобиотиков цитохромом р450	GSTP1; CYP1B1

Метаболизм метана	PRDX6; PRDX1
Метаболизм фенилаланина	PRDX6; PRDX1
Метаболизм пропаноата	ALDH1A1; LDHA
Метаболизм селенаминокислот	PRMT5; AHCY
Метаболизм сфинголипидов	SPHK1; SPHK2
Метаболизм аминофосфонатов	PRMT5
Метаболизм андрогенов и эстрогенов	PRMT5
Метаболизм аскорбата и алдарата	ALDH1A1
Биосинтез желчных кислот	ALDH1A1
Метаболизм цистеина	LDHA
Биосинтез жирных кислот	FASN
Сигналинг рецептора глутамата	GNB2L1
Ответ на опосредованный NRF2 окислительный стресс	PRDX1
Пентозафосфатный путь	GPI
Взаимопревращения пентозы и глюкуроната	UCHL1
Метаболизм ретинола	ALDH1A1

Метаболизм рибофлавина	TYR
Метаболизм тирозина	PRMT5, TYR
Биосинтез убихинона	PRMT5
Деградация валина, лейцина и изолейцина	ALDH1A1
Метаболизм глицина, серина и треонина	CHKA
Деградация лизина	ALDH1A1
Боль/Вкус	TRPM5; TRPA1
Боль	TRPM7; TRPC5; TRPC6; TRPC1; Cnr1; cnr2; Grk2; Trpa1; Pomc; Cgrp; Crf; Pka; Era; Nr2b; TRPM5; Prkaca; Prkacb; Prkar1a; Prkar2a
Митохондриальная функция	AIF; CytC; SMAC (Diablo); Aifm-1; Aifm-2
Неврология развития	BMP-4; хордин (Chrd); ноггин (Nog); WNT (Wnt2; Wnt2b; Wnt3a; Wnt4; Wnt5a; Wnt6; Wnt7b; Wnt8b; Wnt9a; Wnt9b; Wnt10a; Wnt10b; Wnt16); бета-катенин; Dkk-1; связанные с ожогом белки; Otx-2; Gbx2; FGF-8; Рилин; Dab1; unc-86 (Pou4f1 или Brn3a); Numb; Reln

[0560] Таким образом, в данном документе также описаны способы индукции одной или более мутаций в эукариотической или прокариотической клетке (*in vitro*, т.е. в выделенной эукариотической клетке), как описано в данном документе, включающие доставку в клетку вектора, описанного в данном документе. Мутация(-и) может включать введение, делецию или замену одного или более нуклеотидов в целевой последовательности клетки (клеток). В некоторых вариантах осуществления мутации могут включать введение, делецию или замену 1-75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки(-ей). Мутации могут включать введение, делецию или замену 1, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или 75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности. Мутации могут включать введение, делецию или замену 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или 75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток). Мутации включают введение, делецию или замену 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или 75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток). Мутации могут включать введение, делецию или замену 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или 75 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток). Мутации могут включать введение, делецию или замену 40, 45, 50, 75, 100, 200, 300, 400 или 500 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток). Мутации могут включать введение, делецию или замену 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, или 9900 до 10000 нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток).

[0561] В некоторых вариантах осуществления модификации могут включать введение, делецию или замену нуклеотидов в каждой целевой последовательности указанной(-ых) клетки (клеток) с помощью фрагментов нуклеиновой кислоты (например, направляющей РНК или онРНК), таких как те, которые опосредованы системой CRISPR-Cas.

[0562] В некоторых вариантах осуществления модификации могут включать введение, делецию или замену нуклеотидов в целевой или случайной последовательности указанной клетки (клеток) с помощью отличной от CRISPR-Cas системы или метода. Такие методики обсуждаются в других местах данного документа, например, там, где обсуждаются сконструированные клетки и способы получения сконструированных клеток и организмов.

[0563] Для минимизации токсичности и нецелевого эффекта при использовании системы CRISPR-Cas может быть важно контролировать концентрацию мРНК Cas и доставляемой направляющей РНК. Оптимальные концентрации мРНК Cas и направляющей РНК могут определять тестированием различных концентраций в клеточной модели или животной модели отличного от человека эукариота и с использованием глубокого секвенирования для анализа степени модификации в потенциальных нецелевых геномных локусах. Альтернативно, для минимизации уровня токсичности и нецелевого воздействия мРНК никазы Cas (например, Cas9 S. pyogenes с мутацией D10A) можно вводить с парой направляющих РНК, нацеливаемых на представляющий интерес сайт. Направляющие последовательности и стратегии для минимизации токсичности и нецелевых эффектов могут быть такими, как в публикации международной патентной заявки WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667); или посредством мутации, как описано в данном документе.

[0564] Как правило, в контексте эндогенной системы CRISPR образование комплекса CRISPR (содержащего направляющую последовательность, гибридизованную с целевой последовательностью и образующую комплекс с одним или более белками Cas) приводит к расщеплению одной или обеих цепей в или возле целевой последовательности (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований от нее). Не ограничиваясь какой-либо теорией, последовательность tracr, которая может содержать или состоять из всех или части последовательности tracr дикого типа (например, около или более чем около 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 или более нуклеотидов последовательности tracr дикого типа), также может образовывать часть комплекса CRISPR, например, путем гибридизации вдоль по меньшей мере части последовательности tracr со всей или частью сопряженной с tracr последовательностью, которая функционально связана с направляющей последовательностью.

[0565] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ модификации целевого полинуклеотида в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает доставку сконструированной клетки, описанной в данном документе, и/или сконструированной капсидной частицы AAV, описанной в данном документе, содержащей молекулу CRISPR-Cas в качестве молекулы карго, субъекту и/или в клетку. Доставляемая(-ые) молекула(-ы) системы CRISPR-Cas может образовывать комплекс для связывания с целевым полинуклеотидом, например, для осуществления расщепления указанного целевого полинуклеотида, тем самым модифицируя целевой полинуклеотид, при этом комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR в комплексе с последовательностью направляющей молекулы, гибридизованной с целевой последовательностью в указанном целевом полинуклеотиде, где указанная последовательность направляющей молекулы может быть связана с сопряженной с tracr последовательностью, которая, в свою очередь, гибридизируется с последовательностью tracr. В некоторых вариантах осуществления указанное расщепление включает расщепление одной или двух цепей в месте расположения целевой последовательности указанным ферментом CRISPR. В некоторых вариантах осуществления указанное расщепление приводит к снижению транскрипции целевого гена. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает репарацию указанного расщепленного целевого полинуклеотида путем гомологичной рекомбинации с экзогенным полинуклеотидом-матрицей, при этом указанная репарация приводит к мутации, включающей вставку, делецию или замену одного или более нуклеотидов указанного целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления указанная мутация приводит к одной или более аминокислотным заменам в белке, экспрессированном из гена, содержащего целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает доставку одного или более векторов в указанную эукариотическую клетку, где один или более векторов содержат фермент CRISPR, и один или более векторов управляют экспрессией одного или более из: направляющей последовательности, связанной с сопряженной с tracr последовательностью, и последовательности tracr. В некоторых вариантах осуществления указанный фермент CRISPR управляет экспрессией одного или более из: направляющей последовательности, связанной с сопряженной с tracr последовательностью, и последовательности tracr. В некоторых вариантах осуществления такой фермент CRISPR доставляют в эукариотическую клетку субъекта. В некоторых вариантах осуществления указанная модификация имеет место в указанной эукариотической клетке в клеточной культуре. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение указанной эукариотической клетки от субъекта перед указанной модификацией. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает возвращение указанному субъекту указанной эукариотической клетки и/или клеток, полученных от него. В некоторых вариантах осуществления выделенные клетки могут быть возвращены субъекту после доставки одной или более сконструированных частиц капсида AAV в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления выделенные клетки могут быть возвращены субъекту после доставки одной или более молекул сконструированной системы доставки, описанной в данном документе, в выделенную клетку, что позволяет получить выделенные клетки сконструированными клетками, как описано ранее.

Скрининг и селекция клеток

[0566] Векторы на основе системы сконструированных капсидов AAV, сконструированные клетки и/или сконструированные капсидные частицы AAV, описанные в данном документе, можно использовать в скрининговом тесте и/или анализе селекции клеток. Векторы на основе сконструированной системы доставки, сконструированные клетки и/или сконструированные капсидные частицы AAV могут быть доставлены субъекту и/или в клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку. Клетка может быть in vitro, ex vivo, in situ или in vivo. Молекулы системы сконструированных капсидов AAV, векторы, сконструированные клетки и/или сконструированные капсидные частицы AAV, описанные в данном документе, могут вводить экзогенную молекулу или соединение субъекту или в клетку, в которую они доставляются. Присутствие экзогенной молекулы или соединения может быть обнаружено, что может позволить идентифицировать клетку и/или ее признак. В некоторых вариантах реализации доставленные молекулы или частицы могут вносить генную или другую нуклеотидную модификацию (например, мутации, вставку и/или делецию гена или полинуклеотида и т.д.). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная модификация может быть обнаружена в клетке путем секвенирования. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная модификация может приводить к физиологической и/или биологической модификации клетки, что приводит к обнаруживаемым фенотипическим изменениям в клетке, что может позволить обнаружение, идентификацию и/или селекцию клетки. В некоторых вариантах осуществления фенотипическое изменение может представлять собой гибель клеток, например, варианты осуществления, в которых связывание комплекса CRISPR с целевым полинуклеотидом приводит к гибели клетки. Варианты осуществления изобретения позволяют проводить селекцию конкретных клеток, не используя маркер селекции или двухстадийный процесс, который может включать систему контрселекции. Клетка(-и) может быть прокариотической или эукариотической клеткой.

[0567] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ селекции одной или более клеток путем введения одной или более мутаций в гене в одной или более клетках, причем способ включает: введение одного или более векторов, которые могут включать одну или более молекул или векторов на основе сконструированной системы доставки, описанных в другом месте данном документа, в клетку(-и), при этом один или более векторов могут включать фермент CRISPR и/или управлять экспрессией одного или более из: направляющей последовательности, связанной с сопряженной с tracr последовательностью, последовательностью tracr и матрицей для редактирования; или другой полинуклеотид для вставки в клетку и/или ее геном; где, например, то, что экспрессируется, находится внутри фермента CRISPR и экспрессируется in vivo, и/или матрица для редактирования, если она включена, содержит одну или более мутаций, которые отменяют расщепление ферментом CRISPR; обеспечение возможности гомологичной рекомбинации матрицы для редактирования с целевым полинуклеотидом в выбранной(-ых) клетке(-ах); обеспечение связывания комплекса CRISPR с целевым полинуклеотидом для осуществления расщепления целевого полинуклеотида в указанном гене, при этом комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR в комплексе с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью в целевом полинуклеотиде, и (2) сопряженной с tracr последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью tracr, при этом связывание комплекса CRISPR с целевым полинуклеотидом вызывает гибель клеток, что позволяет выбрать одну или более клеток, в которые была введена одна или несколько мутаций. В предпочтительном варианте осуществления фермент CRISPR представляет собой белок Cas. В еще одном варианте осуществления изобретения отбираемой клеткой может быть эукариотическая клетка.

[0568] Методы скрининга, включающие молекулы системы сконструированных капсидов AAV, векторы, сконструированные клетки и/или сконструированные капсидные частицы AAV, включая, помимо прочего, те, которые доставляют в клетку еще одну молекулу системы CRISPR-Cas, можно использовать в таких методах обнаружения, как флуоресцентная гибридизация in situ (FISH). В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов сконструированной системы CRISPR-Cas, которые включают каталитически неактивный белок Cas, могут быть доставлены в клетку с помощью молекулы системы сконструированных капсидов AAV, сконструированной клетки и/или сконструированной капсидной частицы AAV, описанных в другом месте данного документа, и использованы в методе FISH. Система CRISPR-Cas может включать инактивированный белок Cas (dCas) (например, dCas9), у которого отсутствует способность производить двухцепочечные разрывы ДНК, может быть слит с маркером, таким как флуоресцентный белок, такой как усиленный зеленый флуоресцентный белка (eEGFP), и коэкспрессируется с малыми направляющими РНК для нацеливания на перицентрические, центрические и телеомерные повторы in vivo. Систему dCas можно использовать для визуализации как повторяющихся последовательностей, так и отдельных генов в геноме человека. Такие новые применения меченых dCas, систем dCas CRISPR-Cas, молекул системы сконструированных капсидов AAV, сконструированных клеток и/или сконструированных капсидных частиц AAV можно использовать для визуализации клеток и изучения функциональной ядерной архитектуры, особенно в случаях с небольшим объемом ядра или сложными 3-D структурами. (Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, Huang B. 2013. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. Cell 155(7):1479-91. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.001., принципы которого могут быть применены и/или адаптированы к описанным в данном документе системам CRISPR. Аналогичный подход, включающий полинуклеотид, слитый с маркером (например, флуоресцентным маркером), может быть доставлен в клетку с помощью молекулы системы сконструированных капсидов AAV, вектора, сконструированной клетки и/или сконструированной капсидной частицы AAV, описанных в данном документе, и интегрированный в геном клетки и/или иным образом взаимодействующий с областью генома клетки для FISH-анализа.

[0569] Аналогичные подходы для изучения других клеточных органелл и других клеточных структур могут быть реализованы путем доставки в клетку (например, с помощью молекулы сконструированного капсида AAV для доставки, сконструированной клетки и/или сконструированной капсидной частицы AAV, описанных в данном документе) одной или более молекул, слитых с маркером (таким как флуоресцентный маркер), при этом молекулы, слитые с маркером, способны нацеливаться на одну или более клеточных структур. Анализируя присутствие маркеров, можно идентифицировать и/или отображать определенные клеточные структуры.

[0570] В некоторых вариантах осуществления молекулы систем сконструированных капсидов AAV и/или сконструированные частицы AAV могут использоваться в скрининговом тесте внутри или за пределами клетки. В некоторых вариантах осуществления скрининговый тест может включать доставку молекул(-ы) карго CRISPR-Cas посредством сконструированной капсидной частицы AAV.

[0571] Настоящее изобретение также предусматривает применение системы скрининга, например, скрининга мутаций с приобретением функции. Клетки, которые искусственно инициированы сверхэкспрессировать ген, способны со временем снижать экспрессия гена (восстанавливая равновесие), например, с помощью петель отрицательной обратной связи. К моменту начала скрининга нерегулируемый ген может снова восстанавливаться. Другие скрининговые тесты обсуждаются в другом месте данного документа.

[0572] В варианте осуществления изобретение обеспечивает клетку из способа доставки *in vitro*, где способ включает приведение в контакт системы доставки с клеткой, необязательно эукариотической клеткой, посредством чего осуществляется доставка в клетку фрагментов системы доставки, и, необязательно, получение данных или результатов от приведения в контакт и передача данных или результатов.

[0573] В варианте осуществления изобретение обеспечивает клетку из способа доставки in vitro, где способ включает приведение в контакт системы доставки с клеткой, необязательно эукариотической клетки, посредством чего осуществляется доставка в клетку фрагментов системы доставки, и необязательно получение данных или результатов от приведения в контакт и передачи данных или результатов; и где клеточный продукт изменен по сравнению с клеткой, которую не приводили в контакт с системой доставки, например, изменен по сравнению с клеткой, которая была бы дикого типа, если бы ее не приводили в контакт. В варианте осуществления клеточный продукт не является нечеловеческим или животным. В некоторых вариантах осуществления клеточный продукт является человеческим.

[0574] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин транзиентно или нетранзиентно трансфицирована одним или более векторами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетку трансфицируют в том виде, в каком она встречается в природе у субъекта, необязательно для повторного введения ему. В некоторых вариантах осуществления клетка, которую трансфицируют, отобрана у субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка получена из клеток, взятых у субъекта, например, линии клеток. Механизмы и методы доставки системы сконструированных капсидов AAV, сконструированных капсидных частиц AAV описаны в другом месте данном документа.

[0575] В некоторых вариантах осуществления предложено введение молекул(-ы) системы сконструированных капсидов AAV и/или сконструированных капсидных частиц(-ы) AAV непосредственно в клетку-хозяин. Например, молекула(-ы) системы сконструированных капсидов AAV может быть доставлена вместе с одной или более молекулами карго для упаковки в сконструированную капсидную частицу AAV.

[0576] В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает способ экспрессии сконструированной молекулы доставки и молекулы карго для упаковки в сконструированную частицу GTA в клетке, который может включать стадию введения вектора в соответствии с любой из описанных в данном документе систем для доставки вектора.

[0577] Изобретение будет дополнительно описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Способы обнаружения на основе мРНК являются более строгими для селекции вариантов AAV.

[0578] **На Фиг. 1** показан механизм трансдукции адено-ассоциированного вируса (AAV), что приводит к выработке мРНК. Как показано на **Фиг. 1**, функциональная трансдукция клетки частицей AAV может привести к продукции цепи мРНК. Нефункциональная трансдукция не будет давать такой продукт, несмотря на то, что вирусный геном можно обнаружить с помощью анализа на основе ДНК. Таким образом, анализы обнаружения на основе мРНК для обнаружения трансдукции, например, с помощью AAV, могут быть более строгими и обеспечивать обратную связь в отношении функциональности вирусной частицы, которая способна функционально трансдуцировать клетку. На **Фиг. 2** показан график, демонстрирующий, что селекция вариантов AAV на основе мРНК может быть более строгой, чем селекция на основе ДНК. Вирусную библиотеку экспрессировали под контролем промотора CMV.

Пример 2. Методы обнаружения на основе мРНК можно использовать для обнаружения вариантов капсида AAV из библиотеки вариантов капсида

[0579] **На Фиг. 3A-3B** показаны графики, которые могут демонстрировать корреляцию между вирусной библиотекой и геномной ДНК вектора **(Фиг. 3A)** и мРНК **(Фиг. 3B)** в печени. На **Фиг. 4A-4F** показаны графики, которые могут демонстрировать варианты капсида, экспрессированные на уровне мРНК, идентифицированном в различных тканях.

Пример 3. Экспрессия мРНК капсида может управляться тканеспецифичными промоторами

[0580] **На Фиг. 5A-5C** показаны графики, которые могут продемонстрировать экспрессию мРНК капсида в различных тканях под контролем специфичных для клеточного типа промоторов (как отмечено на оси x). CMV был включен в качестве иллюстративного конститутивного промотора. CK8 является специфичным для мышц промотором. MHCK7 является специфичным для мышц промотором. hSyn является нейрон-специфичным промотором.

Пример 4. Создание библиотеки вариантов капсида, скрининг вариантов и идентификация вариантов

[0581] Как правило, капсидная библиотека AAV может быть создана путем экспрессии векторов сконструированного капсида, каждый из которых содержит полинуклеотид сконструированного капсида AAV, ранее описанный в соответствующей линии клеток-продуцентов AAV. См., например, **Фиг. 8**. Он может создать библиотеку капсида AAV, которая может содержать еще один необходимый вариант капсида AAV, специфичный для клеток. На **Фиг. 7** показана схема, демонстрирующая варианты создания библиотеки вариантов капсида AAV, в частности вставку случайного *n*-мера (n=3-15 аминокислот) в AAV дикого типа, например, AAV9. В этом примере случайные 7-меры были вставлены между АК 588-589 вариабельной области VIII вирусного белка AAV9 и использованы для получения векторов, содержащих вирусный геном, с одним вариантом на вектор. Как показано на **Фиг. 8**, векторную библиотеку вариантов капсида использовали для создания частиц AAV, где каждый вариант капсида инкапсулировал свою кодирующую последовательность в виде векторного генома.На **Фиг. 9** показаны векторные карты репрезентативных векторов библиотеки плазмид, кодирующих капсиды AAV, (см., например, **Фиг. 8**), которые можно использовать в векторной системе AAV для создания библиотеки вариантов капсида AAV. Библиотека может быть создана с полинуклеотидом капсидного варианта под контролем тканеспецифичного промотора или конститутивного промотора. Библиотека также была сделана с полинуклеотидом капсидного варианта, который включал сигнал полиаденилирования.

[0582] Как показано на **Фиг. 6**, капсидную библиотеку AAV можно вводить различным животным, отличным от человека, для первого раунда селекции на основе мРНК. Как показано на **Фиг. 1**, процесс трансдукции с помощью AAV и родственных векторов может привести к продукции молекулы мРНК, которая отражает геном вируса, трансдуцирующего клетку. Как, по крайней мере, показано в приведенных в данном документе примерах, селекция на основе мРНК может быть более специфичной и эффективной для определения вирусной частицы, способной к функциональной трансдукции клетки, поскольку она основана на продуцируемом функциональном продукте, а не просто на обнаружении присутствия вирусной частицы в клетке путем измерения присутствия вирусной ДНК.

[0583] После введения в первом раунде одну или более сконструированных вирусных частиц AAV, имеющих желаемый вариант капсида, затем можно использовать для формирования отфильтрованной библиотеки капсидов AAV. Желаемые вирусные частицы AAV можно идентифицировать путем измерения экспрессии мРНК вариантов капсида и определения того, какие варианты высоко экспрессируются в желаемом(-ых) типе(-ах) клеток по сравнению с нежелательным(-и) типом(-ами) клеток. Те, которые высоко экспрессируются в желаемом типе клеток, тканей и/или органов, представляют собой желаемые частицы варианта капсида AAV. В некоторых вариантах осуществления вариант капсида AAV, кодирующий полинуклеотид, находится под контролем тканеспецифичного промотора, обладающего селективной активностью в желаемой клетке, ткани или органе.

[0584] Частицы сконструированного варианта капсида AAV, идентифицированные в первом раунде, затем можно вводить различным животным, отличным от человека. В некоторых вариантах осуществления животные, используемые во втором раунде селекции и идентификации, отличаются от животных, используемых в первом раунде селекции и идентификации. Подобно раунду 1, после введения наиболее экспрессирующие варианты в желаемом типе(-ах) клетки, ткани и/или органа могут быть идентифицированы путем измерения экспрессии вирусной мРНК в клетках. Лучшие варианты, выявленные после второго раунда, могут быть баркодированы и объединены в пул. В некоторых вариантах осуществления лучшие варианты из второго раунда затем можно вводить приматам, отличным от человека, для идентификации лучшего(-их) специфичного(-ых) для клеток варианта(-ов), особенно если конечным применением для лучших вариантов являются люди. Введение в каждом раунде может быть системным.

[0585] **На Фиг. 10** показан график, демонстрирующий титр вируса (рассчитанный как векторные геномы AAV9/чашка диаметром 15 см), продуцируемый библиотеками, созданными с использованием различных промоторов. Как показано на **Фиг. 10**, использование различных промоторов существенно не влияло на титр вируса.

[0586]

Пример 5. Тропные для мышц капсиды усиленного myoAAV

[0587] Специфичные для мышц капсиды AAV первого и второго поколения были разработаны с использованием специфичного для мышц промотора, и полученные капсидные библиотеки были проверены у мышей и нечеловеческих приматов, как описано в другом месте данного документа и/или, например, в предварительной заявке №№ 62/899453, 62/916207, и 63/018454. Капсиды myoAAV первого и второго поколения дополнительно оптимизировали на мышах и отличных от человека приматах, как описано ранее, для получения улучшенных капсидов myoAAV (см., например, **Фиг. 11**). В **таблицах 2 и 3** показаны лучшие выбранные варианты усиленных специфичных для мышц n-мерных мотивов и их кодирующие последовательности в порядке ранга в каждой таблице. На **Фиг. 12** показано, что капсид «улучшенный MyoAAV» (eMyoAAV) может более эффективно трансдуцировать мышцы мыши по сравнению с MyoAAV первого поколения после системной доставки.

[0588] **На Фиг. 13** показано, что варианты капсида myoAAV первого и второго поколения зависят от гетеродимера интегрина aVb6 для трансдукции первичных миотрубочек человека.

Таблица 2. Варианты капсида «улучшенный MyoAAV» (eMyoAAV) мыши

Ранг	**N-мерный мотив**	**SEQ ID NO:**	**Кодирующая последовательность**	**SEQ ID NO:**
1	AEGRGDQYTR	3	GCTGAGGGTAGAGGAGACCAGTATACTCGT	41
2	GPGRGDQTTL	2	GGGCCGGGTAGAGGAGACCAGACTACGTTG	42
3	AEGRGDQYTR	3	GCGGAAGGCAGAGGAGACCAATACACAAGG	43
4	ATGRGDLGQA	4	GCGACTGGTAGAGGAGACCTGGGTCAGGCT	44
5	AVARGDQGLI	5	GCGGTGGCGAGAGGAGACCAGGGTCTTATT	45
6	NISRGDQGYQ	6	AACATCTCCAGAGGAGACCAAGGTTACCAA	46
7	APARGDQGSQ	7	GCGCCGGCTAGAGGAGACCAGGGGAGTCAG	47

8	AVSRGDRMEF	20	GCCGTTAGCAGAGGAGACCGGATGGAATTC	48
9	QMGRGDMGIK	49	CAGATGGGTAGAGGAGACATGGGGATTAAG	50
10	EYRRGDKADI	51	GAGTATCGGAGAGGAGACAAGGCGGATATT	52
11	ESRRGDKEPL	53	GAGAGTCGGAGAGGAGACAAGGAGCCGCTG	54
12	AHMRGDLGGT	55	GCACACATGAGAGGAGACCTAGGCGGCACG	56
13	VWQRGDKMDM	57	GTGTGGCAAAGAGGAGACAAAATGGACATG	58
14	SIGRGDTGHM	59	TCTATTGGGAGAGGAGACACGGGTCATATG	60
15	NIARGDAGQY	61	AATATTGCTAGAGGAGACGCTGGTCAGTAT	62
16	AVARGDQGLI	5	GCAGTAGCAAGAGGAGACCAAGGCTTAATC	63
17	SVSRGDQGLH	64	TCGGTCTCGAGAGGAGACCAAGGATTGCAC	65
18	EYRRGDKADI	51	GAATACAGGAGAGGAGACAAAGCAGACATC	66
19	AHMRGDLGGT	55	GCGCATATGAGAGGAGACTTGGGGGGGACT	67
20	QIGRGDITHG	68	CAGATTGGTAGAGGAGACATTACTCATGGG	69
21	EVRRGDLHGT	70	GAAGTCAGAAGAGGAGACTTGCACGGGACA	71
22	SVSRGDVHTM	72	AGTGTCTCAAGAGGAGACGTGCACACGATG	73
23	MVTRGDLGTR	74	ATGGTGACTAGAGGAGACCTTGGTACGCGG	75
24	NGGRGDTTHF	76	AACGGCGGGAGAGGAGACACGACGCACTTC	77
25	TMGRGDMNSL	78	ACGATGGGGAGAGGAGACATGAATTCGCTT	79
26	AISRGDQGLS	80	GCGATTAGTAGAGGAGACCAGGGTCTTTCT	81
27	NDARGDKSTY	82	AACGACGCAAGAGGAGACAAATCCACATAC	83
28	VGLRGDLTGS	84	GTGGGGCTGAGAGGAGACTTGACGGGTTCG	85
29	EMRRGDLGTS	86	GAGATGAGGAGAGGAGACCTGGGGACGAGT	87
30	AMSRGDMGMA	88	GCGATGAGTAGAGGAGACATGGGGATGGCG	89
31	ATGRGDLGQA	4	GCAACGGGCAGAGGAGACTTAGGCCAAGC	90

			A	
32	NVARGDQVNY	91	AACGTAGCAAGAGGAGACCAAGTTAACTAC	92
33	SIGRGDTGHM	59	AGCATCGGAAGAGGAGACACCGGCCACATG	93
34	ASVRGDLSGS	94	GCATCCGTAAGAGGAGACCTATCAGGCTCA	95
35	SAARGDTERL	96	AGCGCCGCGAGAGGAGACACTGAACGGCTA	97
36	AMSRGDMGMA	88	GCCATGTCAAGAGGAGACATGGGTATGGCT	98
37	SPSRGDQGRT	21	AGTCCATCGAGAGGAGACCAAGGACGCACT	99
38	VPGRGDLNTM	100	GTGCCTGGGAGAGGAGACCTTAATACTATG	101
39	GPGRGDQTTL	2	GGTCCTGGGAGAGGAGACCAAACGACCCTT	102
40	TSVRGDHGTL	103	ACATCGGTCAGAGGAGACCACGGAACATTG	104
41	TPSRGDLGQT	105	ACGCCTTCGAGAGGAGACCTTGGGCAGACT	106
42	AGHRGDTGVI	107	GCTGGACACAGAGGAGACACAGGAGTCATC	108
43	APARGDQGSM	109	GCGCCGGCGAGAGGAGACCAGGGTAGTATG	110
44	MSLRGDLNGS	111	ATGTCGTTGAGAGGAGACTTGAATGGGTCG	112
45	EAKRGDVHSI	113	GAGGCTAAGAGAGGAGACGTGCATTCTATT	114
46	SAQRGDVQAV	115	AGTGCTCAGAGAGGAGACGTGCAGGCGGTG	116
47	STARGDQGDR	117	AGTACGGCGAGAGGAGACCAGGGGGATAGG	118
48	QISRGDLGIN	119	CAGATTAGTAGAGGAGACCTGGGGATTAAT	120
49	TFTRGDMTMN	121	ACGTTCACAAGAGGAGACATGACGATGAAC	122
50	QEGRGDLNMR	123	CAAGAAGGAAGAGGAGACCTGAACATGAGG	124
51	AHARGDTSSL	125	GCACACGCAAGAGGAGACACCAGCTCCCTG	126
52	TNGRGDAGTL	127	ACGAATGGGAGAGGAGACGCTGGGACTCTG	128
53	AFGRGDQGQL	129	GCTTTCGGCAGAGGAGACCAAGGGCAACTA	130
54	ADGRGDRSSL	131	GCTGATGGGAGAGGAGACCGTTCGTCTCTG	132
55	DGRRGDGHSL	133	GACGGACGCAGAGGAGACGGACACAGCCTT	134
56	EKLRGDLHST	135	GAGAAGTTGAGAGGAGACCTTCATTCGACT	136
57	EARRGDASAM	137	GAGGCGCGTAGAGGAGACGCTTCGGCGATG	138
58	MGTRGDKMDF	139	ATGGGAACGAGAGGAGACAAAATGGACTT	140

			C	
59	STSRGDRESY	141	TCGACTTCGAGAGGAGACCGGGAGTCGTAT	142
60	CQPRGDTTRC	143	TGTCAGCCGAGAGGAGACACGACTCGGTGT	144
61	MHTRGDKMDF	145	ATGCACACGAGAGGAGACAAAATGGACTTC	146
62	YSARGDTSGL	147	TACAGTGCCAGAGGAGACACAAGTGGCCTG	148
63	STMRGDHEKL	149	TCGACGATGAGAGGAGACCATGAGAAGTTG	150
64	TQMRGDGVTL	151	ACCCAAATGAGAGGAGACGGGGTCACACTA	152
65	TTRRGDMGDN	153	ACTACTCGTAGAGGAGACATGGGGGATAAT	154
66	ANGRGDRLEL	155	GCGAATGGTAGAGGAGACAGGCTGGAGTTG	156
67	AVSRGDRMEF	20	GCTGTGTCTAGAGGAGACAGGATGGAGTTT	157
68	ENQRGDLSGR	158	GAGAATCAGAGAGGAGACTTGTCGGGTCGG	159
69	STGRGDLGQA	160	TCGACTGGTAGAGGAGACCTGGGGCAGGCT	161
70	MHTRGDKMDF	145	ATGCATACTAGAGGAGACAAGATGGATTTT	162
71	SSARGDYSEV	163	AGTAGTGCGAGAGGAGACTATAGTGAGGTG	164
72	AFGRGDQGQL	129	GCGTTTGGGAGAGGAGACCAGGGTCAGCTT	165
73	STARGDAATY	166	AGTACGGCGAGAGGAGACGCGGCGACTTAT	167
74	VNTRGDTQKL	168	GTCAACACAAGAGGAGACACTCAAAAACTT	169
75	AMSRGDHASL	170	GCGATGAGTAGAGGAGACCATGCGTCGCTT	171
76	QAARGDVNKL	172	CAGGCTGCTAGAGGAGACGTTAATAAGCTG	173
77	RGTRGDTVEL	174	AGGGGTACGAGAGGAGACACGGTTGAGTTG	175
78	TTRRGDMGDN	153	ACCACCCGGAGAGGAGACATGGGAGACAA C	176
79	ASTRGDYAGV	177	GCTAGTACGAGAGGAGACTATGCGGGTGTT	178
80	DDRRGDKLPL	179	GACGACAGGAGAGGAGACAAACTGCCCCTT	180
81	SGSRGDLNAV	181	TCGGGGTCGAGAGGAGACCTGAATGCGGTG	182
82	EYRRGDQQIQ	183	GAGTATAGGAGAGGAGACCAGCAGATTCA G	184
83	TYVRGDRAEV	185	ACGTACGTCAGAGGAGACAGAGCAGAAGT G	186
84	QSLRGDLNGS	187	CAATCACTAAGAGGAGACTTGAACGGATCC	188
85	EGRRGDTTSL	189	GAGGGTCGGAGAGGAGACACGACGTCGTTG	190
86	AENRGDRSSL	191	GCGGAGAATAGAGGAGACCGGTCGAGTTTG	192
87	VAGRGDRSEL	193	GTGGCTGGGAGAGGAGACCGTAGTGAGCTG	194
88	DPARGDIGAR	195	GATCCGGCGAGAGGAGACATTGGTGCGCGT	196

89	EMRRGDLGTS	86	GAAATGCGCAGAGGAGACTTGGGAACTTCA	197
90	VWQRGDKMDM	57	GTTTGGCAGAGAGGAGACAAGATGGATATG	198
91	VIGRGDKALQ	199	GTGATTGGGAGAGGAGACAAGGCGCTTCAG	200
92	SFERGDKNSL	201	AGCTTCGAAAGAGGAGACAAAAACTCTCTT	202
93	QIARGDIASV	203	CAGATTGCTAGAGGAGACATTGCTAGTGTG	204
94	TISRGDLGGA	205	ACGATTAGTAGAGGAGACCTGGGTGGGGCT	206
95	AMIRGDMTHS	207	GCGATGATTAGAGGAGACATGACGCATAGT	208
96	TSVRGDHGTL	103	ACGAGTGTGAGAGGAGACCATGGGACGCTG	209
97	TMRRGDLNDS	210	ACGATGCGGAGAGGAGACCTGAATGATAGT	211
98	AYSRGDLGNH	212	GCCTACTCCAGAGGAGACCTAGGCAACCAC	213
99	EERRGDTHRL	214	GAGGAGCGGAGAGGAGACACTCATCGGCTG	215
100	SQLRGDAGTI	216	TCACAACTAAGAGGAGACGCGGGGACAATC	217
101	AMVRGDAHQL	218	GCGATGGTGAGAGGAGACGCGCATCAGCTG	219
102	TTSRGDLNSV	220	ACGACTAGTAGAGGAGACTTGAATTCGGTT	221
103	WEQRGDMIGK	222	TGGGAGCAGAGAGGAGACATGATTGGGAAG	223
104	YTTRGDLQSN	224	TACACCACCAGAGGAGACCTCCAATCAAAC	225
105	MSQRGDLSHQ	226	ATGTCGCAGAGAGGAGACCTTTCGCATCAG	227
106	ASTRGDTTHM	228	GCGAGTACTAGAGGAGACACGACGCATATG	229
107	SDTRGDTHRL	230	TCAGACACCAGAGGAGACACCCACAGACTG	231
108	TLGRGDQYTS	232	ACGCTGGGTAGAGGAGACCAGTATACGAGT	233
109	SYARGDVREV	234	TCGTATGCGAGAGGAGACGTTAGGGAGGTT	235
110	ETRRGDLSQN	236	GAGACTCGTAGAGGAGACCTGAGTCAGAAT	237
111	TIGRGDLMDK	238	ACAATCGGGAGAGGAGACCTGATGGACAAA	239
112	SYTRGDLSQN	240	AGTTACACCAGAGGAGACCTTAGCCAAAAC	241
113	SKLRGDASEI	242	TCGAAGCTGAGAGGAGACGCTAGTGAGATT	243
114	SMARGDKAEI	244	TCGATGGCGAGAGGAGACAAGGCGGAGATT	245
115	GAVRGDHSSL	246	GGAGCCGTCAGAGGAGACCACTCATCGTTA	247
116	METRGDMSNR	248	ATGGAGACGAGAGGAGACATGAGTAATCGT	249
117	AYTRGDKDAL	250	GCGTACACAAGAGGAGACAAAGACGCACT	251

			A	
118	ENRRGDITQS	252	GAGAATCGGAGAGGAGACATTACGCAGTCG	253
119	STGRGDLGQA	160	TCCACGGGCAGAGGAGACCTTGGACAAGCA	254
120	GAVRGDHSSL	246	GGTGCTGTTAGAGGAGACCATAGTAGTCTT	255
121	SQLRGDAGTI	216	TCTCAGCTTAGAGGAGACGCTGGTACGATT	256
122	MLLRGDKNDF	257	ATGCTCCTAAGAGGAGACAAAAACGACTTC	258
123	KVQRGDASDW	259	AAGGTGCAGAGAGGAGACGCGAGTGATTGG	260
124	AFTRGDMQTA	261	GCGTTTACGAGAGGAGACATGCAGACTGCT	262
125	QPKRGDVQAQ	263	CAGCCTAAGAGAGGAGACGTTCAGGCTCAG	264
126	ASLRGDMGVS	265	GCTAGTCTGAGAGGAGACATGGGGGTGAGT	266
127	AYSRGDKESF	267	GCCTACTCCAGAGGAGACAAAGAATCGTTC	268
128	RFQRGDLTDA	269	CGGTTCCAAAGAGGAGACTTGACCGACGCT	270
129	SDARGDTMKL	271	TCTGATGCTAGAGGAGACACGATGAAGCTG	272
130	SGARGDTVSL	273	AGCGGGGCCAGAGGAGACACAGTAAGTCTC	274
131	DEKRGDQKHL	275	GATGAGAAGAGAGGAGACCAGAAGCATCTT	276
132	NGVRGDVQNF	277	AACGGAGTAAGAGGAGACGTCCAAAACTTC	278
133	MTLRGDLGGS	279	ATGACGTTGAGAGGAGACCTGGGTGGGTCG	280
134	EARRGDASAM	137	GAGGCTAGGAGAGGAGACGCTAGTGCGATG	281
135	GQERGDLGTR	282	GGGCAGGAGAGAGGAGACCTGGGGACTCGG	283
136	RGARGDLVDA	284	AGAGGCGCCAGAGGAGACCTAGTCGACGCT	285
137	QYSRGDHTDL	286	CAATACTCCAGAGGAGACCACACCGACCTT	287
138	MNTRGDVHAM	288	ATGAACACCAGAGGAGACGTGCACGCTATG	289
139	TVRRGDLATE	290	ACGGTACGGAGAGGAGACCTAGCAACCGAA	291
140	NIARGDAGQY	61	AATATTGCGAGAGGAGACGCTGGTCAGTAT	292
141	SVGRGDKADI	293	TCTGTTGGGAGAGGAGACAAGGCTGATATT	294
142	SHNRGDTGTM	295	TCACACAACAGAGGAGACACCGGAACCATG	296
143	TNTRGDKESV	297	ACGAACACCAGAGGAGACAAAGAATCAGTA	298
144	SIGRGDQYTI	299	TCGATTGGTAGAGGAGACCAGTATACGATT	300

145	QTSRGDAGSW	301	CAGACGAGTAGAGGAGACGCGGGTCTTGG	302
146	AENRGDRSSL	191	GCTGAAAACAGAGGAGACCGAAGCAGCCT A	303
147	AISRGDVQSL	304	GCGATTTCGAGAGGAGACGTTCAGTCGTTG	305
148	NAQRGDHGQL	306	AACGCACAAAGAGGAGACCACGGGCAACT G	307
149	LNSRGDQASV	308	CTCAACTCGAGAGGAGACCAAGCCTCCGTC	309
150	SGNRGDIGTF	310	TCGGGAAACAGAGGAGACATAGGTACATTC	311
151	NVGRGDQATM	312	AACGTGGGAAGAGGAGACCAAGCCACAAT G	313
152	SYSRGDTGRL	314	TCGTATTCTAGAGGAGACACTGGTCGGCTT	315
153	SHLRGDQALA	316	AGCCACTTAAGAGGAGACCAAGCGTTGGCC	317
154	YFARGDMTMN	318	TACTTCGCCAGAGGAGACATGACTATGAAC	319
155	QSQRGDLNPM	320	CAGTCGCAGAGAGGAGACCTTAATCCTATG	321
156	EQRRGDKTEL	322	GAGCAGAGGAGAGGAGACAAGACGGAGCT G	323
157	VSARGDAGQL	324	GTGTCTGCGAGAGGAGACGCGGGTCAGTTG	325
158	SPSRGDQGRT	21	TCTCCGTCTAGAGGAGACCAGGGGCGGACG	326
159	EASRGDKGTH	327	GAGGCTAGTAGAGGAGACAAGGGTACGCA T	328
160	LSTRGDMGMQ	329	CTGTCTACTAGAGGAGACATGGGTATGCAG	332
161	ANMRGDQLHT	333	GCGAATATGAGAGGAGACCAGCTGCATACT	334
162	ENTRGDLTHA	335	GAGAATACGAGAGGAGACCTTACTCATGCG	336
163	IERRGDSAGL	337	ATTGAGCGTAGAGGAGACTCGGCGGGGCTG	338
164	SAMRGDGVSL	339	AGTGCGATGAGAGGAGACGGAGTGAGCTTG	340
165	TVSRGDQGLS	341	ACGGTTTCGAGAGGAGACCAGGGGTTGTCT	342
166	SIVRGDLNST	343	TCGATCGTCAGAGGAGACCTGAACTCCACG	344
167	DVARGDKTNF	345	GACGTAGCGAGAGGAGACAAAACAAACTT C	346
168	WSQRGDLSGT	347	TGGAGCCAAAGAGGAGACCTGAGTGGAAC C	348
169	LNQRGDVSNM	349	CTGAACCAAAGAGGAGACGTTTCCAACATG	350
170	AALRGDLSGS	351	GCCGCCCTAAGAGGAGACCTATCCGGCTCA	352
171	RVARGDITDI	353	AGGGTTGCGAGAGGAGACATTACGGATATT	354

172	STNRGDLNQV	355	TCGACGAACAGAGGAGACCTCAACCAAGTT	356
173	DSRRGDSVSL	357	GATTCGCGGAGAGGAGACTCTGTGAGTCTT	358
174	SVGRGDQSQM	359	AGTGTTGGGAGAGGAGACCAGTCTCAGATG	360
175	SNTRGDTNSL	361	TCCAACACGAGAGGAGACACAAACTCCCTA	362
176	DNRRGDGTTM	363	GATAATCGGAGAGGAGACGGTACGACTATG	364
177	TPSRGDQGRL	365	ACGCCTTCGAGAGGAGACCAAGGAAGACTA	366
178	NYSRGDSMTL	367	AACTACAGCAGAGGAGACTCAATGACGCTT	368
179	MQARGDAGTL	369	ATGCAGGCTAGAGGAGACGCTGGGACTCTG	370
180	TQSRGDLSGA	371	ACGCAGTCGAGAGGAGACTTGTCTGGTGCG	372
181	FAQRGDLTGV	373	TTTGCGCAGAGAGGAGACTTGACTGGGGTT	374
182	APVRGDLIGT	375	GCGCCGGTGAGAGGAGACCTGATTGGTACG	376
183	SNTRGDTNSL	361	TCGAATACTAGAGGAGACACGAATAGTTTG	377
184	EPKRGDLSNT	378	GAGCCGAAGAGAGGAGACTTGAGTAATAC G	379
185	SVGRGDTYPL	380	TCGGTTGGGAGAGGAGACACTTATCCTCTG	381
186	QTARGDMTGH	382	CAAACAGCCAGAGGAGACATGACTGGCCAC	383
187	AGARGDLENR	384	GCTGGTGCGAGAGGAGACTTGGAGAATCGG	385
188	MSTRGDLNNV	386	ATGAGCACTAGAGGAGACCTAAACAACGTC	387
189	EKQRGDLNSM	388	GAAAAACAAAGAGGAGACCTCAACAGCAT G	389
190	IKTRGDLGHE	390	ATTAAGACGAGAGGAGACCTTGGTCATGAG	391
191	IGRRGDMELS	392	ATTGGGAGGAGAGGAGACATGGAGTTGTCT	393
192	TTGRGDLKEV	394	ACTACGGGTAGAGGAGACTTGAAGGAGGTT	395
193	TDKRGDQNTV	396	ACGGATAAGAGAGGAGACCAGAATACTGT G	397
194	SNVRGDREAV	398	TCGAATGTTAGAGGAGACCGGGAGGCGGTT	399
195	SVGRGDQSQM	359	TCAGTCGGCAGAGGAGACCAAAGTCAAATG	400
196	YANRGDLSHQ	401	TACGCCAACAGAGGAGACCTGAGTCACCAA	402
197	QISRGDLGIN	119	CAAATATCGAGAGGAGACCTAGGTATCAAC	403
198	SMMRGDAGQL	404	TCGATGATGAGAGGAGACGCTGGGCAGTTG	405
199	EARRGDSQGL	406	GAGGCGCGGAGAGGAGACAGTCAGGGGCT G	407
200	MPTRGDQTKF	408	ATGCCCACAAGAGGAGACCAAACCAAATTC	409

Таблица 3. Варианты капсида «улучшенный MyoAAV» (eMyoAAV) отличного от человека примата				
Ранг	**N-мерная вставка**	**SEQ ID NO:**	**Кодирующая последовательность**	**SEQ ID NO:**
1	SNSRGDYNSL	28	TCAAACTCCAGAGGAGACTACAACTCCTTG	410
2	SSARGDRDYL	411	TCGTCGGCTAGAGGAGACCGTGATTATCTG	412
3	STVRGDYTSV	413	AGCACGGTCAGAGGAGACTACACGTCCGTG	414
4	QERRGDYTSM	30	CAGGAGCGGAGAGGAGACTATACGAGTATG	415
5	NGGRGDTTHF	76	AACGGCGGGAGAGGAGACACGACGCACTTC	416
6	ASTRGDHGVL	31	GCGAGTACTAGAGGAGACCATGGTGTGTTG	417
7	SYQRGDQHNM	418	TCGTACCAAAGAGGAGACCAACACAACATG	419
8	NDTRGDRSYM	420	AACGACACAAGAGGAGACCGATCTTACATG	421
9	ENRRGDFNNT	32	GAAAACAGGAGAGGAGACTTCAACAACACT	422
10	SGSRGDLSGH	423	TCCGGCTCGAGAGGAGACTTGTCAGGACAC	424
11	ENRRGDITQS	252	GAGAATCGGAGAGGAGACATTACGCAGTCG	425
12	DKPRGDRQLL	426	GATAAGCCGAGAGGAGACCGGCAGTTGTTG	427
13	EERRGDTHRL	214	GAGGAGCGGAGAGGAGACACTCATCGGCTG	428
14	AMIRGDMTHS	207	GCGATGATTAGAGGAGACATGACGCATAGT	429
15	SNNRGD	430	TCAAACAACAGAGGAGACTACACGACAATG	431

	YTTM			
16	QGGRGD LSTL	432	CAGGGTGGGAGAGGAGACTTGTCGACGTTG	433
17	SKDRGD YQTL	434	TCGAAGGATAGAGGAGACTATCAGACTCTT	435
18	ATARGD QMKL	436	GCTACGGCGAGAGGAGACCAGATGAAGCTG	437
19	QHMRGD LTGA	438	CAGCATATGAGAGGAGACTTGACTGGTGCG	439
20	DGTRGD LGRY	440	GACGGCACGAGAGGAGACCTTGGAAGGTAC	441
21	DSRRGD YANL	442	GACTCTCGGAGAGGAGACTACGCAAACCTC	443
22	SAMRGD YTST	444	TCGGCGATGAGAGGAGACTATACTAGTACT	445
23	ENRRGD AQLL	446	GAGAATCGGAGAGGAGACGCGCAGCTGCTG	447
24	TTLRGDH SQL	448	ACGACGCTGAGAGGAGACCATAGTCAGCTT	449
25	DAGRGD MHRM	450	GACGCAGGGAGAGGAGACATGCACCGTATG	451
26	QHTRGD LSST	452	CAGCATACGAGAGGAGACTTGAGTTCTACT	453
27	QVYRGD RESV	454	CAAGTTTACAGAGGAGACAGGGAATCCGTG	455
28	SSQRGDL AGT	456	TCGAGTCAGAGAGGAGACTTGGCTGGTACT	457
29	TDVRGD RGTF	458	ACGGATGTTAGAGGAGACAGGGGGACGTTT	459
30	SSVRGDR EVT	460	TCGTCTGTGAGAGGAGACCGGGAGGTGACG	461
31	ENRRGDL TNA	462	GAGAATAGGAGAGGAGACCTGACTAATGCG	463
32	SYARGD	464	TCGTATGCGAGAGGAGACGTTCATTCTATT	465

	VHSI			
33	DSSRGDL NLR	466	GACAGCTCAAGAGGAGACCTCAACCTCCGG	467
34	SNARGD YSNM	468	TCGAACGCGAGAGGAGACTACTCAAACATG	469
35	SSVRGDH SVL	470	TCGTCTGTGAGAGGAGACCATTCGGTGCTT	471
36	SAFRGDL HAT	472	TCGGCTTTTAGAGGAGACCTGCATGCTACT	473
37	SAMRGD YTST	444	TCCGCCATGAGAGGAGACTACACAAGCACG	474
38	NAQRGD HGQL	306	AACGCACAAAGAGGAGACCACGGGCAACTG	475
39	SDRRGD QLLY	476	TCGGATCGGAGAGGAGACCAGCTGTTGTAT	477
40	SGVRGD RLAV	478	AGCGGCGTAAGAGGAGACCGCCTAGCCGTA	479
41	ASLRGDL SST	480	GCCAGCCTAAGAGGAGACCTCAGCTCAACG	481
42	TNGRGD LHGM	482	ACGAACGGAAGAGGAGACCTTCACGGAATG	483
43	TNTRGD HGML	484	ACGAATACGAGAGGAGACCATGGGATGCTG	485
44	SSARGDR DYL	411	AGTTCCGCCAGAGGAGACCGGGACTACCTC	486
45	EDRRGDL LRT	487	GAGGATCGGAGAGGAGACCTTTTGAGGACT	488
46	SSLRGDL LHS	489	TCGTCGCTGAGAGGAGACCTGTTGCATTCT	490
47	ENRRGDL TNA	462	GAAAACCGTAGAGGAGACCTCACGAACGCT	491
48	DGRRGD RESI	492	GACGGCAGGAGAGGAGACCGGGAATCGATC	493
49	TGTRGDT	494	ACTGGAACCAGAGGAGACACAATGACATGG	495

	MTW			
50	STVRGDY TSV	413	TCGACTGTTAGAGGAGACTATACTTCTGTT	496
51	SATRGDH NVL	497	TCGGCAACGAGAGGAGACCACAACGTACTG	498
52	TDRRGDS GTL	499	ACGGATCGGAGAGGAGACAGTGGTACTCTG	500
53	TSARGDL IHT	501	ACGAGTGCTAGAGGAGACCTGATTCATACG	502
54	SGVRGD RLAV	478	AGTGGGGTGAGAGGAGACCGGCTGGCGGTG	503
55	AVERGD RLML	504	GCGGTTGAGAGAGGAGACCGTCTTATGCTG	505
56	DRSRGDT HVL	506	GACAGGTCGAGAGGAGACACGCACGTACTC	507
57	ESTRGDL RVV	508	GAGTCGACGAGAGGAGACCTTCGTGTTGTG	509
58	TTIRGDY REL	510	ACGACGATTAGAGGAGACTATCGTGAGTTG	511
59	TFIRGDL AGA	512	ACGTTCATCAGAGGAGACCTGGCAGGTGCG	513
60	MTSRGD LTTY	514	ATGACGAGCAGAGGAGACTTGACAACATAC	515
61	ADRRGD QLYS	516	GCGGATCGTAGAGGAGACCAGCTTTATTCG	517
62	AHMRGD LGGT	55	GCACACATGAGAGGAGACCTAGGCGGCACG	518
63	GYVRGD LGQH	519	GGGTACGTCAGAGGAGACCTGGGGCAACAC	520
64	DASRGD RTSL	521	GATGCGAGTAGAGGAGACAGGACTAGTTTG	522
65	TEVRGDR SQV	523	ACGGAGGTGAGAGGAGACAGGTCGCAGGTT	524
66	SHLRGDQ	316	TCGCATCTGAGAGGAGACCAGGCTCTTGCG	525

	ALA			
67	SEVRGDR LSI	526	TCGGAGGTGAGAGGAGACCGGTTGAGTATT	527
68	SAARGDT ERL	96	AGCGCCGCGAGAGGAGACACTGAACGGCTA	528
69	SDRRGDL SGA	529	TCAGACCGTAGAGGAGACCTGTCGGGCGCT	530
70	SVTRGDR VVI	531	AGCGTCACAAGAGGAGACAGAGTAGTCATC	532
71	SEGRGDR MAL	533	TCGGAGGGGAGAGGAGACAGGATGGCTCTT	534
72	SSTRGDH LSL	535	TCGTCTACTAGAGGAGACCATCTTTCGCTG	536
73	AMIRGD MTHS	207	GCTATGATCAGAGGAGACATGACCCACTCC	537
74	SSTRGDQ IYV	538	TCGTCGACGAGAGGAGACCAGATTTATGTG	539
75	EERRGDT HRL	214	GAGGAGCGGAGAGGAGACACTCATCGGTTG	540
76	SNSRGDY NSL	28	TCGAATTCGAGAGGAGACTATAATAGTCTT	541
77	SAQRDR MGSP	542	TCCGCACAAAGGGATCGTATGGGTTCTCCG	543
78	TGTRGDI ATF	544	ACGGGTACGAGAGGAGACATTGCGACTTTT	545
79	SMQRGD LLST	546	TCGATGCAGAGAGGAGACCTGCTTTCTACT	547
80	EDVRGD RSKL	548	GAGGATGTGAGAGGAGACAGGAGTAAGCTT	549
81	AHMRGD LGGT	55	GCGCATATGAGAGGAGACTTGGGGGGGACT	550
82	TSVRGDQ SQY	551	ACGAGTGTGAGAGGAGACCAGAGTCAGTAT	552
83	ADRRGD	553	GCGGATCGGAGAGGAGACACGGGGTTGTTT	554

	TGLF			
84	NTYRGD RDSL	555	AACACTTACAGAGGAGACCGAGACAGCCTG	556
85	TDVRGD RGTF	458	ACGGATGTTAGAGGAGACCGGGGGACGTTT	557
86	SRGRGDL NDL	558	TCTCGTGGGAGAGGAGACCTGAATGATTTG	559
87	SNVRGD REAV	398	AGCAACGTAAGAGGAGACAGGGAAGCCGTC	560
88	MDRRGD ASIL	561	ATGGACAGGAGAGGAGACGCCTCCATACTG	562
89	SIWRGDR TEV	563	TCGATATGGAGAGGAGACCGTACAGAAGTC	564
90	NSQRGD YSGM	565	AACTCACAAAGAGGAGACTACAGTGGAATG	566
91	SSVRGDI GGI	567	TCTAGCGTAAGAGGAGACATCGGGGGGATC	568
92	ENQRGD LSGR	158	GAGAATCAGAGAGGAGACTTGTCGGGTCGG	569
93	EIRRGDL LAQ	570	GAGATTCGGAGAGGAGACCTTCTGGCTCAG	571
94	SNIRGDH AVM	572	TCGAACATCAGAGGAGACCACGCAGTCATG	573
95	LDTRGDR SQV	574	CTGGATACGAGAGGAGACCGGAGTCAGGTT	575
96	ANTRGD HQNF	576	GCGAATACGAGAGGAGACCATCAGAATTTT	577
97	QVYRGD RESV	454	CAGGTGTATAGAGGAGACCGTGAGTCTGTT	578
98	TSVRGDL SMN	579	ACGTCGGTGAGAGGAGACCTTTCGATGAAT	580
99	ASTRGDH GVL	31	GCCTCAACGAGAGGAGACCACGGAGTTCTC	581
100	TTTRGDY	582	ACGACGACGAGAGGAGACTATCTTAATACG	583

	LNT			
101	AERRGDI KEY	584	GCGGAGAGGAGAGGAGACATTAAGGAGTAT	585
102	SHARGDL GST	586	TCGCATGCTAGAGGAGACTTGGGTTCGACT	587
103	TSQRGDY VSL	588	ACGTCTCAGAGAGGAGACTATGTTTCTCTT	589
104	GPGRGD QTTL	2	GGGCCGGGTAGAGGAGACCAGACTACGTTG	590
105	VNVRGD RGEV	591	GTGAATGTGAGAGGAGACCGTGGTGAGGTG	592
106	SYRRGD HDQL	593	TCGTATCGTAGAGGAGACCATGATCAGCTT	594
107	SGTRGDR VDL	595	AGCGGCACAAGAGGAGACAGGGTAGACCTC	596
108	SHFRGDL HTS	597	TCCCACTTCAGAGGAGACTTGCACACGTCC	598
109	SDRRGDL SVP	599	TCGGATCGTAGAGGAGACCTTTCGGTGCCT	600
110	SGTRGDT LIL	601	AGCGGCACCAGAGGAGACACCCTTATACTC	602
111	ENTRGDL HGK	603	GAAAACACCAGAGGAGACCTCCACGGCAAA	604
112	DRARGD THVL	605	GATCGGGCGAGAGGAGACACGCATGTGCTG	606
113	ASGRGDI AGL	607	GCGTCTGGTAGAGGAGACATTGCGGGGCTT	608
114	EGRRGDL FQA	609	GAGGGTCGTAGAGGAGACCTGTTTCAGGCG	610
115	RSERGDR LEI	611	AGATCCGAAAGAGGAGACAGGCTAGAAATC	612
116	AAYRGD AHVL	613	GCGGCCTACAGAGGAGACGCACACGTGCTC	614
117	NDSRGD	615	AACGACTCGAGAGGAGACCAACACCGATTG	616

	QHRL			
118	SSARGDH SQL	617	TCATCGGCAAGAGGAGACCACTCTCAACTG	618
119	TNERGDR LSI	619	ACGAATGAGAGAGGAGACCGTCTTTCGATT	620
120	SNSRGDY TSV	621	AGCAACTCCAGAGGAGACTACACCAGTGTC	622
121	NVTRGD HTVM	623	AACGTCACAAGAGGAGACCACACCGTTATG	624
122	TMVRGD VKGL	625	ACGATGGTGAGAGGAGACGTTAAGGGGCTT	626
123	TGTRGDI ATF	544	ACCGGGACAAGAGGAGACATAGCCACGTTC	627
124	VQLRGD LAST	628	GTGCAGCTGAGAGGAGACTTGGCTTCTACT	629
125	MNRRGD YSEQ	630	ATGAACCGGAGAGGAGACTACTCGGAACAA	631
126	ANTRGD LSPV	632	GCGAATACTAGAGGAGACCTGAGTCCGGTT	633
127	TGMRGD AGSL	634	ACGGGTATGAGAGGAGACGCTGGGAGTCTT	635
128	LDRRGDF SSA	636	CTAGACCGCAGAGGAGACTTCAGCTCCGCG	637
129	MYHRGD MTSV	638	ATGTACCACAGAGGAGACATGACTTCGGTG	639
130	GSMRGD LHST	640	GGGTCGATGAGAGGAGACTTGCATTCGACG	641
131	SSSRGDF SSV	642	TCGTCGTCCAGAGGAGACTTCAGCTCTGTT	643
132	TGTRGDL HTY	644	ACGGGTACGAGAGGAGACTTGCATACTTAT	645
133	YTQRGD LATV	646	TACACCCAAAGAGGAGACCTTGCCACCGTC	647
134	TDVRGD	648	ACGGATGTTAGAGGAGACCGGATGTATGTG	649

	RMYV			
135	TSVRGDH GTL	103	ACATCGGTCAGAGGAGACCACGGAACATTG	650
136	SNSRGDL SVN	651	TCGAACTCCAGAGGAGACCTATCGGTAAAC	652
137	QSGRGD QMTL	653	CAGTCTGGGAGAGGAGACCAGATGACGTTG	654
138	MNTRGD LQQS	655	ATGAACACCAGAGGAGACTTGCAACAATCG	656
139	AGSRGDL QTV	657	GCGGGATCAAGAGGAGACCTACAAACGGTG	658
140	SNMRGD QTYV	659	TCGAACATGAGAGGAGACCAAACTTACGTC	660
141	TPSRGDM SNV	661	ACGCCAAGTAGAGGAGACATGTCCAACGTC	662
142	NSTRGDL HMA	663	AACAGCACAAGAGGAGACCTACACATGGCA	664
143	ANTRGD LSVS	665	GCTAACACCAGAGGAGACCTCTCAGTCAGT	666
144	TDRRGDT GLL	667	ACCGACCGAAGAGGAGACACCGGCTTACTG	668
145	DGVRGD RATW	669	GACGGCGTAAGAGGAGACCGTGCAACATGG	670
146	ENRRGDF NNT	32	GAGAATCGTAGAGGAGACTTTAATAATACG	671
147	EPSRGDR MVL	672	GAGCCTAGTAGAGGAGACAGGATGGTGTTG	673
148	SGVRGD RIII	674	AGCGGCGTTAGAGGAGACCGGATCATAATC	675
149	TSMRGD YTHV	676	ACGTCGATGAGAGGAGACTATACGCATGTT	677
150	ASSRGDL TVI	678	GCGTCGAGTAGAGGAGACTTGACTGTTATT	679
151	ETRRGDL	680	GAGACGCGTAGAGGAGACCTGTCGCTTCAG	681

	SLQ			
152	NNARGD QSMH	682	AACAACGCAAGAGGAGACCAATCAATGCAC	683
153	TDRRGDS SAL	684	ACGGATAGGAGAGGAGACTCTAGTGCGCTT	685
154	SSQRGDL TGV	686	TCAAGCCAAAGAGGAGACTTGACAGGTGTG	687
155	QTARGD VMVH	688	CAGACGGCTAGAGGAGACGTTATGGTTCAT	689
156	VSQRGDL NAV	690	GTGTCGCAGAGAGGAGACCTGAATGCTGTT	691
157	TMTRGD LAAN	692	ACGATGACCAGAGGAGACCTCGCTGCTAAC	693
158	NASRGD HSSL	694	AATGCTTCGAGAGGAGACCATTCGTCGTTG	695
159	SNTRGD MGLT	696	TCAAACACCAGAGGAGACATGGGCCTCACG	697
160	MYSRGD THSL	698	ATGTATTCGAGAGGAGACACTCATAGTCTG	699
161	ADQRGD RAPL	700	GCGGATCAGAGAGGAGACAGGGCTCCGCTT	701
162	QERRGD YTSM	30	CAAGAAAGGAGAGGAGACTACACCTCTATG	702
163	SQNRGDL ANT	703	TCCCAAAACAGAGGAGACCTAGCCAACACG	704
164	EKLRGDL HST	135	GAGAAGTTGAGAGGAGACCTTCATTCGACT	705
165	QGGRGD LSTL	432	CAAGGCGGAAGAGGAGACCTGAGTACACTG	706
166	SNRRGDT EMQ	707	TCGAATAGGAGAGGAGACACTGAGATGCAG	708
167	SGSRGDV SAL	709	TCGGGTAGTAGAGGAGACGTGAGTGCTTTG	710
168	ESTRGDR	711	GAGTCGACGAGAGGAGACCGTGGTACGCTG	712

	GTL			
169	SAVRGD AALH	713	TCGGCGGTGAGAGGAGACGCGGCGCTTCAT	714
170	LSSRGDV NRL	715	CTGAGCAGCAGAGGAGACGTTAACCGCCTT	716
171	EQRRGDI QTI	717	GAGCAGAGGAGAGGAGACATTCAGACTATT	718
172	AAYRGD AHVL	613	GCTGCGTATAGAGGAGACGCGCATGTTCTT	719
173	SPVRGDH GAL	720	TCGCCGGTGAGAGGAGACCATGGGGCTTTG	721
174	DSRRGD YANL	442	GATTCGAGGAGAGGAGACTATGCGAATCTG	722
175	LSRRGDY QEL	723	TTGAGTCGGAGAGGAGACTATCAGGAGTTG	724
176	SYARGD VHSI	464	TCCTACGCAAGAGGAGACGTCCACTCCATC	725
177	DSRRGD ASYH	726	GACTCACGCAGAGGAGACGCGTCGTACCAC	727
178	NHQRGD LSSS	728	AACCACCAAAGAGGAGACCTGAGCTCGAGT	729
179	SSTRGDH LSL	535	TCCTCAACGAGAGGAGACCACCTGTCTTTG	730
180	SWNRGDI SGL	731	TCGTGGAACAGAGGAGACATATCTGGCCTT	732
181	TGTRGDL GTM	733	ACGGGTACTAGAGGAGACCTGGGGACGATG	734
182	QQLRGD THTL	735	CAGCAGCTTAGAGGAGACACGCATACTCTT	736
183	AGLRGD RDSL	737	GCGGGGTTGAGAGGAGACCGTGATTCGCTT	738
184	QVYRGD RDQL	739	CAGGTTTATAGAGGAGACCGGGATCAGTTG	740
185	AGVRGD	741	GCAGGAGTAAGAGGAGACAGAGTGACCATC	742

	RVTI			
186	NSARGDL LHS	743	AACTCAGCCAGAGGAGACCTTCTGCACTCC	744
187	NHSRGDL TGV	745	AACCACAGTAGAGGAGACCTGACAGGCGTT	746
188	NAYRGD TSAF	747	AACGCTTACAGAGGAGACACATCCGCGTTC	748
189	SANRGDI MHT	749	TCGGCTAACAGAGGAGACATAATGCACACG	750
190	QSARGDL VSY	751	CAATCCGCCAGAGGAGACCTCGTCAGTTAC	752
191	DSRRGD ASYH	726	GATAGTAGGAGAGGAGACGCTAGTTATCAT	753
192	SFVRGDV RTL	754	TCGTTTGTGAGAGGAGACGTTCGTACGCTG	755
193	SDMRGD RSVY	756	AGCGACATGAGAGGAGACCGATCTGTGTAC	757
194	SGIRGDR YPI	758	TCCGGAATCAGAGGAGACCGCTACCCAATA	759
195	SNVRGD MAHS	760	TCCAACGTCAGAGGAGACATGGCTCACAGC	761
196	TEVRGDR SQV	523	ACTGAGGTTAGAGGAGACCGTTCGCAGGTT	762
197	ASSRGDL QQT	763	GCGAGCAGCAGAGGAGACCTGCAACAAACG	764
198	QSARGDL VSY	751	CAGTCTGCTAGAGGAGACCTTGTGTCTTAT	765
199	DASRGD RTSL	521	GACGCATCTAGAGGAGACCGAACATCCCTC	766
200	NSVRGDL NQT	767	AACAGTGTCAGAGGAGACCTCAACCAAACT	768

Пример 6. Направленная эволюция сконструированных капсидов AAV и специфичных для мышц вариантов капсида

[0589] Рекомбинантные адено-ассоциированные вирусы (rAAV) являются наиболее часто используемыми носителями для ген-заместительной терапии и редактирования генов *in vivo* в доклинических и клинических исследованиях, однако селективная трансдукция конкретных тканей после системной доставки остается проблемой. Рекомбинантные AAV, полученные с использованием природных капсидов, преимущественно секвестрируются в печени после системного введения. Эта секвестрация ограничивает эффективность трансдукции в других органах (Gao et al., 2006; Murrey et al., 2014; Zincarelli et al., 2008) и создает особую проблему для доставки генов в скелетные мышцы. Поскольку мышцы составляют до 40% от общей массы тела, для достижения терапевтических порогов в мышцах с природными вариантами капсида требуются чрезвычайно высокие дозы вируса (около 2E+14 гв/кг) (Duan, 2018a, b), что создает серьезное препятствие для производства векторов и может привести к ограничивающей терапию токсичности, как это наблюдалось в некоторых недавних клинических испытаниях (Morales et al., 2020).

[0590] Конструирование капсидного белка AAV в сочетании с селекцией *in vivo* является перспективным подходом для обеспечения надежной доставки генов в различные ткани. Капсиды AAV состоят из 5 субъединиц VP1, 5 VP2 и 50 VP3, которые объединяются в сложную 3-мерную структуру, определяющую тропизм к ткани после системной доставки. Даже одно аминокислотное изменение в субъединицах VP3, расположенных на поверхности капсида, может изменить тропизм к различным тканям (Pulicherla et al., 2011; Wu et al., 2006). Таким образом, стратегии конструирования капсида AAV обычно включают создание разнообразных библиотек капсидов различными способами с последующей селекцией вариантов с желаемым тропизмом на моделях животных. Этот подход позволил создать оптимизированные векторы для доставки в ряд тканей, включая сетчатку (Dalkara et al., 2013) и центральную и периферическую нервную систему мыши (Chan et al., 2017; Deverman et al., 2016).

[0591] Тем не менее, современные подходы к разработке капсидов имеют ключевые ограничения с точки зрения методов селекции, моделей животных, которые они могут использовать, и разнообразия библиотек, которые они могут подвергать скринингу.Трансдукция AAV представляет собой многостадийный процесс, включающий связывание с рецепторами на клеточной поверхности, внутриклеточный перенос, эндосомальное ускользание, проникновение в ядро, синтез второй цепи ДНК векторного генома и экспрессию трансгена ((Berry and Asokan, 2016; Ding et al., 2005), **Фиг. 21A**), а неэффективность любой из этих стадий может ограничивать активность вектора. Следовательно, успешная идентификация перспективных капсидов требует выбора вариантов, которые эффективно проходят все стадии трансдукции.Специфичные для вида и линии различия в кодирующей последовательности и экспрессии генов, участвующих в трансдукции AAV, представляют собой еще одну проблему, поскольку капсидные варианты, отобранные в определенных линиях мышей, могут не обеспечивать эффективную трансдукцию в других линиях или других видах (Hordeaux et al., 2018). Таким образом, весьма желателен подход конструирования, который позволяет выбирать эффективные варианты капсида среди различных линий и видов.

[0592] В этом примере описана стратегия DELIVER (направленная эволюция капсидов AAV с использованием экспрессии РНК трансгена in vivo) для решения этих проблем. DELIVER сочетает создание разнообразных библиотек капсидов со строгой селекцией *in vivo* на основе транскриптов и обеспечивает направленную эволюцию с последующей идентификацией эффективных вариантов капсида в любой представляющей интерес ткани и на любой животной модели. Здесь демонстрируется применимость DELIVER для создания тропных к мышцам капсидов у мышей, и результаты сравниваются с AAV9, природным капсидом AAV, который в настоящее время используется в клинических испытаниях по замене генов при мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) (идентификаторы на clinicaltrials.gov: NCT03362502 и NCT03368742). В целом, направленные на мышцы векторы демонстрируют превосходную активность и селективность для трансдукции как скелетных мышц, так и сердечной ткани, обеспечивая терапевтическую эффективность при значительно сниженной дозировке по сравнению с AAV9, и с сохраненной инфективностью для мышечных клеток как мыши, так и человека. Кроме того, перекрестное сравнение последовательностей вариантных капсидов, обогащенных в мышцах, выявило общий мотив RGD среди лучших вариантов, а дополнительный анализ обнаружил сильное взаимодействие с гетеродимерами RGD-связывающего интегрина, и их зависимость от экспрессии в целевых клетках. В целом, данный пример демонстрирует, помимо прочего, новый класс вариантов капсида с особой полезностью для разработки и тестирования терапевтических препаратов в поперечнополосатых мышцах, а также экспериментальную основу для будущей эволюции дополнительных семейств AAV с альтернативным тропизмом к тканям.

Результаты

Эволюция капсида AAV9 in vivo с использованием DELIVER позволяет выявить класс тропных к мышцам вариантов

[0593] Дизайн библиотеки является важным фактором, определяющим успех любой кампании по скринингу. Библиотеки капсидов на основе AAV9, разработанные для этого исследования, включали несколько ключевых функций, облегчающих идентификацию направленных на мышцы векторов с высокой активностью для использования *in vivo*. Во-первых, каждый вариант включал случайный 7-мерный пептид, вставленный между аминокислотами 588 и 589 в гипервариабельную область VIII капсида AAV9, дизайн, обеспечивающий воздействие вариабельной пептидной последовательности на поверхность капсида ((DiMattia et al., 2012), **Фиг. 14A**). Каждый вариант также инкапсулировал трансген, кодирующий его собственную капсидную последовательность, под контролем универсального или специфичного для типа клеток промотора млекопитающих, что позволяло экспрессировать трансген (вариант капсида) как в клетках HEK293, используемых для получения вирусной библиотеки (**Фиг. 14B**), так и в ткани животных, трансдуцированных вирусом после доставки *in vivo* (**Фиг. 14C-14D**).

[0594] Строгость DELIVER для селекции вариантов капсида для функциональной трансдукции отдельных тканей мыши оценивали на мышах C57BL/6J с использованием вирусной библиотеки, в которой варианты капсида экспрессировались под контролем универсального промотора CMV. Выявлены варианты, обогащенные относительно вирусной библиотеки на уровне ДНК и мРНК в различных тканях. Селекция вариантов, основанная на экспрессии мРНК, привела к выбору нескольких функциональных капсидов по сравнению с селекцией, основанной на присутствии векторной геномной ДНК (**Фиг. 21B-21G**), предполагая, что только небольшая часть вариантов капсида, которые физически проникают в целевые клетки, могут функционально трансдуцировать эти клетки для экспрессии кодируемого ими трансгена. В соответствии с этим открытием, в то время как варианты капсида с более высокой представленностью в библиотеке инъецированных вирусов были в большей степени представлены в печени инъецированных животных на уровне геномной ДНК вектора, практически не было корреляции между представленностью каждого варианта в библиотеке вирусов и уровнем мРНК трансгена из того же варианта в печени (**Фиг. 21H-21I**).

[0595] Далее была проведена оценка возможности использования специфичных для мышц промоторов для более эффективной селекции вариантов капсида, обладающих мощным тропным к мышцам действием. Скелетная и сердечная мышцы содержат несколько разных типов клеток, но капсиды AAV, способные к эффективной доставке трансгена, в частности, к двум типам клеток — мышечным волокнам и кардиомиоцитам — наиболее желательны для терапевтической доставки генов при генетических миопатиях. Чтобы сделать возможной селекцию вариантов, специфично экспрессируемых в этих типах клеток *in vivo*, мы создали библиотеки капсидов AAV в клетках HEK293 с использованием конструкций, содержащих ITR, в которых экспрессия последовательностей, кодирующих капсид, контролировалась специфичными для мышц промоторами CK8 или MHCK7. Эти конструкции продуцировали такие же титры rAAV, как и конструкции, экспрессирующие капсид под контролем универсального промотора CMV (**Фиг. 14B**). Кроме того, в скелетных и сердечных мышцах мышей, которые получали инъекции, вирусные библиотеки, экспрессированные под контролем промоторов CK8 или MHCK7, обеспечивали даже более высокую экспрессию мРНК трансгена по сравнению с теми, которые экспрессировались под контролем промотора CMV, что значительно облегчало идентификацию функциональных вариантов, которые трансдуцируют мышечные волокна и кардиомиоциты (**Фиг. 14C-14D**).

[0596] Было проведено два раунда селекции *in vivo* с направленной эволюцией, и был проведен скрининг вариантов, экспрессируемых под контролем промотора MHCK7 в нескольких различных мышцах мышей C57BL/6J. Процесс начался с использования разнообразной библиотеки из более чем 5000000 вариантов капсида, и были отобраны 30000 лучших вариантов, которые экспрессировались на высоком уровне в семи мышцах (четырехглавой, передней большеберцовой, икроножной, трехглавой, брюшной, диафрагмальной и сердечной) (**Фиг. 14A и 14E**). Для второго раунда селекции *in vivo* были включены два контроля. Первым был контроль с синонимичными кодонами, в котором одни и те же 7-мерные вставленные пептиды, идентифицированные для каждого выбранного варианта из первичного скрининга, кодировались с использованием синонимичных кодонов ДНК. Вторым был контроль экспрессии, в котором были созданы дублированные вирусные библиотеки для экспрессии вариантов под контролем любого из двух специфичных для скелетных мышц промоторов, CK8 или MHCK7 (**Фиг. 14A**).**На Фиг. 14F** показана последовательность 7-мерной вставки в лучшие варианты капсида с высокой экспрессией в мышцах мышей после второго раунда селекции на основе транскриптов. Варианты с одинаковым цветом в каждой группе кодируются синонимичными кодонами ДНК.

[0597] Поразительно, что во втором раунде селекции все 12 лучших вариантов капсида, экспрессируемых на высоком уровне в мышцах из библиотек CK8 или MHCK7, содержали один и тот же мотив аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты (RGD) в первых 3 положениях аминокислот 7-мерной вставки. Что еще больше указывает на то, что специфичные пептидные последовательности, включенные в эти варианты капсида, способствуют их превосходной трансдукции в мышцах, 10 из 12 лучших выбранных вариантов в группе CK8 и 8 из 12 лучших выбранных вариантов MHCK7 были из синонимичных пар (т.е. соответствующий вариант, кодируемый синонимичными кодонами ДНК, также входил в число 12 лучших вариантов, экспрессируемых мышцами) (**Фиг. 14F**).

[0598] Титры rAAV, полученных с использованием 5 лучших уникальных RGD-содержащих вариантов капсида, были количественно определены для оценки возможности использования этих сконструированных капсидов для исследований *in vivo*. Сравнение титров rAAV не показало значимой разницы между 5 лучшими RGD-содержащими вариантами капсида и исходным капсидом AAV9 (**Фиг. 22E**). Вариант, содержащий вставку пептида RGDLTTP, который также соответствует консенсусным аминокислотам в каждом положении из 12 лучших RGD-содержащих выбранных вариантов, был выбран для дальнейшего определения характеристик и назван этот вариант «MyoAAV».

MyoAAV трансдуцирует мышцы мышей с беспрецедентной эффективностью после системного введения

[0599] Для исследования профиля трансдукции и биораспределения rAAV, полученных с использованием MyoAAV, в различных тканях мыши после системной доставки, взрослым мышам C57BL/6J вводили 1E+12 гв (~4E+13 гв/кг) AAV9- или MyoAAV-CMV-EGFP и анализировали экспрессию трансгена и представленность векторного генома в различных тканях через две недели после инъекции. Флуоресцентная визуализация тотального препарата собранных тканей выявила гораздо большую интенсивность флуоресценции в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV, по сравнению с мышами, которым вводили AAV9 (**Фиг. 15A** и **22A**). Важно отметить, что MyoAAV трансдуцировал сердце, ключевой поражаемый орган при многих генетических миопатиях, более эффективно, чем AAV9. Сильная экспрессия трансгена в мышечных волокнах и кардиомиоцитах мышей, которым вводили MyoAAV, была дополнительно подтверждена иммунофлуоресцентным анализом (**Фиг. 15B** и **22B**). Примечательно, что MyoAAV продемонстрировал относительно сниженную трансдукцию печени после системной доставки мышам C57BL/6J, что свидетельствует о профиле трансдукции, не направленной на печень, для этого варианта по сравнению с AAV9 (**Фиг. 15A-15C**).

[0600] Количественное определение мРНК EGFP в различных скелетных мышцах выявило в 10-25 раз более высокую экспрессию трансгена в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV, по сравнению с мышцами мышей, которым вводили AAV9 (**Фиг. 15C**). Экспрессия мРНК EGFP была в 6,3 раза выше в сердце и в 2,8 раза ниже в печени животных, которым вводили MyoAAV (**Фиг. 15C**). Примечательно, что повышенная эффективность трансдукции с помощью MyoAAV была ограничена тканями поперечнополосатых мышц, и этот сконструированный вариант капсида трансдуцировал легкие, почки, селезенку и мозг инъецированных животных с аналогичной или более низкой эффективностью по сравнению с AAV9 (**Фиг. 15C** и **22C**). Анализ биораспределения показал, что MyoAAV доставлял векторные геномы во все мышцы мышей C57BL/6J более эффективно, чем AAV9, за исключением брюшных мышц, и обеспечивал значительно меньшее количество векторных геномов в печени после системного введения (**Фиг. 22D**).

[0601] Затем была проанализирована эффективность MyoAAV в трансдукции скелетных мышц человека. Первичные миотрубочки человека от 4 разных доноров (2 самцов и 2 самок) трансдуцировали *in vitro* с помощью AAV9- или MyoAAV-CK8-нанолюциферазы (Nluc). MyoAAV трансдуцировал миотрубочки от разных доноров в 35-52 раза более эффективно, чем AAV9 (**Фиг. 15D**). MyoAAV также трансдуцировал первичные миотрубочки мышей C57BL/6J с эффективностью, в 23 раза превышающей эффективность AAV9 (**Фиг. 15D**).

[0602] Кроме того, эффективность трансдукции мышечных стволовых клеток (сателлитных клеток) с помощью MyoAAV оценивали после внутривенного введения 6-месячным мышам *mdx-Ai9*. Эти мыши с дефицитом дистрофина представляют собой генетическую модель DMD человека и дополнительно несут Cre-активируемый трансген tdTomato, который служит репортером для трансдукции Cre-кодирующими AAV.Сортировка флуоресцентно-активированных сателлитных клеток (FACS) из мышц мышей, которым вводили AAV8-, AAV9- или MyoAAV-CMV-Cre, показала трансдукцию значительно большего процента сателлитных клеток у животных, получавших MyoAAV (**Фиг. 22F-22I**).

[0603] Чтобы исследовать кинетику экспрессии генов *in vivo* после системной доставки MyoAAV, мы вводили взрослым мышам BALB/cJ 4E+11 гв (~1,6E+13 гв/кг) AAV8-, AAV9- или MyoAAV-CMV-люциферазу светлячка (Fluc) и выполняли визуализацию биолюминесценции всего тела в разные моменты времени в течение 120 дней после инъекции.Мыши, получавшие MyoAAV, демонстрировали более быструю кинетику и значительно более высокие общие уровни экспрессии трансгена в конечностях и во всем теле по сравнению с мышами, которым вводили AAV8 или AAV9 (**Фиг. 16A-16B** и **23A**). Биолюминесцентная визуализация всего органа из мышц мышей, собранных через четыре месяца после инъекции, подтвердила значительно более высокую экспрессию люциферазы в мышцах животных, которым вводили MyoAAV (**Фиг. 16C-16D** и **23B**). Эти данные, полученные в Balb/cJ, в отличие от C57BL/6J, дополнительно демонстрируют, что мощная трансдукция мышц с помощью MyoAAV после системной доставки сохраняется у разных линий мышей.

Системное введение терапевтических трансгенов с использованием MyoAAV приводит к функциональному улучшению в мышиных моделях DMD и XLMTM

[0604] Чтобы исследовать возможность использования MyoAAV для доставки терапевтических трансгенов *in vivo*, взрослым мышам *mdx* (мышиная модель DMD, несущая нонсенс-мутацию в экзоне 23 *Dmd*) вводили AAV9 или MyoAAV, несущие конструкции, кодирующие SaCas9, вместе с направляющими РНК (нРНК), нацеленными на 5' и 3' мутации *mdx* (**Фиг. 24A-24B**). Ранее было показано, что этот CRISPR-Cas9-опосредованный подход приводит к вырезанию экзона 23 из генома клеток *mdx* и экспрессии укороченной, но все еще функциональной версии белка дистрофина в мышцах (Nelson et al., 2016; Tabebordbar et al., 2016). При получении укороченного варианта эта делеция в рамке считывания по-прежнему приводит к образованию функционального белка, тем самым обеспечивая терапевтический эффект при DMD.

[0605] MyoAAV-*Dmd* CRISPR привел к продукции мРНК *Dmd* с делецией экзона 23 с эффективностью от 3,4% до 25% от общей мРНК *Dmd* в различных мышцах *mdx*. Напротив, эффективность продукции мРНК с делецией экзона 23 в мышцах мышей *mdx*, которым вводили такую же дозу AAV9-*Dmd* CRISPR, составляла всего от 1,3% до 8,7% (**Фиг. 17C**). Количественная оценка экспрессии SaCas9 и нРНК показала, что экспрессия SaCas9 в 6,7-19 раз выше, а экспрессия нРНК в 3,5-7,8 раз выше в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV, по сравнению с животными, которым вводили AAV9 (**Фиг. 24C-24D**).

[0606] Несколько результатов указывают на лучшее восстановление экспрессии дистрофина с помощью MyoAAV-*Dmd* CRISPR по сравнению с AAV9-*Dmd* CRISPR. Иммунофлуоресценция и вестерн-блот анализ подтвердили большее и более широкое восстановление дистрофина в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV-*Dmd* CRISPR, по сравнению с AAV9-*Dmd* CRISPR (**Фиг. 17A-17B**). Физиологическая оценка передней большеберцовой мышцы (TA) у животных, получавших лечение AAV-CRISPR, продемонстрировала значительно более высокую удельную силу (**Фиг. 17D**) и снижение процентного падения силы после эксцентрического сокращения (**Фиг. 17E**) у мышей *mdx*, которым вводили MyoAAV-*Dmd* CRISPR, по сравнению контролями, которым вводили либо носитель, либо AAV9-*Dmd* CRISPR. Таким образом, MyoAAV демонстрирует заметно повышенную эффективность доставки терапевтических комплексов для редактирования генов в мышцы по сравнению со стандартным и широко используемым AAV9.

[0607] Эффективность MyoAAV в отношении замены генов после системного введения низких доз оценивали на мышиной модели X-сцепленной миотубулярной миопатии (XLMTM). Мыши с нокаутом *Mtm1* (KO) представляют собой превосходную генетическую и фенотипическую модель XLMTM; они демонстрируют заметное истощение мышц, потерю подвижности и резкое сокращение продолжительности жизни. Мышам с нокаутом *Mtm1* в возрасте 4 недель вводили 2E+12 гв/кг AAV9 или MyoAAV, кодирующего *MTM1* человека (h*MTM1*), экспрессируемого под контролем промотора MHCK7 (MHCK7-h*MTM1*). Мы измеряли массу тела, активность и выживаемость для каждой группы в течение 7-месячного периода (**Фиг. 17F и 24E**). Доза вируса, использованная в этом эксперименте, была в 50-150 раз ниже, чем доза, используемая в продолжающемся клиническом испытании XLMTM с участием людей (идентификатор на clinicaltrials.gov:

NCT03199469), и в 15-250 раз ниже, чем доз, использованные в ранее опубликованных доклинических исследованиях генной терапии XLMTM (Childers et al., 2014; Elverman et al., 2017; Mack et al., 2017).

[0608] У мышей, которым вводили MyoAAV-MHCK7-h*MTM1*, наблюдалось поразительное улучшение функции и выживаемости. Все мыши, которым вводили 2E+12 гв/кг AAV9-MHCK7-h*MTM1*, были минимально активны и достигли гуманной конечной точки эвтаназии между 11-21 неделями после инъекции. Напротив, все мыши, которым вводили одну и ту же дозу MyoAAV-MHCK7-h*MTM1*, выживали с той же закономерностью, что и мыши дикого типа, а также набирали массу и были заметно более активными по сравнению с мышами, которым вводили AAV9, на протяжении всего исследования (**Фиг. 17G-17K**).

MyoAAV зависит от гетеродимеров интегрина для трансдукции первичных миотрубочек мыши и человека

[0609] Учитывая наличие мотива RGD в MyoAAV и всех других лучших вариантах из нашей выборки, была оценена роль гетеродимеров RGD-связывающего интегрина в трансдукции MyoAAV. Мотив RGD был впервые обнаружен в 1984 г. как минимальная последовательность в фибронектине, которая облегчает связывание с его рецептором, позднее идентифицированным как гетеродимер интегрина α5β1 (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984; Pytela et al., 1985). С тех пор RGD был идентифицирован как мотив распознавания для нескольких различных гетеродимеров интегрина; конкретно, αIIbβ3, α5β1, α8β1, αVβ1, αVβ3, αVβ5, αVβ6, и αVβ8 (Ruoslahti, 1996). Эффективность трансдукции AAV9- и MyoAAV-CMV-Nluc сравнивали в клетках HEK293, сверхэкспрессирующих каждый из этих восьми гетеродимеров человеческого RGD-связывающего интегрина (**Фиг. 255A-25I**). Сверхэкспрессия α8β1, αVβ1, αVβ3, αVβ6 или αVβ8 повышала эффективность трансдукции MyoAAV в трансфицированных клетках HEK293 по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными PUC19, тогда как трансдукция AAV9 не усиливалась за счет сверхэкспрессии любого из этих гетеродимеров интегрина (**Фиг. 18A**).

[0610] Затем влияние различных гетеродимеров интегрина на эффективность связывания MyoAAV и AAV9 с клеточной поверхностью оценивали с помощью экспериментов по сверхэкспрессии. Геномы векторов, связанные с поверхностью клеток HEK293, трансфицированных каждым из восьми гетеродимеров RGD-связывающего интегрина или контрольной плазмидой PUC19, были количественно определены, и было обнаружено, что α8β1, αVβ6 и, в меньшей степени, αVβ1 увеличивали связывание MyoAAV, но не AAV9 в клетки, трансфицированные интегрином, по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными PUC19 (**Фиг. 18B**). Также было исследовано влияние двух различных антагонистов панинтегрина αV (CWHM-12 и GLPG-0187) на эффективность трансдукции MyoAAV в первичных клетках. Оба ингибитора препятствуют трансдукции MyoAAV дозозависимым образом как в первичных миотрубочках скелетных мышц мыши (**Фиг. 18C** и **26A**), так и человека (**Фиг. 18D** и **26B-26H**), в то время как ни один из ингибиторов не оказывал дозозависимого эффекта на эффективность трансдукции AAV9. Эти результаты демонстрируют, что ингибирование гетеродимеров интегрина, содержащего αV, почти полностью устраняет способность MyoAAV трансдуцировать первичные миотрубочки как мыши, так и человека.

[0611] Для дальнейшего выяснения влияния отдельных гетеродимеров интегрина, содержащего αV, на аффинность связывания MyoAAV первичные миотрубочки человека трансдуцировали MyoAAV или AAV9 после предварительной инкубации этих вирусов с рекомбинантными белками αVβ1, αVβ3, αVβ6, αVβ8 или мальтоза-связывающего белка (MBP). Примечательно, что предварительная инкубация MyoAAV с возрастающими концентрациями αVβ6 приводила к дозозависимому ингибированию трансдукции первичных миотрубочек человека, в то время как ни один из других протестированных нами рекомбинантных белков не оказывал дозозависимого эффекта на трансдукцию клеток MyoAAV или AAV9 (**Фиг. 18E-18F**). Наоборот, предварительная инкубация миотрубочек человека с возрастающими концентрациями антитела к αVβ6 снижала эффективность трансдукции с помощью MyoAAV дозозависимым образом и не влияла на трансдукцию миотрубочек с помощью AAV9 (**Фиг. 18G**). Эти данные свидетельствуют о том, что среди гетеродимеров интегрина, содержащего αV, которые обладают способностью облегчать трансдукцию MyoAAV, αVβ6 обладает наибольшей аффинностью связываться с этим вариантом капсида. Кроме того, αVβ6 должен быть доступен на поверхности мышечных клеток человека, чтобы обеспечить их оптимальную трансдукцию с помощью MyoAAV.

[0612] Была оценена зависимость трансдукции MyoAAV от ранее идентифицированного рецептора AAV (AAVR). Ранее идентифицированный рецептор AAV представляет собой быстро подвергаемый эндоцитозу белок плазматической мембраны, необходимый для эффективной трансдукции большинства известных серотипов AAV, кроме AAV4 и AAVrh32.33 (Dudek et al., 2018; Pillay et al., 2016). HEK293FT с нокаутом AAVR (KO) и исходные клетки HEK293FT дикого типа (ДТ) трансдуцировали с помощью AAV4-, AAV2-, AAV9- или MyoAAV-CMV-Nluc и обнаружили, что, подобно AAV2 и AAV9, трансдукция MyoAAV требует экспрессии AAVR (**Фиг. 18H**).

[0613] Чтобы выяснить, играют ли гетеродимеры интегрина и AAVR повторяющиеся роли в трансдукции MyoAAV, α8β1, αVβ1, αVβ3, αVβ6 или αVβ8 были сверхэкспрессированы в клетках HEK293FT с нокаутом AAVR со сверхэкспрессией AAVR или без нее, а затем трансдуцировали клетки с помощью MyoAAV-CMV-Nluc. Эти результаты продемонстрировали, что, хотя сверхэкспрессия гетеродимеров интегрина повышала эффективность трансдукции MyoAAV в клетках с нокаутом AAVR по сравнению с ложно-трансфицированными контролями, сверхэкспрессии интегрина было недостаточно для восстановления трансдукции до уровней, наблюдаемых в клетках с нокаутом AAVR, сверхэкспрессирующих AAVR, или в клетках HEK293FT ДТ (**Фиг. 26I**). Эти данные свидетельствуют о том, что гетеродимеры интегрина и AAVR играют разные роли и, вероятно, используются на разных стадиях трансдукции MyoAAV.

Дополнительные раунды эволюции in vivo с использованием DELIVER генерируют RGD-содержащие тропные к мышцам варианты второго поколения

[0614] Учитывая важность взаимодействия мотива RGD с гетеродимерами интегрина для трансдукции миотрубочек с помощью MyoAAV и не ограничиваясь какой-либо теорией, считалось, что модификация аминокислот, прилегающих к мотиву, может улучшить это взаимодействие, генерируя еще более мощные тропные к мышцам варианты капсида. Основываясь на предсказанной структуре поверхностной петли гипервариабельной области VIII MyoAAV, аминокислоты в положениях 586, 587 и 588 против хода транскрипции и в положениях 592, 593, 594 и 595 по ходу транскрипции от мотива RGD были идентифицированы как вероятные для расположения в поверхностной петле MyoAAV (**Фиг. 19A**). Была создана разнообразная библиотека капсидов, каждый из которых имел мотив RGD, зафиксированный в положениях 589, 590 и 591, и различные аминокислоты в вышеупомянутых фланкирующих положениях (**Фиг. 19B**).

[0615] Два раунда селекции *in vivo* на тропные к мышцам варианты с использованием DELIVER были проведены на мышах C57BL/6J и *mdx*. Вирусную библиотеку второго цикла вводили в двух разных дозах (1E+12 гв и 1E+11 гв на мышь) для идентификации вариантов, которые эффективно трансдуцируют мышечную ткань как при высокой, так и при низкой дозе (**Фиг. 19B**). Мы обнаружили, что среди наших лучших выбранных вариантов из этих выборок глицин и аланин были обогащены в положении 588, а глутамин — в положении 592. Вариант, содержащий последовательность GPGRGDQTTL (SEQ ID NO: 2), оказался наиболее тщательно отобранным тропным к мышцам капсидом как при дозах 1E+12, так и при дозах 1E+11 во втором раунде селекции (**Фиг. 19B**). Этот вариант второго поколения был назван «улучшенный MyoAAV» (EMyoAAV) и использовался для дальнейшего определения характеристик.

[0616] Эффективность трансдукции EMyoAAV оценивали в различных тканях мыши после системной доставки низкой дозы вируса по сравнению с AAV9 и MyoAAV.Мышам C57BL/6J вводили 2E+11 гв (~8E+12 гв/кг) AAV9-, MyoAAV- или EMyoAAV-CMV-EGFP и анализировали экспрессию трансгена и биораспределение векторных геномов в различных тканях. Флуоресцентная визуализация цельной ткани показала, что системная доставка гена с помощью EMyoAAV приводит к более высоким уровням экспрессии трансгена по сравнению с MyoAAV или AAV9 в различных скелетных мышцах (**Фиг. 19C-19D**). Количественная оценка мРНК EGFP показала, что EMyoAAV трансдуцирует скелетные мышцы мыши в 10-80 раз эффективнее, а сердце в 17 раз эффективнее, чем AAV9. Кроме того, экспрессия мРНК трансгена была в 2,5 раза ниже в печени животных, которым вводили EMyoAAV, по сравнению с мышами, которым вводили AAV9 (**Фиг. 19E**). Аналогичным образом, анализ биораспределения векторных геномов показал, что мыши, которым вводили EMyoAAV, имели значительно более высокие количества векторных геномов на диплоидный геном в скелетных мышцах и сердце и значительно более низкое количество векторных геномов на диплоидный геном в печени по сравнению с животными, которым вводили AAV9 (**Фиг. 27A**).

[0617] Затем была проанализирована эффективность и зависимость интегрина EMyoAAV для трансдукции первичных миотрубочек человека. Примечательно, что EMyoAAV трансдуцирует первичные миотрубочки человека в 128 раз более эффективно по сравнению с AAV9 и в 4,1 раза выше, чем MyoAAV (**Фиг. 19F**). Повышение концентрации антагониста панинтегрина αV GLPG-0187 приводило к дозозависимому снижению эффективности трансдукции EMyoAAV (**Фиг. 19G**), подтверждая, что инфективность EMyoAAV по-прежнему зависит от гетеродимеров интегрина, содержащего αV, экспрессированных на целевых клетках.

[0618] Для оценки аффинности связывания EMyoAAV с различными отдельными гетеродимерами интегрина αV, EMyoAAV или AAV9 предварительно инкубировали с рекомбинантными белками αVβ1, αVβ3, αVβ6, αVβ8 или мальтоза-связывающего белка (MBP) перед трансдукцией первичных миотрубочек человека. Интересно, что в отличие от результатов, полученных в тех же самых анализах с MyoAAV (**Фиг. 18E**), все четыре протестированных гетеродимера интегрина, содержащего αV, ингибировали трансдукцию миотрубочек человека с помощью EMyoAAV дозозависимым образом (**Фиг. 19H-19I**), в то время как не было дозозависимого эффекта на трансдукцию AAV9. Этот результат свидетельствует о том, что аминокислотные замены, включенные в EMyoAAV, обеспечивают более высокую аффинность связывания с более широким классом гетеродимеров интегрина αV по сравнению с MyoAAV, который в основном зависит от αVβ6.

[0619] Была оценена зависимость от гетеродимеров αVβ6 лучших вариантов капсида первого и второго поколения, которые были получены с помощью DELIVER. Первичные миотрубочки человека предварительно инкубировали с антителом к αVβ6 перед трансдукцией клеток лучшими вариантами (RGDLTTP (SEQ ID NO: 12), RGDLSTP (SEQ ID NO: 8), RGDLNQY (SEQ ID NO: 9), RGDATEL (SEQ ID NO: 10), RGDTMSK (SEQ ID NO: 11)) первого поколения и (GPGRGDQTTL (SEQ ID NO: 2), AEGRGDQYTR (SEQ ID NO: 3), ATGRGDLGQA (SEQ ID NO: 4), AVARGDQGLI (SEQ ID NO: 5), NISRGDQGYQ (SEQ ID NO: 6), APARGDQGSQ (SEQ ID NO: 7)) второго поколения. В то время как связывание антител в некоторой степени ингибировало трансдукцию миотрубочек человека всеми этими вариантами, капсиды первого поколения значительно больше зависели от αVβ6 для трансдукции миотрубочек (**Фиг. 27B**).

EMyoAAV демонстрирует большой терапевтический потенциал после инъекции низкой дозы вируса

[0620] Наконец, была изучена терапевтическая значимость EMyoAAV по сравнению с капсидами, которые в настоящее время проходят клинические испытания при нервно-мышечных заболеваниях человека. В частности, для DMD, как AAV9, так и AAVrh74 исследуются в текущих клинических испытаниях (идентификаторы clinicaltrials.gov: NCT03362502, NCT03368742 и NCT03769116). Системное введение функционально дополняющего мини-гена дистрофина (названного микродистрофином), экспрессируемого под контролем специфичного для мышц промотора MHCK7 и доставляемого с использованием вектора AAVrh74, показало многообещающие результаты в недавно опубликованном клиническом испытании с участием людей, а именно четырех пациентов с DMD. В этом испытании введение высокой дозы вируса 2E+14 гв/кг привело к экспрессии трансгена в мышцах и функциональному улучшению фенотипа заболевания (Mendell et al., 2020).

[0621] Опосредованную EMyoAAV доставку гена сравнивали с таковой для векторов AAVrh74 и AAV9 и дополнительно исследовали эффективность в модели DMD на мышах *DBA-mdx*. В продольном эксперименте по визуализации *in vivo* мы вводили взрослым мышам BABL/cJ низкую дозу (2E+11 гв, что составляет ~8E+12 гв/кг) AAVrh74, AAV9 или EMyoAAV, кодирующих репортерный ген CMV-Fluc. Мыши, которым вводили EMyoAAV, демонстрировали значительно более высокий сигнал биолюминесценции в конечностях и во всем теле по сравнению с мышами, получавшими AAVrh74 или AAV9, во все проанализированные моменты времени (**Фиг. 19J-19K**). Затем мы протестировали системную доставку EMyoAAV или AAV9, несущих трансген микродистрофина (CK8-микродистрофин-FLAG), в мышиную модель DMD *DBA-mdx* с использованием эквивалентной низкой дозы (2E+13 гв/кг) каждого AAV. У животных, которым вводили EMyoAAV, наблюдалась относительно большая и более распространенная экспрессия микродистрофина, локализованного в сарколемме, во многих группах мышц по сравнению с животными, которым вводили AAV9 (**Фиг. 20A**). Вестерн-блоттинг подтвердил более высокие уровни белка микродистрофина в мышцах мышей, которым вводили EMyoAAV, по сравнению с животными, которым вводили AAV9 (**Фиг. 20B**). Количественная ОТ-ПЦР показала в 7,6-15 раз более высокие уровни мРНК микродистрофина в скелетных мышцах мышей, которым вводили EMyoAAV-CK8-микродистрофин-FLAG, по сравнению с AAV9-CK8-микродистрофин-FLAG (**Фиг. 20C**).

[0622] Наконец, представленность векторных геномов и мышечную функцию у мышей, которым вводили EMyoAAV, оценивали по сравнению с животными, которым вводили AAV9. EMyoAAV доставлял в 12-46 раз больше векторных геномов на диплоидный геном в скелетных мышцах мышей *DBA-mdx* и в 2,5 раза меньше векторных геномов на диплоидный геном в печени по сравнению с AAV9 (**Фиг. 20D**). Примечательно, что если у животных, которым вводили AAV9, количество векторных геномов на диплоидный геном в печени было более чем в 40 раз выше, чем в мышцах, то у мышей, которым вводили EMyoAAV, их количество в печени и мышцах было одинаковым. Количественное определение мышечной удельной силы и процентное падение силы после эксцентрического повреждения показало, что мышцы TA мышей *DBA-mdx*, которым вводили EMyoAAV, восстанавливали значительно большую удельную силу и были более защищены от повреждений по сравнению с мышцами мышей, получавших равные дозы AAV9, и мышцами, которым вводили носитель (**Фиг. 20E-20F**).

Подробности способа

<u>*Конструкции*</u>

[0623] Плазмида, используемая для создания AAV-CMV-EGFP, была получена путем клонирования промотора цитомегаловируса (CMV), последовательности, кодирующей EGFP, и сигнала полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH pA) в остов плазмиды pZac2.1 AAV с применением сборки Гибсона. Конструкции, используемые для создания AAV-CMV-Nluc и AAV-CMV-Fluc, были получены путем замены последовательности, кодирующей EGFP, в pZac2.1-CMV-EGFP-bGH pA последовательностями, кодирующими Nluc и Fluc, соответственно. Конструкция pZac2.1 была приобретена у Penn Vector Core Пенсильванского университета. Плазмиды, используемые для создания вирусов AAV-CMV-Cre и AAV-CRISPR, были описаны ранее (Goldstein et al., 2019; Tabebordbar et al., 2016). Реципиентная плазмида библиотеки плазмид была создана путем клонирования промоторов CMV, MHCK7 (Salva et al., 2007) или CK8 (Bengtsson et al., 2017), последовательностей сплайсинга из rep AAV2 (модифицированного из последовательности, описанной в (Deverman et al., 2016), включающей консервативный донор сплайсинга (Farris and Pintel, 2008)), последовательности, кодирующей капсид AAV9, содержащей сайты рестрикции BsmBI сразу после Q486 и Q588, и сигнала полиаденилирования SV40 в остов pZac2.1 с применением сборки Гибсона. Для создания конструкций, кодирующих белки интегрина и AAVR, последовательности, кодирующие человеческий интегрин αV, α5, α8, αIIb, β1, β3, β5, β6, β8 и AAVR, амплифицировали из кДНК скелетных мышц человека. Ампликоны встраивали в остов pUC57 по ходу транскрипции от промотора фактора элонгации 1 альфа (EF1α) человека и против хода транскрипции от последовательности позднего сигнала полиаденилирования SV40 с применением сборки Гибсона. Плазмида, используемая для создания AAV-MHCK7- MTM1 человека, была получена путем клонирования промотора MHCK7, химерного интрона из вектора экспрессии pCI-neo млекопитающих (Promega), последовательности, кодирующей MTM1 человека, и pA bGH в остов плазмиды pZac2.1 AAV с применением сборки Гибсона. pZac2.1-CK8-микродистрофин-FLAG был клонирован путем включения промотора CK8, кодирующей последовательности пяти повторов микродистрофина (Hakim et al., 2017), метки FLAG и синтетического сигнала полиаденилирования (Levitt et al., 1989) между ITR остова pZac2.1.

Получение библиотеки капсидов

[0624] Для подготовки библиотек капсидов для первого раунда селекции мы расщепляли реципиентную плазмиду библиотеки AAV, содержащую промотор CMV или MHCK7, с помощью BsmBI. Мы амплифицировали фрагмент, кодирующий случайный 7-мер, с использованием праймеров lib-F (5’-GCAACATGGCTGTCCAGGGAAGAAACTACATACCTG-3’ (SEQ ID NO: 769)) и NNK-R (5’-GTTTTGAACCCAGCCGGTCTGCGCCTGTGCMNNMNNMNNMNNMNNMNNMN

[0625] NTTGGGCACTCTGGTGGTTTGTGGCC-3’ (SEQ ID NO: 770)) с использованием последовательности, кодирующей капсид AAV9, в качестве матрицы, и включения этого фрагмента в реципиентную плазмиду расщепленной библиотеки с применением сборки Гибсона. Для создания плазмидной библиотеки второго раунда использовали пулы олигонуклеотидов, кодирующих варианты, отобранные в первом раунде, а также продукты репликации с синонимичными кодонами ДНК, синтезированные компанией Agilent. Пулы библиотеки олигонуклеотидов использовали вместо праймера NNK-R для создания ампликона для сборки Гибсона в реципиентную плазмиду расщепленной библиотеки. Клетки HEK293 высевали в чашки диаметром 15 см при плотности 2×10^7 клеток/чашку за 1 день до трансфекции. Каждый планшет трансфицировали 16 мкг хелперной плазмиды pALDX-80 (Aldevron), 8 мкг плазмиды Rep-AAP (щедрый подарок Бена Девермана (Deverman et al., 2016)), 8 мкг pUC19 и 10 нг библиотеки плазмид с использованием PEI

MAX (Polysciences). Библиотеку капсидов собирали из клеток и сред и очищали с помощью ультрацентрифугирования с использованием градиента плотности йодиксанола, как описано ранее (Rosemary C Challis, 2018).

Получение и очистка рекомбинантного AAV

[0626] Клетки HEK293 высевали в чашки диаметром 15 см при плотности 2×10^7 клеток/чашку. На следующий день каждый планшет трансфицировали 16 мкг хелперной плазмиды pALDX-80 (Aldevron), 8 мкг плазмиды Rep/Cap и 8 мкг ITR-содержащей плазмиды с использованием PEI MAX (Polysciences). Рекомбинантный вирус собирали из клеток и сред и очищали с помощью ультрацентрифугирования с использованием градиента плотности йодиксанола, как описано ранее (Rosemary C Challis, 2018). Титры AAV определяли количественно с помощью кПЦР на основе Taqman.

Селекция in vivo

[0627] Мышам C57BL/6J вводили 1E+12 гв библиотеки капсидов. Через две недели после инъекции мышам перфузировали PBS и отбирали несколько скелетных мышц (переднюю большеберцовую, четырехглавую, икроножную, трехглавую, брюшную и диафрагму) и сердце. Тотальную РНК и ДНК выделяли из тканей с помощью реагента TRIzol (Thermo Fisher). мРНК обогащали из образцов тотальной РНК с использованием частиц с олиго-dT (NEB), а синтез кДНК осуществляли с использованием обратной транскриптазы SuperScript IV (Thermo Fisher) и специфичного для капсида праймера (5’-GAAAGTTGCCGTCCGTGTGAGG-3’ (SEQ ID NO: 771)). ДНК вариантов капсида и экспрессированную мРНК амплифицировали из образцов ДНК и кДНК, соответственно, с праймерами, связывающимися с расположенными против хода транскрипции (5'-ACAAGTGGCCACAAACCACCA-3' (SEQ ID NO: 772)) и расположенными по ходу транскрипции (5'-GGTTTTGAACCCAGCCGGTC-3' (SEQ ID NO: 773)) от 7-мерной вставки с использованием мастер-микса Q5 High Fidelity 2x. Ампликоны, содержащие адаптеры Illumina и уникальные индексы (NEB E7600S), количественно определяли с использованием Qubit, объединяли в эквимолярном соотношении и секвенировали на Nextseq.

Анализ данных секвенирования нового поколения и дизайн библиотеки вирусов

[0628] Прочтения секвенирования Illumina были демультиплексированы с использованием bcl2fastq2-v2.17.1. Полученные последовательности FASTQ были отфильтрованы, чтобы оставить только те, которые были непосредственно сопоставлены с соответствующими последовательностями конструкции, окружающие вариабельную область, из которой был извлечен вариант из 21 п.н. Для секвенирования спаренных концов вариант дополнительно фильтровали, чтобы сохранить только те варианты, которые совпадали как в прямом, так и в обратном прочтении. Варианты подсчитывали для каждого образца и нормализовали по глубине секвенирования как количество прочтений на миллион (RPM). При необходимости также выполняли дополнительную нормализацию путем деления RPM вариантов на RPM того же варианта в совпадающем образце вирусной библиотеки. Для упрощения дальнейшего анализа варианты образцов с менее чем 10 прочтениями были исключены из дальнейшего анализа. Варианты были ранжированы с использованием отношения RPM образца, деленного на RPM вирусной библиотеки, и были идентифицированы варианты с наивысшим баллом для использования во втором раунде селекции. Для каждого выбранного аминокислотного варианта вариант, кодирующий те же аминокислоты с синонимичным кодоном ДНК, был включен в дизайн библиотеки второго раунда в качестве контроля. Для вариантов с синонимичными вариантами, уже наблюдаемыми в секвенированных образцах, синонимичный вариант с наивысшей оценкой был включен в дизайн второго раунда. Для вариантов без синонимичной версии среди секвенированных образцов, синонимичный вариант был сгенерирован с помощью вычислений путем рандомизации каждого возможного кодона исходной аминокислотной последовательности на другой кодон, если это возможно, таким образом максимально скремблируя исходную последовательность ДНК. Кроме того, мы разработали 5% олигонуклеотидов, чтобы они были случайными вариантами, содержащими стоп-кодон, чтобы контролировать перекрестную упаковку во время получения библиотеки вирусов. Данные секвенирования второго раунда селекции с использованием сконструированных вариантов обрабатывали и подсчитывали, как указано выше, с дополнительным ограничением, состоящим в том, что варианты, не соответствующие пулу сконструированных олигонуклеотидов, отфильтровывались.

Количественная оценка пропусков экзона, экспрессии трансгена и векторных геномов

[0629] Для экспериментов AAV-CRISPR и AAV-CMV-EGFP РНК экстрагировали из образцов тканей с использованием TRIzol (Thermo Fisher). Для образцов из экспериментов с AAV-CRISPR и микродистрофином выделенную РНК обрабатывали ДНКазой TURBO (Thermo Fisher), а кДНК получали с использованием мастер-микса SuperScript IV VILO (Thermo Fisher). Анализ Taqman соединения экзонов 4-5 использовали для количественного определения общего количества транскриптов *Dmd*, а другой анализ соединения экзонов 22-24 использовали для количественного определения транскриптов с удаленным экзоном 23. Для каждого из ампликонов экзонов 4-5 и экзонов 22-24 строили стандартную кривую путем амплификации gblock, содержащего целевые последовательности анализа Taqman, в каждом цикле. На основе стандартных кривых определяли общее количество транскриптов *Dmd* и транскриптов с делецией экзона 23. Экспрессию SaCas9 и нРНК в этих образцах тканей определяли количественно с использованием анализа Taqman. мРНК GAPDH мыши использовали в качестве контроля РНК «домашнего хозяйства» для количественного определения экспрессии SaCas9 и нРНК. Для образцов из эксперимента AAV-CMV-EGFP экстрагированную РНК обрабатывали ДНКазой Turbo (Thermo Fisher), а кДНК получали с использованием обратной транскриптазы SuperScript IV (Thermo Fisher) с праймером олиго-dT. мРНК бета-актина мыши использовали в качестве контроля РНК «домашнего хозяйства» для количественной оценки экспрессии микродистрофина. мРНК GAPDH и бета-актина мыши (контроли РНК «домашнего хозяйств») количественно определяли с использованием предварительно разработанных анализов Taqman Mm.PT.39a.1 и Mm.PT.39a.22214843.g от IDT, соответственно. Для экспериментов по количественному определению векторных геномов тотальную ДНК экстрагировали из образцов тканей с использованием раствора для быстрого извлечения ДНК (Lucigen). Количество векторных геномов на диплоидный геном определяли количественно на основе количественной ПЦР с использованием анализов Taqman, предназначенных для амплификации ДНК трансгена (EGFP или микродустрофина) или GAPDH мыши. Абсолютное количество молекул трансгена и GAPDH в каждом образце определяли количественно с использованием стандартных кривых, полученных путем амплификации различных количеств целевых последовательностей анализа Taqman в каждом цикле.

Эксперименты по трансдукции и связыванию AAV in vitro

[0630] Первичные миотрубочки человека и мыши были дифференцированы из миобластов человека и сателлитных клеток мыши, соответственно. Первичные миобласты скелетных мышц человека (Lonza) поддерживали в среде SkGM-2 (Lonza) при 37°C с 5% CO2. Первичные сателлитные клетки мыши выделяли из мышей C57BL/6J, как описано ранее (Cerletti et al., 2008), и размножали в среде для роста стволовых клеток мыши (20% донорской лошадиной сыворотки (Atlanta Biologics) в F10 (Gibco), содержащей 1% глутамакса (LifeTech), 1% пенициллина-стрептомицина (LifeTech) и 5 нг/мл bFGF (Sigma)) в течение 6 дней. Миобласты человека и мыши высевали в 96-луночные планшеты (Corning), покрытые коллагеном и ламинином (Thermo Fisher), с плотностью 15000 клеток/лунку. Через 24 часа после посева среду заменяли на DMEM (Gibco), содержащую 2% лошадиной сыворотки (Gibco), и миобласты дифференцировали в миотрубочки в течение 4-6 дней, прежде чем их трансдуцировали с помощью AAV9- или MyoAAV-Ck8-Nluc в 5E+3 гв/клетку. Для экспериментов по сверхэкспрессии интегрина клетки HEK293 высевали по 35000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты (Corning) в среде DMEM (Gibco), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки (Gibco). Для экспериментов по сверхэкспрессии интегрина клетки трансфицировали различными парами конструкций интегрина в общей сложности 100 нг плазмиды на лунку с использованием PEI MAX (Polysciences) на следующий день. Через 72 часа после трансфекции клетки трансдуцировали 1E+4 гв/клетку AAV9- или MyoAAV-CMV-Nluc. Для экспериментов по сверхэкспрессии интегрина и анализу трансдукции добавляли реагент Nano-Glo Luciferase Assay Reagent (Promega) в количестве, равном объему среды в планшете, и измеряли люминесценцию на устройстве для считывания микропланшетов SpectraMax L через 24 часа после трансдукции. Для экспериментов по сверхэкспрессии интегрина и анализу связывания клетки охлаждали на льду для ингибирования эндоцитоза и к клеткам добавляли AAV9- или MyoAAV-Nluc в количестве 1E+4 гв/клетку через 72 часа после трансфекции. Клетки выдерживали на льду в течение 30 мин и промывали 3 раза PBS перед лизисом в растворе для выделения ДНК QuickExtract (Lucigen). Векторные геномы и диплоидные геномы количественно определяли с помощью кПЦР на основе Taqman с использованием анализов, нацеленных на кодирующую последовательность Nluc и геномный локус GAPDH человека. Для экспериментов с зависимостью от AAVR клетки HEK293FT с нокаутом AAVR и HEK293FT с AAVR ДТ высевали в количестве 35000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты (Corning). На следующий день клетки трансдуцировали AAV2-, AAV4-, AAV9- или MyoAAV-CMV-NLuc в количестве 1E+3 гв/клетку. Для эксперимента по восстановлению AAVR клетки HEK293FT с нокаутом AAVR и HEK293FT ДТ трансфицировали 33,3 нг каждой конструкции интегрина или pUC19 и 33,3 нг конструкции AAVR или pUC19. Для трансфекции использовали в общей сложности 100 нг плазмидной ДНК. Через 48 после трансфекции клетки были трансдуцированы MyoAAV-CMV-Nluc в количестве 1E+3 гв/клетку. Реагент для анализа люциферазы Nano-Glo (Promega) добавляли через 24 часа после трансдукции в объеме, равном объему среды в планшете, и измеряли люминесценцию с использованием микропланшетного ридера SpectraMax L.

Эксперименты по ингибированию малыми молекулами и антителами

[0631] Антагонисты панинтегрина альфа V CWHM-12 и GLPG0187 (MedChem Express) или антитело к αVβ6 (ab77906, abcam) разводили в DMEM, содержащей 2% лошадиной сыворотки, в указанных концентрациях. Среду удаляли из дифференцированных миотрубочек и заменяли разведенными ингибиторами, после чего миотрубочки инкубировали на льду в течение 30 минут для ингибирования эндоцитоза. После этой инкубации к клеткам добавляли AAV9-, MyoAAV- или EMyoAAV-CK8-Nluc в количестве 5E+3 гв/клетку, и планшеты переносили обратно в инкубаторы для тканевых культур. Через 24 часа после трансдукции интенсивность люциферазы измеряли с помощью анализа люциферазы Nano-Glo (Promega).

Эксперименты по ингибированию рекомбинантных белков

[0632] Первичные миобласты скелетных мышц человека (Lonza) дифференцировали в миотрубочки в среде DMEM с 2% лошадиной сывороткой (Gibco) на 96-луночных планшетах, покрытых поли-D-лизином, дополнительно покрытых коллагеном и ламинином. MyoAAV-, AAV9- или EMyoAAV-CMV-Nluc предварительно инкубировали с рекомбинантными растворимыми гетеродимерами человеческого интегрина $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$ (R&D Systems) или мальтоза-связывающего белка (Novus Biologicals) при 37°C в течение 30 минут. Затем к клеткам добавляли вирус и белок в количестве 1E+4 гв/клетку. Клетки выдерживали при 37°C в течение 24 часов перед измерением интенсивности люциферазы с помощью анализа люциферазы Nano-Glo (Promega).

Мыши и инъекции AAV

[0633] Все процедуры по уходу за животными и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с Институциональным этическим комитетом по содержанию и использованию животных Института Броуда (IACUC), а также IACUC Гарвардского университета и Бостонской детской больницы. В лабораториях Джексона были приобретены следующие мыши: мыши mdx (JAX, №001801), C57BL/6J (JAX, №000664), DBA/2J (JAX, 000671), DBA/2J-mdx (JAX, 013141) и BALB/cJ (JAX, №000651). Для экспериментов AAV-CMV-EGFP 8-недельным мышам C57BL/6J вводили либо 1E+12 гв AAV9- или MyoAAV-CMV-EGFP, либо 2E+11 гв AAV9-, MyoAAV-, или EMyoAAV-CMV-EGFP. Для экспериментов AAV-CRISPR 8-недельным мышам *mdx* вводили 4,5E+12 гв AAV9- или MyoAAV-CMV-SaCas9 и 9E+12 гв AAV9- или MyoAAV-gRNA. Для экспериментов по визуализации *in vivo* мы вводили 8-недельным мышам BALB/cJ либо 4E+11 гв AAV8-, AAV9- или MyoAAV-CMV-Fluc, либо 2E+11 гв AAVrh74-, AAV9- или EMyoAAV-CMV-Fluc. Для эксперимента по трансдукции сателлитных клеток 6-месячным мышам mdx;Ai9 вводили 4E+11 гв AAV8-, AAV9- или MyoAAV-CMV-Cre. Мышам с нокаутом MTM1 вводили 2E+12 гв/кг AAV9- или MyoAAV-MHCK7-hMTM1. Мы вводили мышам *DBA/2J-mdx* 2E+13 гв/кг AAV9- или EMyoAAV-CK8-микродистрофин-FLAG. Все инъекции осуществляли ретроорбитально.

Измерение активности мыши

[0634] Актиметр (Harvard Apparatus) использовали для измерения количества случаев поднятия на задние лапы для каждой мыши каждые две недели. Каждое животное помещали в клетку для актиметра на 5 минут и количественно определяли количество случаев поднятия на задние лапы за этот период времени с использованием программного обеспечения Actitrack. Для измерения спонтанного вращения бегового колеса мышей размещали по отдельности в возрасте 5 недель и на протяжении всей жизни в клетках, оборудованных низкопрофильными беспроводными беговыми колесами (Med Associates). Животные имели свободный доступ к своим беговым колесам и могли свободно бегать по ним. Вращение каждого колеса непрерывно регистрировали, и данные загружали раз в неделю, когда беговые колеса очищали и проверяли на исправность. Для нормализации данных общую активность за каждую неделю выражали как среднее значение общего вращения колеса в час.

Иммунофлуоресценция

[0635] Для тканей, собранных у мышей C67BL/6J, которым вводили AAV-CMV-EGFP, образцы фиксировали 4% параформальдегидом (PFA) в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ) и промывали 3 раза DPBS. Фиксированные ткани погружали в 30%-ный раствор сахарозы при 4°C до полного погружения, заливали O.C.T. Compound (Tissue-Tek) и замораживали в смеси жидкого азота с холодным изопентаном. Мышцы, собранные у мышей mdx, которым вводили AAV-CRISPR, замораживали в смеси жидкого азота и холодного изопентана сразу после иссечения. Срезы тканей делали толщиной 12 мкм с помощью криостата CM1860 (Leica Biosciences). Иммуноокрашивание срезов тканей на ламинин и дистрофин проводили, как описано ранее (Tabebordbar et al., 2016). Для иммуноокрашивания микродистрофина-FLAG срезы тканей окрашивали кроличьим антителом к FLAG (Sigma) с использованием того же протокола, что и при иммуноокрашивании дистрофина. Для окрашивания образцов печени лектином срезы ткани промывали 3 раза по 5 минут PBST (PBS + 0,1% Tween-20), инкубировали с лектином Lycopersicon Esculentum (томат), меченным Dylight 594 (Vector Laboratories) в концентрации 10 мкг/мл. в течение 10 минут при комнатной температуре, отмывали 3 раза по 5 минут с помощью PBST, окрашивали Hoechst 33342 (Thermo Fisher) в концентрации 10 мкг/мл в течение 5 минут, промывали 2 раза по 5 минут с помощью PBST и заключали в монтирующую среду со средством, препятствующим выгоранию флуоресценции, Vectashield без DAPI (Vector Laboratories). Дифференцированные *in vitro* миотрубочки иммуноокрашивали на тяжелую цепь миозина (MHC), как описано ранее (Tabebordbar et al., 2016).

Вестерн-блоттинг

[0636] Для вестерн-блоттинга дистрофина белок экстрагировали из образцов мышц с использованием буфера RIPA (Cell signalling). Общие белки (25 мкг) разделяли с помощью электрофореза с использованием трис-ацетата 3-8% и полиакриламидных гелей Stain Free (Bio-Rad) и переносили на мембраны из поливинилидендифторида (PVDF) (Biorad). Для первых трех дорожек на каждом геле различные проценты мышечных белков дикого типа разводили в белках mdx из мышц того же типа, чтобы общее количество белка для всех дорожек было одинаковым (25 мкг). Мембраны блокировали 5% обезжиренным молоком (Biorad) в TBST (TBS + 0,1% Tween-20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Дистрофин и GAPDH (контроль для нанесения) определяли с помощью первичных антител к дистрофину (1:100, Abcam, ab15277) и GAPDH (1:25000, Santa-Cruz Biotechnology sc-32233), а затем с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела к IgG кролика (1:5000, abcam ab97051) или конъюгированных с HRP вторичных антител к IgG мыши (1:5000, Cell Signaling 7076P2), соответственно. Из-за большой разницы в размерах дистрофина и GAPDH и необходимости разного времени электрофореза одни и те же образцы белка анализировали на двух трис-ацетатных 3-8% гелях для получения блотов дистрофина и GAPDH. Систему визуализации FluorChem E (Protein Simple) использовали для обнаружения хемилюминесценции после использования набора Supersignal west Dura ECL (Thermo Fisher). Относительное содержание дистрофина в общем белке оценивали полуколичественно по соотношению сигналов дистрофина и GAPDH, рассчитанному с использованием изображения J и представленному в относительных единицах (AU). Для вестерн-блоттинга микродистрофина-FLAG содержание белка в лизатах тканей передней большеберцовой мышцы, четырехглавой мышцы, трицепса и сердца мышей, которым вводили AAV9 и EMyoAAV, измеряли с использованием реагента для анализа белка Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher). 20 μмкг общего белка из каждого образца фракционировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза на геле Criterion TGX 4-20% (Bio-Rad) и переносили на мембрану из ПВДФ в камере для влажного переноса в соответствии с инструкциями производителя (Bio-Rad). Мембрану блокировали в течение 1 часа в обезжиренном сухом молоке с концентрацией 5 % масс./об. в TBST (10 мМ Трис, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 % Tween-20), промывали 3 раза по 10 минут в TBST и инкубировали с первичными антителами против метки FLAG (Millipore F7425, 1:400) или GAPDH (Santa Cruz sc-32233, 1:25000) при 4°C в течение 16 часов. Затем мембраны промывали 3 раза по 10 минут TBST и инкубировали в конъюгированных с пероксидазой хрена вторичных антителах против IgG кролика (Abcam ab97051, 1:5000) или мыши (Cell Signaling 7076P2, 1:5000) в течение 1 часа при комнатной температуре. Блоты трижды промывали TBST, проявляли с помощью хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher) и визуализировали с помощью устройства для визуализации на базе CCD.

[0637] Для вестерн-блоттинга интегрина α8 и αIIb экстракты цельных клеток готовили из клеток HEK293, сверхэкспрессирующих одиночные цепи pUC19, интегрина α8 или αIIb, путем лизиса в лизирующем буфере NP-40 (150 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 1% NP-40) и центрифугирования для удаления клеточного дебриса. 2 μмкг общего белка из каждого образца подвергали электрофорезу на 4-20% геле Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad) и переносили на мембрану из ПВДФ. Мембрану блокировали в течение 1 часа в обезжиренном сухом молоке с концентрацией 5% масс./об. в TBST и инкубировали с первичными антителами к интегрину α8 (1:1000, Invitrogen MA5-31449), интегрину αIIb (1:5000, abcam ab134131) или α-тубулину (1:5000, abcam ab7291) при 4°C в течение 16 часов. Затем мембраны промывали 3 раза по 10 минут каждый TBST и инкубировали в разведении 1:10000 конъюгированных с пероксидазой хрена вторичных антителах к IgG мыши или кролика в течение 1 часа при комнатной температуре. Блоты трижды промывали TBST и проявляли хемилюминесцентным субстратом SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher). Блоты α8 визуализировали с помощью устройства для визуализации на базе CCD (ProteinSimple), а блоты αIIb визуализировали на рентгеновской пленке с временем экспозиции 20 секунд и 15 минут для срезов для α-тубулина и αIIb, соответственно.

Проточная цитометрия

[0638] Клетки HEK293, сверхэкспрессирующие одиночные цепи pUC19 или интегрина, собирали в PBS, содержащем 5 мМ ЭДТА, и промывали 3 раза буфером для окрашивания (2% FBS в PBS). Затем клетки окрашивали в течение 1 часа при 4°C первичными антителами, разведенными в буфере для окрашивания. Клетки промывали 3 раза буфером для окрашивания. Для образцов, окрашенных антителом к интегрину β8, клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C с PE-конъюгированным козьим вторичным антителом к IgG мыши (Invitrogen, 12-4010-82), разведенным в буфере для окрашивания. Клетки промывали 3 раза, ресуспендировали в буфере для окрашивания и анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью Flow Jo.

Выделение, культивирование и дифференцировка сателлитных клеток мыши

[0639] Выделение сателлитных клеток у мышей mdx-Ai9, которым вводили AAV-CMV-Cre, проводили, как описано ранее (Goldstein et al., 2019). Сателлитные клетки, выделенные от инъецированных животных, высевали на планшеты, покрытые коллагеном/ламинином, в ростовой среде для сателлитных клеток (20% донорской лошадиной сыворотки (Atlanta Biologics) в F10 (Gibco), содержащей 1% глутамакса (LifeTech), 1% пенициллина-стрептомицина (LifeTech) и 5 нг/мл bFGF (Sigma)). Ростовую среду меняли каждые два дня. Через 6 дней собирали сателлитные клетки, подсчитывали количество клеток и клетки повторно высевали в несколько лунок 96-луночного планшета с плотностью 10000 клеток/лунку для дифференцировки. На следующий день ростовую среду меняли на среду для дифференцировки (DMEM (GIBCO), содержащую 2% донорской лошадиной сыворотки (Atlanta Biologics)). Миотрубочки фиксировали 4% PFA через 60 часов после начала дифференцировки.

Анализ физиологии мышц

[0640] Мышей готовили для оценки передней большеберцовой мышцы *in situ*, как описано ранее (Tabebordbar et al., 2016). Силу регистрировали при девяти различных частотах стимуляции в диапазоне от 20 до 200 Гц. Полученные данные аппроксимировались сигмоидальной кривой вида $P = P_{min} + ((P_{max} - P_{min}) / (1 + (K/f)^H))$, где P — сила при частоте стимуляции f, P_{min}— минимальная сила, P_{max} — максимальная сила, K — частота стимуляции в точке перегиба кривой, H — коэффициент или угловой коэффициент Хилла (Chan et al., 2007). Параметр K использовали для расчета силы в точке перегиба, которую назвали промежуточной силой или P_{int}. Затем TA подвергали серии из 5 изометрических и эксцентрических сокращений для оценки ее восприимчивости к травмам (100 мс фиксированного сокращения с последующим активным удлинением со скоростью 4 длины волокна в секунду до конечной длины 1,2 длины волокна). Серия была ограничена изометрическими сокращениями, чтобы можно было количественно определить потерю изометрической силы как относительную разницу между силой до и после протокола. Длина волокна и площадь поперечного сечения TA были рассчитаны, как описано ранее (Tabebordbar et al., 2016).

Биолюминесцентная визуализация

[0641] Мышам вводили 150 мг/кг D-люциферина (Goldbio) и подвергали анестезии изофлураном перед визуализацией. Биолюминесцентные изображения получали через 5 минут после инъекции D-люциферина со скоростью одно изображение в 2 минуты в течение 25 минут. Общую и среднюю интенсивность излучения измеряли для представляющей интерес области (ROI) одинакового размера с использованием программного обеспечения Living Image 4.7.3 (PerkinElmer). Наибольшую интенсивность захваченного излучения за время визуализации определяли как пик кинетической кривой и отбирали для анализа. Для измерения интенсивности излучения иссеченных мышц, мышей умерщвляли через 12 минут после инъекции D-люциферина. Рассеченные мышцы помещали в чашку Петри с последующей биолюминесцентной визуализацией с использованием IVIS Spectrum.

Ссылки

[0642] Asokan, A., Hamra, J.B., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2006). Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. J Virol 80, 8961-8969.

[0643] Bengtsson, N.E., Hall, J.K., Odom, G.L., Phelps, M.P., Andrus, C.R., Hawkins, R.D., Hauschka, S.D., Chamberlain, J.R., and Chamberlain, J.S. (2017). Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. Nat Commun 8, 14454.

[0644] Berry, G.E., and Asokan, A. (2016). Cellular transduction mechanisms of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol 21, 54-60.

[0645] Cerletti, M., Jurga, S., Witczak, C.A., Hirshman, M.F., Shadrach, J.L., Goodyear, L.J., and Wagers, A.J. (2008). Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. Cell 134, 37-47.

[0646] Chan, K.Y., Jang, M.J., Yoo, B.B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.L., Sanchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S.K., Deverman, B.E., et al. (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. Nat Neurosci 20, 1172-1179.

[0647] Chan, S., Head, S.I., and Morley, J.W. (2007). Branched fibers in dystrophic mdx muscle are associated with a loss of force following lengthening contractions. Am J Physiol Cell Physiol 293, C985-992.

[0648] Childers, M.K., Joubert, R., Poulard, K., Moal, C., Grange, R.W., Doering, J.A., Lawlor, M.W., Rider, B.E., Jamet, T., Daniele, N., et al. (2014). Gene therapy prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy. Sci Transl Med 6, 220ra210.

[0649] Dalkara, D., Byrne, L.C., Klimczak, R.R., Visel, M., Yin, L., Merigan, W.H., Flannery, J.G., and Schaffer, D.V. (2013). In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. Sci Transl Med 5, 189ra176.

[0650] Davidsson, M., Wang, G., Aldrin-Kirk, P., Cardoso, T., Nolbrant, S., Hartnor, M., Mudannayake, J., Parmar, M., and Bjorklund, T. (2019). A systematic capsid evolution approach performed in vivo for the design of AAV vectors with tailored properties and tropism. Proc Natl Acad Sci U S A.

[0651] Deverman, B.E., Pravdo, P.L., Simpson, B.P., Kumar, S.R., Chan, K.Y., Banerjee, A., Wu, W.L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S.P., et al. (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. Nat Biotechnol 34, 204-209.

[0652] DiMattia, M.A., Nam, H.J., Van Vliet, K., Mitchell, M., Bennett, A., Gurda, B.L., McKenna, R., Olson, N.H., Sinkovits, R.S., Potter, M., et al. (2012). Structural insight into the unique properties of adeno-associated virus serotype 9. J Virol 86, 6947-6958.

[0653] Ding, W., Zhang, L., Yan, Z., and Engelhardt, J.F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. Gene Ther 12, 873-880.

[0654] Duan, D. (2018a). Micro-Dystrophin Gene Therapy Goes Systemic in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. Hum Gene Ther 29, 733-736.

[0655] Duan, D. (2018b). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. Mol Ther 26, 2337-2356.

[0656] Dudek, A.M., Pillay, S., Puschnik, A.S., Nagamine, C.M., Cheng, F., Qiu, J., Carette, J.E., and Vandenberghe, L.H. (2018). An Alternate Route for Adeno-associated Virus (AAV) Entry Independent of AAV Receptor. J Virol 92.

[0657] Elverman, M., Goddard, M.A., Mack, D., Snyder, J.M., Lawlor, M.W., Meng, H., Beggs, A.H., Buj-Bello, A., Poulard, K., Marsh, A.P., et al. (2017). Long-term effects of systemic gene therapy in a canine model of myotubular myopathy. Muscle Nerve 56, 943-953.

[0658] Farris, K.D., and Pintel, D.J. (2008). Improved splicing of adeno-associated viral (AAV) capsid protein-supplying pre-mRNAs leads to increased recombinant AAV vector production. Hum Gene Ther 19, 1421-1427.

[0659] Gao, G., Lu, Y., Calcedo, R., Grant, R.L., Bell, P., Wang, L., Figueredo, J., Lock, M., and Wilson, J.M. (2006). Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. Mol Ther 13, 77-87.

[0660] Goldstein, J.M., Tabebordbar, M., Zhu, K., Wang, L.D., Messemer, K.A., Peacker, B., Ashrafi Kakhki, S., Gonzalez-Celeiro, M., Shwartz, Y., Cheng, J.K.W., et al. (2019). In Situ Modification of Tissue Stem and Progenitor Cell Genomes. Cell Rep 27, 1254-1264 e1257.

[0661] Hakim, C.H., Wasala, N.B., Pan, X., Kodippili, K., Yue, Y., Zhang, K., Yao, G., Haffner, B., Duan, S.X., Ramos, J., et al. (2017). A Five-Repeat Micro-Dystrophin Gene Ameliorated Dystrophic Phenotype in the Severe DBA/2J-mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy. Mol Ther Methods Clin Dev 6, 216-230.

[0662] Hanlon, K.S., Meltzer, J.C., Buzhdygan, T., Cheng, M.J., Sena-Esteves, M., Bennett, R.E., Sullivan, T.P., Razmpour, R., Gong, Y., Ng, C., et al. (2019). Selection of an Efficient AAV Vector for Robust CNS Transgene Expression. Mol Ther Methods Clin Dev 15, 320-332.

[0663] Hinderer, C., Katz, N., Buza, E.L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L.K., and Wilson, J.M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. Hum Gene Ther 29, 285-298.

[0664] Hordeaux, J., Wang, Q., Katz, N., Buza, E.L., Bell, P., and Wilson, J.M. (2018). The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. Mol Ther 26, 664-668.

[0665] Levitt, N., Briggs, D., Gil, A., and Proudfoot, N.J. (1989). Definition of an efficient synthetic poly(A) site. Genes Dev 3, 1019-1025.

[0666] Li, C., and Samulski, R.J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. Nat Rev Genet 21, 255-272.

[0667] Mack, D.L., Poulard, K., Goddard, M.A., Latournerie, V., Snyder, J.M., Grange, R.W., Elverman, M.R., Denard, J., Veron, P., Buscara, L., et al. (2017). Systemic AAV8-Mediated Gene Therapy Drives Whole-Body Correction of Myotubular Myopathy in Dogs. Mol Ther 25, 839-854.

[0668] Mendell, J.R., Sahenk, Z., Lehman, K., Nease, C., Lowes, L.P., Miller, N.F., Iammarino, M.A., Alfano, L.N., Nicholl, A., Al-Zaidy, S., et al. (2020). Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. JAMA Neurol.

[0669] Morales, L., Gambhir, Y., Bennett, J., and Stedman, H.H. (2020). Broader Implications of Progressive Liver Dysfunction and Lethal Sepsis in Two Boys following Systemic High-Dose AAV. Mol Ther 28, 1753-1755.

[0670] Murrey, D.A., Naughton, B.J., Duncan, F.J., Meadows, A.S., Ware, T.A., Campbell, K.J., Bremer, W.G., Walker, C.M., Goodchild, L., Bolon, B., et al. (2014). Feasibility and safety of systemic rAAV9-hNAGLU delivery for treating mucopolysaccharidosis IIIB: toxicology, biodistribution, and immunological assessments in primates. Hum Gene Ther Clin Dev 25, 72-84.

[0671] Nelson, C.E., Hakim, C.H., Ousterout, D.G., Thakore, P.I., Moreb, E.A., Castellanos Rivera, R.M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F.A., Yan, W.X., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Science 351, 403-407.

[0672] Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 309, 30-33.

[0673] Pillay, S., Meyer, N.L., Puschnik, A.S., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, Y., Jae, L.T., Wosen, J.E., Nagamine, C.M., Chapman, M.S., et al. (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature 530, 108-112.

[0674] Pulicherla, N., Shen, S., Yadav, S., Debbink, K., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Asokan, A. (2011). Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. Mol Ther 19, 1070-1078.

[0675] Pytela, R., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. Cell 40, 191-198.

[0676] Rosemary C Challis, S.R.K., Ken Y Chan, Collin Challis, Min J Jang, Pradeep S Rajendran, John D Tompkins, Kalyanam Shivkumar, Benjamin E Deverman, Viviana Gradinaru (2018). Widespread and targeted gene expression by systemic AAV vectors: Production, purification, and administration. bioRxiv.

[0677] Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. Annu Rev Cell Dev Biol 12, 697-715.

[0678] Salva, M.Z., Himeda, C.L., Tai, P.W., Nishiuchi, E., Gregorevic, P., Allen, J.M., Finn, E.E., Nguyen, Q.G., Blankinship, M.J., Meuse, L., et al. (2007). Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. Mol Ther 15, 320-329.

[0679] Summerford, C., Bartlett, J.S., and Samulski, R.J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. Nat Med 5, 78-82.

[0680] Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J.K.W., Chew, W.L., Widrick, J.J., Yan, W.X., Maesner, C., Wu, E.Y., Xiao, R., Ran, F.A., et al. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. Science 351, 407-411.

[0681] Wu, Z., Asokan, A., Grieger, J.C., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2006). Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. J Virol 80, 11393-11397.

[0682] Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. Mol Ther 16, 1073-1080.

Пример 7. Направленная эволюция класса сконструированных вариантов капсида AAV, обеспечивающих эффективную направленную на мышцы доставку генов у разных видов.

[0683] Рекомбинантные адено-ассоциированные вирусы (rAAV) являются наиболее часто используемыми носителями для ген-заместительной терапии и редактирования генов *in vivo* в доклинических и клинических исследованиях, однако селективная трансдукция конкретных тканей после системной доставки остается проблемой. Рекомбинантные AAV, полученные с использованием природных капсидов, преимущественно секвестрируются в печени после системного введения. Эта секвестрация ограничивает эффективность трансдукции в других органах ((Gao et al., 2006; Murrey et al., 2014; Zincarelli et al., 2008) и создает особую проблему для доставки генов в скелетные мышцы. Поскольку мышцы составляют до 40% от общей массы тела, для достижения терапевтических порогов в мышцах с природными вариантами капсида требуются чрезвычайно высокие дозы вируса (~ 2E+14 гв/кг) (Duan, 2018), что создает серьезное препятствие для производства векторов и может привести к ограничивающей терапию токсичности, как это наблюдалось в некоторых недавних клинических испытаниях (Morales et al., 2020).

[0684] Конструирование капсидного белка AAV в сочетании с селекцией *in vivo* является перспективным подходом для обеспечения надежной доставки генов в различные ткани. Стратегии направленной эволюции капсида AAV обычно включают создание разнообразных капсидных библиотек различными методами с последующей селекцией вариантов с желаемым тропизмом на животных моделях. Этот подход позволил создать оптимизированные векторы для доставки в ряд тканей (Choudhury et al., 2016; Dalkara et al., 2013; Deverman et al., 2016; Korbelin et al., 2016; Li et al., 2016; Michelfelder et al., 2009; Tse et al., 2017; Yang et al., 2009; Yang and Xiao, 2013).

[0685] Трансдукция AAV представляет собой многостадийный процесс, включающий связывание с рецепторами на клеточной поверхности, внутриклеточный перенос, эндосомальное ускользание, проникновение в ядро, синтез второй цепи ДНК векторного генома и экспрессию трансгена ((Berry and Asokan, 2016; Ding et al., 2005), Фиг. S1A), а неэффективность любой из этих стадий может ограничивать активность вектора. Следовательно, успешная идентификация перспективных капсидов требует выбора вариантов, которые эффективно проходят все стадии трансдукции. Тем не менее, в большинстве стратегий направленной эволюции капсида *in vivo* выбирают успешные варианты капсида на основе присутствия векторной геномной ДНК, а не трансгенной мРНК в представляющей интерес ткани (Li and Samulski, 2020). Специфичные для вида и линии различия в кодирующей последовательности и экспрессии генов, участвующих в трансдукции AAV, представляют собой еще одну проблему, поскольку капсидные варианты, отобранные в определенных линиях мышей, могут не обеспечивать эффективную трансдукцию в других линиях или других видах (Hordeaux et al., 2018).Таким образом, подход направленной эволюции, который обеспечивает строгую селекцию функциональных вариантов капсида у разных линий и видов, очень применим и необходим.

[0686] В этом Примере описывается и демонстрируется, по крайней мере, стратегия DELIVER (направленная эволюция капсидов AAV с использованием экспрессии трансгенной РНК in vivo) для объединения создания разнообразных библиотек капсидов со строгой селекцией *in vivo* на основе транскриптов и обеспечения возможности направленной эволюции с последующей идентификацией функциональных вариантов капсида в любой представляющей интерес ткани и на любой животной модели. Этот пример демонстрирует полезность DELIVER для разработки тропных к мышцам капсидов у мышей и отличных от человека приматов и сравнивает наши результаты с AAV9 и AAVrh74, природными капсидами AAV, которые в настоящее время используется в клинических испытаниях по замене генов при мышечной дистрофии Дюшенна (DMD) (идентификаторы clinicaltrials.gov: NCT03362502, NCT03368742, NCT03375164 и NCT03769116). В целом, эти направленные на мышцы векторы демонстрируют превосходную активность и селективность в отношении трансдукции как скелетных мышц, так и сердечной ткани, обеспечивая терапевтическую эффективность при существенно сниженной дозе по сравнению с AAV9 и сохраняя эффективность трансдукции мышечных клеток у мышей, NHP и человека. Кроме того, перекрестное сравнение последовательностей вариантных капсидов, обогащенных в мышцах, у мышей и NHP выявило общий мотив RGD среди лучших вариантов, а дополнительный анализ обнаружил сильное взаимодействие с гетеродимерами RGD-связывающего интегрина, и их зависимость от экспрессии в целевых клетках. В совокупности эта работа обеспечивает класс вариантов капсида AAV, особенно полезных для разработки и тестирования терапевтических средств в поперечнополосатых мышцах, а также экспериментальную основу для будущей эволюции дополнительных семейств AAV с альтернативным тропизмом к тканям.

Результаты

[0687] *Эволюция* капсида AAV9 in vivo с использованием DELIVER позволяет выявить класс тропных *к мышцам вариантов*

[0688] Библиотеки капсидов на основе AAV9, которые были разработаны для этого исследования, включали несколько ключевых функций, облегчающих идентификацию направленных на мышцы векторов с высокой активностью для использования *in vivo*. Во-первых, каждый вариант включал случайный 7-мерный пептид, вставленный между аминокислотами 588 и 589 в гипервариабельную область VIII капсида AAV9 - конструкция, обеспечивающая воздействие вариабельной пептидной последовательности на поверхность капсида ((Borner et al., 2020; DiMattia et al., 2012)), **Фиг. 14A**). Каждый вариант также инкапсулировал трансген, кодирующий его собственную капсидную последовательность, под контролем универсального или специфичного для типа клеток промотора млекопитающих, что позволяло экспрессировать трансген (вариант капсида) как в клетках HEK293, используемых для получения вирусной библиотеки (**Фиг. 14B**), так и в ткани животных, трансдуцированных вирусом после доставки *in vivo* (**Фиг. 14C-14D**).

[0689] Строгость DELIVER для селекции вариантов капсида для функциональной трансдукции отдельных тканей мыши первоначально оценивали на мышах C57BL/6J с использованием вирусной библиотеки, в которой варианты капсида экспрессировались под контролем универсального промотора CMV. Выявлены варианты, обогащенные относительно вирусной библиотеки на уровне ДНК и мРНК в различных тканях. Селекция вариантов, основанная на экспрессии мРНК, привела к выбору нескольких функциональных капсидов по сравнению с селекцией, основанной на присутствии векторной геномной ДНК (**Фиг. 21A-21G**), предполагая, что только небольшая часть вариантов капсида, которые физически проникают в целевые клетки, могут функционально трансдуцировать эти клетки для экспрессии кодируемого ими трансгена. В соответствии с этим открытием, в то время как варианты капсида с более высокой представленностью в библиотеке инъецированных вирусов были в большей степени представлены в печени инъецированных животных на уровне геномной ДНК вектора, практически не было корреляции между представленностью каждого варианта в библиотеке вирусов и уровнем мРНК трансгена из того же варианта в печени (**Фиг. 21H-21I**).

[0690] Затем была оценена возможность использования промоторов, специфичных для мышц, для усиления селекции на мощные тропные к мышцам варианты капсида. Скелетная и сердечная мышцы содержат несколько разных типов клеток, но капсиды AAV, способные к эффективной доставке трансгена, в частности, к двум типам клеток — мышечным волокнам и кардиомиоцитам — наиболее желательны для терапевтической доставки генов при генетических миопатиях. Чтобы сделать возможной селекцию вариантов, специфично экспрессируемых в этих типах клеток *in vivo*, мы создали библиотеки капсидов AAV в клетках HEK293 с использованием конструкций, содержащих ITR, в которых экспрессия последовательностей, кодирующих капсид, контролировалась специфичными для мышц промоторами CK8 или MHCK7. Эти конструкции продуцировали такие же титры rAAV, как и конструкции, экспрессирующие капсид под контролем универсального промотора CMV (**Фиг. 14B**). Кроме того, в скелетных и сердечных мышцах мышей, которые получали инъекции, вирусные библиотеки, экспрессированные под контролем промоторов CK8 или MHCK7, обеспечивали аналогичную или более высокую экспрессию мРНК трансгена по сравнению с теми, которые экспрессировались под контролем промотора CMV, что значительно облегчало идентификацию функциональных вариантов, которые трансдуцируют мышечные волокна и кардиомиоциты (**Фиг. 14C-14D**).

[0691] Было проведено два раунда селекции *in vivo* с направленной эволюцией, скрининг вариантов капсида, экспрессируемых промотором MHCK7, в нескольких различных мышцах мышей C57BL/6J. Секвенирование вирусной библиотеки первого раунда выявило более 5000000 уникальных вариантов капсида. После первого раунда селекции мы отобрали 30000 лучших вариантов, которые экспрессировались на высоком уровне в семи мышцах (четырехглавой, передней большеберцовой, икроножной, трехглавой, брюшной, диафрагмальной и сердечной) (**Фиг. 14A и 14E**). Для второго раунда селекции *in vivo* были включены два контроля. Первым был контроль с синонимичными кодонами, в котором одни и те же 7-мерные вставленные пептиды, идентифицированные для каждого выбранного варианта из первичного скрининга, кодировались с использованием синонимичных кодонов ДНК. Вторым был контроль экспрессии, в котором были созданы дублированные вирусные библиотеки для экспрессии вариантов под контролем любого из двух специфичных для скелетных мышц промоторов, CK8 или MHCK7 (**Фиг. 14A**).

[0692] Поразительно, что во втором раунде селекции все 12 лучших вариантов капсида, экспрессируемых на высоком уровне в мышцах из библиотек CK8 или MHCK7, содержали один и тот же мотив аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты (RGD) в первых 3 положениях аминокислот 7-мерной вставки. Что еще больше указывает на то, что специфичные пептидные последовательности, включенные в эти варианты капсида, способствуют их превосходной трансдукции в мышцах, 10 из 12 лучших выбранных вариантов в группе CK8 и 8 из 12 лучших выбранных вариантов MHCK7 были из синонимичных пар (т.е. соответствующий вариант, кодируемый синонимичными кодонами ДНК, также входил в число 12 лучших вариантов, экспрессируемых мышцами) (**Фиг. 14F**).

[0693] Титры rAAV, полученных с использованием 5 лучших уникальных RGD-содержащих вариантов капсида, были количественно определены для оценки возможности использования этих сконструированных капсидов для исследований *in vivo*. Сравнение титров rAAV не показало значимой разницы между 5 лучшими RGD-содержащими вариантами капсида и исходным капсидом AAV9 (**Фиг. 22E**). Вариант, содержащий вставку пептида RGDLTTP (SEQ ID NO: 12), который также соответствует консенсусным аминокислотам в каждом положении из 12 лучших RGD-содержащих выбранных вариантов, был выбран для дальнейшего определения характеристик назван этот вариант «MyoAAV 1A» (который также упоминается в данном документе как MyoAAV.

MyoAAV 1A с высокой эффективностью трансдуцирует мышцы мыши после системного введения

[0694] Для исследования профиля трансдукции и биораспределения rAAV, полученных с использованием MyoAAV 1A, в различных тканях мыши после системной доставки, взрослым мышам C57BL/6J вводили 1E+12 гв (~4E+13 гв/кг) AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP и анализировали экспрессию трансгена и представленность векторных геномов различных тканях через две недели после инъекции. Флуоресцентная визуализация тотального препарата собранных тканей выявила гораздо большую интенсивность флуоресценции в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV 1A, по сравнению с мышами, которым вводили AAV9 (**Фиг. 15A и 22A**). Важно отметить, что MyoAAV 1A трансдуцировал сердце, ключевой поражаемый орган при многих генетических миопатиях, более эффективно, чем AAV9. Сильная экспрессия трансгена в мышечных волокнах и кардиомиоцитах мышей, которым вводили MyoAAV 1A, была дополнительно подтверждена иммунофлуоресцентным анализом (**Фиг. 15B и 22B**). Примечательно, что MyoAAV 1A продемонстрировал относительно сниженную трансдукцию печени после системной доставки мышам C57BL/6J, что свидетельствует о профиле трансдукции, не направленном на печень, для этого варианта по сравнению с AAV9 (**Фиг. 15A-15C**).

[0695] Количественное определение мРНК EGFP в различных скелетных мышцах самцов и самок мышей C57BL/6J выявило в 10-29 раз более высокую экспрессию трансгена в мышцах MyoAAV 1A по сравнению с мышами, которым вводили AAV9 (**Фиг. 15C**). Экспрессия мРНК EGFP была в 6,3 раза выше в сердце и в 2,8 раза ниже в печени животных, которым вводили MyoAAV 1A (**Фиг. 15C**). Примечательно, что повышенная эффективность трансдукции с помощью MyoAAV 1A была ограничена тканями поперечнополосатых мышц, и этот сконструированный вариант капсида трансдуцировал легкие, почки, селезенку и мозг инъецированных животных с аналогичной или более низкой эффективностью по сравнению с AAV9 (**Фиг. 15C и 22C**). Вестерн-блоттинг подтвердил значительно более высокую экспрессию белка EGFP в икроножных и трехглавых мышцах и более низкую экспрессию EGFP в печени животных, которым вводили MyoAAV 1A, по сравнению с мышами, которым вводили AAV9 (**Фиг. 22J**). Анализ биораспределения показал, что MyoAAV 1A доставлял векторные геномы во все мышцы мышей C57BL/6J более эффективно, чем AAV9, за исключением брюшных мышц, и обеспечивал значительно меньшее количество векторных геномов в печени после системного введения (**Фиг. 22D**).

[0696] Для оценки эффективности мышечной трансдукции после системного введения MyoAAV 1A мышам различных линий, самцам и самкам мышей BALB/cJ и DBA/2J вводили 1E+12 гв (~4E+13 гв/кг) AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP, а экспрессию трансгена сравнивали в различных тканях инъецированных мышей. Визуализация всего органа и количественная оценка мРНК EGFP показали, что характеристики эффективной трансдукции мышц и ненацеливания на печень MyoAAV 1A также распространяются на мышей BALB/cJ и DBA/2J (**Фиг. 29A-29E**).

[0697] Также оценивали эффективность трансдукции мышц после внутримышечной доставки MyoAAV 1A по сравнению с AAV9. Внутримышечное введение 2E+10 гв AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-EGFP в мышцу TA у мышей C57BL/6J приводило к 14-кратному увеличению экспрессии мРНК EGFP, а также резкому повышению экспрессии белка EGFP, что было проанализировано с помощью вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции, в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV 1A, по сравнению с мышцами мышей, которым вводили AAV9 (**Фиг. 22E-22F и 22K**).

[0698] Для исследования возможности повреждения печени после системного введения MyoAAV 1A мы измерили уровни ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови мышей C57BL/6J, которым вводили носитель (физиологический раствор) или 1E+12 гв (~4E+13 гв/кг) AAV9-, или MyoAAV 1A-CMV-EGFP до инъекции, а также через 14 и 28 дней после инъекции. Уровни ферментов АЛТ и АСТ в сыворотке мышей, которым вводили AAV9 или MyoAAV 1A, существенно не отличались по сравнению с животными, которым вводили носитель, что свидетельствует об отсутствии повреждения печени при вводимой нами дозе (**Фиг. 22G, 22H**). Анализ ингибирования трансдукции AAV9 и MyoAAV 1A сывороткой, выделенной из мышей, которым вводили AAV9- или MyoAAV 1A-EGFP, показал, что антитела, продуцируемые против AAV9, перекрестно реагируют с MyoAAV 1A и наоборот (**Фиг. 29K-29L**).

[0699] Затем была проанализирована эффективность MyoAAV 1A в трансдукции скелетных мышц человека. Первичные миотрубочки человека от 4 разных доноров (2 самцов и 2 самок) трансдуцировали *in vitro* с помощью AAV9- или MyoAAV 1A -CK8-нанолюциферазы (Nluc). MyoAAV 1A трансдуцировал миотрубочки от разных доноров в 35-52 раза более эффективно, чем AAV9 (**Фиг. 15D**). MyoAAV 1A также трансдуцировал первичные миотрубочки мышей C57BL/6J с эффективностью, в 23 раза превышающей эффективность AAV9 (**Фиг. 15D**).

[0700] Кроме того, эффективность трансдукции мышечных стволовых клеток (сателлитных клеток) с помощью MyoAAV 1A после внутривенного введения оценивали у 6-месячных мышей mdx-Ai9. Эти мыши с дефицитом дистрофина представляют собой генетическую модель DMD человека и дополнительно несут Cre-активируемый трансген tdTomato, который служит репортером для трансдукции Cre-кодирующими AAV.Сортировка флуоресцентно-активированных сателлитных клеток (FACS) из мышц мышей, которым вводили AAV8-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Cre, показала трансдукцию значительно большего процента сателлитных клеток у животных, получавших MyoAAV 1A (**Фиг. 22I-22K**).

[0701] Для исследования кинетики экспрессии генов *in vivo* после системной доставки MyoAAV 1A взрослым мышам BALB/cJ вводили 4E+11 гв (~1,6E+13 гв/кг) AAV8-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-люциферазу светлячка (Fluc), а биолюминесцентную визуализацию всего тела выполняли в разные моменты времени в течение 120 дней после инъекции.Мыши, получавшие MyoAAV 1A, демонстрировали более быструю кинетику и значительно более высокие общие уровни экспрессии трансгена в конечностях и во всем теле по сравнению с мышами, которым вводили AAV8 или AAV9 (**Фиг. 16A-16B**). Биолюминесцентная визуализация всего органа из мышц мышей, собранных через четыре месяца после инъекции, подтвердила значительно более высокую экспрессию люциферазы в мышцах животных, которым вводили MyoAAV 1A (**Фиг. 29M-29O**).

[0702] Дополнительные результаты, которые дополнительно подтверждают, что MyoAAV 1A эффективно трансдуцирует различные скелетные мышцы после системного введения мышам с фонами DBA/2J и BALB/cJ и обладает высокой эффективностью в трансдукции мышц после внутримышечной доставки, показаны на **Фиг. 29F-29L**.

Системное введение терапевтических трансгенов с использованием MyoAAV 1A приводит к функциональному улучшению в мышиных моделях DMD и X-сцепленной миотубулярной миопатии (XLMTM)

[0703] Чтобы исследовать возможность использования MyoAAV 1A для доставки терапевтических трансгенов *in vivo*, взрослым мышам mdx (мышиная модель DMD, несущая нонсенс-мутацию в экзоне 23 *Dmd*) вводили AAV9 или MyoAAV 1A, несущие конструкции, кодирующие SaCas9, вместе с направляющими РНК (нРНК), нацеленными на 5' и 3' мутации mdx (**Фиг. 24A-24B**). Заявитель и другие ранее показали, что этот CRISPR-Cas9-опосредованный подход приводит к вырезанию экзона 23 из генома клеток mdx и экспрессии укороченной, но все еще функциональной версии белка дистрофина в мышцах. (Nelson et al., 2016; Tabebordbar et al., 2016).При получении укороченного варианта эта делеция в рамке считывания по-прежнему приводит к образованию функционального белка, тем самым обеспечивая терапевтический эффект при DMD.

[0704] MyoAAV 1A-*Dmd* CRISPR привел к продукции мРНК *Dmd* с делецией экзона 23 с эффективностью от 3,4% до 25% от общей мРНК *Dmd* в различных мышцах mdx. Напротив, эффективность продукции мРНК с делецией экзона 23 в мышцах мышей mdx, которым вводили такую же дозу AAV9-*Dmd* CRISPR, составляла всего от 1,3% до 8,7% (Фиг. 4C). Количественная оценка экспрессии SaCas9 и нРНК показала, что экспрессия SaCas9 в 6,7-19 раз выше, а экспрессия нРНК в 3,5-7,8 раз выше в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV 1A, по сравнению с животными, которым вводили AAV9 (**Фиг. 24F, 24C**).

[0705] Несколько результатов указывают на лучшее восстановление экспрессии дистрофина с помощью MyoAAV 1A-*Dmd* CRISPR по сравнению с AAV9-*Dmd* CRISPR. Иммунофлуоресценция и вестерн-блот анализ подтвердили большее и более широкое восстановление дистрофина в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV 1A-*Dmd* CRISPR, по сравнению с AAV9-*Dmd* CRISPR (**Фиг. 18I-18J и 24F**). Физиологическая оценка передней большеберцовой мышцы (TA) у животных, получавших лечение AAV-CRISPR, продемонстрировала значительно более высокую удельную силу (Фиг. 4D) и снижение процентного падения силы после эксцентрического сокращения (**Фиг. 18E**) у мышей *mdx*, которым вводили MyoAAV 1A-Dmd CRISPR, по сравнению контролями, которым вводили либо носитель, либо AAV9-*Dmd* CRISPR. Таким образом, MyoAAV 1A демонстрирует заметно повышенную эффективность доставки терапевтических комплексов для редактирования генов в мышцы по сравнению со стандартным и широко используемым AAV9.

[0706] Эффективность MyoAAV 1A в отношении замены гена после системного введения низких доз дополнительно оценивали на мышиной модели XLMTM. Мыши с нокаутом *Mtm1* (KO) представляют собой превосходную генетическую и фенотипическую модель XLMTM; они демонстрируют заметное истощение мышц, потерю подвижности и резкое сокращение продолжительности жизни. Мышам с нокаутом *Mtm1* в возрасте 4 недель вводили 2E+12 гв/кг AAV9 или MyoAAV 1A, кодирующего *MTM1* человека (h*MTM1*), экспрессируемого под контролем промотора MHCK7 (**Фиг. 24E**). Мы измеряли массу тела, активность и выживаемость для каждой группы в течение 8-месячного периода (**Фиг. 18F**). Доза вируса, которую мы использовали в этом эксперименте, была в 50-150 раз ниже, чем доза, используемая в продолжающемся клиническом испытании XLMTM с участием людей (идентификатор на clinicaltrials.gov: NCT03199469), и в 15-250 раз ниже, чем доз, использованные в ранее опубликованных доклинических исследованиях генной терапии XLMTM (Childers et al., 2014; Elverman et al., 2017; Mack et al., 2017).

[0707] У мышей, которым вводили MyoAAV 1A-MHCK7-h*MTM1*, наблюдалось поразительное улучшение функции и выживаемости. Все мыши, которым вводили 2E+12 гв/кг AAV9-MHCK7-h*MTM1*, были минимально активны и достигли гуманной конечной точки эвтаназии между 11-21 неделями после инъекции. Напротив, все мыши, которым вводили одну и ту же дозу MyoAAV 1A-MHCK7-h*MTM1*, выживали по той же модели, что и мыши дикого типа, а также набирали массу и были заметно более активными по сравнению с мышами, которым вводили AAV9, на протяжении всего исследования (**Фиг. 29G-29J** и **24G**). Количественная оценка экспрессии мРНК h*MTM1* и биораспределения векторных геномов в икроножной мышце, четырехглавой мышце, сердце и печени мышей, которым вводили AAV, через 4 недели после введения AAV показала значительно более высокую экспрессию трансгена и гв/дг в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV 1A-MHCK7-h*MTM1*, по сравнению с животными, которым вводили AAV9-MHCK7-h*MTM1*, в то время как экспрессия hMTM1 и число гв/кг в печени мышей, которым вводили MyoAAV 1A-MHCK7-h*MTM1*, были ниже, чем у животных, которым вводили AAV9-MHCK7-h*MTM1* (**Фиг. 17L и 17M**). Вестерн-блоттинг подтвердил более высокую экспрессию белка h*MTM1* в икроножной и четырехглавой мышцах мышей, которым вводили MyoAAV 1A-MHCK7-h*MTM1* (**Фиг. 17N**), а физиологический анализ длинного разгибателя пальцев (EDL) продемонстрировал значительно более высокую удельную силу у мышей, которым вводили MyoAAV 1A-MHCK7-h*MTM1*, по сравнению с контролями, которым вводили носитель, или AAV9-MHCK7-h*MTM1* (**Фиг. 17O**).

[0708] Дополнительная информация о результатах системного введения MyoAAV-*Dmd* CRISPR и MyoAAV - *MTM1* человека в мышиных моделях DMD и XLMTM, соответственно, представлена на Фиг. 17A-17I and 17K. MyoAAV 1A зависит от гетеродимеров интегрина для трансдукции первичных миотрубочек мыши и человека

[0709] Учитывая наличие мотива RGD в MyoAAV и всех других лучших вариантах из селекции, была оценена роль гетеродимеров RGD-связывающего интегрина в трансдукции MyoAAV 1A. Мотив RGD был впервые обнаружен в 1984 г. как минимальная последовательность в фибронектине, которая облегчает связывание с его рецептором, позднее идентифицированным какгетеродимер интегрина α5β1 (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984; Pytela et al., 1985). С тех пор RGD был идентифицирован как мотив распознавания для нескольких различных гетеродимеров интегрина; конкретно, αIIbβ3, α5β1, α8β1, αVβ1, αVβ3, αVβ5, αVβ6, и αVβ8 (Ruoslahti, 1996). Сравнивали эффективность трансдукции MyoAAV 1A-CMV-Nluc в клетках HEK293, трансфицированных плазмидами, кодирующими каждый из этих восьми гетеродимеров человеческого RGD-связывающего интегрина, или плазмидой pUC19 в качестве контроля. Сверхэкспрессия α8β1, αVβ1, αVβ3, αVβ6 или αVβ8 увеличивала эффективность трансдукции MyoAAV 1A в трансфицированных клетках HEK293 по сравнению с контролями, трансфицированными pUC19 (**Фиг. 18I и 25A-25K**).

[0710] Затем влияние различных гетеродимеров интегрина на эффективность связывания MyoAAV 1A с клеточной поверхностью анализировали с помощью экспериментов по сверхэкспрессии. Геномы векторов, связанные с поверхностью клеток HEK293, трансфицированных каждым из восьми RGD-связывающих гетеродимеров интегрина или контрольной плазмидой pUC19, были количественно определены, и было обнаружено, что αVβ6 и, в меньшей степени, α8β1 и αVβ1 увеличивали связывание MyoAAV 1A с клетками, трансфицированными интегрином, по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными pUC19, (**Фиг. 18J**). Также было исследовано влияние двух различных антагонистов панинтегрина αV (CWHM-12 и GLPG-0187) на эффективность трансдукции MyoAAV 1A в первичных клетках. Оба ингибитора препятствуют трансдукции MyoAAV 1A дозозависимым образом как в первичных миотрубочках скелетных мышц мыши (**Фиг. 26A и 26J**), так и человека (**Фиг. 18K, 18D и 26C-26H**), в то время как ни один из ингибиторов не оказывал дозозависимого эффекта на эффективность трансдукции AAV9. Эти результаты демонстрируют, что ингибирование гетеродимеров интегрина, содержащего αV, почти полностью устраняет способность MyoAAV 1A трансдуцировать первичные миотрубочки как мыши, так и человека.

[0711] Для дальнейшего выяснения влияния отдельных гетеродимеров интегрина, содержащего αV, на аффинность связывания MyoAAV 1A, мы трансдуцировали первичные миотрубочки человека MyoAAV 1A или AAV9 после предварительной инкубации этих вирусов с рекомбинантными белками αVβ1, αVβ3, αVβ6, αVβ8, или мальтоза-связывающего белка (MBP). Примечательно, что предварительная инкубация MyoAAV 1A с возрастающими концентрациями αVβ6 приводила к дозозависимому ингибированию трансдукции первичных миотрубочек человека, в то время как ни один из других протестированных нами рекомбинантных белков не оказывал дозозависимого эффекта на трансдукцию клеток MyoAAV 1A или AAV9 (**Фиг.18E, 18F**). Наоборот, предварительная инкубация миотрубочек человека с возрастающими концентрациями антитела к αVβ6 снижала эффективность трансдукции с помощью MyoAAV 1A дозозависимым образом и не влияла на трансдукцию миотрубочек с помощью AAV9 (**Фиг. 18G, 18L**). Эти данные свидетельствуют о том, что среди гетеродимеров интегрина, содержащего αV, которые обладают способностью облегчать трансдукцию MyoAAV 1A, αVβ6 обладает наибольшей аффинностью связываться с этим вариантом капсида. Кроме того, αVβ6 должен быть доступен на поверхности мышечных клеток человека, чтобы обеспечить их оптимальную трансдукцию с помощью MyoAAV 1A.

[0712] Учитывая важность гликанов с терминальной сиаловой кислотой для трансдукции и связывания AAV9 с клетками (Bell et al., 2011), затем оценивали роль гликанов и сиаловой кислоты для трансдукции и связывания MyoAAV 1A. Обработка клеток HEK293 нейраминидазой (NA), которая расщепляет связи сиаловой кислоты с гликанами на клеточной поверхности, привела к увеличению трансдукции в 172 раза и в 4 раза более эффективному связыванию MyoAAV 1A с обработанными клетками по сравнению с необработанными контролями (**Фиг. 26K, 26L**). Далее было проверено, важна ли терминальная галактоза для трансдукции и связывания MyoAAV 1A. Добавление лектина Erythrina cristagalli (ECL), который связывается с терминальной галактозой на клеточной поверхности, к клеткам HEK293, обработанным NA, значительно ингибировало связывание и трансдукцию как AAV9, так и MyoAAV 1A, но не влияло на связывание и трансдукцию AAV2 (**Фиг. 26M, 26N**).Эти результаты показали, что, как и в случае с AAV9, трансдукция MyoAAV 1A и связывание с клетками усиливаются за счет удаления сиаловой кислоты и экспонирования галактозы на клеточной поверхности.

[0713] Оценивали зависимость трансдукции MyoAAV 1A от ранее идентифицированного рецептора AAV (AAVR). AAVR представляет собой быстро эндоцитозируемый белок плазматической мембраны, необходимый для эффективной трансдукции большинства известных серотипов AAV, кроме AAV4 и AAVrh32.33 (Dudek et al., 2018; Pillay et al., 2016). HEK293FT с нокаутом AAVR (KO) и исходные клетки HEK293FT дикого типа (ДТ) трансдуцировали с помощью AAV4-, AAV2-, AAV9- или MyoAAV 1A-CMV-Nluc и обнаружили, что, подобно AAV2 и AAV9, трансдукция MyoAAV требует экспрессии AAVR (**Фиг. 26O**).

[0714] Чтобы выяснить, играют ли гетеродимеры интегрина и AAVR повторяющиеся роли в трансдукции MyoAAV 1A, мы сверхэкспрессировали α8β1, αVβ1, αVβ3, αVβ6 или αVβ8 в клетках HEK293FT с нокаутом AAVR со сверхэкспрессией AAVR или без нее, а затем трансдуцировали клетки с помощью MyoAAV 1A- ЦМВ-Nluc. Эти результаты продемонстрировали, что, хотя сверхэкспрессия гетеродимеров интегрина повышала эффективность трансдукции MyoAAV 1A в клетках с нокаутом AAVR по сравнению с ложно-трансфицированными контролями, сверхэкспрессии интегрина было недостаточно для восстановления трансдукции до уровней, наблюдаемых в клетках с нокаутом AAVR, сверхэкспрессирующих AAVR, или в клетках HEK293FT ДТ (**Фиг. 26I**). Эти данные свидетельствуют о том, что гетеродимеры интегрина и AAVR играют разные роли и, вероятно, используются на разных стадиях трансдукции MyoAAV 1A.

Дополнительные раунды эволюции in vivo с использованием DELIVER генерируют RGD-содержащие тропные к мышцам варианты второго поколения у мышей

[0715] Учитывая важность взаимодействия мотива RGD с гетеродимерами интегрина для трансдукции миотрубочек с помощью MyoAAV 1A, было высказано предположение, что модификация аминокислот, прилегающих к мотиву, может улучшить это взаимодействие, генерируя еще более мощные тропные к мышцам варианты капсида. Основываясь на предсказанной структуре поверхностной петли гипервариабельной области VIII MyoAAV 1A, мы идентифицировали аминокислоты в положениях 586, 587 и 588 против хода транскрипции и в положениях 592, 593, 594 и 595 по ходу транскрипции от мотива RGD как вероятно расположенные в поверхностной петле MyoAAV 1A (**Фиг. 19A**). Затем была создана разнообразная библиотека капсидов, каждый из которых имел мотив RGD, зафиксированный в положениях 589, 590 и 591, и различные аминокислоты в вышеупомянутых фланкирующих положениях (**Фиг. 19B**).

[0716] Два раунда селекции *in vivo* на тропные к мышцам варианты с использованием DELIVER проводили у мышей C57BL/6J и mdx. RGD-фиксированную библиотеку вирусов второго цикла вводили в двух разных дозах (1E+12 гв и 1E+11 гв на мышь) для идентификации вариантов, которые эффективно трансдуцируют мышечную ткань как при высокой, так и при низкой дозе (**Фиг. 19B**). Было обнаружено, что среди наших лучших выбранных вариантов из этих выборок глицин и аланин были обогащены в положении 588, а глутамин — в положении 592. Вариант, содержащий последовательность GPGRGDQTTL (SEQ ID NO: 2), оказался наиболее тщательно отобранным тропным к мышцам капсидом как при дозах 1E+12, так и при дозах 1E+11 во втором раунде селекции (**Фиг. 19B**). Он был назван этим вариантом второго поколения MyoAAV 2A (также упоминаемым в данном документе как EMyoAAV или улучшенным MyoAAV) и использовался для дальнейшего определения характеристик.

[0717] Эффективность трансдукции MyoAAV 2A в различных тканях мыши исследовали после системной доставки низкой дозы вируса. Мышам C57BL/6J вводили 2E+11 гв (~8E+12 гв/кг) AAV9-, MyoAAV 1A- или MyoAAV 2A-CMV-EGFP, и анализировали экспрессию трансгена и биораспределение векторных геномов в различных тканях. Флуоресцентная визуализация цельной ткани показала, что системная доставка гена с помощью MyoAAV 2A приводит к более высоким уровням экспрессии трансгена по сравнению с MyoAAV 1A или AAV9 в различных скелетных мышцах (**Фиг. 19C-19D**). Количественная оценка мРНК EGFP показала, что MyoAAV 2A трансдуцирует скелетные мышцы мыши в 10-80 раз эффективнее, а сердце в 17 раз эффективнее, чем AAV9. Кроме того, экспрессия мРНК трансгена была в 2,5 раза ниже в печени животных, которым вводили MyoAAV 2A, по сравнению с мышами, которым вводили AAV9 (**Фиг. 19E**). Аналогичным образом, анализ биораспределения векторных геномов продемонстрировал, что мыши, которым вводили MyoAAV 2A, имели значительно более высокое количество гв/дг в скелетных мышцах и сердце и значительно более низкое количество гв/дг в печени по сравнению с животными, которым вводили AAV9 (**Фиг. 19L**).

[0718] Далее, эффективность и зависимость MyoAAV 2A от интегрина для трансдукции первичных миотрубочек человека. Примечательно, что MyoAAV 2A трансдуцирует первичные миотрубочки человека в 128 раз более эффективно по сравнению с AAV9 и в 4,1 раза выше, чем MyoAAV 1A (**Фиг. 19F**). Повышение концентрации антагониста панинтегрина αV GLPG-0187 приводило к дозозависимому снижению эффективности трансдукции MyoAAV 2A (**Фиг. 19G**), подтверждая, что инфективность MyoAAV 2A по-прежнему зависит от гетеродимеров интегрина, содержащего αV, экспрессированных на целевых клетках.

[0719] Для оценки аффинности связывания MyoAAV 2A с различными отдельными гетеродимерами интегрина αV, мы предварительно инкубировали MyoAAV 2A или AAV9 с рекомбинантными белками αVβ1, αVβ3, αVβ6, αVβ8 или мальтоза-связывающего белка (MBP) перед трансдукцией первичных миотрубочек человека. Интересно, что в отличие от результатов, полученных в тех же самых анализах с MyoAAV 1A (**Фиг. 18E**), все четыре протестированных гетеродимера интегрина, содержащего αV, ингибировали трансдукцию миотрубочек человека с помощью MyoAAV 2A дозозависимым образом (**Фиг. 19H**), в то время как не было дозозависимого эффекта на трансдукцию AAV9 (**FIG. 19I**). Этот результат свидетельствует о том, что аминокислотные замены, включенные в MyoAAV 2A, обеспечивают более высокую аффинность связывания с более широким классом гетеродимеров интегрина αV по сравнению с MyoAAV 1A, который в основном зависит от αVβ6.

[0720] Зависимость лучших вариантов капсида первого и второго поколений, которые были получены с помощью DELIVER у мышей, была исследована на гетеродимере αVβ6. Первичные миотрубочки человека предварительно инкубировали с антителом к αVβ6 перед трансдукцией клеток лучшими мышиными вариантами первого поколения (MyoAAV 1A, MyoAAV 1B, MyoAAV 1C, MyoAAV 1E, MyoAAV 1F) и второго поколения (MyoAAV 2A, MyoAAV 2B, MyoAAV 2C, MyoAAV 2D, MyoAAV 2E, MyoAAV 2F). В то время как связывание антител в некоторой степени ингибировало трансдукцию миотрубочек человека всеми этими вариантами, капсиды первого поколения значительно больше зависели от αVβ6 для трансдукции миотрубочек (**Фиг. 19M**).

MyoAAV 2A демонстрирует большой терапевтический потенциал после инъекции низкой дозы вируса

[0721] Чтобы оценить потенциальную будущую терапевтическую значимость MyoAAV 2A по сравнению с капсидами, которые в настоящее время проходят клинические испытания при нервно-мышечных заболеваниях человека, эффективность трансдукции MyoAAV 2A сравнивали как с AAV9, так и с AAVrh74, которые исследуются в текущих клинических испытаниях в отношении DMD (идентификаторы clinicaltrials.gov: NCT03362502, NCT03368742 и NCT03769116). Системное введение функционально дополняющего мини-гена дистрофина (названного микродистрофином), экспрессируемого под контролем специфичного для мышц промотора MHCK7 и доставляемого с использованием вектора AAVrh74, показало многообещающие результаты в недавно опубликованном клиническом испытании с участием людей, а именно четырех пациентов с DMD. В этом испытании введение высокой дозы вируса 2E+14 гв/кг привело к экспрессии трансгена в мышцах и функциональному улучшению фенотипа заболевания (Mendell et al., 2020).

[02] Опосредованную MyoAAV 2A доставку гена сравнивали с таковой для векторов AAVrh74 и AAV9 и дополнительно исследовали эффективность в модели DMD на мышах DBA/2J-mdx. В продольном эксперименте по визуализации *in vivo* мы вводили взрослым мышам BABL/cJ низкую дозу (2E+11 гв, что составляет ~8E+12 гв/кг) AAVrh74, AAV9 или MyoAAV 2A, кодирующих репортерный ген CMV-Fluc. Мыши, которым вводили MyoAAV 2A, демонстрировали значительно более высокий сигнал биолюминесценции в конечностях и во всем теле по сравнению с мышами, которым вводили AAVrh74 или AAV9 (**Фиг. 19J-19K**). Затем тестировали системную доставку MyoAAV 2A или AAV9, несущих трансген микродистрофина (CK8-микродистрофин-FLAG), в модели DMD на мышах DBA/2J-mdx с использованием эквивалентной низкой дозы (2E+13 гв/кг) каждого AAV. У животных, которым вводили MyoAAV 2A, наблюдалась относительно большая и более распространенная экспрессия микродистрофина, локализованного в сарколемме, во многих группах мышц по сравнению с животными, которым вводили AAV9 (**Фиг. 20A**). Вестерн-блоттинг подтвердил более высокие уровни белка микродистрофина в мышцах мышей, которым вводили MyoAAV 2A, по сравнению с животными, которым вводили AAV9 (**Фиг. 20B**). Количественная ОТ-ПЦР показала в 7,6-15 раз более высокие уровни мРНК микродистрофина в скелетных мышцах мышей, которым вводили MyoAAV 2A-CK8-микродистрофин-FLAG, по сравнению с AAV9-CK8-микродистрофин-FLAG (**Фиг. 20C**).

[0722] Наконец, была оценена представленность векторных геномов и мышечная функция у мышей, которым вводили MyoAAV 2A, по сравнению с животными, которым вводили AAV9. MyoAAV 2A доставлял в 12-46 раз более высокие количества гв/дг в скелетных мышцах мышей DBA/2J-mdx и в 2,5 раза более низкие гв/дг в печени по сравнению с AAV9 (**Фиг. 20D**). Поразительно, хотя у животных, которым вводили AAV9, количество гв/дг в печени было более чем в 40 раз выше, чем в мышцах, то у мышей, которым вводили MyoAAV 2A, уровни в печени и мышцах были сходными. Количественное определение мышечной удельной силы и процентное падение силы после эксцентрического повреждения показало, что мышцы TA мышей DBA/2J-mdx, которым вводили MyoAAV 2A, восстанавливали значительно большую удельную силу и были более защищены от повреждений по сравнению с мышцами мышей, получавших равные дозы AAV9, и мышцами, которым вводили носитель (**Фиг. 20E-20F**).

Направленная эволюция in vivo идентифицирует варианты капсида класса MyoAAV как лучшие выбранные варианты у яванских макак

[0723] Для идентификации вариантов капсида, которые обеспечивают эффективную направленную на мышцы доставку генов после системного введения NHP, была проведена направленная эволюция AAV9 *in vivo* с использованием DELIVER у яванских макак. Два цикла селекции *in vivo*, начиная со случайной вставки 7-мерного пептида в положении 588, идентифицировали 6 вариантов, содержащих мотив RGD, в качестве лучших выбранных вариантов (**Фиг. 28A**). Эти результаты подтверждают высокий тропизм к мышцам капсидов класса MyoAAV у приматов после системного введения. Чтобы отобрать для дальнейшей эволюции варианты класса MyoAAV, которые обеспечивают эффективную трансдукцию мышц у разных видов, был проведен раунд селекции *in vivo* на NHP с использованием 120000 лучших вариантов, идентифицированных в первом раунде нашей RGD-фиксированной селекции у мышей (**Фиг. 28B**). Интересно, что было обнаружено, что тирозин был обогащен в первом положении после мотива RGD в лучших выбранных вариантах, которые мы идентифицировали в NHP.

[0724] Эффективность трансдукции наиболее высокотропных к мышцам вариантов, выявленных у NHP (MyoAAV 3A-F и MyoAAV 4A-E), а также 4 тропных к мышцам вариантов, идентифицированных у мышей, с высокой эффективностью трансдуцирующих первичные миотрубочки человека (MyoAAV 1C, MyoAAV 1E, MyoAAV 2A, и MyoAAV 2E) (**Фиг. 28C**) сравнивали с AAVrh74 и AAV9 у мышей и NHP. rAAV были созданы с использованием каждого из вариантов капсида, а также AAVrh74 и AAV9 для кодирования трансгена человеческого фратаксина (hFXN) под контролем промотора CBh. Рекомбинантные AAV, полученные с каждым из капсидов, содержали уникальный набор баркодов в 3'-нетранслируемой области (3'-НТО) трансгена (**Фиг. 28D**). Был приготовлен пул rAAV, содержащих равные титры всех 17 вирусов, и затем этот пул был введен как яванским макакам, так и мышам. Количественная оценка экспрессии мРНК трансгена в различных тканях NHP определила MyoAAV 4A, MyoAAV 4E, MyoAAV 3A и MyoAAV 4C как наиболее эффективные варианты для трансдукции различных скелетных мышц по сравнению с AAVrh74 и AAV9 у макак (**Фиг. 28D-28E и 30B**). Эти 4 варианта также очень эффективно трансдуцируют различные скелетные мышцы мыши и не нацеливаются на печень по сравнению с AAVrh74 и AAV9 как у мышей, так и у NHP (**Фиг. 30A и 28E**).

[0725] Для оценки выход продукции для 4 лучших капсидов, мы получили rAAV с 4 лучшими вариантами, а также AAVrh74 и AAV9, используя 6 различных трансгенов. AAV9 был лучшим продуцентом среди протестированных нами капсидов, и все варианты MyoAAV продуцировали аналогичные или более высокие титры вируса по сравнению с AAVrh74 (**Фиг. 28F**).

[0726] Зависимость от трансдукции и аффинность 4 лучших вариантов капсида затем оценивали на гетеродимерах интегрина αV. Повышение концентрации GLPG-0187 приводило к дозозависимому снижению трансдукции для всех 4 вариантов в первичных миотрубочках человека (**Фиг. 28G**). Предварительная инкубация вариантов капсида с αVβ1, αVβ3, αVβ6, αVβ8 или MBP продемонстрировала, что все 4 лучших варианта обладают самой высокой аффинностью к αVβ6, за которыми следуют αVβ8 и αVβ3 (**Фиг. 28H-28I**). В соответствии с этими результатами обработка первичных миотрубочек человека возрастающими концентрациями антитела к αVβ6 приводила к дозозависимому снижению трансдукции всеми 4 вариантами (**Фиг. 28J**). Кроме того, анализ эффективности трансдукции 4 лучших вариантов в клетках с нокаутом AAVR и клетках дикого типа продемонстрировал, что в отношении трансдукции все эти варианты зависят от AAVR (**Фиг. 28K**).

[0727] Наконец, учитывая высокую зависимость и аффинность вариантов капсида MyoAAV класса к αVβ6, мы проанализировали экспрессию интегрина β6, который образует гетеродимер только с αV (Hynes, 2002), в мышцах мыши, NHP и человека. Иммунофлуоресцентный анализ продемонстрировал экспрессию интегрина β6 в мышцах всех трех видов (**Фиг. 30C**).

Обсуждение

[0728] Этот пример, по меньшей мере, описывает и демонстрирует стратегию конструирования и выбора эффективных вариантов капсида AAV для эффективной доставки генов в любую представляющую интерес ткань и/или тип клеток. DELIVER сочетает в себе три критически важные функции, необходимые для строгой и широко применимой стратегии конструирования капсида AAV: (i) DELIVER позволяет выбирать варианты капсида, которые не только физически связываются с клетками или проникают в них *in vivo*, но также функционально трансдуцируют ткань и экспрессируют свои трансгены в специфичных типах клеток. (ii) DELIVER можно применять для любых видов млекопитающих, *in vivo* или *in vitro*, что позволяет выявлять векторные системы, которые можно напрямую переносить из доклинических моделей животных на применение у человека. (iii) DELIVER поддерживает скрининг чрезвычайно разнообразных библиотек капсидов и полностью совместим с подходами направленной эволюции.

[0729] В конечном счете, интерес к разработке системы DELIVER был обусловлен ее потенциальными преимуществами для продвижения геномной медицины за счет создания более эффективных и селективных вирусных векторов, а варианты капсида AAV, направленные на мышцы, выявленные в данном исследовании, служат важным доказательством концепции для такого применения. Однако не менее важным для повышения активности капсида в отношении мышц было обеспечение снижения трансдукции печени. Печень является основным местом трансдукции естественными капсидами AAV и мишенью токсичности, связанной с введением высоких доз векторов AAV в моделях на крупных животных (Hinderer et al., 2018) и у пациентов-людей (Morales et al., 2020).В частности, FDA приостановило два испытания генной терапии (идентификаторы клинических испытаний NCT03368742 и NCT03199469) из-за серьезных побочных эффектов, связанных с гепатотоксичностью. Эти недавние неудачи в клиническом применении генной терапии на основе AAV для лечения генетических миопатий (Morales et al., 2020) подчеркивают исключительные трудности доставки в мышцу и иллюстрируют явную потребность в эффективных вариантах AAV, направленных на мышцы, таких как описанные в данном Примере.

[0730] DELIVER применялся для разработки новых капсидов AAV, которые при системном введении могли бы транспортировать генетическое карго к скелетным мышцам по всему телу с большей эффективностью и селективностью и, возможно, с более благоприятным профилем безопасности, чем капсиды, используемые в настоящее время в клинических испытаниях и доклинических исследованиях. Два раунда строгой селекции на основе транскриптов выявили новый класс RGD-содержащих вариантов капсида, включая MyoAAV 1A, который показал более чем в 10 раз более высокую эффективность трансдукции мышц, чем широко используемые капсиды. Кроме того, направленные на мышцы AAV, выбранные с помощью DELIVER, показали заметно меньшее нацеливание на печень. Эти два атрибута предполагают, что этот новый класс капсидов AAV может снизить дозу вируса, необходимую для достижения терапевтических уровней трансдукции целевых клеток, и смягчить потенциально вредные последствия трансдукции в клетках печени, где она не нужна для терапевтического эффекта.

[0731] DELIVER идентифицировал многочисленные варианты, содержащие критический мотив RGD, который, как известно, связывается с гетеродимерами интегрина, и дальнейшая работа показала функциональную важность этого мотива для трансдукции первичных миотрубочек мыши и человека. Скрининг капсидов, нацеленных на мышцы, у мышей и NHP выявил поразительное обогащение вариантов, содержащих RGD в качестве первых трех аминокислот вставленного 7-мерного пептида. Лучшие варианты из селекции *in vivo* показали взаимодействие с гетеродимерами интегрина и могли быть блокированы от трансдукции целевых клеток растворимыми гетеродимерами интегрина, антителами к интегрину и низкомолекулярными антагонистами. Эта наблюдаемая зависимость от интегрина сохранялась в первичных миотрубочках мыши и человека, что указывает на общий механизм действия трансдукции капсидов класса MyoAAV. Взаимодействие капсидов класса MyoAAV с интегринами, по-видимому, действует параллельно с ранее идентифицированным AAV-связывающим белком AAVR, который также был необходим для трансдукции целевых клеток этими вариантами. Среди гетеродимеров RGD-связывающего интегрина $\alpha V\beta 6$ показал наивысшую аффинность связывания и был особенно необходим на поверхности мышечных клеток человека, чтобы сделать возможной их трансдукцию лучшими идентифицированными нами вариантами. Эти наблюдения особенно интересны в свете предыдущих исследований AAV2, в котором отсутствует мотив RGD, но все еще используются гетеродимеры интегрина, включая $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha V\beta 5$, в качестве корецепторов для интернализации вируса, по-видимому, посредством родственного мотива NGR (Asokan et al., 2006; Summerford et al., 1999).

[0732] Хотя требуется дополнительная работа, чтобы понять молекулярную основу, лежащую в основе взаимодействия гетеродимера RGD-интегрина для AAV-опосредованной доставки генов в мышцы, его важность для открытого нами класса векторов, направленных на мышцы, позволила нам продолжить эволюцию этих капсидов путем систематического изменения фланкирующих остатков вокруг важного мотива RGD. В этом втором раунде эволюции идентифицировали дополнительные варианты, способные связывать более широкий набор гетеродимеров интегрина с еще большей аффинностью, чем MyoAAV 1A. Лучший вариант второго поколения у мышей, MyoAAV 2A, продемонстрировал значительно повышенную активность в отношении трансдукции мышц (до 128 раз выше, чем у AAV9) в анализах как *in vivo*, так и *in vitro*, при сохранении низкой трансдукции печени, и его успех обеспечивает основу для итеративной разработки сверхактивных векторов для других представляющих интерес целевых тканей.

[0733] С нашей целью продвижения геномной медицины мы применили MyoAAV 1A и MyoAAV 2A в качестве векторов доставки для редактирования генов и генной терапии, которые в настоящее время находятся в стадии разработки и тестирования для лечения генетических миопатий человека. В этих исследованиях использовали хорошо известные мышиные модели DMD и XLMTM, в которых целевое удаление ДНК и изменение рамки считывания для транскриптов (Nelson et al., 2016; Tabebordbar et al., 2016) или генетическое дополнение полноразмерным или миниатюрным терапевтическим трансгеном (Childers et al., 2014; Hakim et al., 2017) ранее продемонстрировали функциональную эффективность. В обеих моделях наблюдались заметные терапевтические эффекты, включая восстановление экспрессии белков, с которым связано заболевание, значительное увеличение мышечной силы и производительности, а в случае XLMTM - значительное сокращение смертности, вызванной заболеванием, что резко увеличило наблюдаемую продолжительность жизни животных, получавших MyoAAV 1A, по сравнению со средней продолжительностью жизни контрольных животных без лечения и получавших AAV9.

[0734] Терапевтические результаты тем более примечательны, что они были достигнуты после введения в 10-250 раз более низких доз терапевтического вектора, чем те, которые использовались в ранее опубликованных доклинических исследованиях, основанных на тех же подходах к генной терапии (Childers et al., 2014; Elverman et al., 2017; Hakim et al., 2017; Mack et al., 2017) или в текущих клинических испытаниях с участием людей (идентификаторы clinicaltrials.gov NCT03362502, NCT03368742, NCT03769116 и NCT03199469). Требуемая более низкая дозировка для достижения терапевтической эффективности с этими новыми вариантами AAV может иметь существенные преимущества в клиническом применении, включая улучшенную экспрессию и профиль безопасности, а также снижение производственных затрат.

[0735] Наконец, варианты из класса капсидов MyoAAV были идентифицированы как варианты с наиболее высокой тропностью к мышцам после направленной эволюции *in vivo* в NHP. Эти результаты предполагают прямую применимость вариантов капсида класса

MyoAAV у мышей, NHP и людей, поскольку эти варианты продемонстрировали широкую активность в мышечной трансдукции у нескольких инбредных линий мышей, включая C57BL/6J, BALB/cJ, DBA/2J, mdx, и DBA/2J-mdx,, а также у яванских макак и в культурах первичных миобластов человека, полученных от нескольких доноров. Более того, необходимость гетеродимеров интегринов для инфективности капсидов класса MyoAAV в мышечных клетках как мыши, так и человека позволяет предположить консервативный способ трансдукции в мышцах мыши и человека, что может ускорить сроки разработки и внедрения новых подходов генной терапии для широкого спектра генетических миопатий.

[0736] В недавней публикации Вайнманна и др. (Weinmann et al., 2020) сообщается об идентификации тропного к мышцам варианта капсида после определения эффективности трансдукции 183 капсидов AAV дикого типа и модифицированных капсидов AAV после системного введения мышам. Интересно, что тропный к мышцам вариант, который Вайнманн и др. идентифицировали в результате их скрининга, содержит мотив RGD, представленный на поверхности капсида, и может служить независимым подтверждением полученных нами результатов. Однако авторы не охарактеризовали механизм трансдукции и эффективность трансдукции их варианта у NHP и в клетках человека. Полученные в данном примере результаты направленной эволюции капсидов *in vivo* у мышей и NHP демонстрируют, что последовательность аминокислот вокруг мотива RGD во вставляемом пептиде играет решающую роль в определении эффективности трансдукции капсидов у разных видов. Хотя наиболее высокотропные к мышцам варианты, выявленные в результате направленной эволюции *in vivo* у мышей и NHP, содержат мотив RGD, как показано в данном Примере, последовательность аминокислот вокруг мотива для отдельных вариантов, выявленных в качестве лучших выбранных вариантов для каждого вида, отличается. Например, MyoAAV 2A является лучшим вариантом второго поколения, который мы идентифицировали у мышей, и он очень эффективен в трансдукции мышц мышей, но не трансдуцирует мышцы NHP с высокой эффективностью после системного введения. Фактически, все варианты, которые были идентифицированы из этих отборов NHP, превосходили варианты, идентифицированные на мышах, при тестировании на трансдукцию мышц после системной доставки в виде рекомбинантных AAV NHP. К счастью, лучшие варианты капсидов, отобранные нами для NHP, обладают высокой эффективностью при трансдукции мышц мыши, что делает их вполне применимыми для терапевтических разработок. Эти результаты подчеркивают важность использования направленной эволюции *in vivo* со строгой стратегией селекции для выбора наиболее мощных вариантов капсида у приматов.

[0737] В целом, данный Пример описывает и демонстрирует эволюцию, разработку и механистическое исследование семейства высокоэффективных вариантов капсида AAV, направленных на мышцы,у разных видов. В данном документе также показана терапевтическая эффективность этих векторов даже в низких дозах на нескольких мышиных моделях генетического заболевания мышц. Эти векторы обладают потенциалом для улучшения направленной на мышцы доставки терапевтических генов для большого числа заболеваний опорно-двигательного аппарата. В более широком смысле, описанная в данном документе система DELIVER обеспечивает высоко адаптируемую платформу для определения точных вариантов капсида AAV для любой ткани или типа клеток в организме, что может значительно расширить клиническое и экспериментальное применение этой векторной системы в различных областях и дисциплинах. Применение DELIVER для других тканей и систем органов будет иметь далеко идущие последствия в ускорении разработки и реализации новых методов генной терапии и других подходов геномной медицины для лечения различных заболеваний человека.

Ссылки для Примера 7

[0738] Asokan, A., Hamra, J.B., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2006). Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. J Virol *80*, 8961-8969.

[0739] Bell, C.L., Vandenberghe, L.H., Bell, P., Limberis, M.P., Gao, G.P., Van Vliet, K., Agbandje-McKenna, M., and Wilson, J.M. (2011). The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice. J Clin Invest *121*, 2427-2435.

[0740] Berry, G.E., and Asokan, A. (2016). Cellular transduction mechanisms of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol *21*, 54-60.

[0741] Borner, K., Kienle, E., Huang, L.Y., Weinmann, J., Sacher, A., Bayer, P., Stullein, C., Fakhiri, J., Zimmermann, L., Westhaus, A., *et al.* (2020). Pre-arrayed Pan-AAV Peptide Display Libraries for Rapid Single-Round Screening. Mol Ther *28*, 1016-1032.

[0742] Childers, M.K., Joubert, R., Poulard, K., Moal, C., Grange, R.W., Doering, J.A., Lawlor, M.W., Rider, B.E., Jamet, T., Daniele, N., *et al.* (2014). Gene therapy prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy. Sci Transl Med *6*, 220ra210.

[0743] Choudhury, S.R., Fitzpatrick, Z., Harris, A.F., Maitland, S.A., Ferreira, J.S., Zhang, Y., Ma, S., Sharma, R.B., Gray-Edwards, H.L., Johnson, J.A., *et al.* (2016). In Vivo Selection Yields AAV-B1 Capsid for Central Nervous System and Muscle Gene Therapy. Mol Ther *24*, 1247-1257.

[0744] Dalkara, D., Byrne, L.C., Klimczak, R.R., Visel, M., Yin, L., Merigan, W.H., Flannery, J.G., and Schaffer, D.V. (2013). In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. Sci Transl Med *5*, 189ra176.

[0745] Deverman, B.E., Pravdo, P.L., Simpson, B.P., Kumar, S.R., Chan, K.Y., Banerjee, A., Wu, W.L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S.P., *et al.* (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. Nat Biotechnol *34*, 204-209.

[0746] DiMattia, M.A., Nam, H.J., Van Vliet, K., Mitchell, M., Bennett, A., Gurda, B.L., McKenna, R., Olson, N.H., Sinkovits, R.S., Potter, M., *et al.* (2012). Structural insight into the unique properties of adeno-associated virus serotype 9. J Virol *86*, 6947-6958.

[0747] Ding, W., Zhang, L., Yan, Z., and Engelhardt, J.F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. Gene Ther *12*, 873-880.

[0748] Duan, D. (2018). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. Mol Ther *26*, 2337-2356.

[0749] Dudek, A.M., Pillay, S., Puschnik, A.S., Nagamine, C.M., Cheng, F., Qiu, J., Carette, J.E., and Vandenberghe, L.H. (2018). An Alternate Route for Adeno-associated Virus (AAV) Entry Independent of AAV Receptor. J Virol *92*.

[0750] Elverman, M., Goddard, M.A., Mack, D., Snyder, J.M., Lawlor, M.W., Meng, H., Beggs, A.H., Buj-Bello, A., Poulard, K., Marsh, A.P., *et al.* (2017). Long-term effects of systemic gene therapy in a canine model of myotubular myopathy. Muscle Nerve *56*, 943-953.

[0751] Gao, G., Lu, Y., Calcedo, R., Grant, R.L., Bell, P., Wang, L., Figueredo, J., Lock, M., and Wilson, J.M. (2006). Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. Mol Ther *13*, 77-87.

[0752] Hakim, C.H., Wasala, N.B., Pan, X., Kodippili, K., Yue, Y., Zhang, K., Yao, G., Haffner, B., Duan, S.X., Ramos, J., *et al.* (2017). A Five-Repeat Micro-Dystrophin Gene Ameliorated Dystrophic Phenotype in the Severe DBA/2J-mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy. Mol Ther Methods Clin Dev *6*, 216-230.

[0753] Hinderer, C., Katz, N., Buza, E.L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L.K., and Wilson, J.M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. Hum Gene Ther *29*, 285-298.

[0754] Hordeaux, J., Wang, Q., Katz, N., Buza, E.L., Bell, P., and Wilson, J.M. (2018). The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. Mol Ther *26*, 664-668.

[0755] Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell *110*, 673-687.

[0756] Korbelin, J., Sieber, T., Michelfelder, S., Lunding, L., Spies, E., Hunger, A., Alawi, M., Rapti, K., Indenbirken, D., Muller, O.J., *et al.* (2016). Pulmonary Targeting of Adeno-associated Viral Vectors by Next-generation Sequencing-guided Screening of Random Capsid Displayed Peptide Libraries. Mol Ther *24*, 1050-1061.

[0757] Li, C., and Samulski, R.J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. Nat Rev Genet *21*, 255-272.

[0758] Li, C., Wu, S., Albright, B., Hirsch, M., Li, W., Tseng, Y.S., Agbandje-McKenna, M., McPhee, S., Asokan, A., and Samulski, R.J. (2016). Development of Patient-specific AAV Vectors After Neutralizing Antibody Selection for Enhanced Muscle Gene Transfer. Mol Ther *24*, 53-65.

[0759] Mack, D.L., Poulard, K., Goddard, M.A., Latournerie, V., Snyder, J.M., Grange, R.W., Elverman, M.R., Denard, J., Veron, P., Buscara, L., *et al.* (2017). Systemic AAV8-Mediated Gene Therapy Drives Whole-Body Correction of Myotubular Myopathy in Dogs. Mol Ther *25*, 839-854.

[0760] Mendell, J.R., Sahenk, Z., Lehman, K., Nease, C., Lowes, L.P., Miller, N.F., Iammarino, M.A., Alfano, L.N., Nicholl, A., Al-Zaidy, S., *et al.* (2020). Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. JAMA Neurol.

[0761] Michelfelder, S., Kohlschutter, J., Skorupa, A., Pfennings, S., Muller, O., Kleinschmidt, J.A., and Trepel, M. (2009). Successful expansion but not complete restriction of tropism of adeno-associated virus by in vivo biopanning of random virus display peptide libraries. PLoS One *4*, e5122.

[0762] Morales, L., Gambhir, Y., Bennett, J., and Stedman, H.H. (2020). Broader Implications of Progressive Liver Dysfunction and Lethal Sepsis in Two Boys following Systemic High-Dose AAV. Mol Ther *28*, 1753-1755.

[0763] Murrey, D.A., Naughton, B.J., Duncan, F.J., Meadows, A.S., Ware, T.A., Campbell, K.J., Bremer, W.G., Walker, C.M., Goodchild, L., Bolon, B., *et al.* (2014). Feasibility and safety of systemic rAAV9-hNAGLU delivery for treating mucopolysaccharidosis IIIB: toxicology, biodistribution, and immunological assessments in primates. Hum Gene Ther Clin Dev *25*, 72-84.

[0764] Nelson, C.E., Hakim, C.H., Ousterout, D.G., Thakore, P.I., Moreb, E.A., Castellanos Rivera, R.M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F.A., Yan, W.X., *et al.* (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Science *351*, 403-407.

[0765] Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature *309*, 30-33.

[0766] Pillay, S., Meyer, N.L., Puschnik, A.S., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, Y., Jae, L.T., Wosen, J.E., Nagamine, C.M., Chapman, M.S., *et al.* (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature *530*, 108-112.

[0767] Pytela, R., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. Cell *40*, 191-198.

[0768] Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. Annu Rev Cell Dev Biol *12*, 697-715.

[0769] Summerford, C., Bartlett, J.S., and Samulski, R.J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. Nat Med *5*, 78-82.

[0770] Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J.K.W., Chew, W.L., Widrick, J.J., Yan, W.X., Maesner, C., Wu, E.Y., Xiao, R., Ran, F.A., *et al.* (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. Science *351*, 407-411.

[0771] Tse, L.V., Klinc, K.A., Madigan, V.J., Castellanos Rivera, R.M., Wells, L.F., Havlik, L.P., Smith, J.K., Agbandje-McKenna, M., and Asokan, A. (2017). Structure-guided evolution of antigenically distinct adeno-associated virus variants for immune evasion. Proc Natl Acad Sci U S A *114*, E4812-E4821.

[0772] Weinmann, J., Weis, S., Sippel, J., Tulalamba, W., Remes, A., El Andari, J., Herrmann, A.K., Pham, Q.H., Borowski, C., Hille, S., *et al.* (2020). Identification of a myotropic AAV by massively parallel in vivo evaluation of barcoded capsid variants. Nat Commun *11*, 5432.

[0773] Yang, L., Jiang, J., Drouin, L.M., Agbandje-McKenna, M., Chen, C., Qiao, C., Pu, D., Hu, X., Wang, D.Z., Li, J., *et al.* (2009). A myocardium tropic adeno-associated virus (AAV) evolved by DNA shuffling and in vivo selection. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 3946-3951.

[0774] Yang, L., and Xiao, X. (2013). Creation of a cardiotropic adeno-associated virus: the story of viral directed evolution. Virol J *10*, 50.

[0775] Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. Mol Ther *16*, 1073-1080.

***

[0776] Различные модификации и вариации описанных способов, фармацевтических композиций и наборов по изобретению станут очевидны для специалистов в данной области техники без отступления от объема и сущности изобретения. Хотя изобретение было описано в связи с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно предусматривает дополнительные модификации и что заявляемое изобретение не должно быть чрезмерно ограничено такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, предполагается, что различные модификации описанных способов реализации изобретения, которые очевидны для специалистов в данной области техники, находятся в пределах объема изобретения. Подразумевается, что данная заявка охватывает любые вариации, применения или адаптации изобретения, согласующиеся, в общем случае, с принципами изобретения и включающие такие отклонения от настоящего раскрытия, которые относятся к компетенции известной или общепринятой практики в области техники, к которой относится изобретение, и применимы к существенным признакам, приведенным ранее в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая:

нацеливающий фрагмент, эффективный для нацеливания на мышечную клетку, при этом нацеливающий фрагмент содержит один или более n-мерных мотивов, причем по меньшей мере один n-мерный мотив из одного или более n-мерных мотивов содержит или состоит из X_mRGDX_n, где каждый из X_m и X_n независимо выбран из любой аминокислоты, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, и где m равно 1-4; и

необязательно карго, причем карго соединено или иным образом связано с нацеливающим фрагментом.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что по меньшей мере один n-мерный мотив соответствует любому из таблицы 2 (SEQ ID NO: 2-7, 20-21, 41-409), таблицы 3 (SEQ ID NO: 2, 28, 30-32, 55, 76, 96, 103, 135, 158, 207, 214, 252, 306, 316, 398, 410-768), Фиг. 14F (SEQ ID NO: 8-12, 14-18) или любой их комбинации.

3. Композиция по любому из пп. 1-2, отличающаяся тем, что нацеливающий фрагмент содержит полипептид, полинуклеотид, липид, полимер, сахар или их комбинацию.

4. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что нацеливающий фрагмент содержит вирусный белок.

5. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что вирусный белок представляет собой капсидный белок.

6. Композиция по любому из пп. 4-5, отличающаяся тем, что вирусный белок представляет собой белок аденоассоциированного вируса (AAV - англ.: adeno associated virus).

7. Композиция по любому из пп. 5-6, отличающаяся тем, что n-мерный мотив расположен между двумя аминокислотами вирусного белка, так что n-мерный мотив является внешним по отношению к вирусному капсиду.

8. Композиция по любому из пп. 6-7, отличающаяся тем, что n-мерный мотив вставлен между любыми двумя смежными аминокислотами между аминокислотами 262-269, 327-

332, 382-386, 452-460, 488-505, 527-539, 545-558, 581-593, 704-714 или любой их комбинацией в капсидном полипептиде AAV9 или в аналогичном положении в капсидном полипептиде AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74, AAV rh.10.

9. Композиция по любому из пп. 6-8, отличающаяся тем, что n-мерный мотив вставлен между аминокислотами 588 и 589 в капсидном полипептиде AAV9 или в аналогичном положении в капсидном полипептиде AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74, AAV rh.10.

10. Композиция по любому из пп. 1-9, причем композиция представляет собой сконструированную вирусную частицу.

11. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что сконструированная вирусная частица представляет собой сконструированную вирусную частицу AAV.

12. Композиция по п. 11, отличающаяся тем, что вирусная частица AAV представляет собой сконструированную вирусную частицу AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV rh.74 или AAV rh.10.

13. Композиция по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что n-мерный мотив имеет длину 3-15 аминокислот.

14. Композиция по любому из предшествующих пунктов, причем композиция имеет сниженную или устраненную специфичность в отношении немышечной клетки.

15. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что немышечная клетка представляет собой клетку печени.

16. Композиция по любому из пп. 5-14, отличающаяся тем, что вирусный капсид представляет собой сконструированный капсидный белок AAV, имеющий сниженное или устраненное поглощение немышечной клеткой по сравнению с соответствующим капсидным полипептидом AAV дикого типа.

17. Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что капсидный полипептид дикого типа

представляет собой капсидный полипептид AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV rh.74 или AAV rh.10.

18. Композиция по любому из пп. 16-17, отличающаяся тем, что сконструированный капсидный белок AAV содержит одну или более мутаций, которые приводят к уменьшению или устранению поглощения немышечной клеткой.

19. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что одна или более мутаций находятся

a. в положении 267,

b. в положении 269,

c. в положении 504,

d. в положении 505,

e. в положении 590

f. или любой их комбинации

в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в одном или более положениях, соответствующих им в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9.

20. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что капсидный белок, отличный от капсидного белка AAV9, представляет собой капсидный полипептид AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74 или AAV rh.10.

21. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что мутация в положении 267 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены G или X на A, где X представляет собой любую аминокислоту.

22. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что мутация в положении 269 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены S или X на T, где X представляет собой любую аминокислоту.

23. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что мутация в положении 504 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены G или X на A, где X представляет собой любую аминокислоту.

24. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что мутация в положении 505 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены P или X на A, где X представляет собой любую аминокислоту.

25. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что мутация в положении 590 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены Q или X на A, где X представляет собой любую аминокислоту.

26. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что сконструированный капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV9, имеющий мутацию в положении 267, положении 269 или в обоих положениях капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 1), где мутация в положении 267 представляет собой мутацию замены G на A, а мутация в положении 269 представляет собой мутацию замены S на T.

27. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что сконструированный капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV9, имеющий мутацию в положении 590 капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 1), где мутация в положении 509 представляет собой мутацию замены Q на A.

28. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что сконструированный капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV9, содержащий мутацию в положении 504, положении 505 или в обоих положениях капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 1), где мутация в положении 504 представляет собой мутацию замены G на A, а мутация в положении 505 представляет собой мутацию замены P на A.

29. Композиция по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что необязательное карго способно лечить или предотвращать мышечное заболевание или нарушение.

30. Композиция по п. 29, отличающаяся тем, что мышечное заболевание или нарушение представляет собой

a. аутоиммунное заболевание;
b. рак;
c. мышечную дистрофию;
d. нервно-мышечное заболевание;
e. болезнь накопления сахара или гликогена;
f. болезнь экспансии тринуклеотидных повторов;
g. обусловленную доминантно-негативной мутацией болезнь;
h. кардиомиопатию;
i. вирусное заболевание;
j. прогероидный синдром; или
k. любую их комбинацию.

31. Композиция по любому из пп 1-30, отличающаяся тем, что карго представляет собой морфолин, связанный с пептидом морфолин, антисмысловой олигонуклеотид, PMO, терапевтический трансген, полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид или пептид, PPMO, один или более пептидов, один или более полинуклеотидов, кодирующих белок CRISPR-Cas, направляющую РНК или и то, и другое, рибонуклеопротеин, причем рибонуклеопротеин содержит молекулу системы CRISPR-Cas, РНК терапевтического трансгена или другую модифицирующую ген или терапевтическую РНК и/или белок, или любую их комбинацию.

32. Композиция по любому из пп. 1-31, отличающаяся тем, что карго способно индуцировать пропуск экзона в гене.

33. Композиция по любому из пп. 1-32, отличающаяся тем, что карго способно индуцировать пропуск экзона в гене дистрофина.

34. Композиция по любому из пп. 1-33, отличающаяся тем, что карго представляет собой ген мини- или микродистрофина.

35. Композиция по п. 34, отличающаяся тем, что ген мини- или микродистрофина содержит спектрин-подобные повторы 1, 2, 3, и 24, и необязательно домен nNOS.

36. Композиция по любому из пп. 29-35, отличающаяся тем, что болезнь экспансии тринуклеотидных повторов представляет собой болезнь Гентингтона, миотоническую

дистрофию или лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию (FSHD - англ.: Facioscapulohumeral muscular dystrophy).

37. Композиция по любому из пп. 29-36, отличающаяся тем, что мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Эмери — Дрейфуса, миотоническую дистрофию или FSHD.

38. Композиция по п. 36, отличающаяся тем, что миотоническая дистрофия относится к типу 1 или типу 2.

39. Композиция по любому из пп. 29-38, отличающаяся тем, что кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, ассоциированную с мышечной дистрофией Дюшенна кардиомиопатию или болезнь Данона.

40. Композиция по любому из пп. 29-39, отличающаяся тем, что болезнь накопления сахара или гликогена представляет собой болезнь МПС типа III или болезнь Помпе.

41. Композиция по п. 40, отличающаяся тем, что МПС типа III представляет собой МПС типа IIIA, IIIB, IIIC или IIID.

42. Композиция по любому из пп. 29-41, отличающаяся тем, что нервно-мышечное заболевание представляет собой болезнь Шарко — Мари — Тута или атаксию Фридрейха.

43. Композиция по любому из пп. 1-42, причем композиция имеет повышенную активность в отношении мышечных клеток, специфичность в отношении мышечных клеток, сниженную иммуногенность или любую их комбинацию.

44. Векторная система, содержащая:
вектор, содержащий:
один или более полинуклеотидов, каждый из которых кодирует все или часть одного или более нацеливающих фрагментов, эффективных для нацеливания на мышечную клетку, причем каждый нацеливающий фрагмент содержит один или более n-мерных мотивов, где по меньшей мере один n-мерный мотив из одного или более n-мерных мотивов содержит

или состоит из X_mRGDX_n, где каждый из X_mи X_n независимо выбран из любой аминокислоты, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, и где m равно 1-4, и где по меньшей мере один из одного или более полинуклеотидов кодирует по меньшей мере один n-мерный мотив; и

необязательно регуляторный элемент, функционально связанный с одним или более полинуклеотидами.

45. Векторная система по п. 44, отличающаяся тем, что по меньшей мере один n-мерный мотив соответствует любому из **таблицы 2 (SEQ ID NO: 2-7, 20-21, 41-409), таблицы 3** (SEQ ID NO: 2, 28, 30-32, 55, 76, 96, 103, 135, 158, 207, 214, 252, 306, 316, 398, 410-768), **Фиг. 14F (SEQ ID NO: 8-12, 14-18)** или любой их комбинации.

46. Векторная система по любому из пп. 44-45, дополнительно содержащая карго.

47. Векторная система по п. 46, отличающаяся тем, что карго представляет собой карго-полинуклеотид и необязательно связан с одним или более из одного или более полинуклеотидов, кодирующих нацеливающий фрагмент.

48. Векторная система по любому из пп. 46-47, отличающаяся тем, что карго-полинуклеотид присутствует в том же векторе или в другом векторе, что и один или более полинуклеотидов, кодирующих нацеливающий фрагмент.

49. Векторная система по любому из пп. 44-48, причем векторная система способна продуцировать вирусные частицы, содержащие карго, если оно присутствует.

50. Векторная система по любому из пп. 44-49, отличающаяся тем, что векторная система способна продуцировать вирусный полипептид, содержащий один или более нацеливающих фрагментов.

51. Векторная система по п. 50, отличающаяся тем, что вирусный полипептид представляет собой капсидный полипептид.

52. Векторная система по п. 51, отличающаяся тем, что капсидный полипептид представляет собой капсидный полипептид AAV.

53. Векторная система по любому из пп. 44-51, отличающаяся тем, что векторная система способна продуцировать вирусные частицы AAV.

54. Векторная система по п. 53, отличающаяся тем, что вирусные частицы AAV представляют собой сконструированные вирусные частицы AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV rh.74 или AAV rh.10.

55. Векторная система по любому из пп. 51-54, отличающаяся тем, что капсидный полипептид представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV rh.74, AAV rh.10.

56. Векторная система по любому из пп. 50-55, отличающаяся тем, что один или более полинуклеотидов, кодирующих один n-мерный мотив, вставлены между двумя кодонами, соответствующими двум аминокислотам вирусного полипептида, так что n-мерный(-е) мотив(-ы) является внешним по отношению к вирусному капсиду.

57. Векторная система по п. 56, отличающаяся тем, что один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более n-мерных мотивов, вставлены между двумя кодонами, соответствующими любым двум смежным аминокислотам, между аминокислотами 262-269, 327-332, 382-386, 452-460, 488-505, 527-539, 545-558, 581-593, 704-714 или любой их комбинацией, в капсидном полипептиде AAV9 или в аналогичном положении в капсидном полипептиде AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74, AAV rh.10.

58. Векторная система по п. 57, отличающаяся тем, что один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более n-мерных мотивов, вставлены между кодонами, соответствующими аминокислотам 588 и 589 в капсидном полинуклеотиде AAV9, или в аналогичном положении в капсидном полипетиде AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74, AAV rh.10.

59. Векторная система по любому из пп. 51-58, отличающаяся тем, что капсидный белок представляет собой сконструированный капсидный белок AAV, имеющий сниженное или устраненное поглощение немышечной клеткой по сравнению с соответствующим капсидным полипептидом AAV дикого типа.

60. Векторная система по п. 59, отличающаяся тем, что немышечная клетка представляет собой клетку печени.

61. Векторная система по любому из пп. 59-60, отличающаяся тем, что капсидный полипептид дикого типа представляет собой капсидный полипептид AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV rh.74 или AAV rh. 10.

62. Векторная система по любому из пп. 69-61, отличающаяся тем, что сконструированный капсидный белок AAV содержит одну или более мутаций, которые приводят к уменьшению или устранению поглощения немышечной клеткой.

63. Векторная система по п. 62, отличающаяся тем, что одна или более мутаций находятся

a. в положении 267,

b. в положении 269,

c. в положении 504,

d. в положении 505,

e. в положении 590

f. или любой их комбинации

в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в одном или более положениях, соответствующих им в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9.

64. Векторная система по п. 63, отличающаяся тем, что капсидный белок, отличный от капсидного белка AAV9, представляет собой капсидный полипептид AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV rh.74 или AAV rh.10.

65. Векторная система по п. 63, отличающаяся тем, что мутация в положении 267 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены G или X на A, где X представляет собой любую аминокислоту.

66. Векторная система по п. 63, отличающаяся тем, что мутация в положении 269 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены S или X на T, где X представляет собой любую аминокислоту.

67. Векторная система по п. 63, отличающаяся тем, что мутация в положении 504 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или в соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены G или X на A, где X представляет собой любую аминокислоту.

68. Векторная система по п. 63, отличающаяся тем, что мутация в положении 505 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены P или X на A, где X представляет собой любую аминокислоту.

69. Векторная система по п. 63, отличающаяся тем, что мутация в положении 590 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO: 1) или соответствующем ему положении в капсидном полипептиде, отличном от капсидного полипептида AAV9, представляет собой мутацию замены Q или X на A, где X представляет собой любую аминокислоту.

70. Векторная система по п. 62, отличающаяся тем, что сконструированный капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV9, содержащий мутацию в положении 267, положении 269 или в обоих положениях капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 1), где мутация в положении 267 представляет собой мутацию замены G на A, а мутация в положении 269 представляет собой мутацию замены S на T.

71. Векторная система п. 62, отличающаяся тем, что сконструированный капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV9, имеющий мутацию в положении 590 капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 1), где мутация в положении 509 представляет собой мутацию замены Q на A.

72. Векторная система по п. 62, отличающаяся тем, что сконструированный капсидный белок AAV представляет собой сконструированный капсидный полипептид AAV9, содержащий мутацию в положении 504, положении 505 или в обоих положениях капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO: 1), где мутация в положении 504 представляет собой мутацию замены G на A, а мутация в положении 505 представляет собой мутацию замены P на A.

73. Векторная система по любому из пп. 44-72, отличающаяся тем, что вектор,

содержащий один или более полинуклеотидов, каждый из которых кодирует весь или часть одного или более нацеливающих фрагментов, не содержит регуляторные элементы сплайсинга.

74. Векторная система по любому из пп. 43-73, дополнительно содержащая полинуклеотид, кодирующий вирусный белок rep.

75. Векторная система по п. 74, отличающаяся тем, что полинуклеотид, кодирующий вирусный белок rep, представляет собой полинуклеотид, кодирующий белок rep AAV.

76. Векторная система по любому из пп. 74-75, отличающаяся тем, что полинуклеотид, кодирующий вирусный белок rep, находится в том же векторе или в другом векторе, что и один или более полинуклеотидов, каждый из которых кодирует всю или часть одного или более нацеливающих фрагментов.

77. Векторная система по любому из пп. 74-76, отличающаяся тем, что вирусный белок rep функционально связан с регуляторным элементом.

78. Полипептид, кодируемый и/или продуцируемый векторной системой по любому из пп. 44-77.

79. Полипептид по п. 78, отличающийся тем, что полипептид представляет собой вирусный полипептид.

80. Полипептид по п. 79, отличающийся тем, что вирусный полипептид представляет собой полипептид AAV.

81. Частица, продуцируемая векторной системой по любому из пп. 43-77, и/или включающая полипептид по любому из пп. 78-79.

82. Частица по п. 81, причем частица представляет собой вирусную частицу.

83. Частица по п. 82, отличающаяся тем, что вирусная частица представляет собой частицу аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусную частицу или ретровирусную частицу.

84. Частица по п. 83, отличающаяся тем, что вирусная частица обладает специфичным для мышц тропизмом.

85. Векторная система по любому из пп. 46–77, полипептид по любому из пп. 78–80 или частица по любому из пп. 81–84, отличающиеся тем, что карго способно лечить или предотвращать мышечное заболевание или нарушение.

86. Векторная система, полипептид или частица по п. 85, отличающиеся тем, что мышечное заболевание или нарушение представляет собой

(a) аутоиммунное заболевание;

(b) рак;

(c) мышечную дистрофию;

(d) нервно-мышечное заболевание;

(e) болезнь накопления сахара или гликогена;

(f) болезнь экспансии тринуклеотидных повторов;

(g) обусловленную доминантно-негативной мутацией болезнь;

(h) кардиомиопатию;

(i) вирусное заболевание;

(j) прогероидный синдром; или

(k) любую их комбинацию.

87. Векторная система, полипептид или частица по любому из пп 85-86, отличающиеся тем, что карго представляет собой морфолин, связанный с пептидом морфолин, антисмысловой олигонуклеотид, PMO, терапевтический трансген, полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид или пептид, PPMO, один или более пептидов, один или более полинуклеотидов, кодирующих белок CRISPR-Cas, направляющую РНК или и то, и другое, рибонуклеопротеин, где рибонуклеопротеин содержит молекулу системы CRISPR-Cas, РНК терапевтического трансгена или другую модифицирующую ген или терапевтическую РНК и/или белок, или любую их комбинацию.

88. Векторная система, полипептид или частица по любому из пп. 85-87, отличающиеся тем, что карго способно индуцировать пропуск экзона в гене.

89. Векторная система, полипептид или частица по любому из пп. 85-88, отличающиеся

тем, что карго способно индуцировать пропуск экзона в гене дистрофина.

90. Векторная система, полипептид или частица по любому из пп. 85-89, отличающиеся тем, что карго представляет собой ген мини- или микродистрофина.

91. Векторная система, полипептид или частица по п. 90, отличающиеся тем, что ген мини- или микродистрофина содержит спектрин-подобные повторы 1, 2, 3 и 24 и, необязательно, домен nNOS.

92. Векторная система, полипептид или частица по любому из пп. 86-91, отличающиеся тем, что болезнь экспансии тринуклеотидных повторов представляет собой болезнь Гентингтона, миотоническую дистрофию или лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию (FSHD).

93. Векторная система, полипептид или частица по любому из пп. 86-92, отличающиеся тем, что мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Эмери — Дрейфуса, миотоническую дистрофию или FSHD.

94. Векторная система, полипептид или частица по п. 93, отличающиеся тем, что миотоническая дистрофия относится к типу 1 или типу 2.

95. Векторная система, полипептид или частица по любому из пп. 85-94, отличающиеся тем, что кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, ассоциированную с мышечной дистрофией Дюшенна кардиомиопатию или болезнь Данона.

96. Векторная система, полипептид или частица по любому из пп. 85-95, отличающиеся тем, что болезнь накопления сахара или гликогена представляет собой болезнь МПС типа III или болезнь Помпе.

97. Векторная система, полипептид или частица по п. 96, отличающаяся тем, что МПС типа III представляет собой МПС типа IIIA, IIIB, IIIC или IIID.

98. Векторная система, полипептид или частица по любому из пп. 85-97, отличающиеся

тем, что нервно-мышечное заболевание представляет собой болезнь Шарко — Мари — Тута или атаксию Фридрейха.

99. Полипептид или частица по любому из пп. 78-98, отличающиеся тем, что полипептид, частица или и то и другое имеют повышенную активность в отношении мышечных клеток, специфичность в отношении мышечных клеток, сниженную иммуногенность или любую их комбинацию.

100. Клетка, содержащая:
a. композицию по любому из пп. 1-43;
b. векторную систему по любому из пп. 44-77 и 85-98;
c. полипептид по любому из пп. 81-84 и 85-99;
d. частицу по любому из пп. 81-99; или
e. их комбинацию.

101. Клетка по п. 100, причем клетка является прокариотической.

102. Клетка по п. 100, причем клетка является эукариотической.

103. Фармацевтический состав, содержащий:
a. композицию по любому из пп. 1-43;
b. векторную систему по любому из пп. 44-77 и 85-98;
c. полипептид по любому из пп. 81-84 и 85-99;
d. частицу по любому из пп. 81-99;
e. клетку по любому из пп. 100-102; или
f. их комбинацию; и
фармацевтически приемлемый носитель.

104. Способ, включающий:
введение субъекту, нуждающемуся в этом,
a. композицию по любому из пп. 1-43;
b. векторную систему по любому из пп. 44-77 и 85-98;
c. полипептид по любому из пп. 81-84 и 85-99;
d. частицу по любому из пп. 81-99;
e. клетку по любому из пп. 100-102;

f.

g. фармацевтический состав по п. 103; или

h. их комбинации,

105. Способ по п. 104, отличающийся тем, что у субъекта имеется мышечное заболевание или нарушение.

106. Способ по п. 105, отличающийся тем, что мышечное заболевание или нарушение представляет собой

a. аутоиммунное заболевание;

b. рак;

c. мышечную дистрофию;

d. нервно-мышечное заболевание;

e. болезнь накопления сахара или гликогена;

f. болезнь экспансии тринуклеотидных повторов;

g. обусловленную доминантно-негативной мутацией болезнь;

h. кардиомиопатию;

i. вирусное заболевание;

j. прогероидный синдром; или

k. любую их комбинацию.

107. Способ по п. 105, отличающийся тем, что болезнь экспансии тринуклеотидных повторов представляет собой болезнь Гентингтона, миотоническую дистрофию или лице-лопаточно-плечевую мышечную дистрофию (FSHD).

108. Способ по любому из пп. 105-106, отличающийся тем, что мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Эмери — Дрейфуса, миотоническую дистрофию или FSHD.

109. Способ по п. 107, отличающийся тем, что миотоническая дистрофия относится к типу 1 или типу 2.

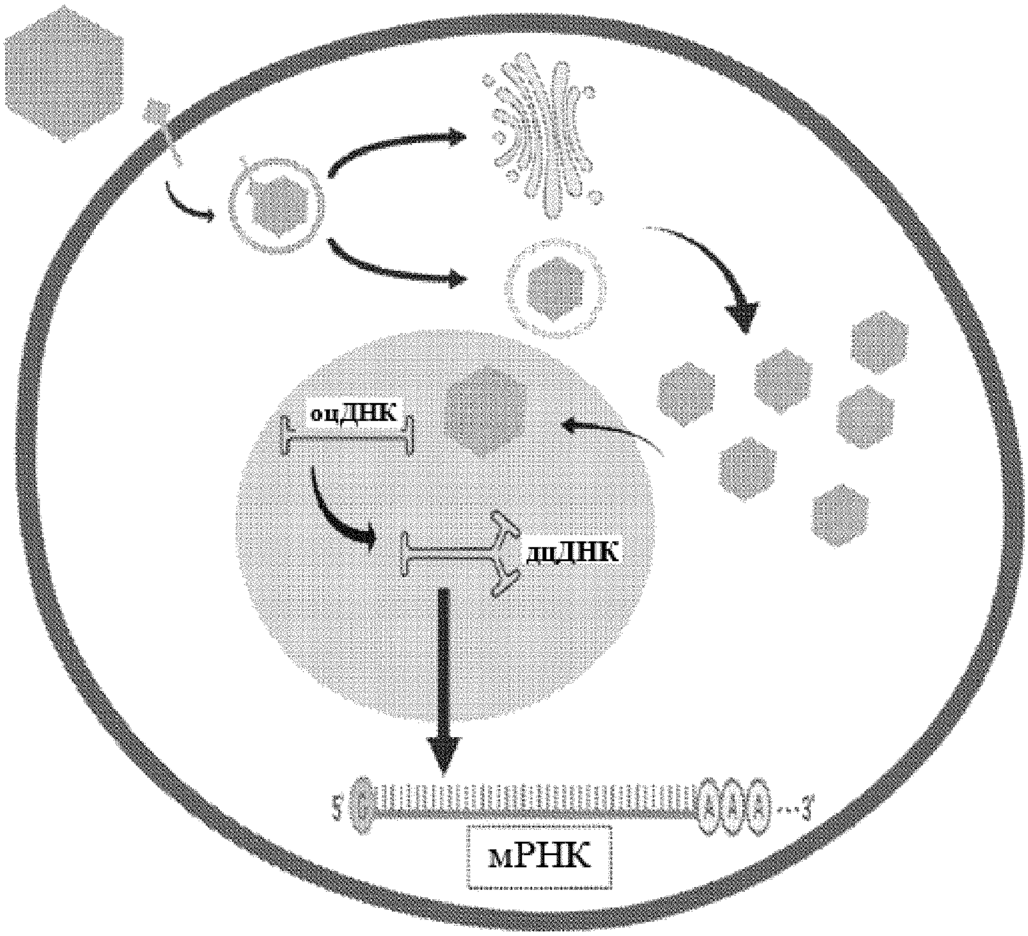
110. Способ по любому из пп. 105-109, отличающийся тем, что кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию, гипертрофическую

кардиомиопатию, ассоциированную с мышечной дистрофией Дюшенна кардиомиопатию или болезнь Данона.

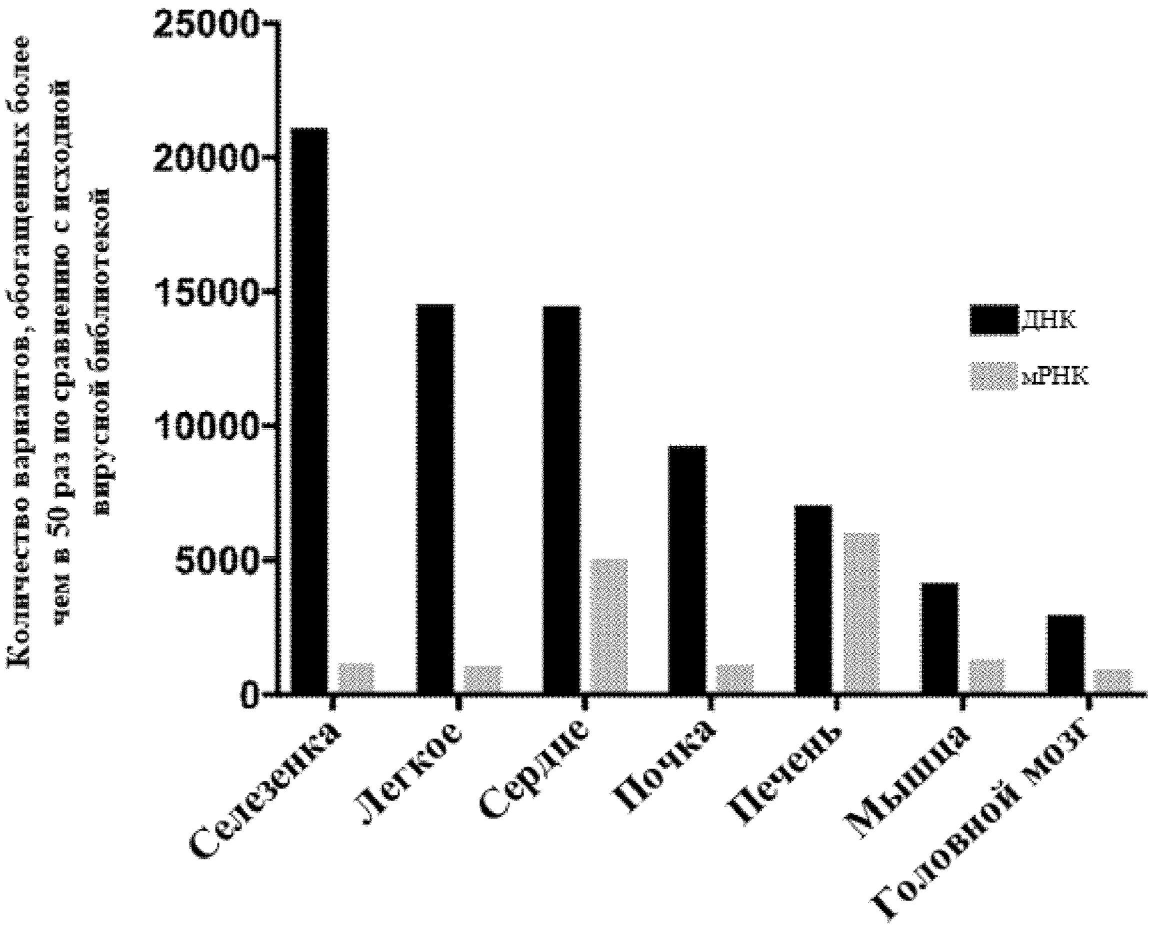
111. Способ по любому из пп. 105-106, отличающаяся тем, что болезнь накопления сахара или гликогена представляет собой болезнь МПС типа III или болезнь Помпе.

112. Способ по п. 111, отличающаяся тем, что МПС типа III представляет собой МПС типа IIIA, IIIB, IIIC или IIID.

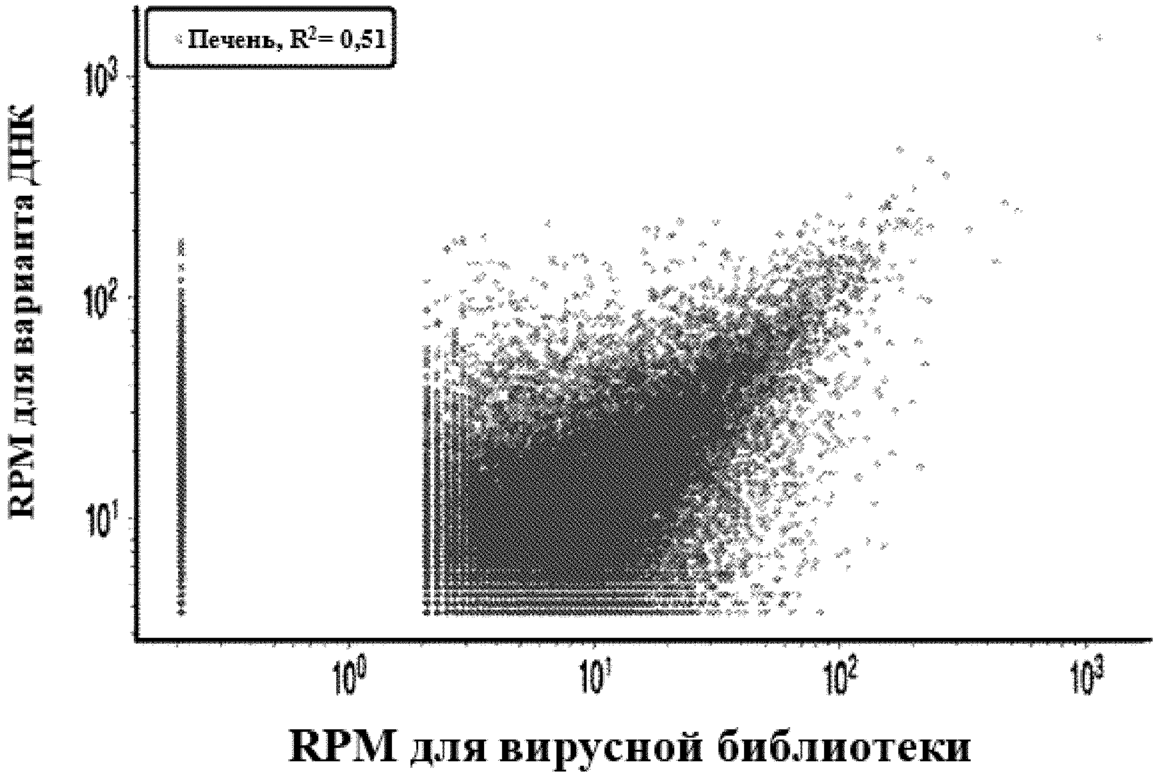
113. Способ по любому из пп. 104-112, отличающаяся тем, что нервно-мышечное заболевание представляет собой болезнь Шарко — Мари — Тута или атаксию Фридрейха.



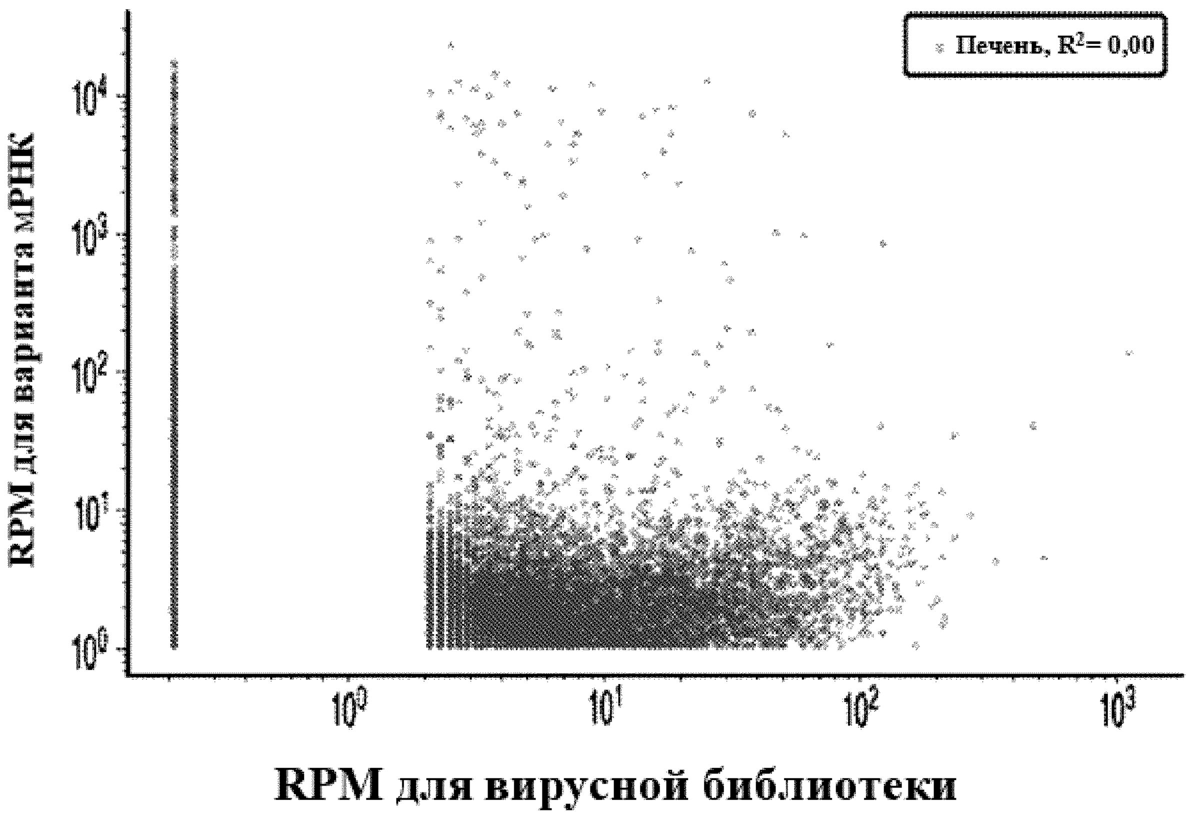
Фиг. 1


Количество вариантов, обогащенных более чем в 50 раз по сравнению с исходной вирусной библиотекой
25000
20000
15000
10000
5000
0
ДНК
мРНК
Селезенка
Легкое
Сердце
Почка
Печень
Мышца
Головной мозг

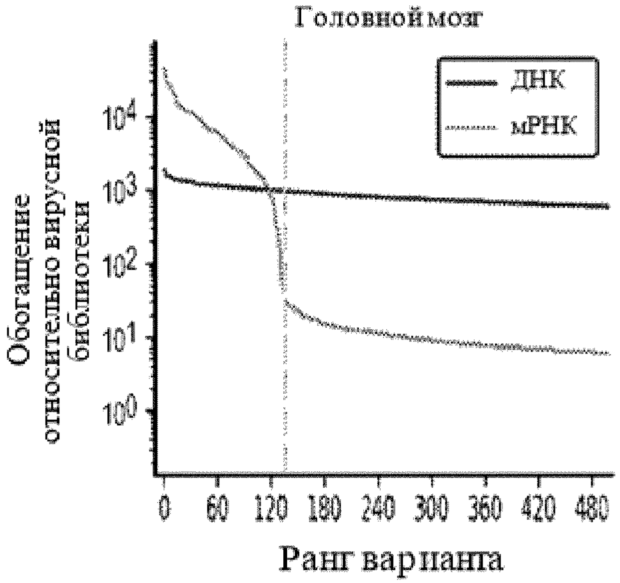
Фиг. 2


Печень, R^2= 0,51
RPM для варианта ДНК
RPM для вирусной библиотеки
10^0
10^1
10^2
10^3

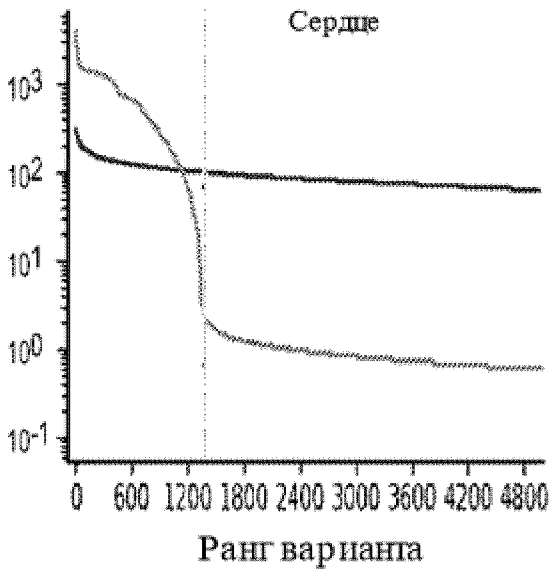
Фиг. 3A


Печень, R^2= 0,00
RPM для варианта мРНК
RPM для вирусной библиотеки
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

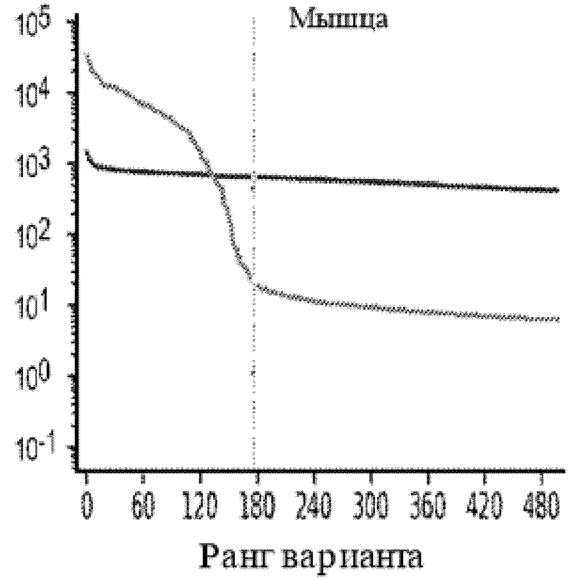
Фиг. 3B



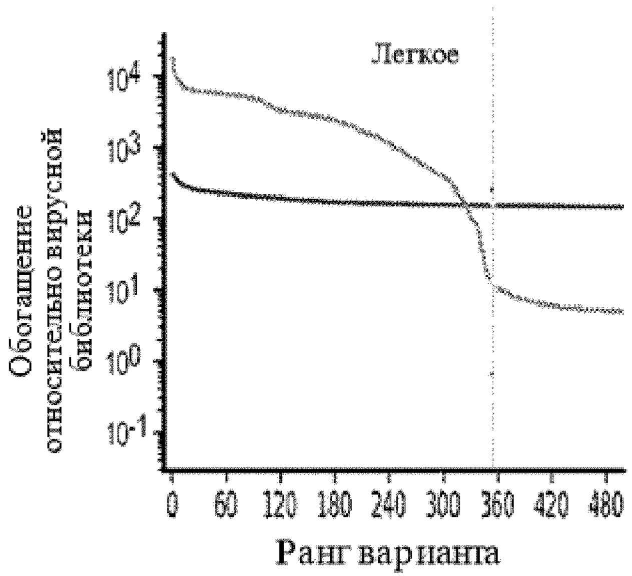
Фиг. 4A



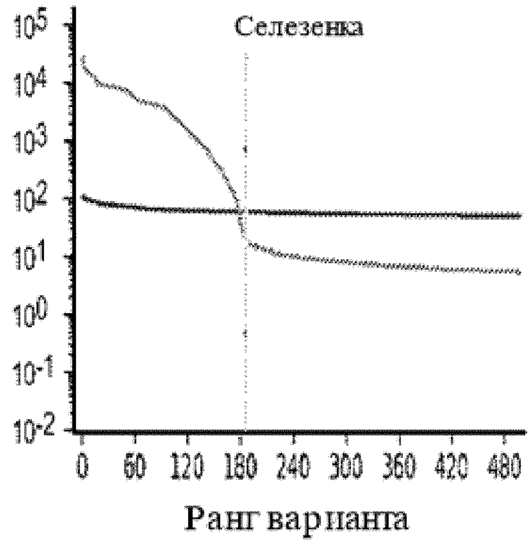
Фиг. 4B



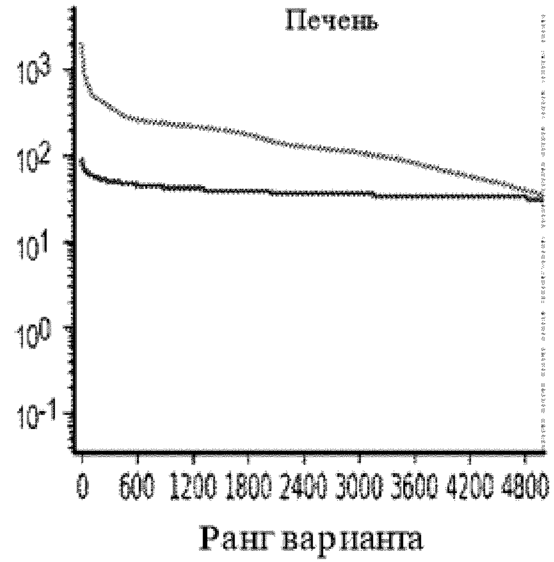
Фиг. 4C



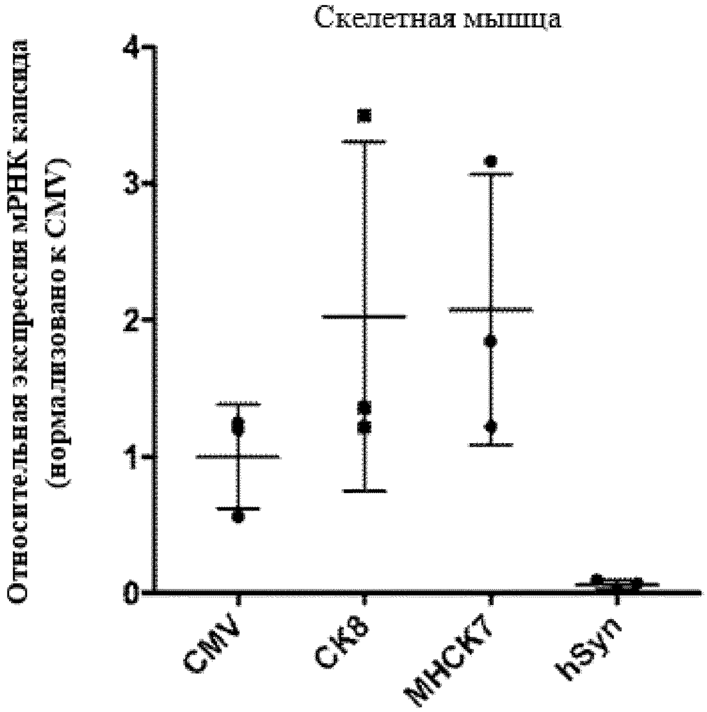
Фиг. 4D



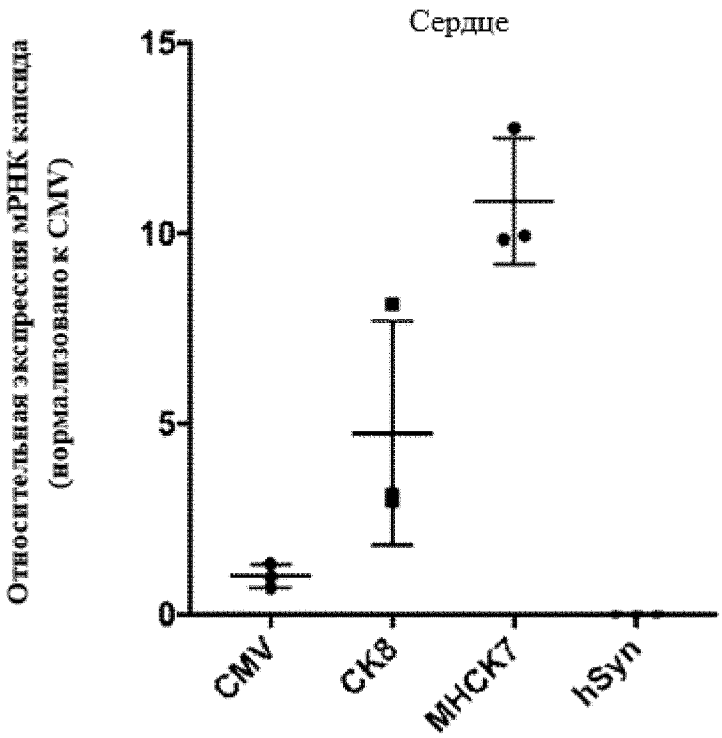
Фиг. 4E



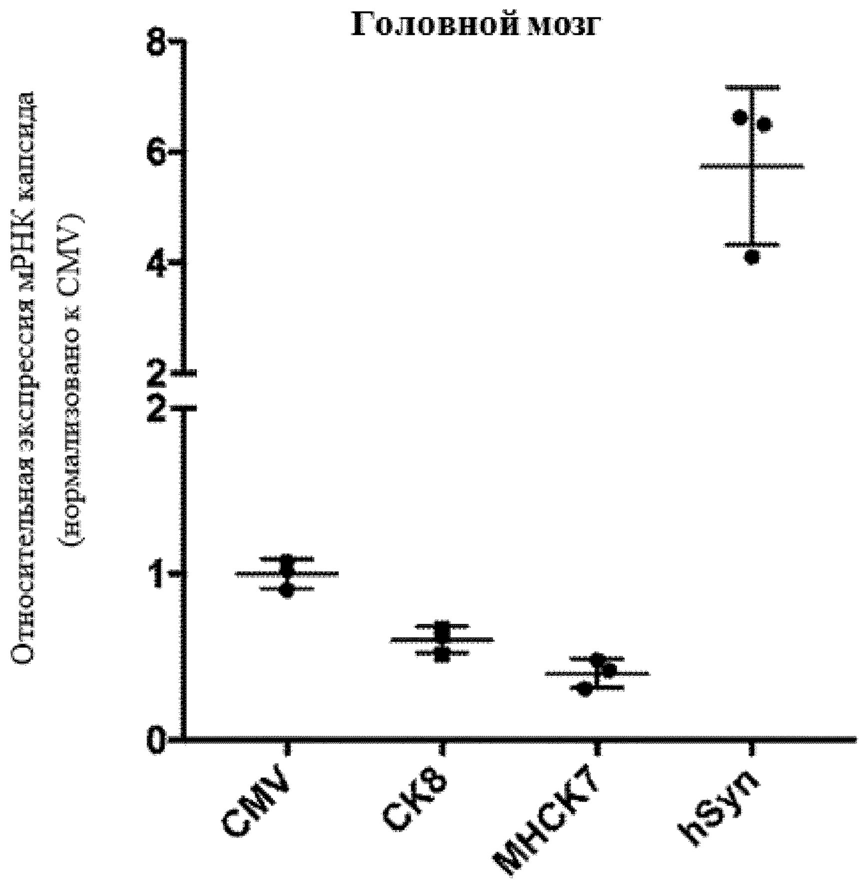
Фиг. 4F


Скелетная мышца
Относительная экспрессия мРНК капсида (нормализовано к CMV)
4
3
2
1
0
CMV
CK8
MHCK7
hSyn

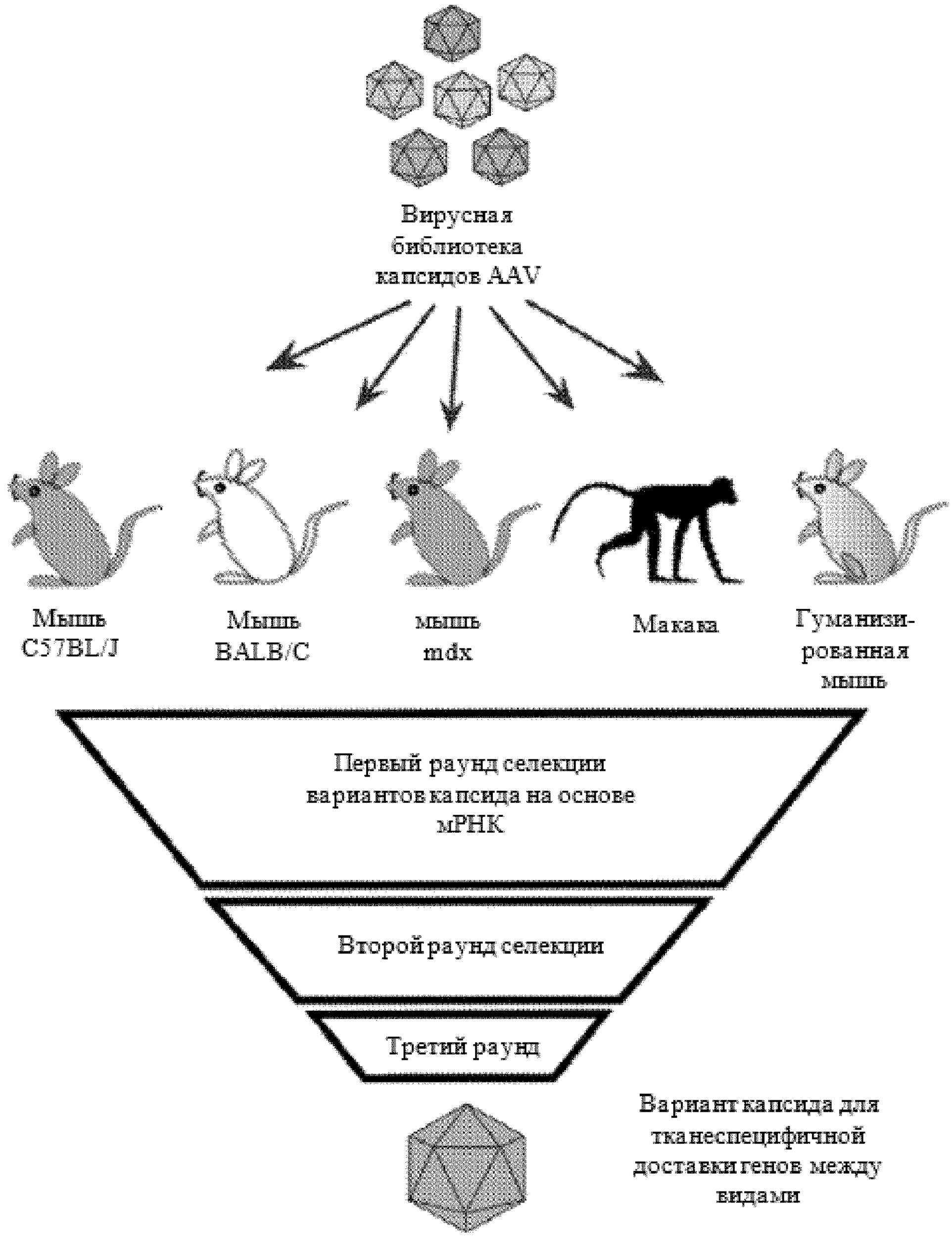
Фиг. 5A


Сердце
Относительная экспрессия мРНК капсида (нормализовано к CMV)
15
10
5
0
CMV
CK8
MHCK7
hSyn

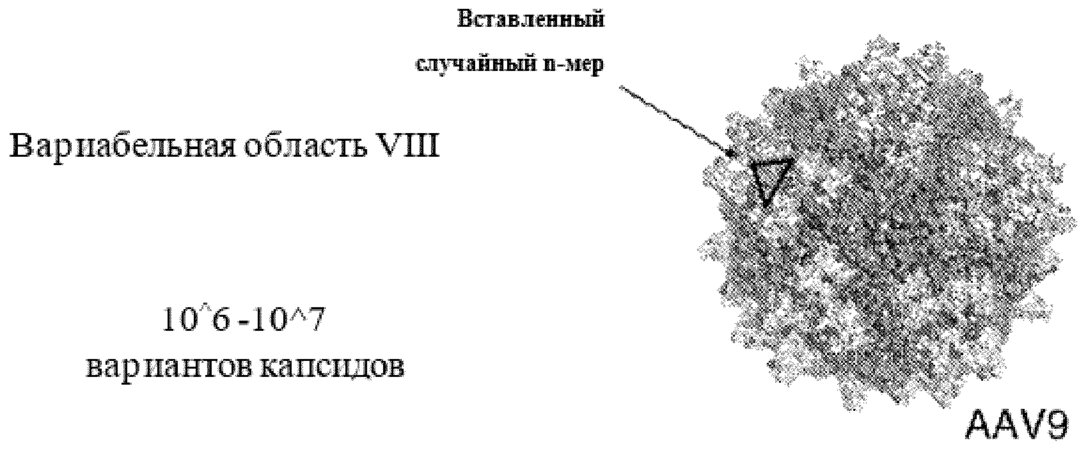
Фиг. 5B


Головной мозг
Относительная экспрессия мРНК капсида (нормализовано к CMV)
8
6
4
2
2
1
0
CMV
CK8
MHCK7
hSyn

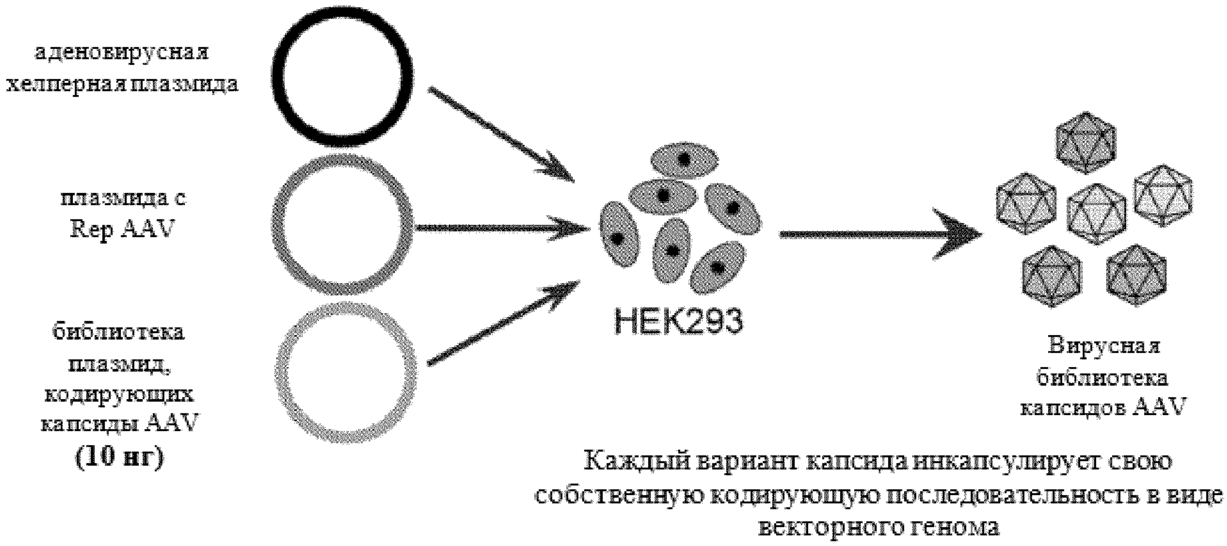
Фиг. 5C


Вирусная
библиотека
капсидов AAV
Мышь
C57BL/J
Мышь
BALB/C
мышь
mdx
Макака
Гуманизи-
рованная
мышь
Первый раунд селекции
вариантов капсида на основе
мРНК
Второй раунд селекции
Третий раунд
Вариант капсида для
тканеспецифичной
доставки генов между
видами

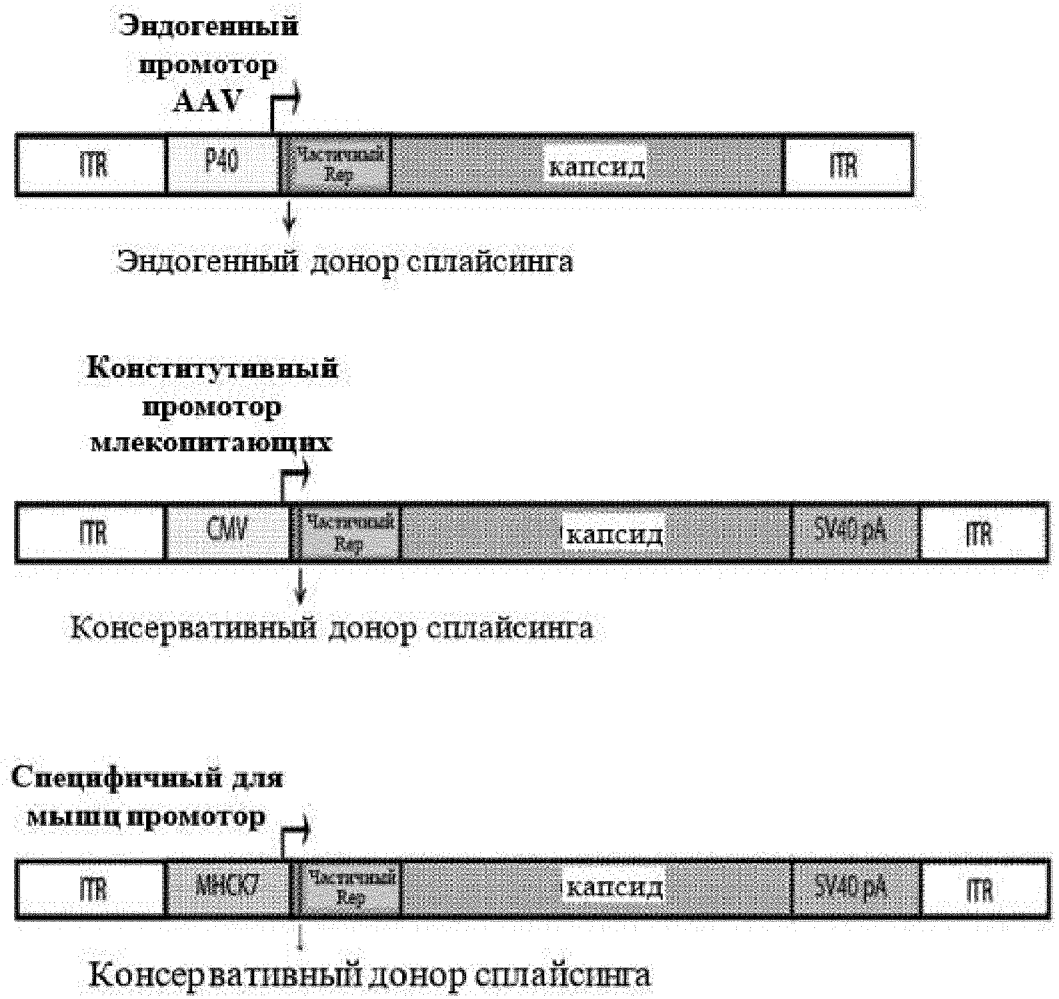
Фиг. 6


Вставленный
случайный n-мер
Вариабельная область VIII
10^6 -10^7
вариантов капсидов
AAV9

Фиг. 7


аденовирусная
хелперная плазмида
плазмида с
Rep AAV
библиотека
плазмид,
кодирующих
капсиды AAV
(10 нг)
HEK293
Вирусная
библиотека
капсидов AAV
Каждый вариант капсида инкапсулирует свою
собственную кодирующую последовательность в виде
векторного генома

Фиг. 8

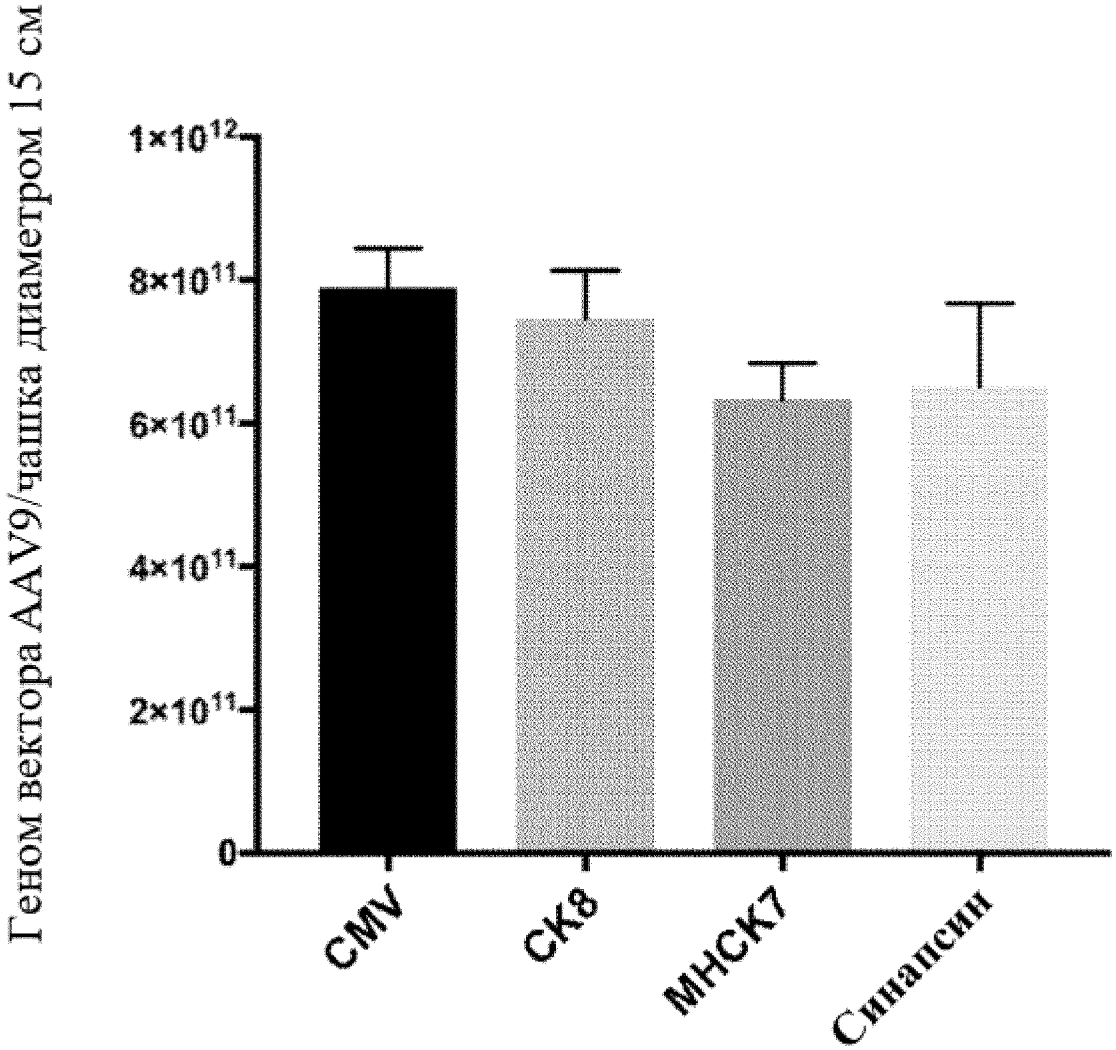


- Экспрессия зависит от генов хелперного аденовируса и белков Rep AAV дикого типа.
- Экспрессируется в клетках HEK293 во время продукции вируса
- Не экспрессируется в тканях после трансдукции *in vivo*

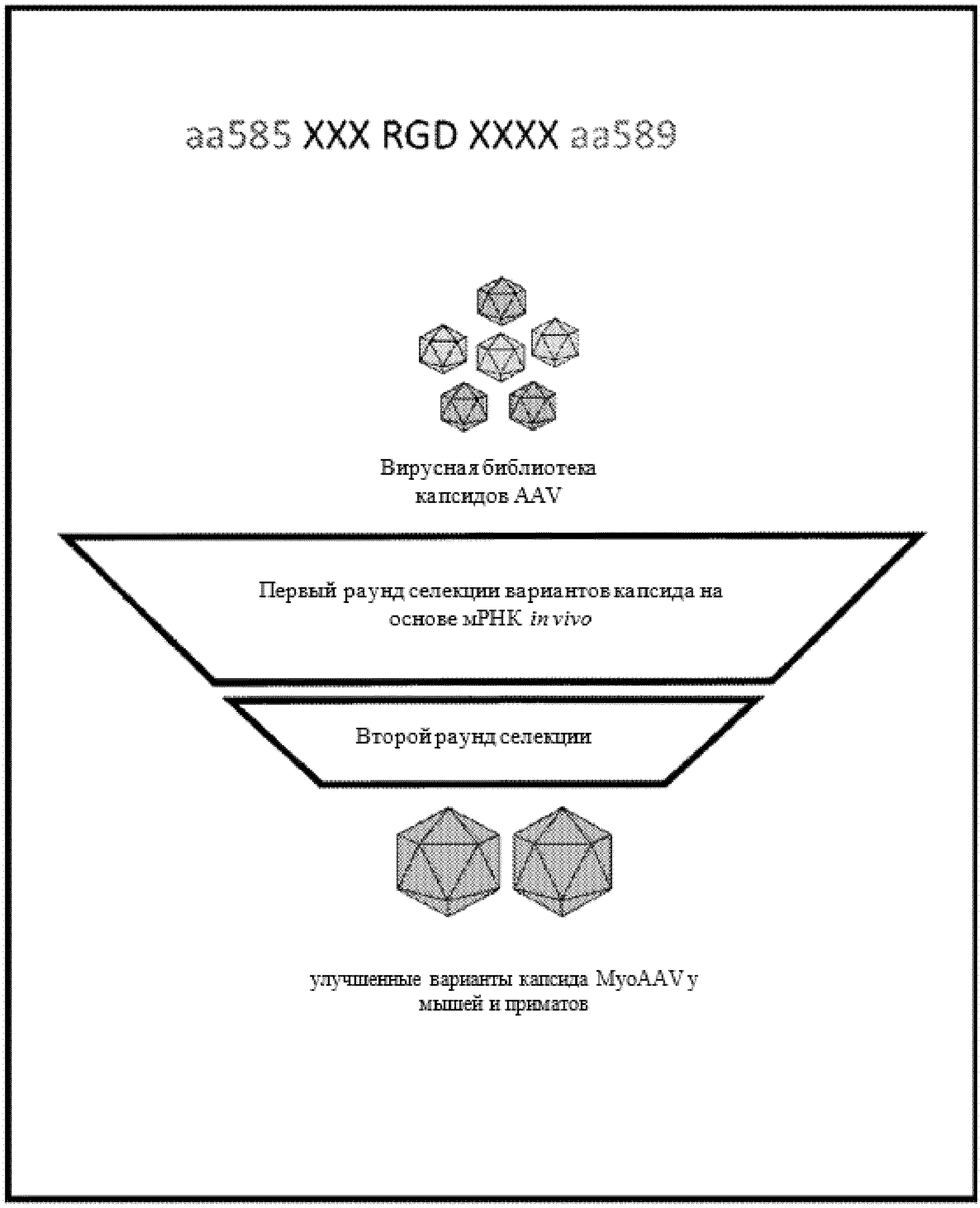
- Экспрессируется в клетках HEK293 во время продукции вируса
- Экспрессируется во всех тканях и типах клеток после трансдукции *in vivo*

- Экспрессируется в клетках HEK293 во время продукции вируса
- Экспрессируется в мышечных волокнах и кардиомиоцитах в скелетных мышцах и тканях сердца

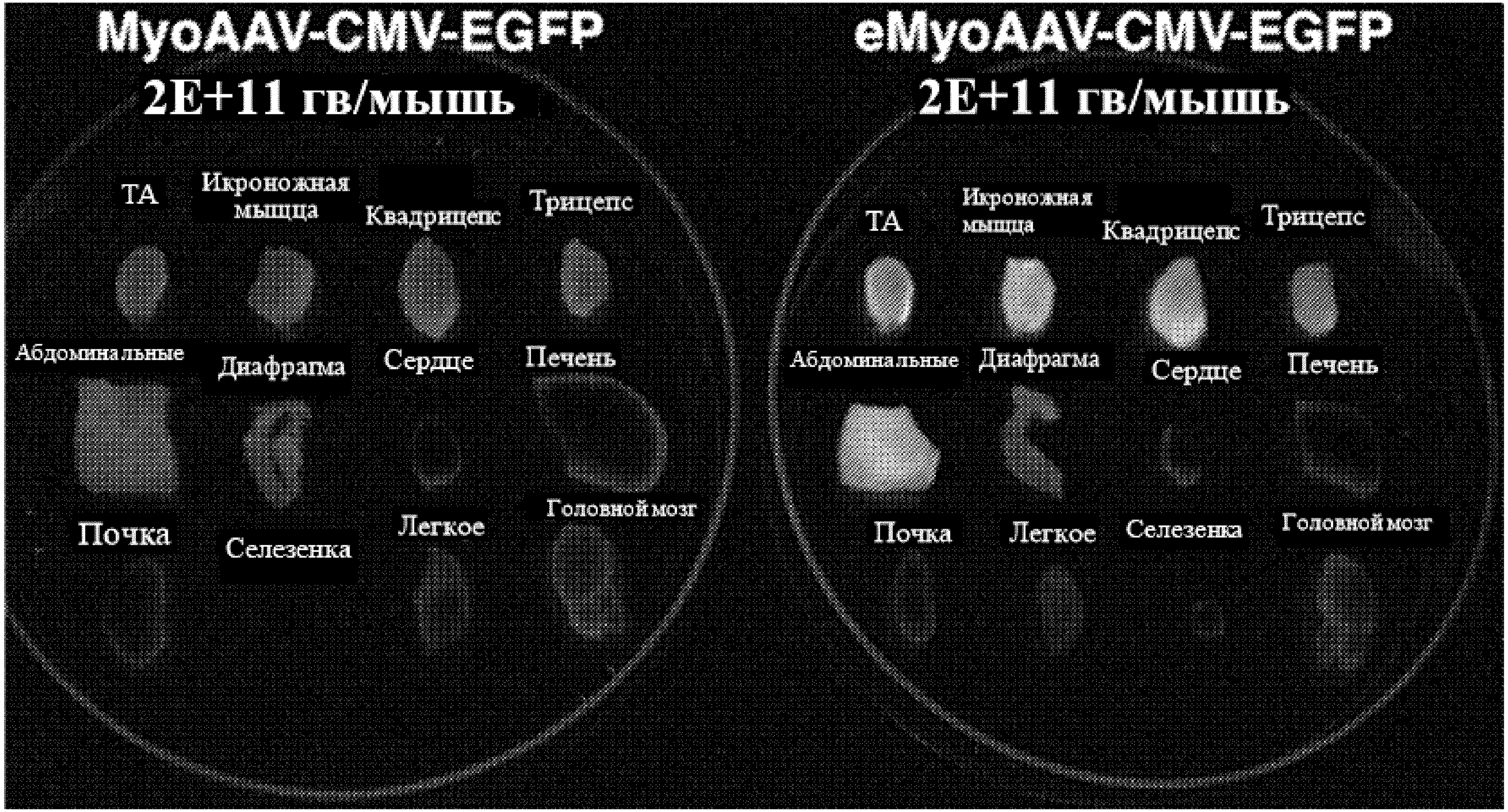
Фиг. 9


Геном вектора AAV9/чашка диаметром 15 см
1×10¹²
8×10¹¹
6×10¹¹
4×10¹¹
2×10¹¹
0
CMV
CK8
MHCK7
Синапсин

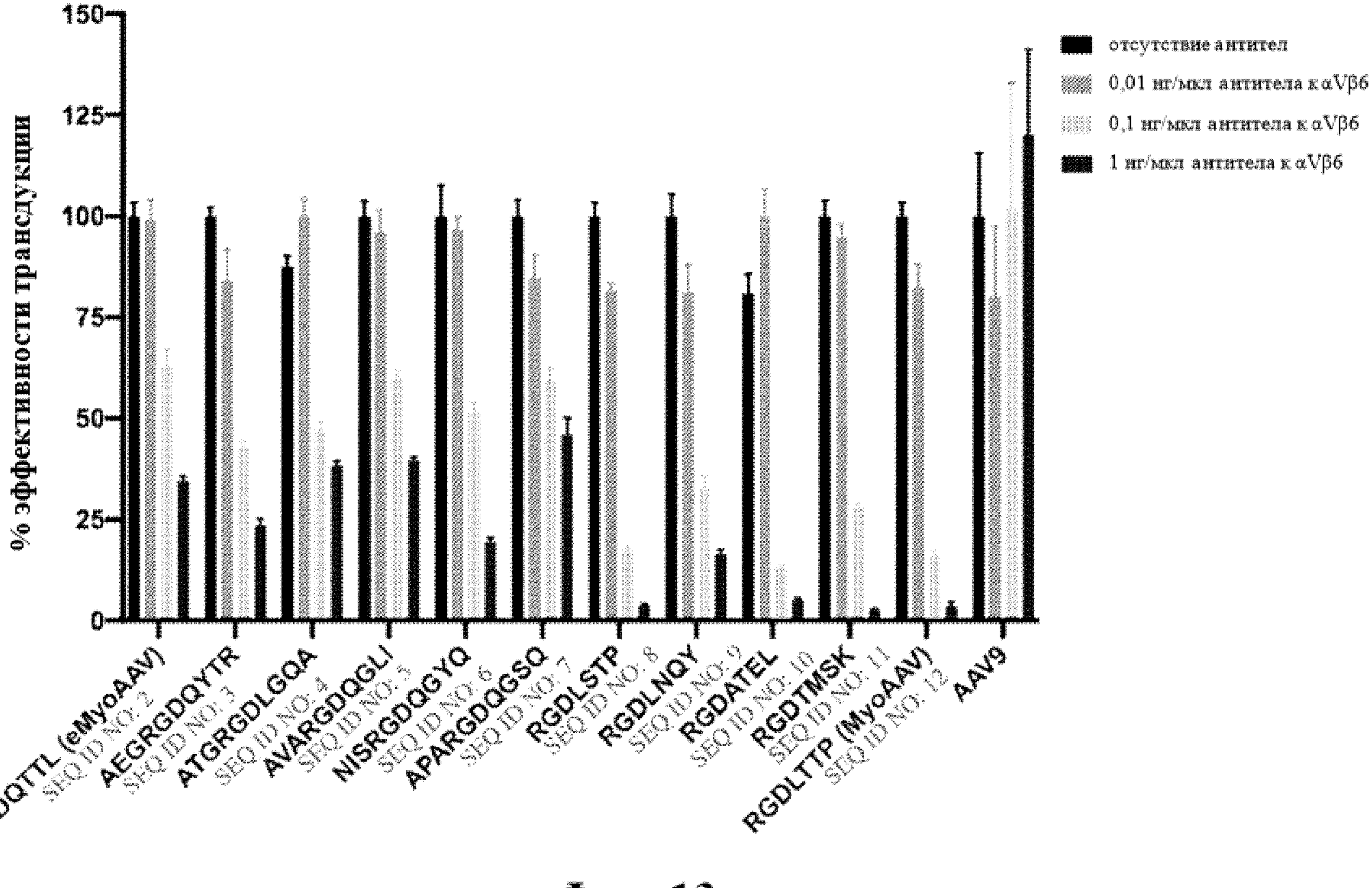
Фиг. 10


aa585 XXX RGD XXXX aa589
Вирусная библиотека
капсидов AAV
Первый раунд селекции вариантов капсида на
основе мРНК *in vivo*
Второй раунд селекции
улучшенные варианты капсида MyoAAV у
мышей и приматов

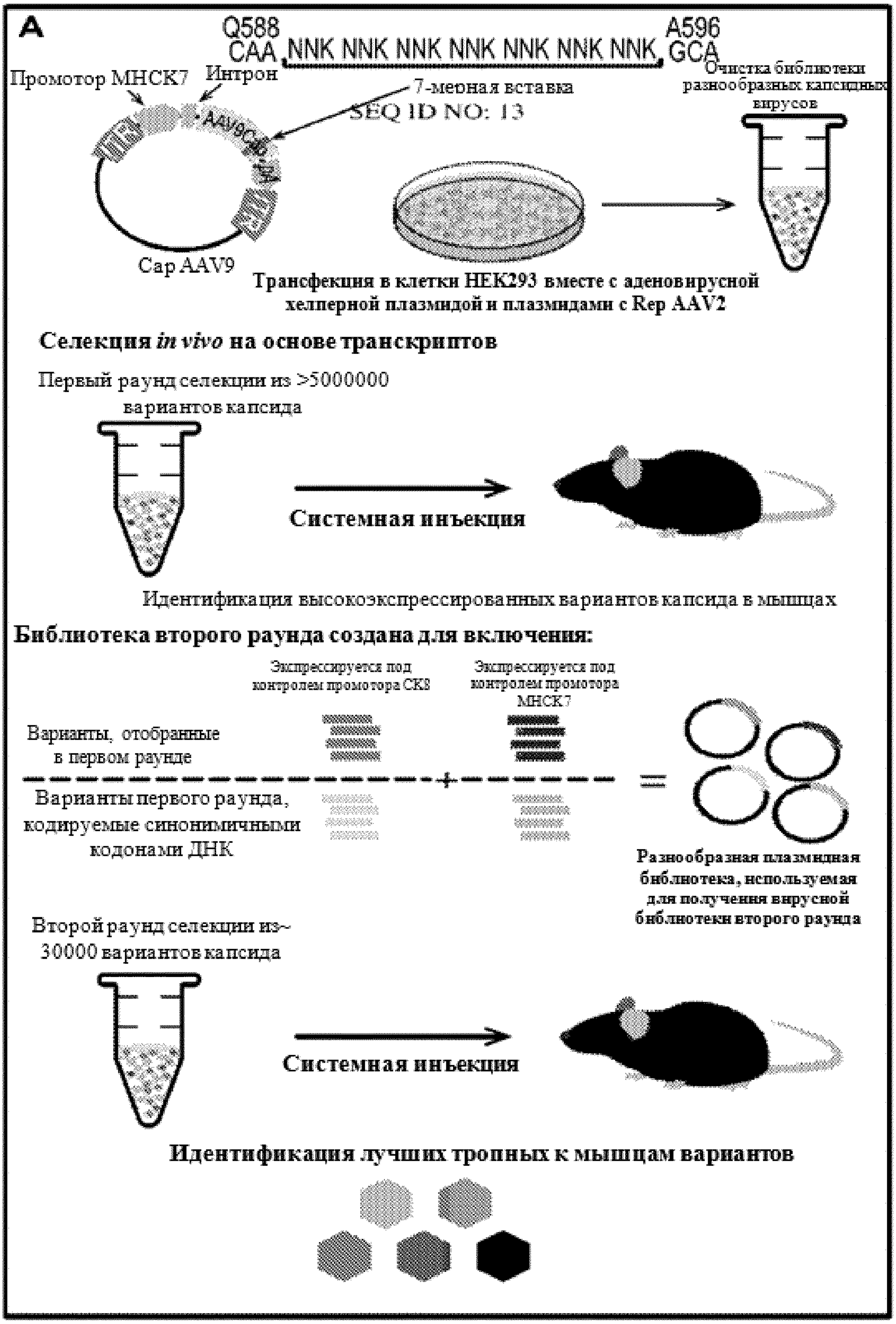
Фиг. 11


MyoAAV-CMV-EGFP
2E+11 гв/мышь
TA
Икроножная мышца
Квадрицепс
Трицепс
Абдоминальные
Диафрагма
Сердце
Печень
Почка
Селезенка
Легкое
Головной мозг
eMyoAAV-CMV-EGFP
2E+11 гв/мышь
TA
Икроножная мышца
Квадрицепс
Трицепс
Абдоминальные
Диафрагма
Сердце
Печень
Почка
Легкое
Селезенка
Головной мозг

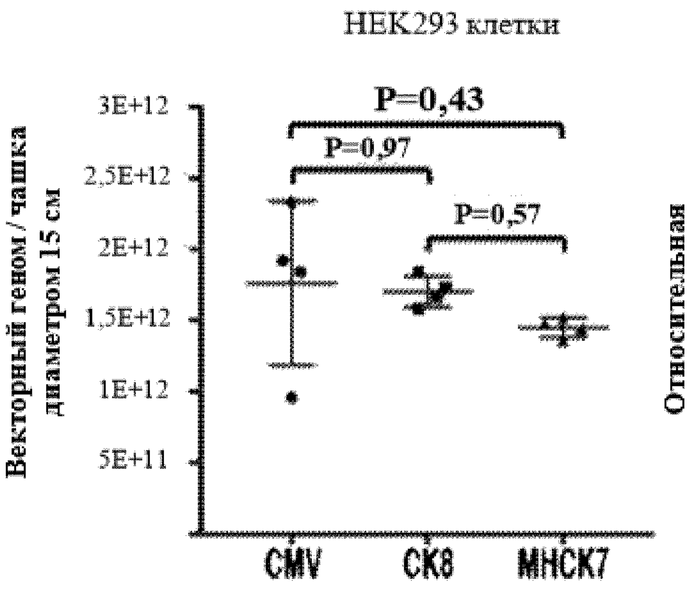
Фиг. 12


% эффективности трансдукции
150
125
100
75
50
25
0
отсутствие антител
0,01 нг/мкл антитела к αVβ6
0,1 нг/мкл антитела к αVβ6
1 нг/мкл антитела к αVβ6
GPGRGDQTTL (eMyoAAV)
SEQ ID NO: 2
AEGRGDQYTR
SEQ ID NO: 3
ATGRGDLGQA
SEQ ID NO: 4
AVARGDQGLI
SEQ ID NO: 5
NISRGDQGYQ
SEQ ID NO: 6
APARGDQGSQ
SEQ ID NO: 7
RGDLSTP
SEQ ID NO: 8
RGDLNQY
SEQ ID NO: 9
RGDATEL
SEQ ID NO: 10
RGDTMSK
SEQ ID NO: 11
RGDLTTP (MyoAAV)
SEQ ID NO: 12
AAV9

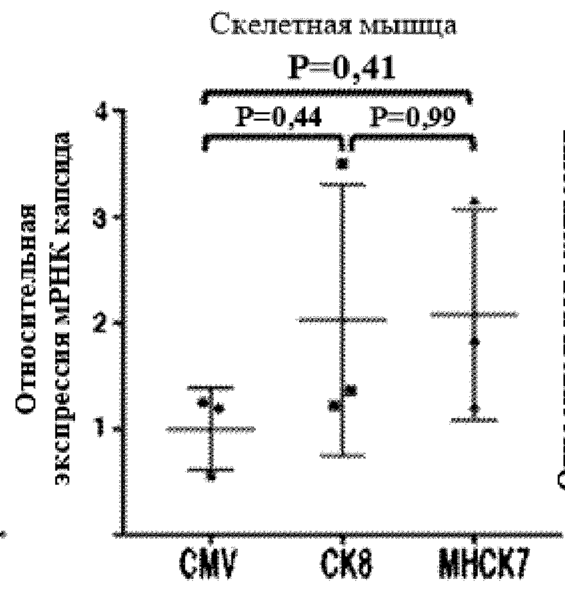
Фиг. 13


A
Q588
CAA NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK GCA
A596
Промотор MHCK7
Интрон
7-мерная вставка
SEQ ID NO: 13
Очистка библиотеки разнообразных капсидных вирусов
Cap AAV9
Трансфекция в клетки HEK293 вместе с аденовирусной хелперной плазмидой и плазмидами с Rep AAV2
Селекция *in vivo* на основе транскриптов
Первый раунд селекции из >5000000 вариантов капсида
Системная инъекция
Идентификация высокоэкспрессированных вариантов капсида в мышцах
Библиотека второго раунда создана для включения:
Экспрессируется под контролем промотора CK8
Экспрессируется под контролем промотора MHCK7
Варианты, отобранные в первом раунде
Варианты первого раунда, кодируемые синонимичными кодонами ДНК
Разнообразная плазмидная библиотека, используемая для получения вирусной библиотеки второго раунда
Второй раунд селекции из~ 30000 вариантов капсида
Системная инъекция
Идентификация лучших тропных к мышцам вариантов

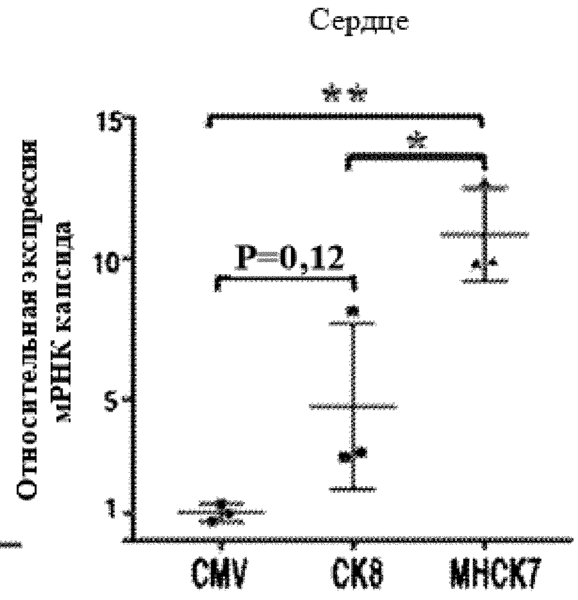
Фиг. 14A



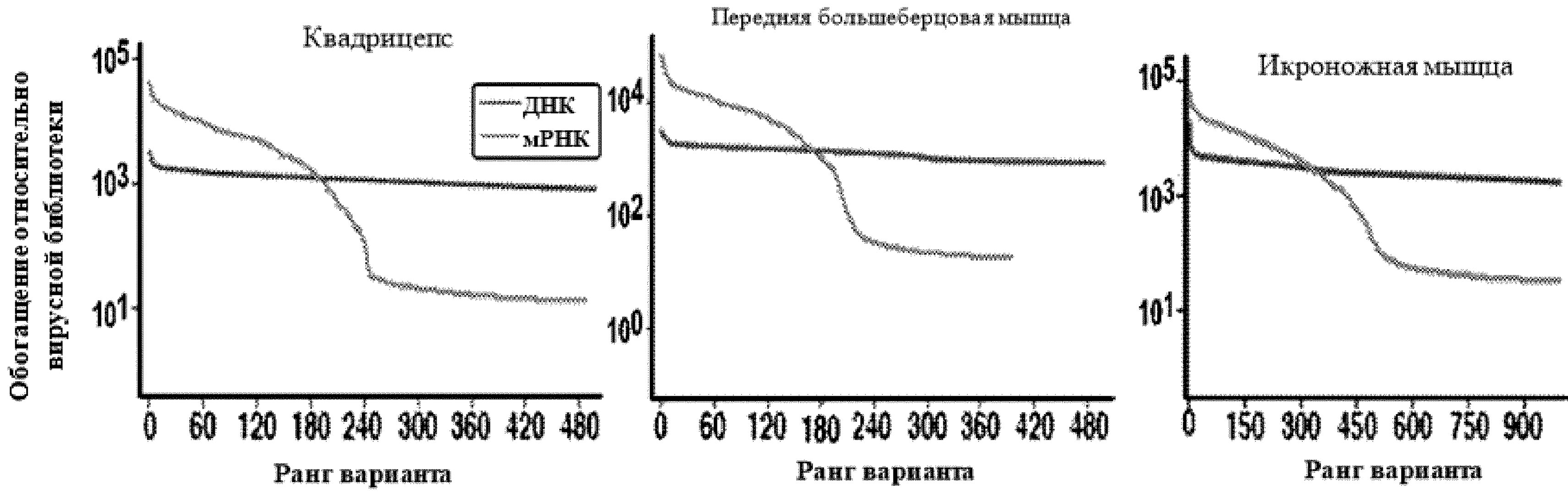
Фиг. 14B



Фиг. 14C

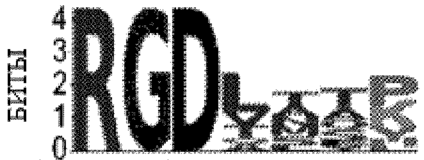


Фиг. 14D



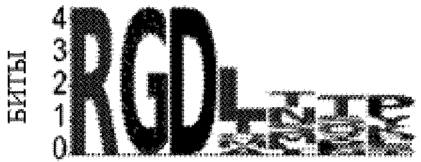
Фиг. 14E

Лучшие варианты CK8



Ранг	Последовательность 7-мера	SEQ ID NO:
1	RGDLSTP	8
2	RGDLNQY	9
3	RGDLTTP	12
4	RGDATEL	10
5	RGDQLYH	14
6	RGDLSTP	8
7	RGDVAAK	15
8	RGDLTTP	12
9	RGDLNQY	9
10	RGDTMSK	11
11	RGDVAAK	15
12	RGDTMSK	11

Лучшие варианты MHCK7

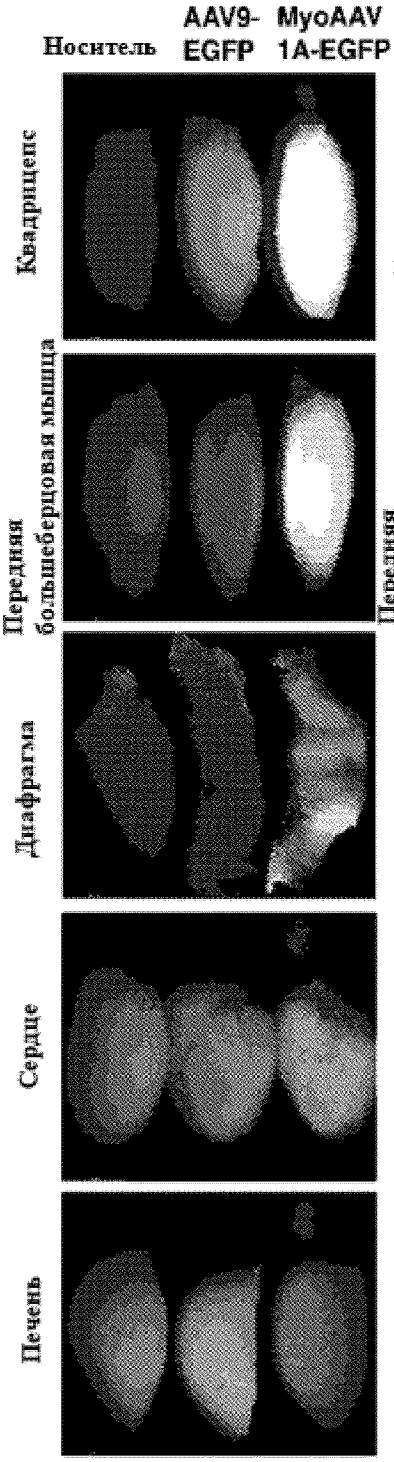


Ранг (название варианта)	Последовательность 7-мера	SEQ ID NO:
1 (MyoAAV 1A)	RGDLTTP	12
2 (MyoAAV 1B)	RGDLNQY	9
3 (MyoAAV 1C)	RGDLSTP	8
4 (MyoAAV 1D)	RGDQLYH	14
5 (MyoAAV 1E)	RGDTMSK	11
6 (MyoAAV 1F)	RGDATEL	10
7 (MyoAAV 1C)	RGDLSTP	8
8 (MyoAAV 1G)	RGDMINT	16
9 (MyoAAV 1B)	RGDLNQY	9
10 (MyoAAV 1E)	RGDTMSK	11
11 (MyoAAV 1A)	RGDLTTP	12
12 (MyoAAV 1H)	RGDLNDS	17

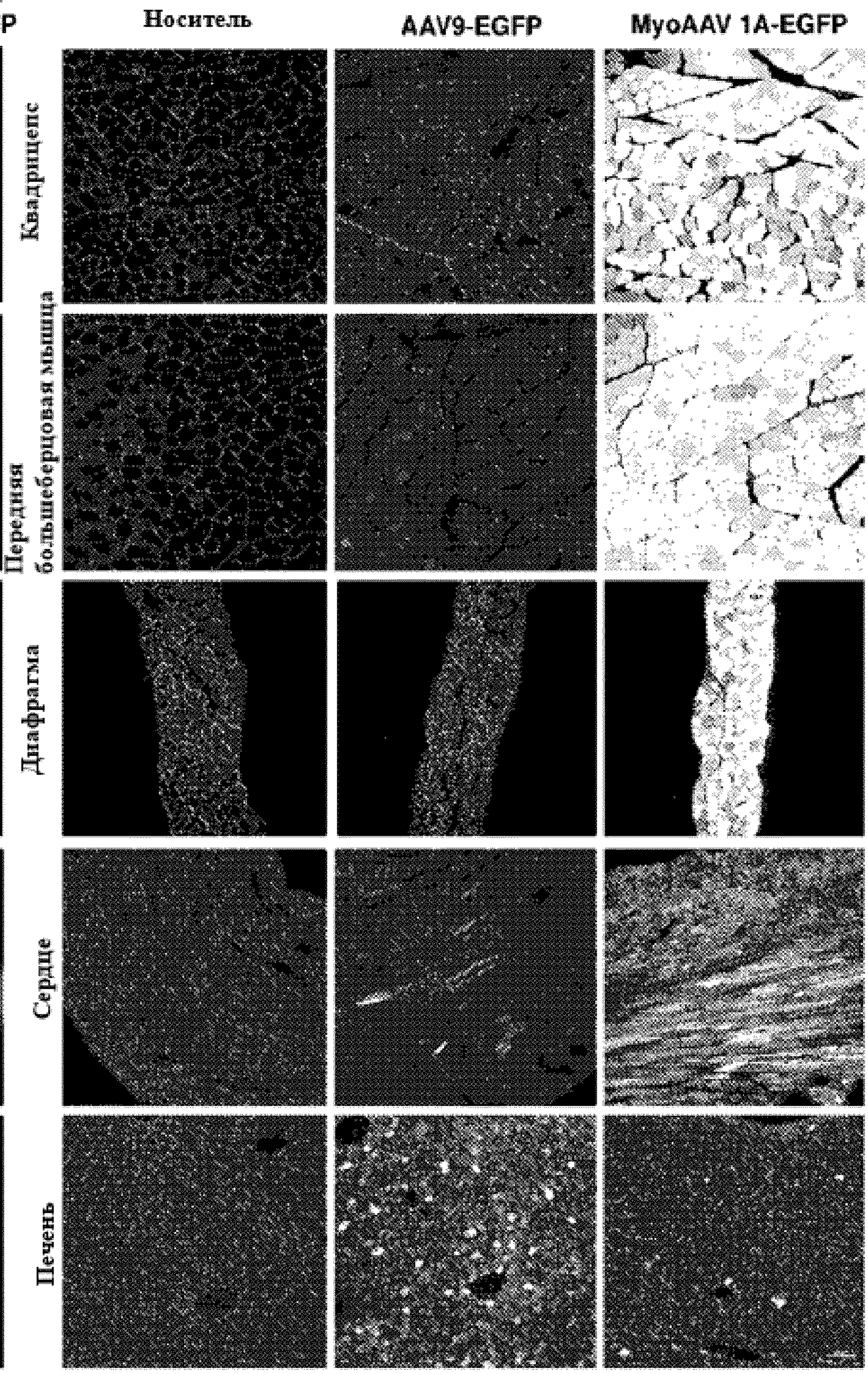
Лучшие комбинированные варианты CK8+MHCK7

Ранг	Последовательность 7-мера	SEQ ID NO:
1	RGDLSTP	8
2	RGDLSTP	8
3	RGDLTTP	12
4	RGDLNQY	9
5	RGDQLYH	14
6	RGDATEL	10
7	RGDTMSK	11
8	RGDLNQY	9
9	RGDLTTP	12
10	RGDMINT	16
11	RGDTMSK	11
12	RGDTMNY	18

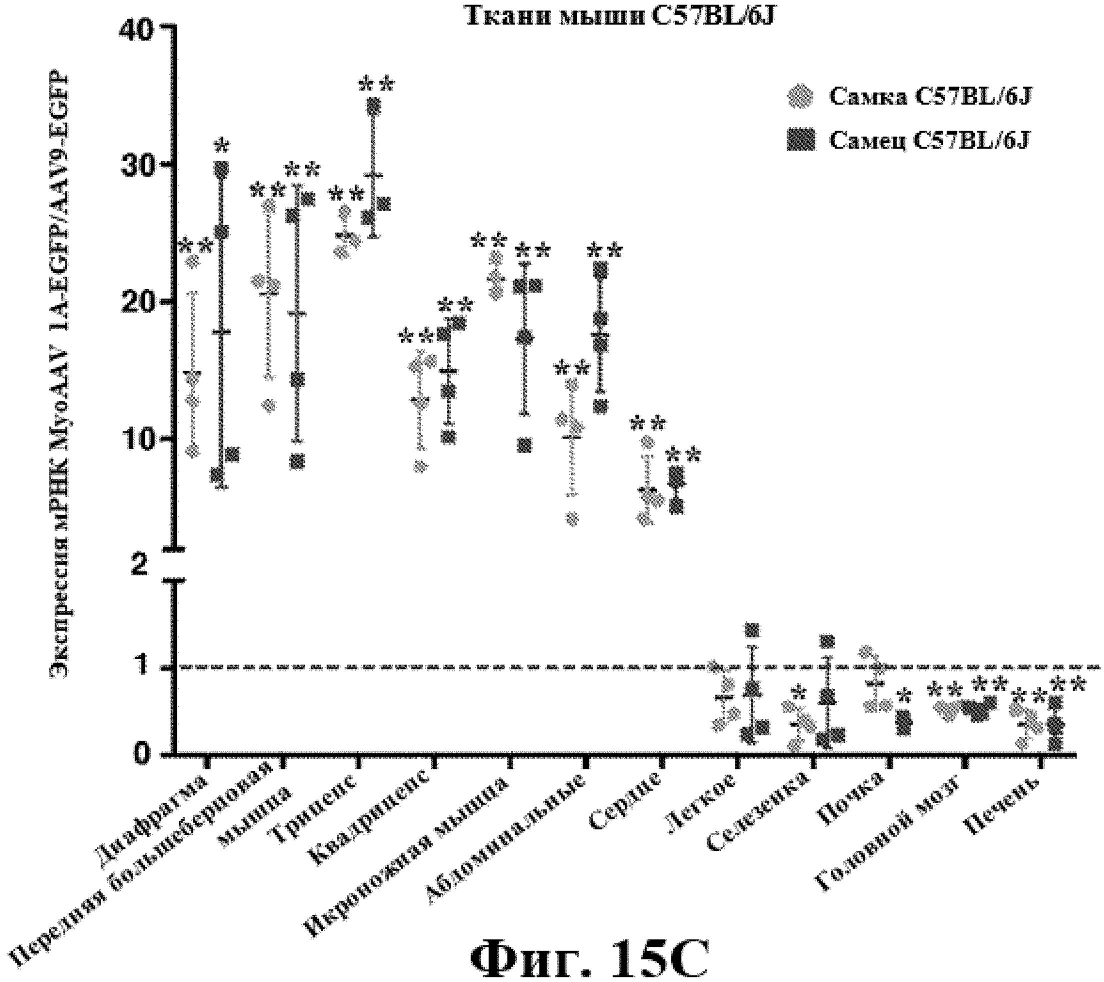
Фиг. 14F



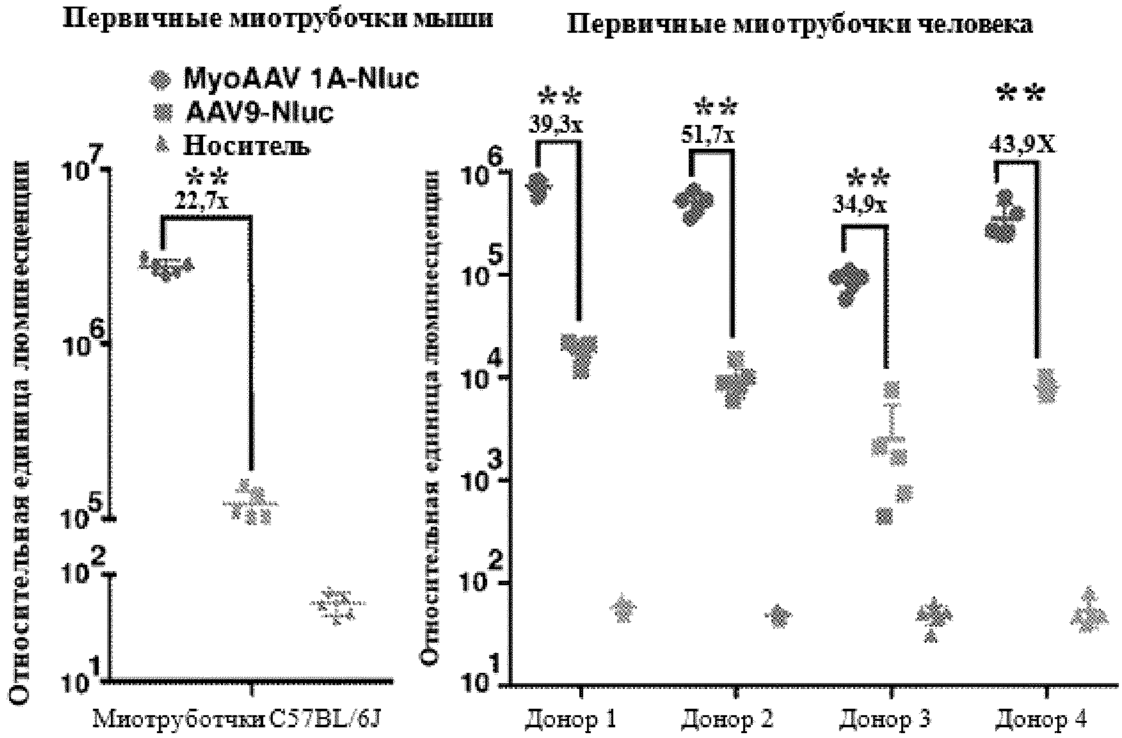
Фиг. 15A



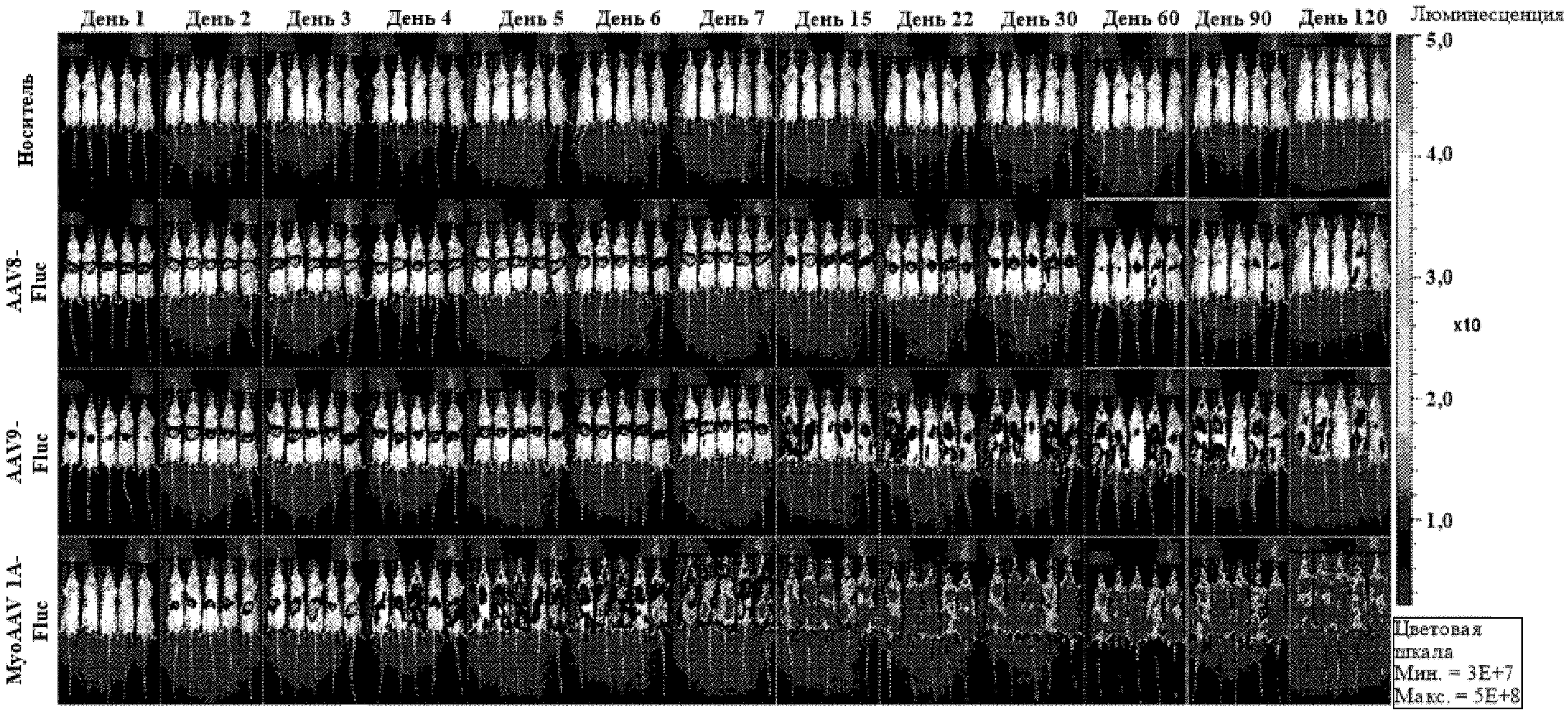
Фиг. 15B



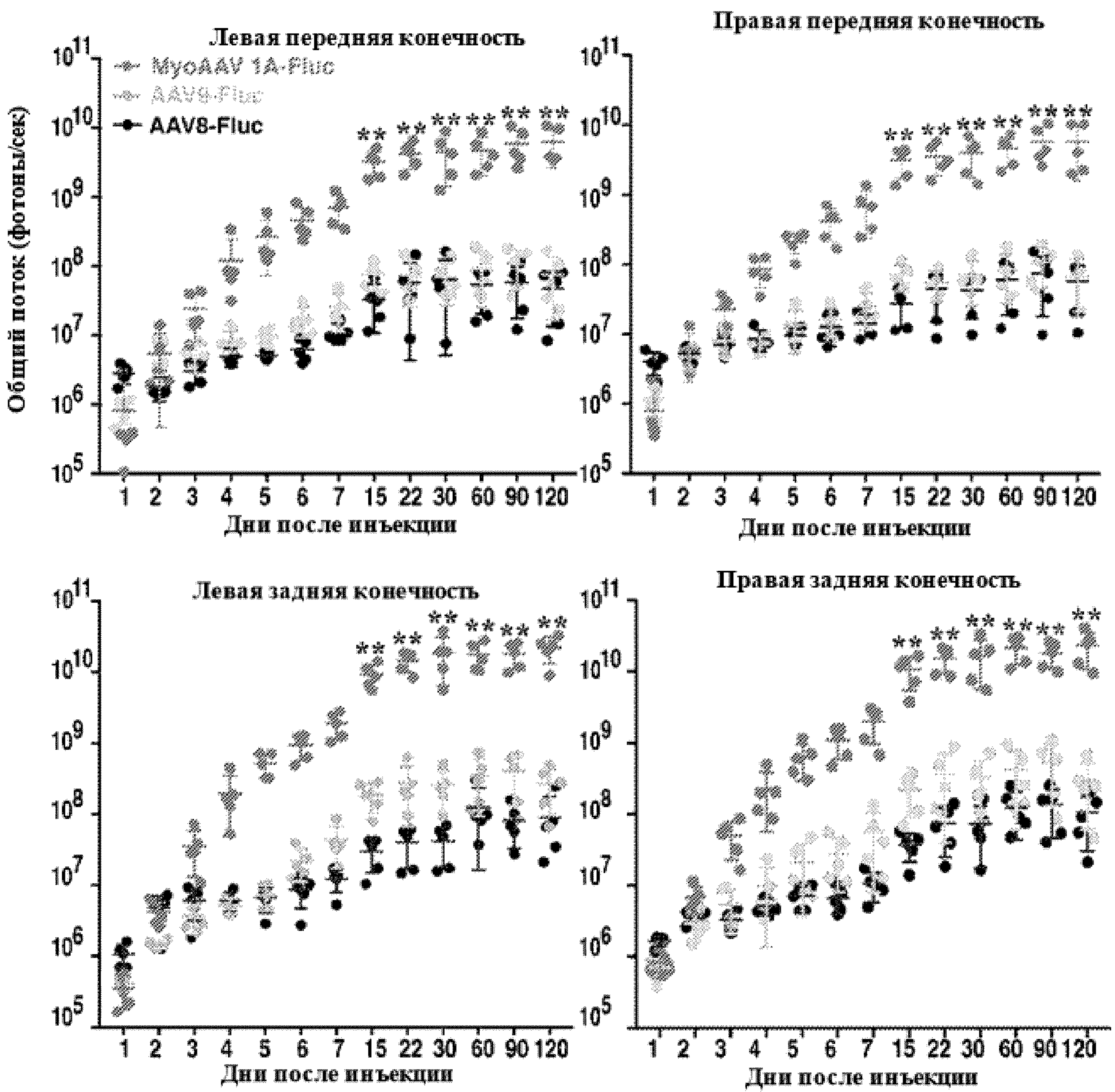
Фиг. 15C



Фиг. 15D


День 1
День 2
День 3
День 4
День 5
День 6
День 7
День 15
День 22
День 30
День 60
День 90
День 120
Люминесценция
5,0
4,0
3,0
x10
2,0
1,0
Носитель
AAV8-Fluc
AAV9-Fluc
MyoAAV 1A-Fluc
Цветовая шкала
Мин. = 3E+7
Макс. = 5E+8

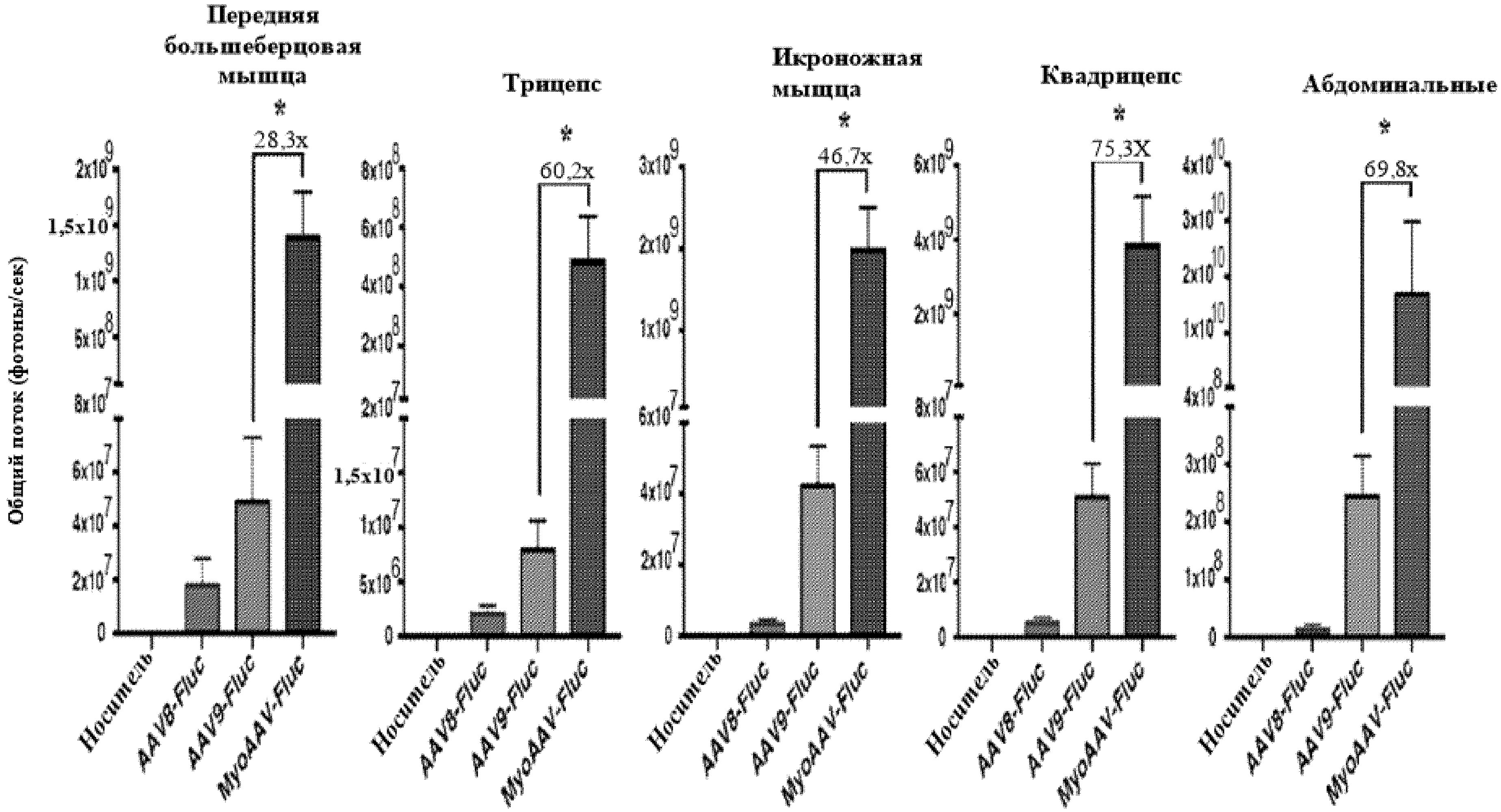
Фиг. 16А


Левая передняя конечность
Правая передняя конечность
Левая задняя конечность
Правая задняя конечность
MyoAAV 1A-Fluc
AAV9-Fluc
AAV8-Fluc
Общий поток (фотоны/сек)
Дни после инъекции
1 2 3 4 5 6 7 15 22 30 60 90 120

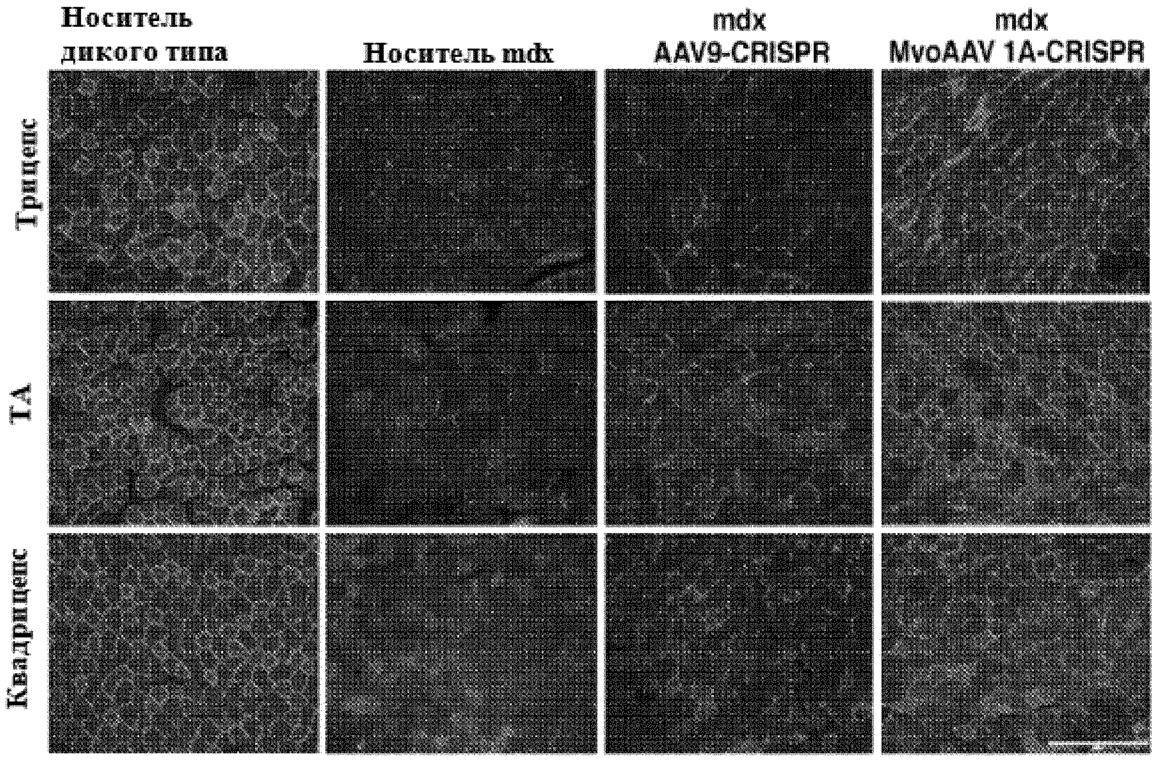
Фиг. 16B


Передняя большеберцовая мышца
Трицепс
Икроножная мышца
Квадрицепс
Абдоминальные
Люминесценция
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
Носитель
AAV8-Fluc
AAV9-Fluc
MyoAAV 1A- Fluc
Цветовая шкала
Мин. =1E+7
Макс. =1E+8
Передняя большеберцовая мышца
Трицепс
Икроножная мышца
Квадрицепс
Абдоминальные

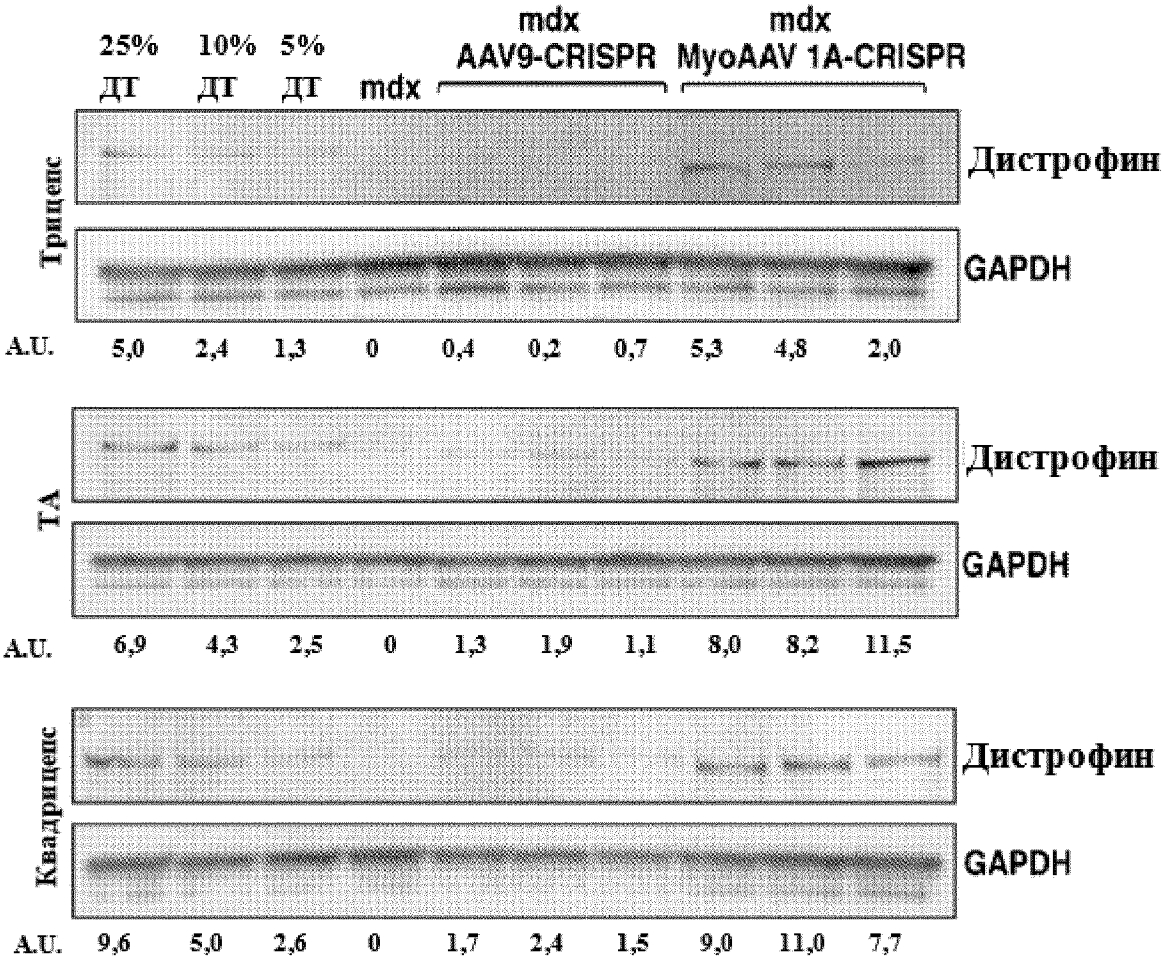
Фиг. 16C


Общий поток (фотоны/сек)
Передняя большеберцовая мышца
*
28,3x
Трицепс
*
60,2x
Икроножная мышца
*
46,7x
Квадрицепс
*
75,3X
Абдоминальные
*
69,8x
Носитель
AAV8-Fluc
AAV9-Fluc
MyoAAV-Fluc

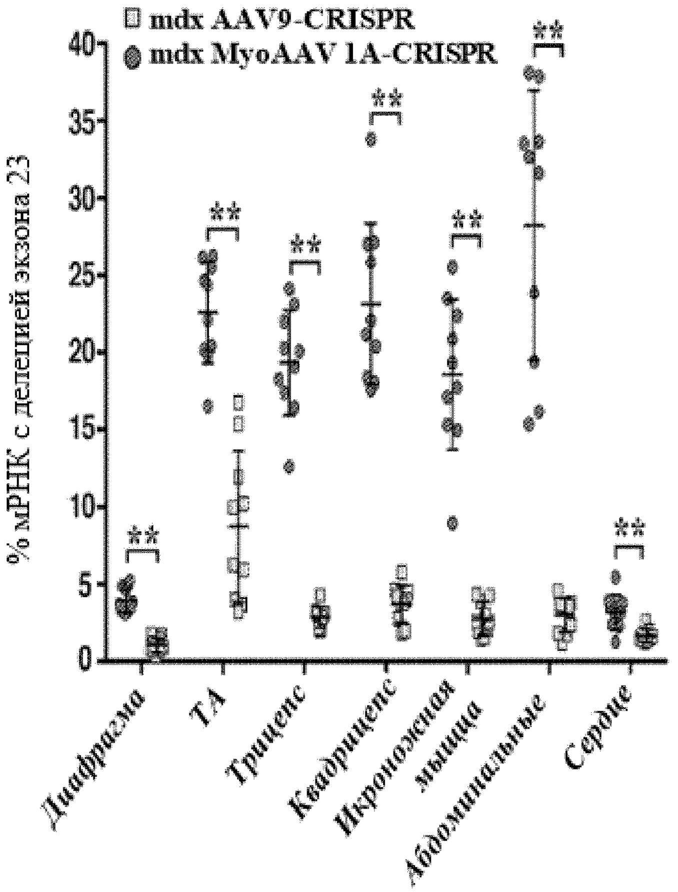
Фиг. 16D



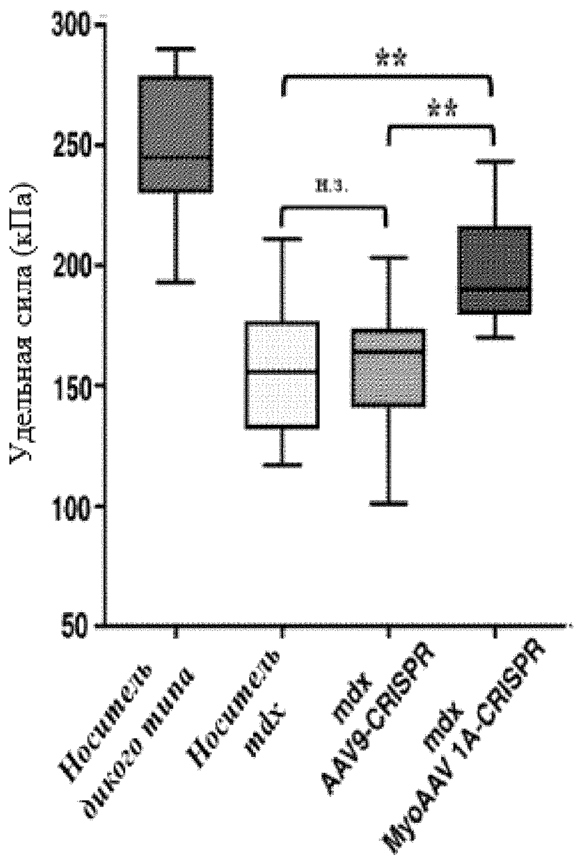
Фиг. 17A



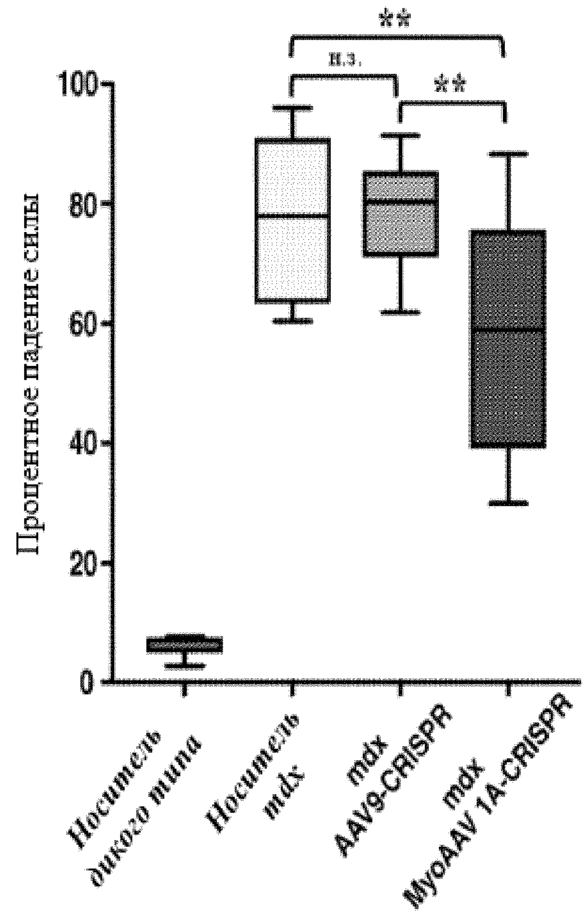
Фиг. 17B



Фиг. 17C

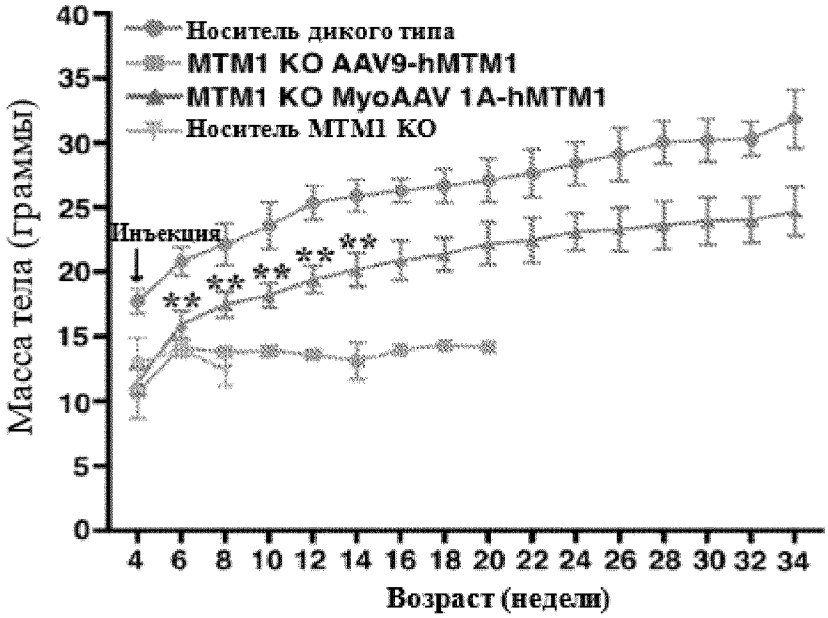


Фиг. 17D

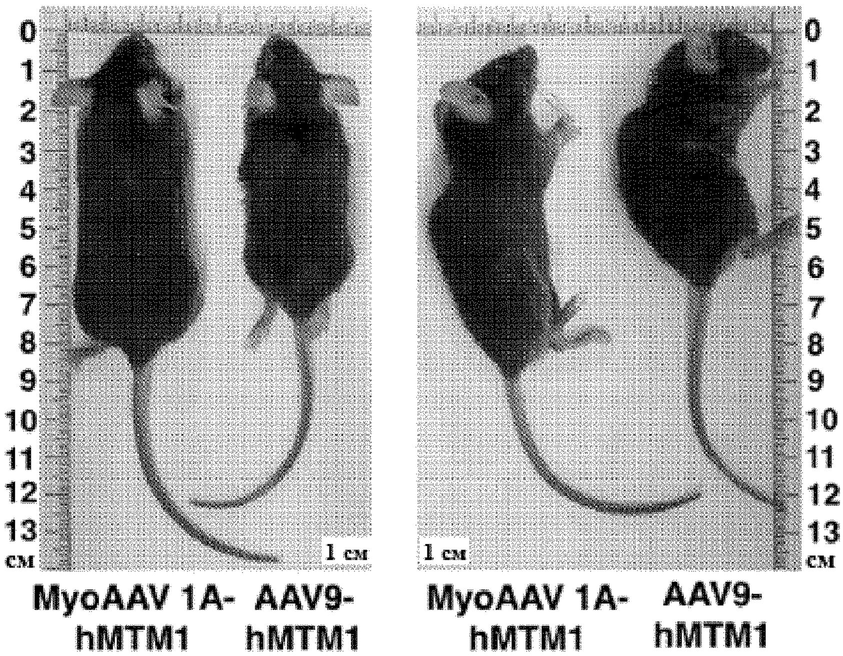


Фиг. 17E

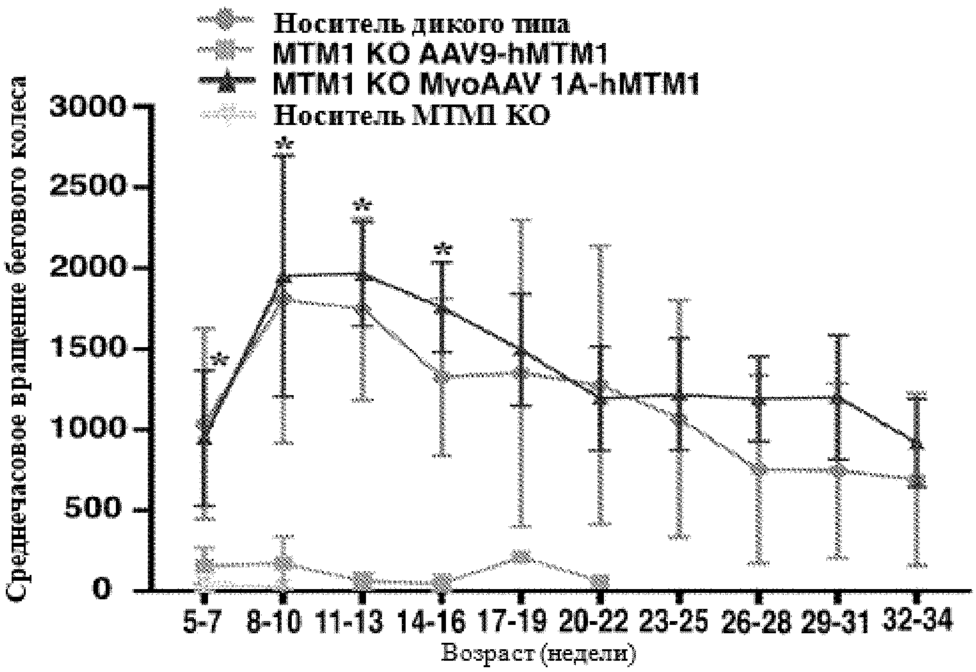
Фиг. 17F



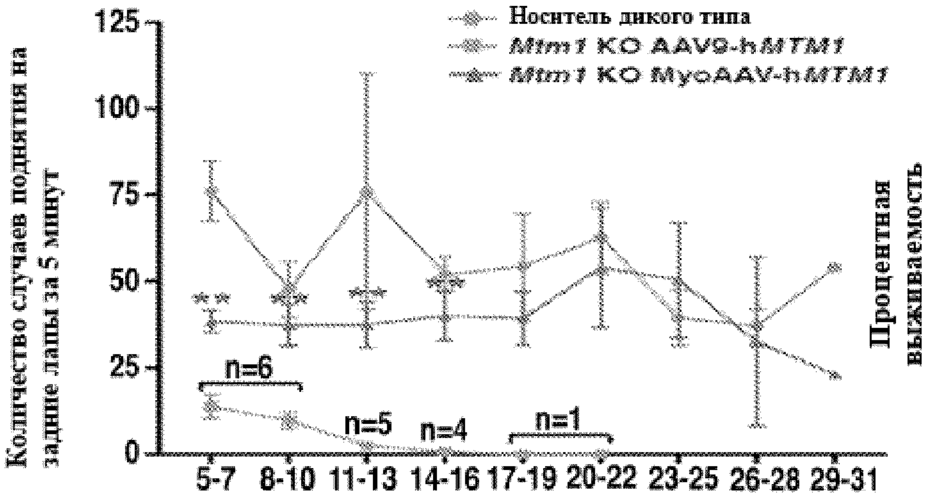
Фиг. 17G



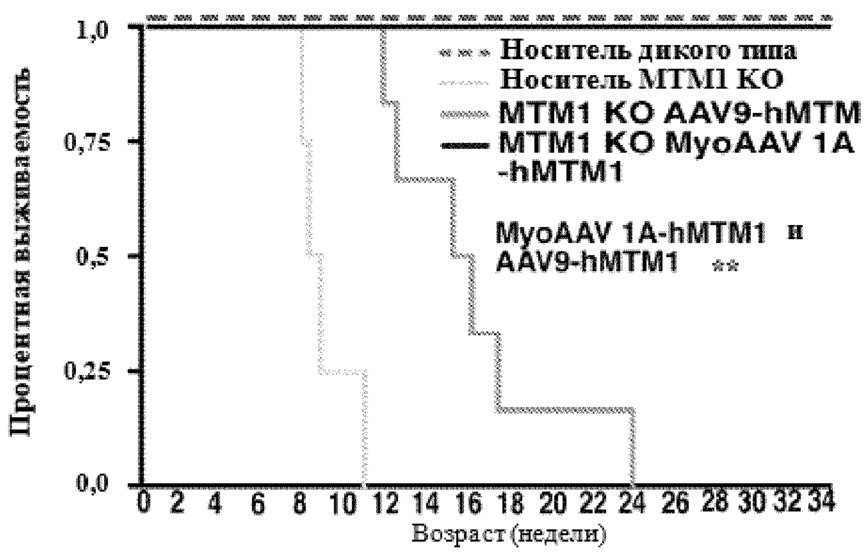
Фиг. 17H



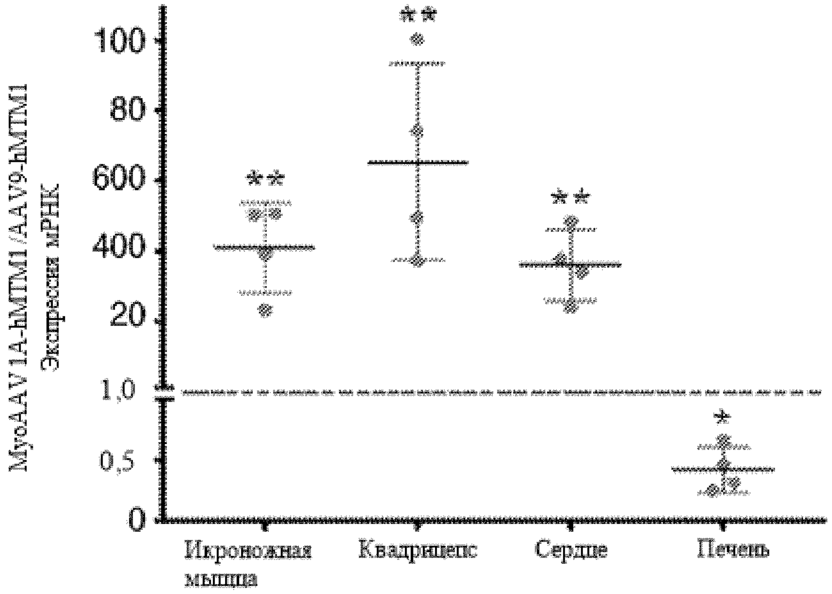
Фиг. 17I



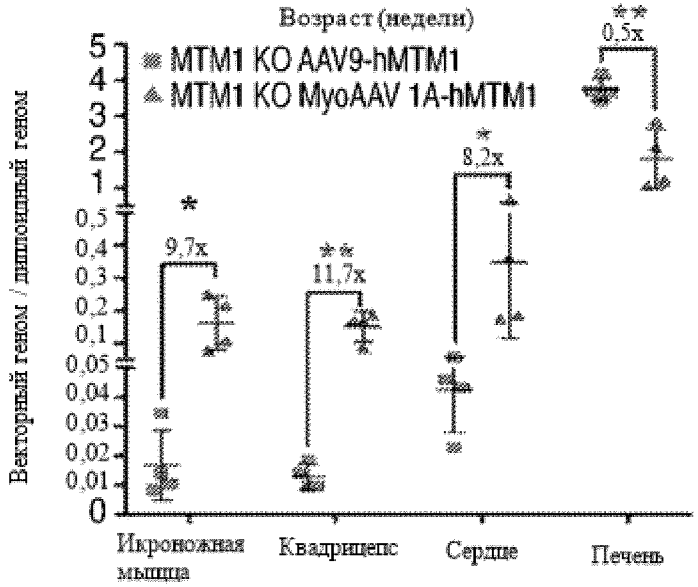
Фиг. 17J



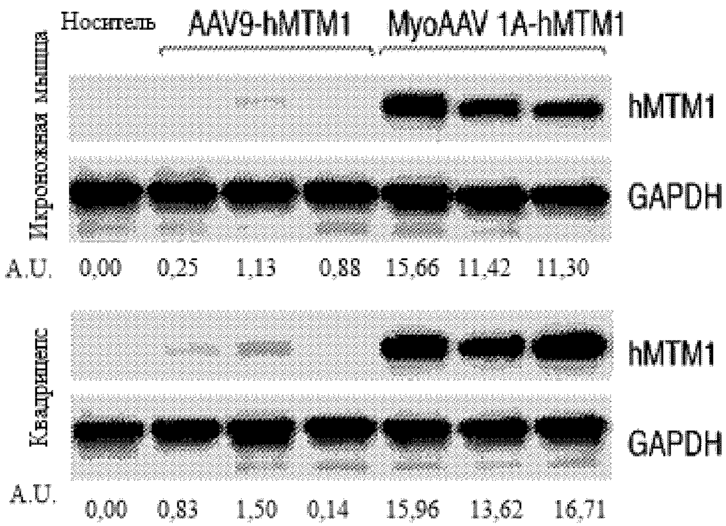
Фиг. 17K



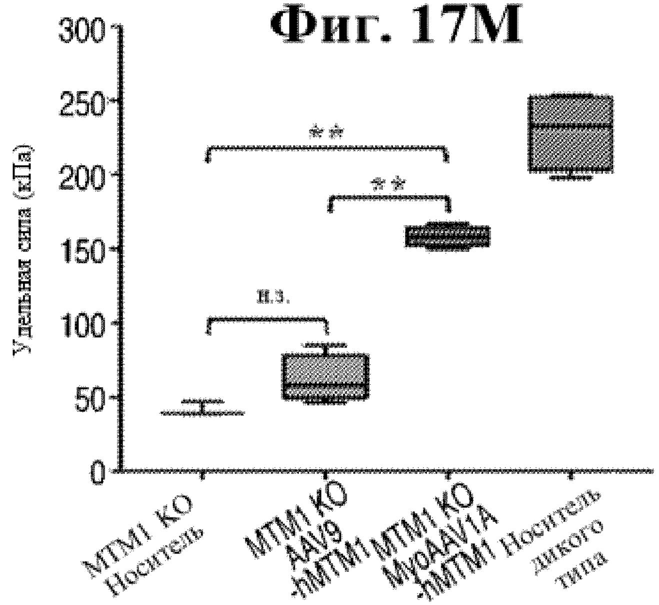
Фиг. 17L



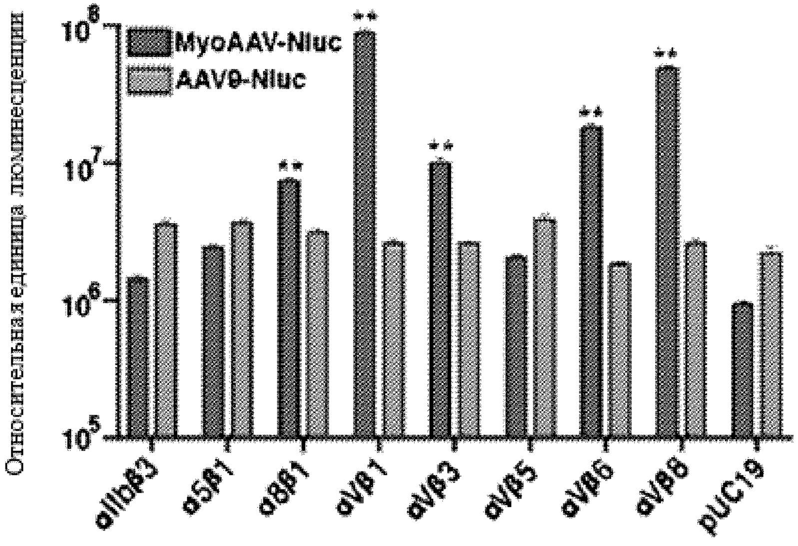
Фиг. 17M



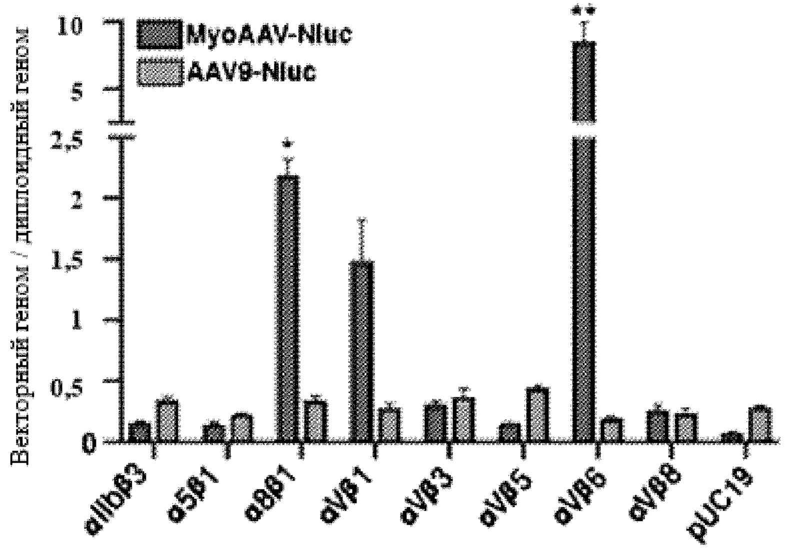
Фиг. 17N



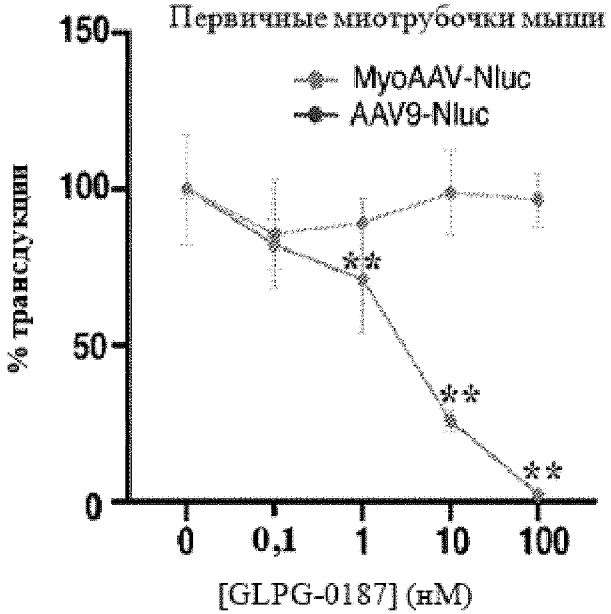
Фиг. 17O



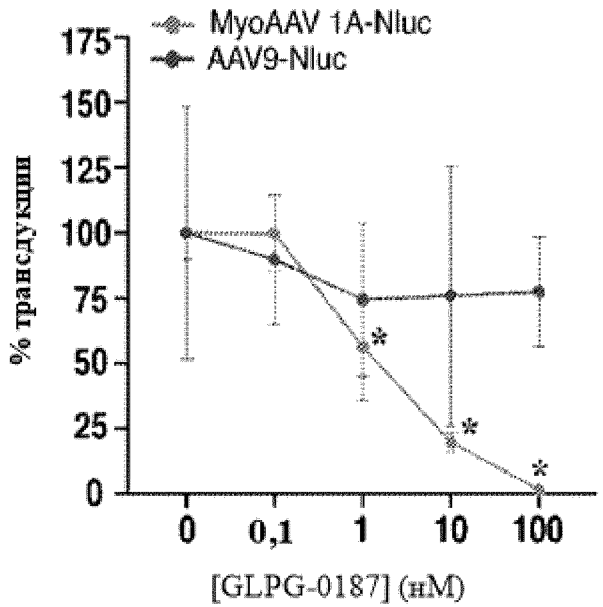
Фиг. 18A



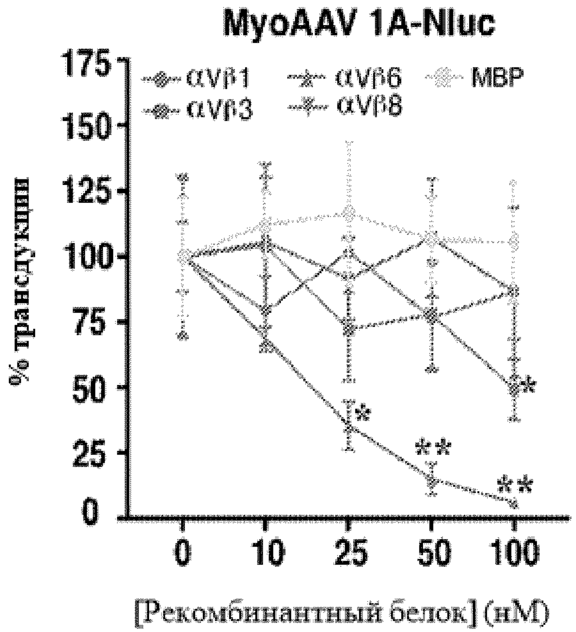
Фиг. 18B



Фиг. 18C

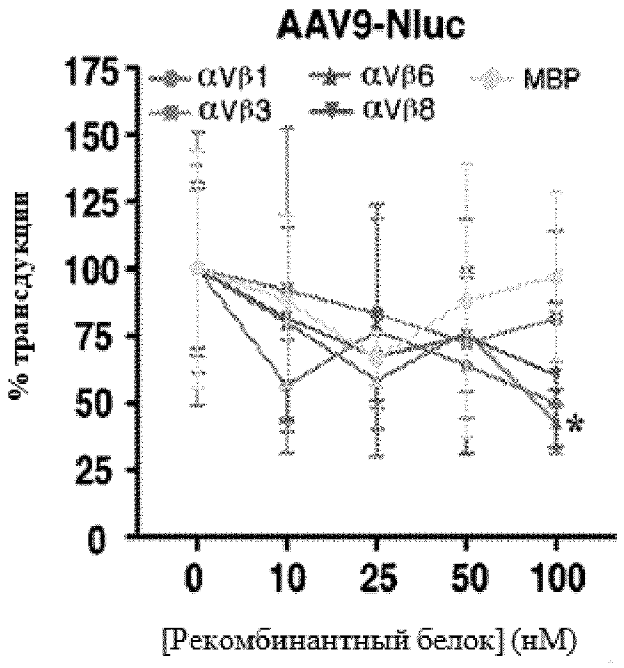


Фиг. 18D

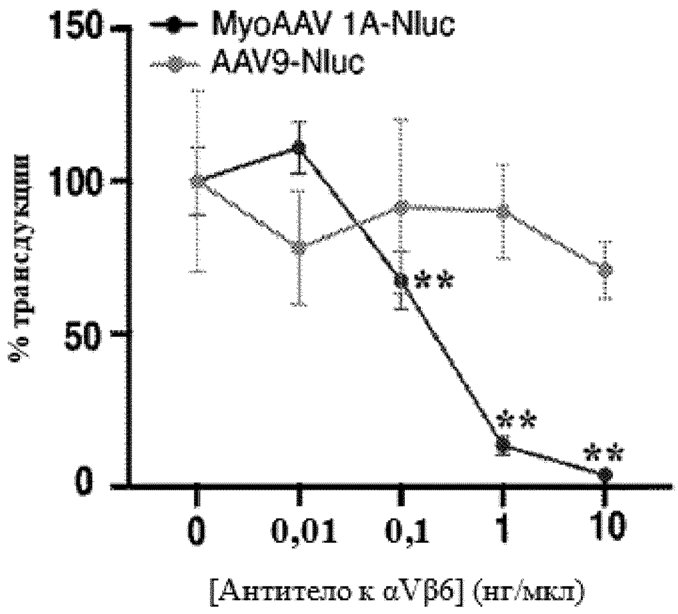


Фиг. 18E

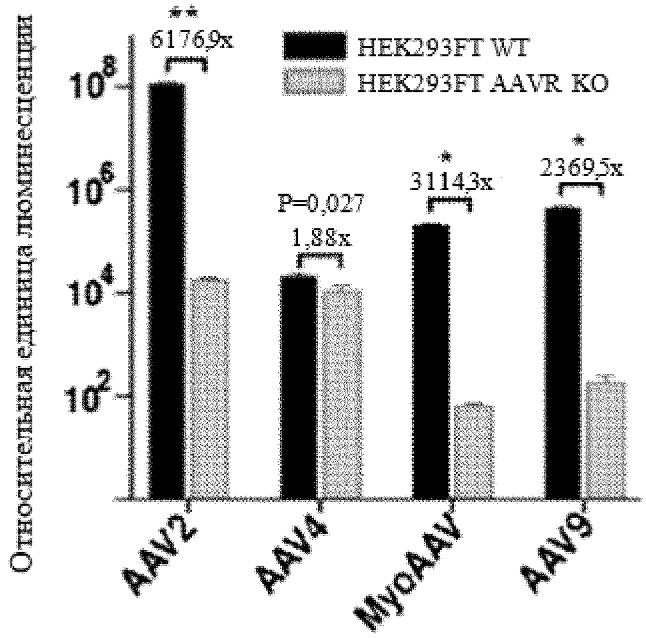
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



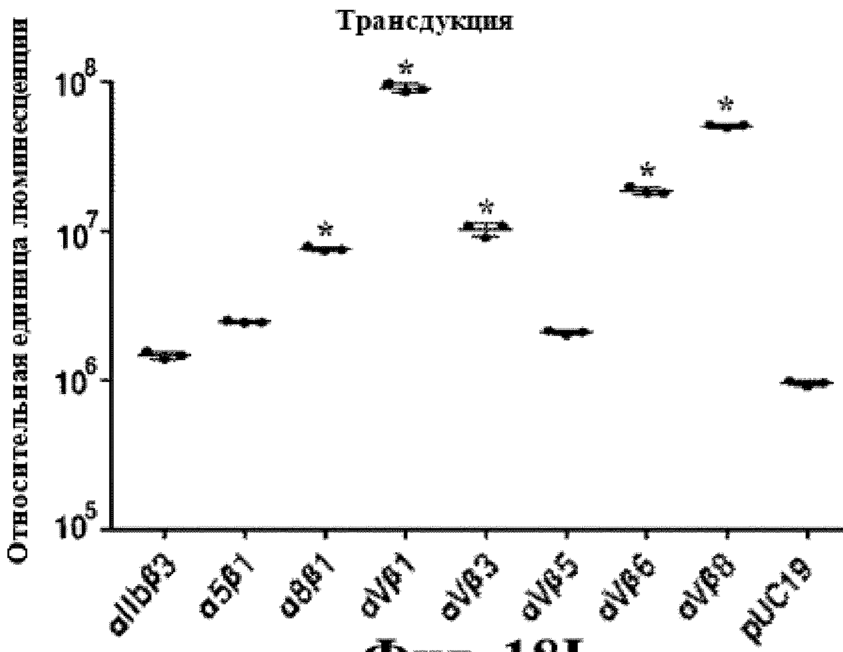
Фиг. 18F



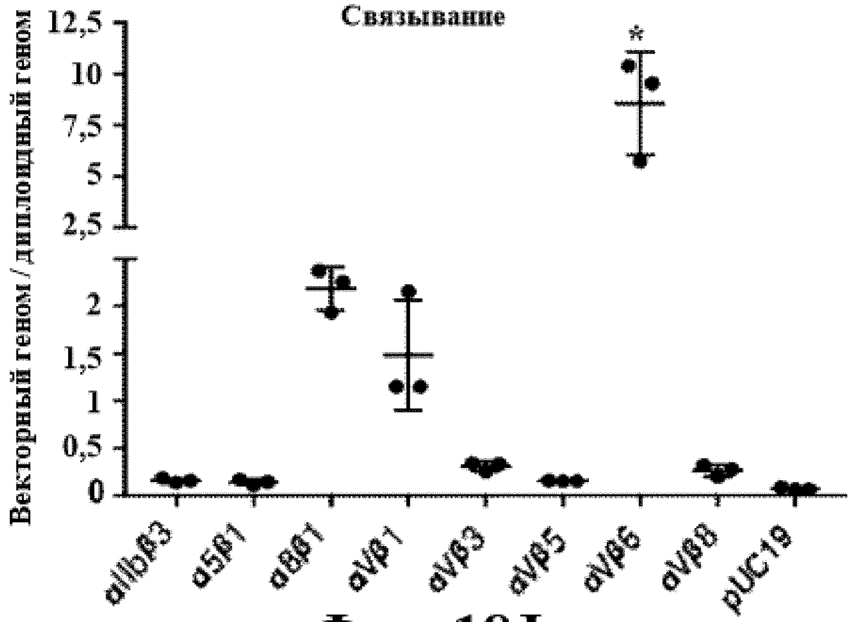
Фиг. 18G



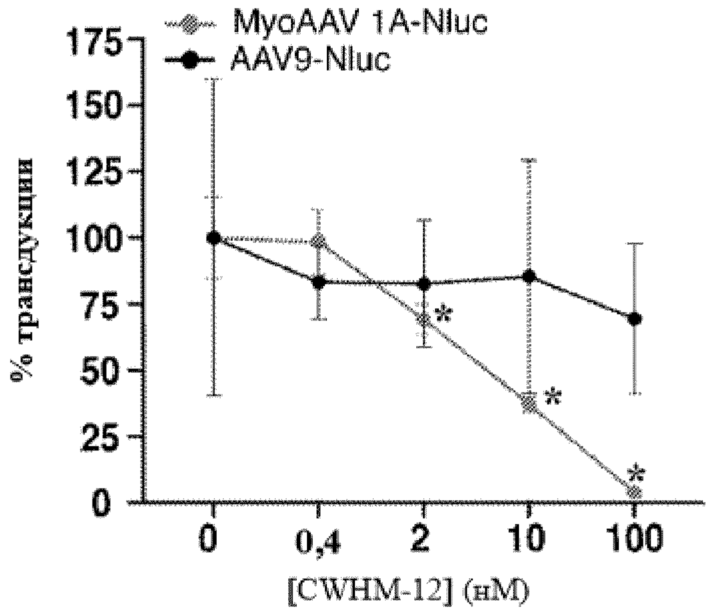
Фиг. 18H



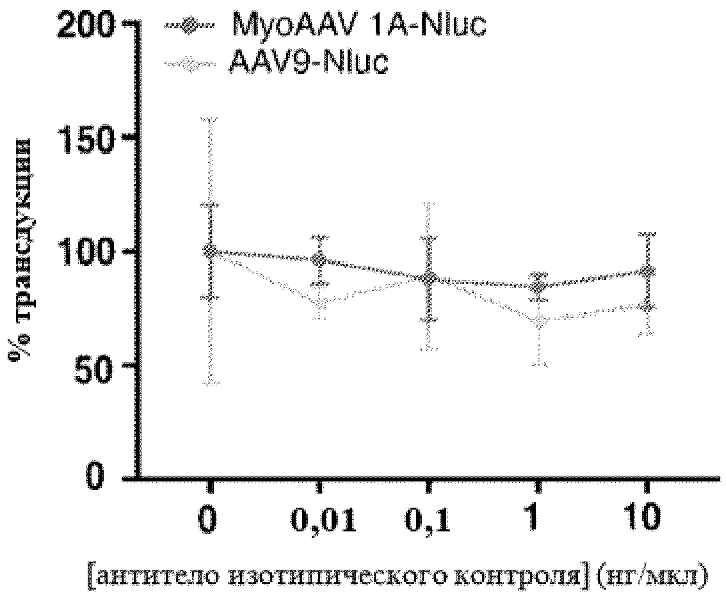
Фиг. 18I



Фиг. 18J

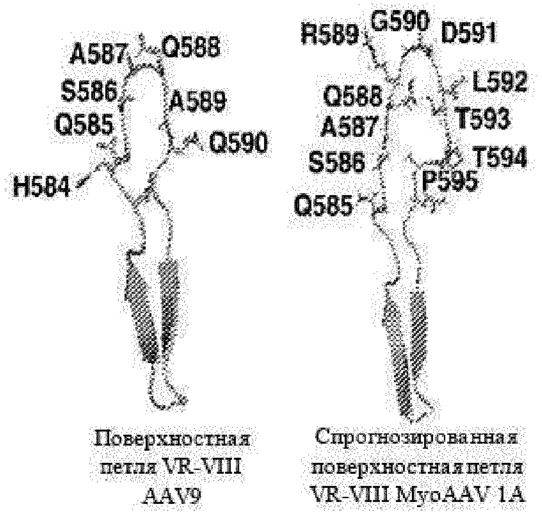


Фиг. 18K

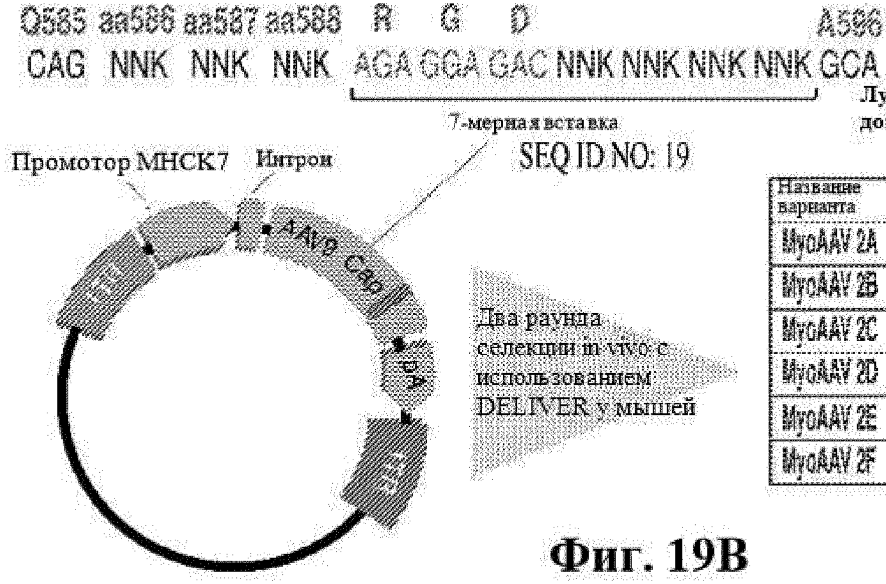


Фиг. 18L

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



Фиг. 19A



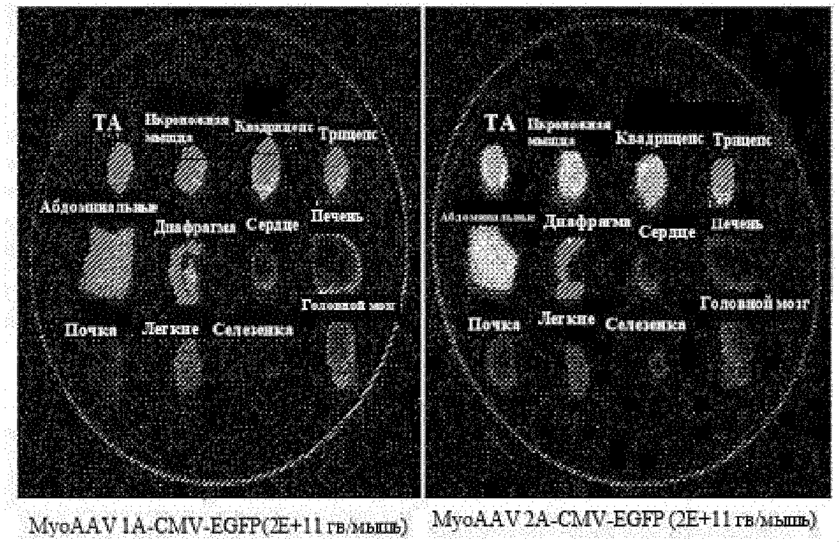
Лучшие варианты при дозе 1E+12 гв

Название варианта	последовательность 10-мера	SEQ ID NO:
MyoAAV 2A	GPGRGDQTTL	2
MyoAAV 2B	AEGRGDQYTR	3
MyoAAV 2C	ATGRGDLGQA	4
MyoAAV 2D	AVARGDQGLI	5
MyoAAV 2E	NISRGDQGYQ	6
MyoAAV 2F	APARGDQGSQ	7

Лучшие варианты при дозе 1E+11 гв

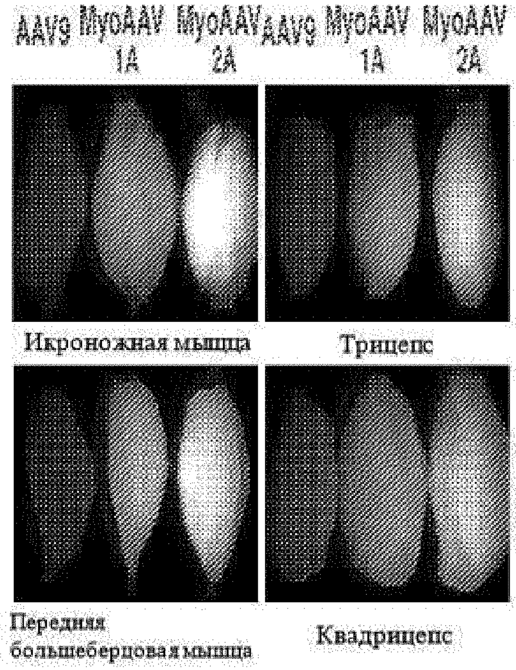
Название варианта	последовательность 10-мера	SEQ ID NO:
MyoAAV 2A	GPGRGDQTTL	2
MyoAAV 2B	AEGRGDQYTR	3
MyoAAV 2F	APARGDQGSQ	7
MyoAAV 2G	AVSRGDRMEF	20
MyoAAV 2H	SPSRGDQGRT	21
MyoAAV 2E	NISRGDQGYQ	6

Фиг. 19B

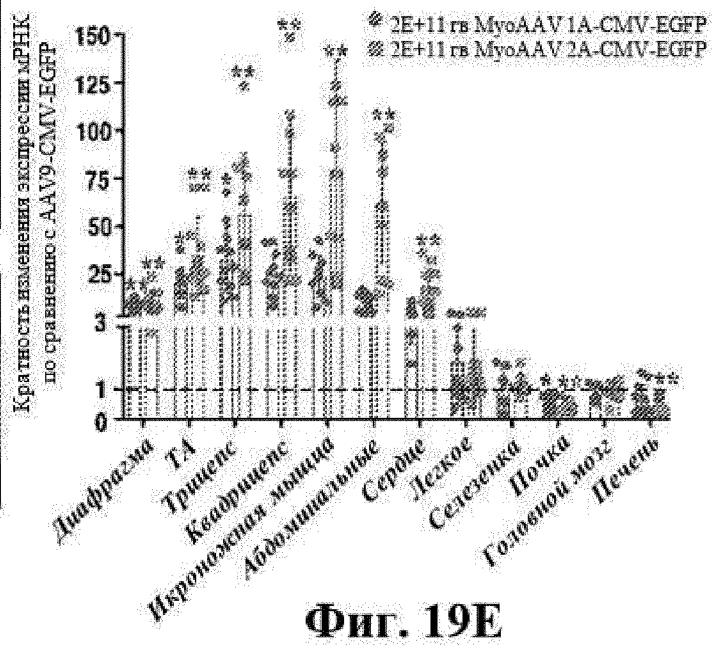


MyoAAV 1A-CMV-EGFP(2E+11 гв/мышь) MyoAAV 2A-CMV-EGFP (2E+11 гв/мышь)

Фиг. 19C

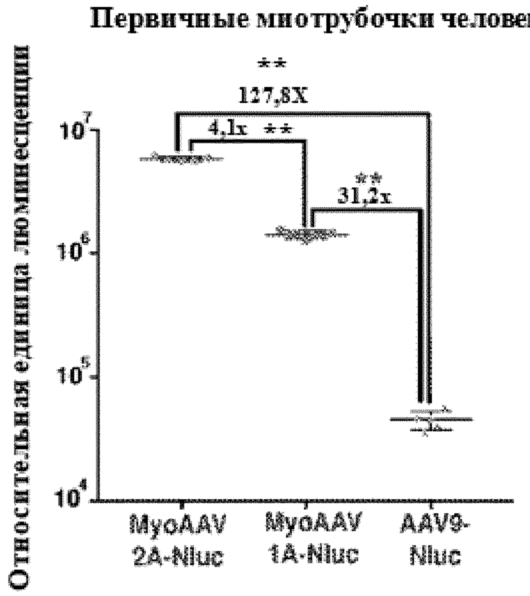


Фиг. 19D

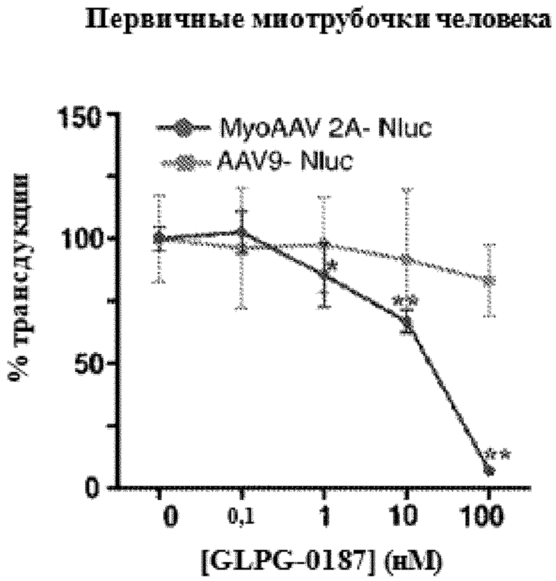


Фиг. 19E

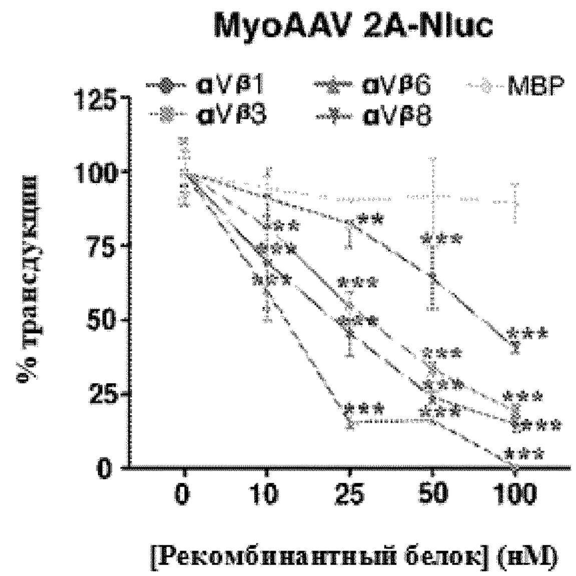
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



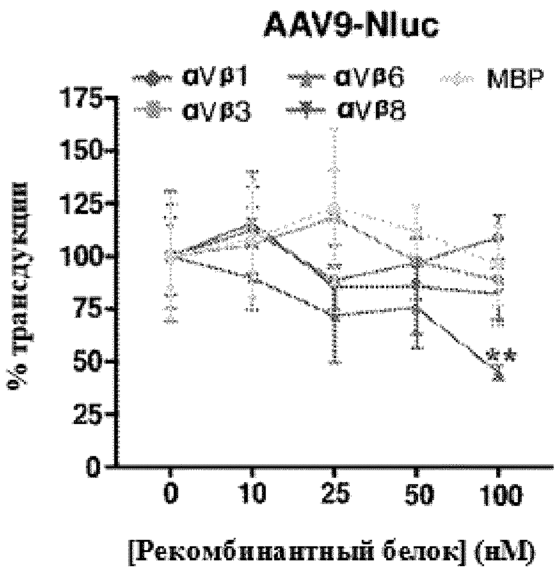
Фиг. 19F



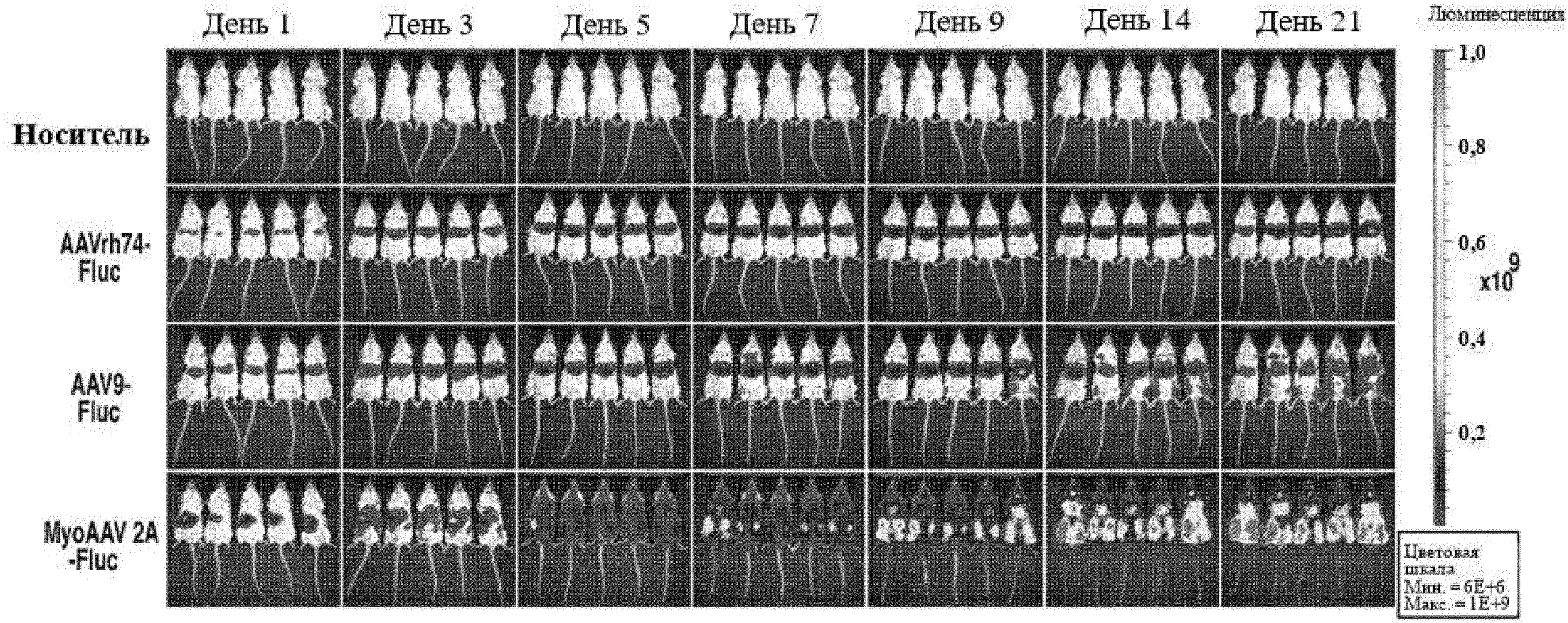
Фиг. 19G



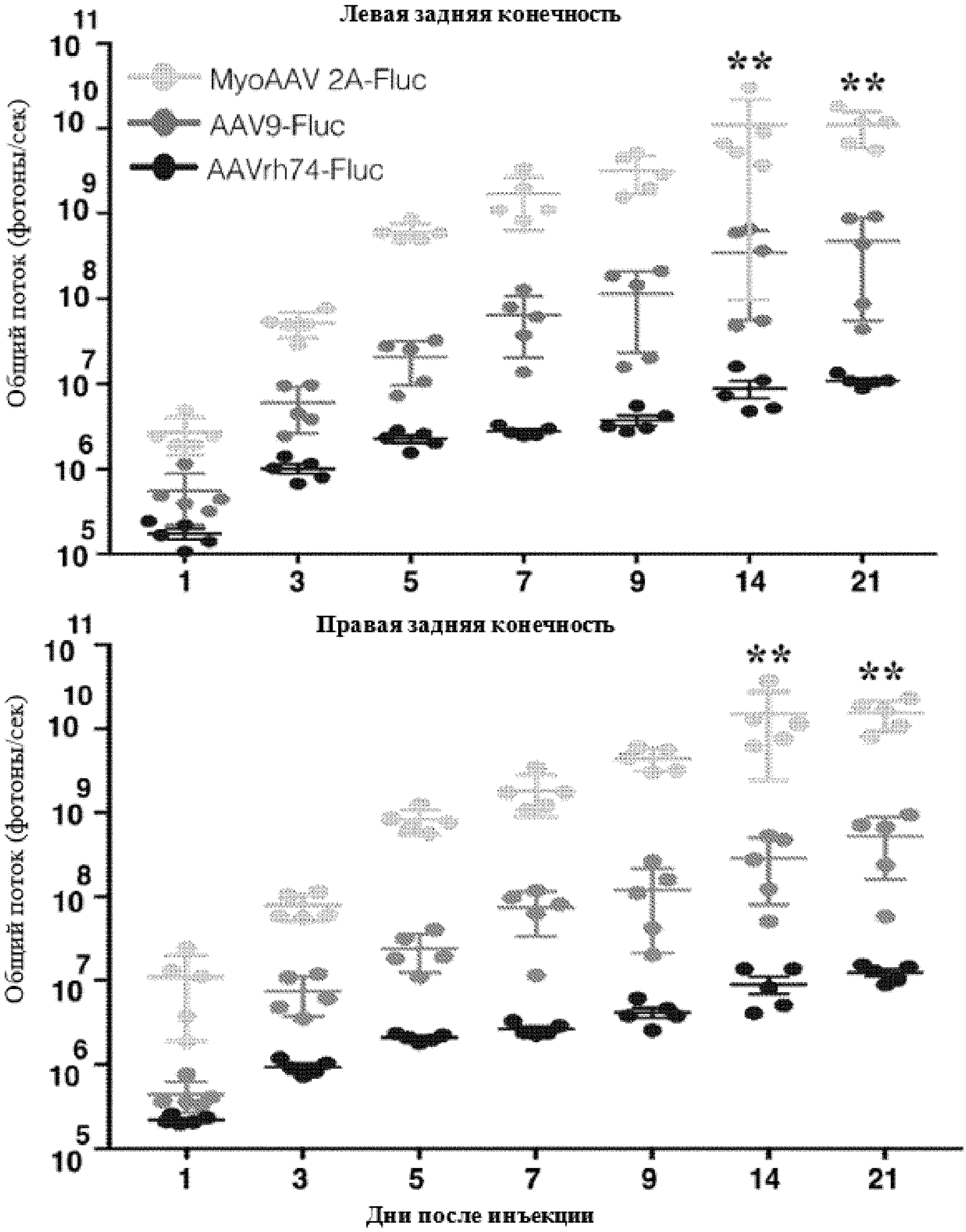
Фиг. 19H



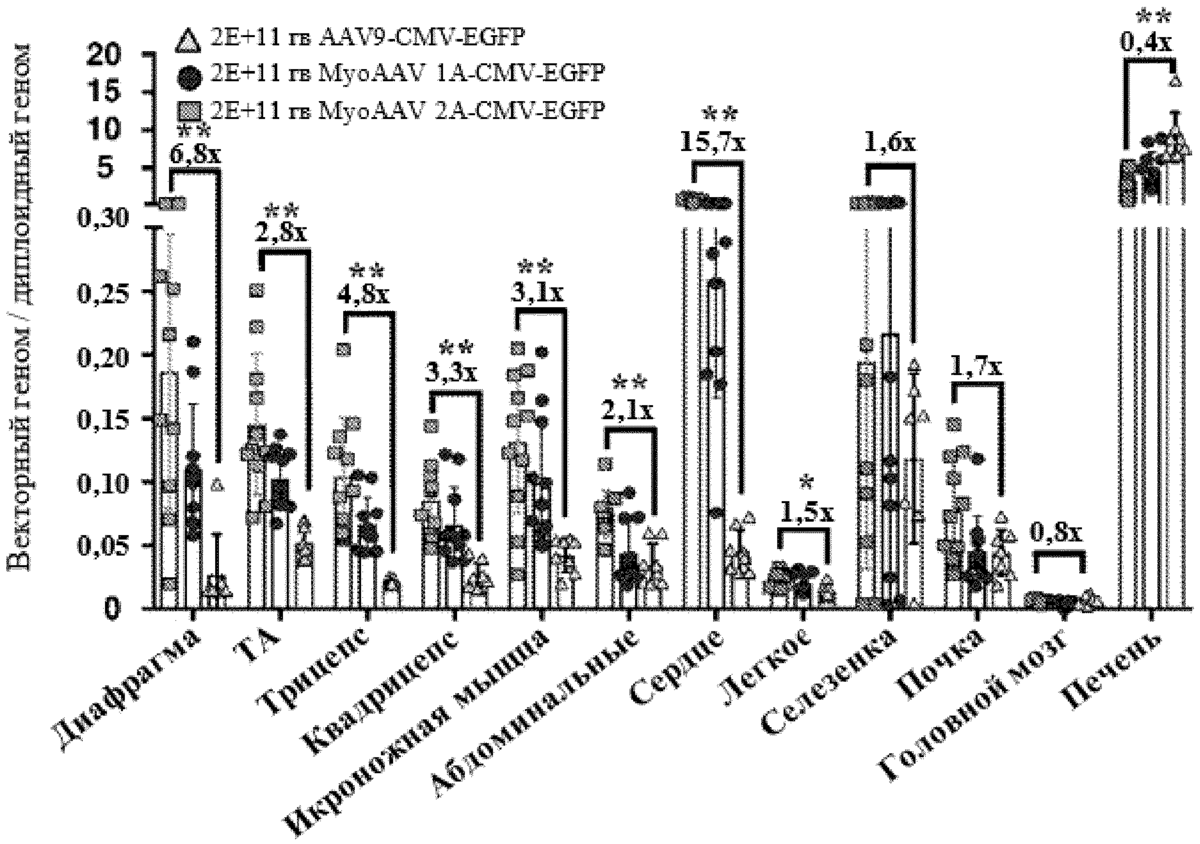
Фиг. 19I


День 1
День 3
День 5
День 7
День 9
День 14
День 21
Люминесценция
Носитель
AAVrh74-
Fluc
AAV9-
Fluc
MyoAAV 2A
-Fluc
1,0
0,8
0,6
x10⁹
0,4
0,2
Цветовая
шкала
Мин. = 6E+6
Макс. = 1E+9

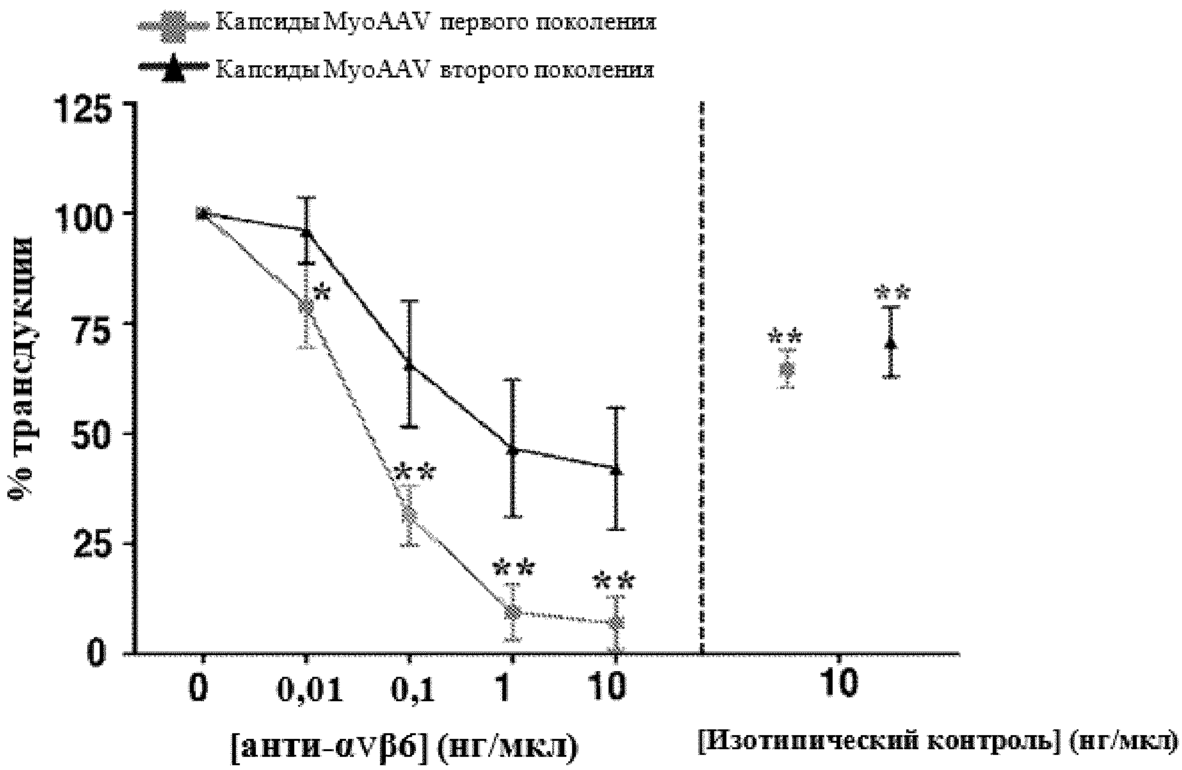
Фиг. 19J


Левая задняя конечность
MyoAAV 2A-Fluc
AAV9-Fluc
AAVrh74-Fluc
Общий поток (фотоны/сек)
**
**
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
1
3
5
7
9
14
21
Правая задняя конечность
Общий поток (фотоны/сек)
Дни после инъекции

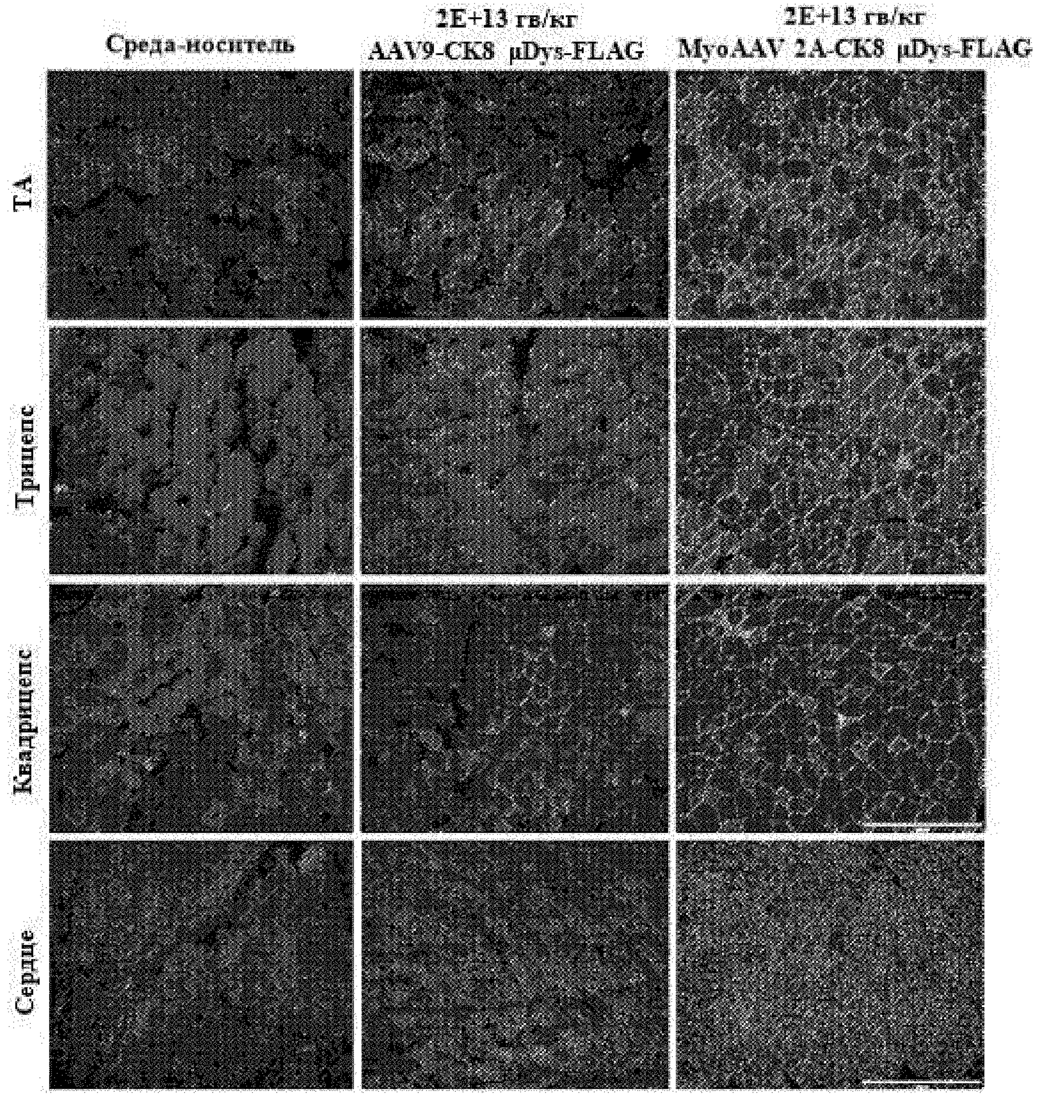
Фиг. 19K



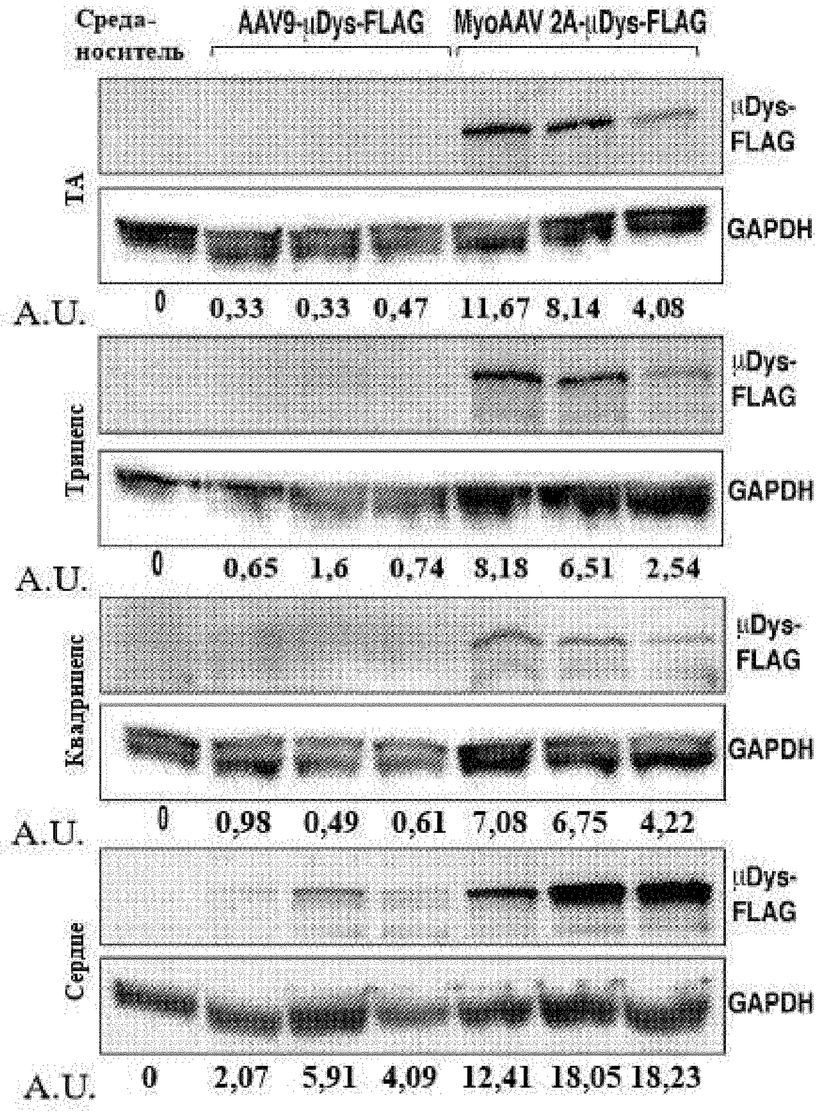
Фиг. 19L



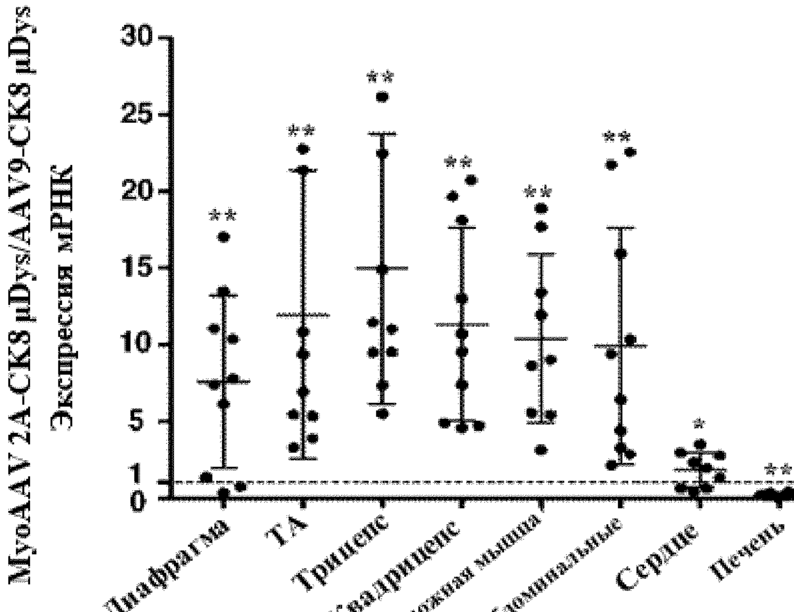
Фиг. 19M



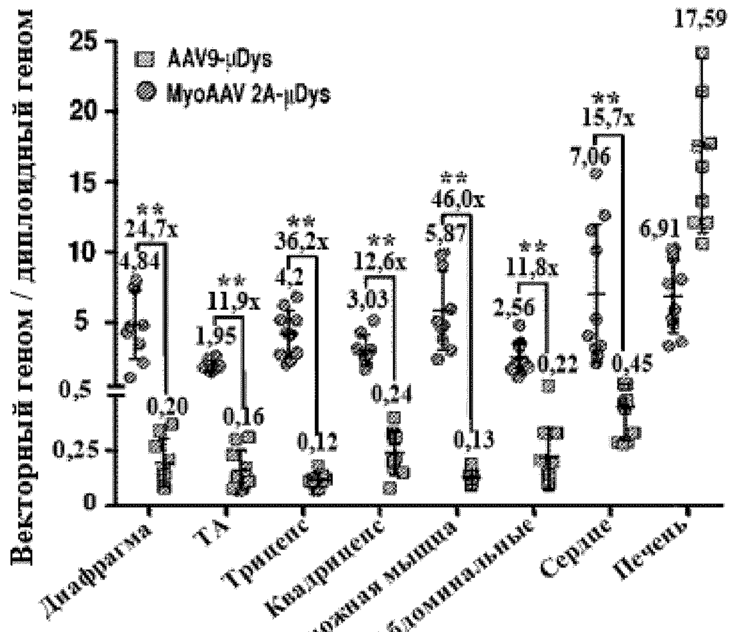
Фиг. 20A



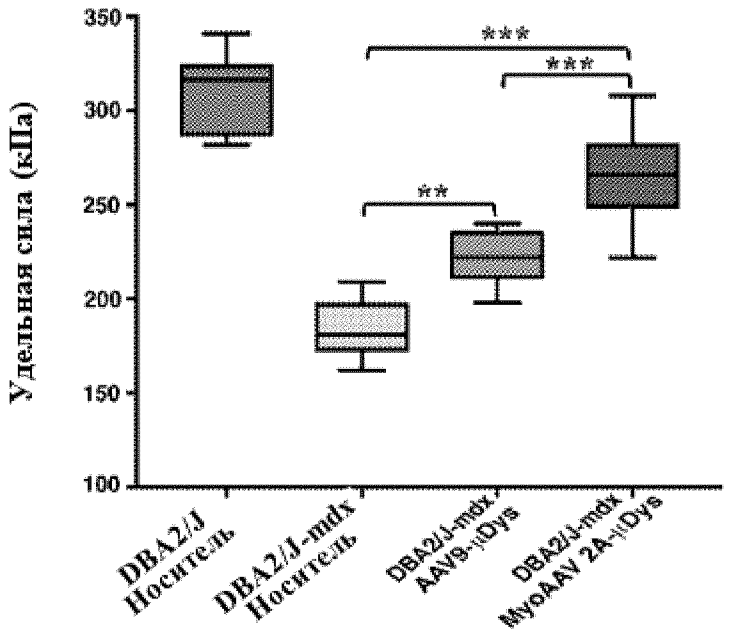
Фиг. 20B



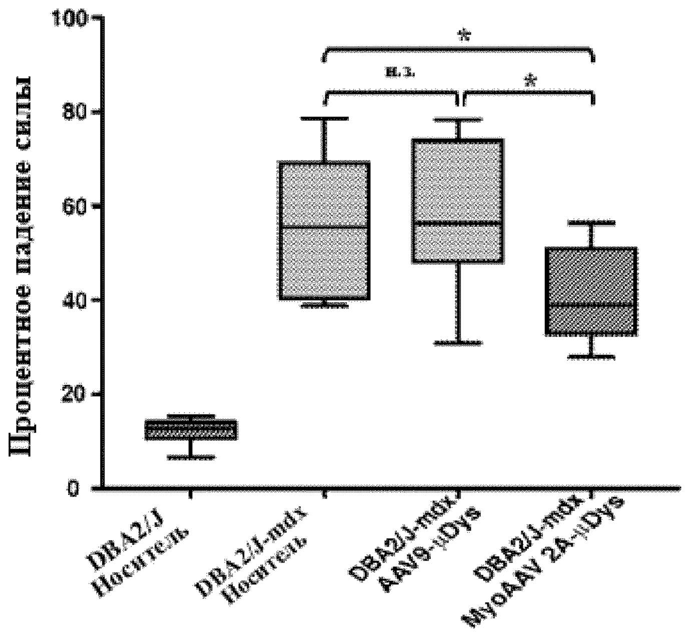
Фиг. 20C



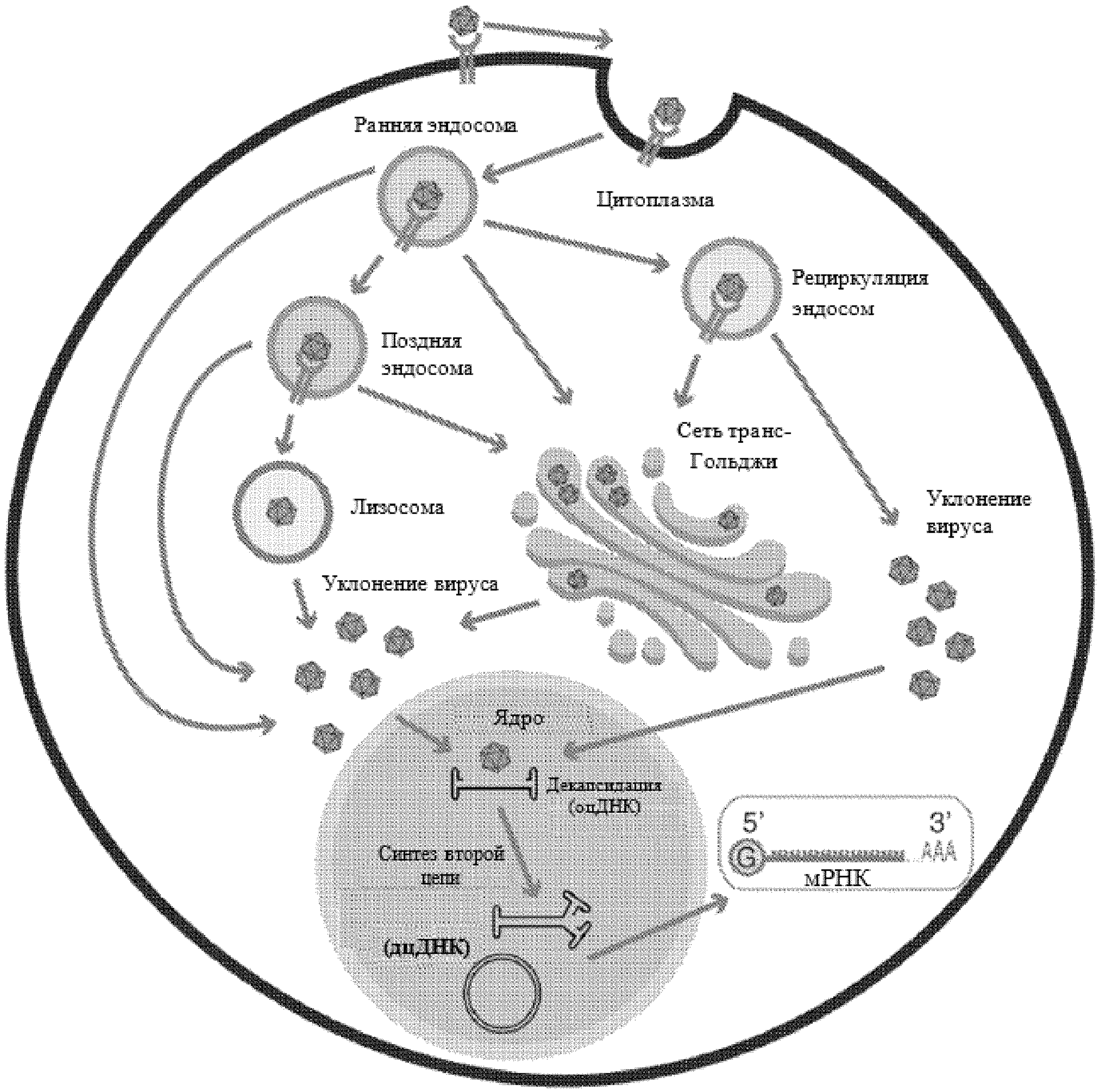
Фиг. 20D



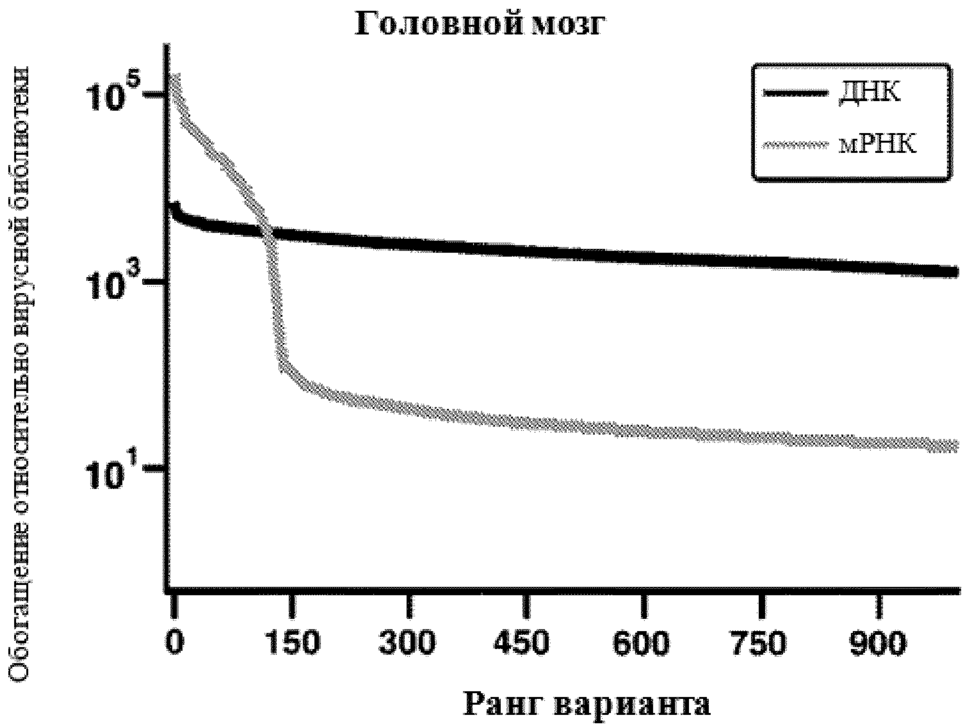
Фиг. 20E



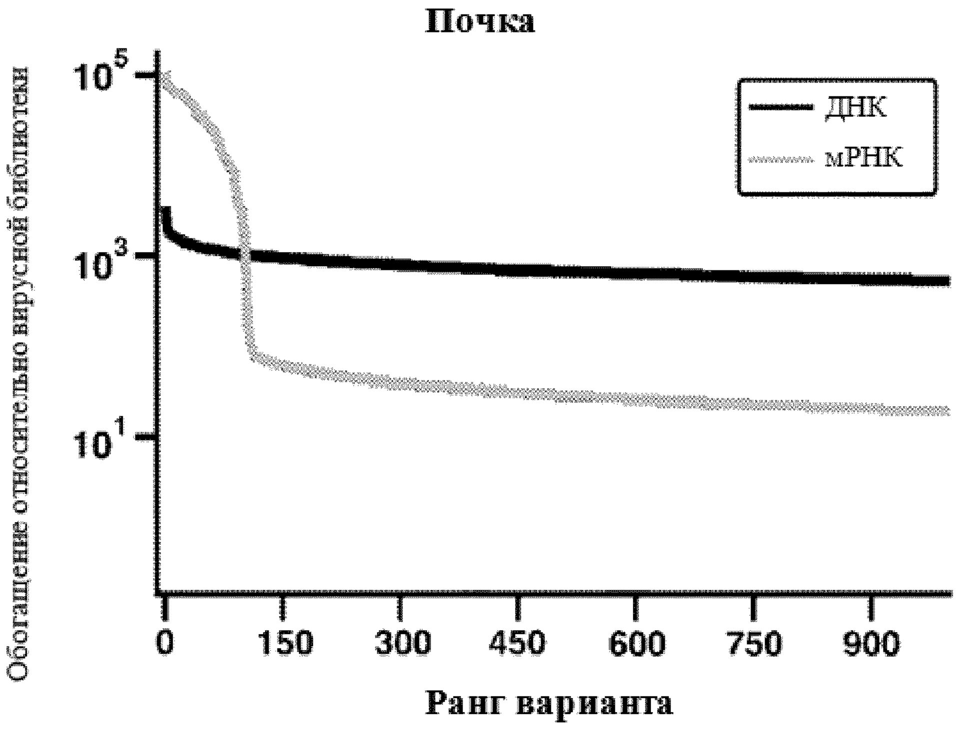
Фиг. 20F


Ранняя эндосома
Цитоплазма
Рециркуляция эндосом
Поздняя эндосома
Сеть транс-Гольджи
Лизосома
Уклонение вируса
Уклонение вируса
Ядро
Декапсидация (оцДНК)
Синтез второй цепи
(дцДНК)
5'
3'
G
AAA
мРНК

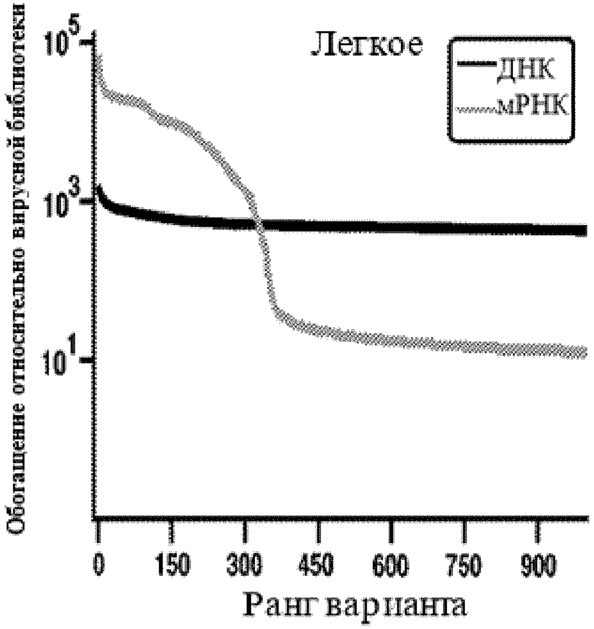
Фиг. 21А



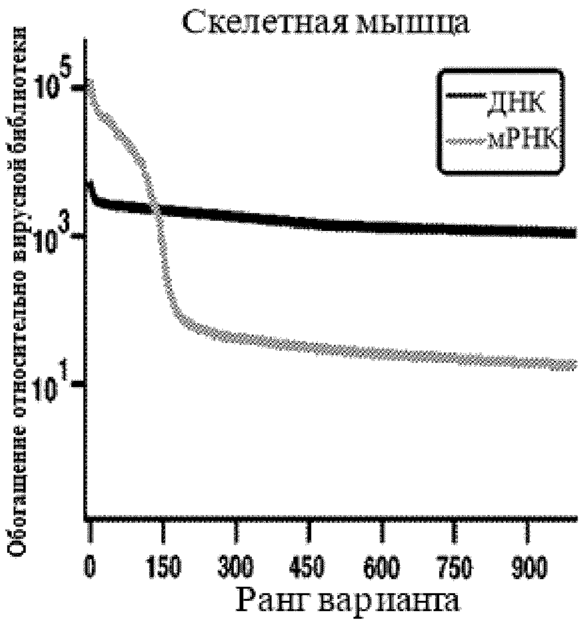
Фиг. 21B



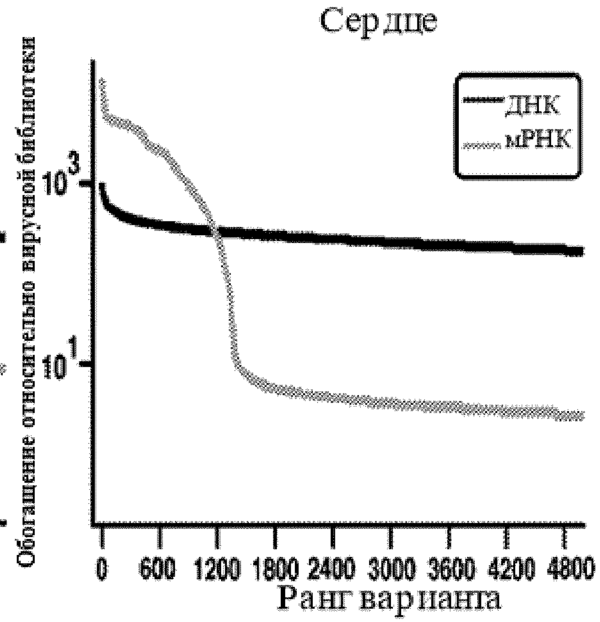
Фиг. 21C



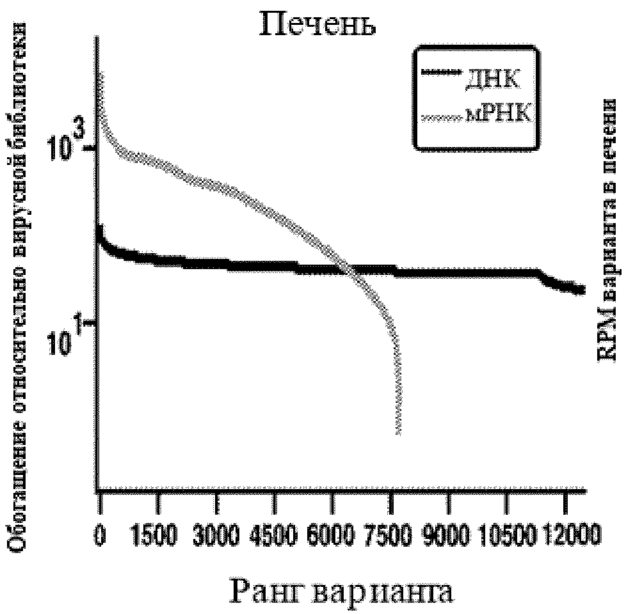
Фиг. 21D



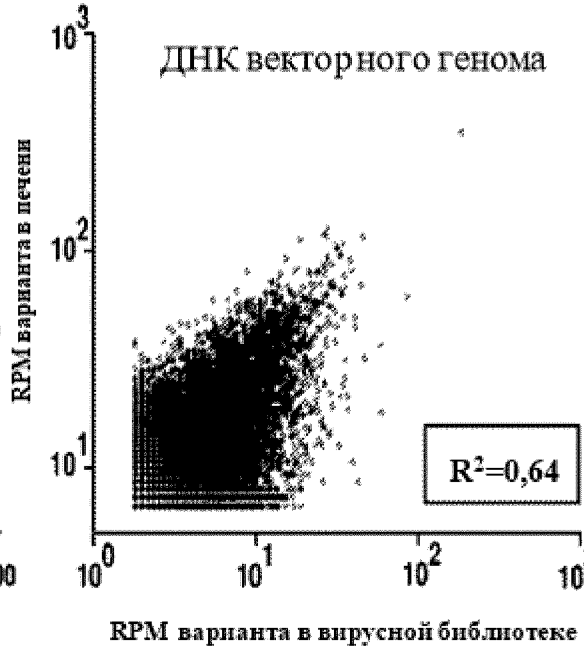
Фиг. 21E



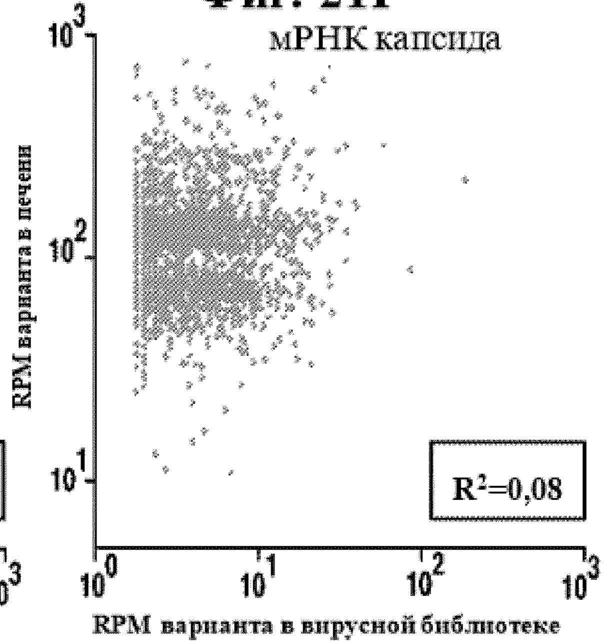
Фиг. 21F



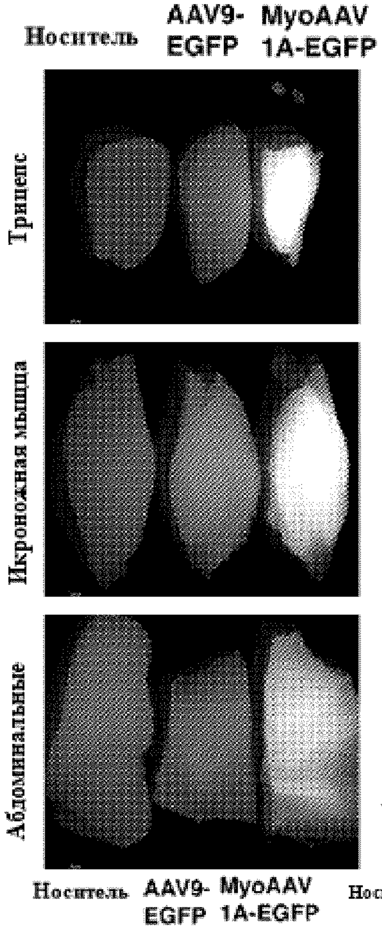
Фиг. 21G



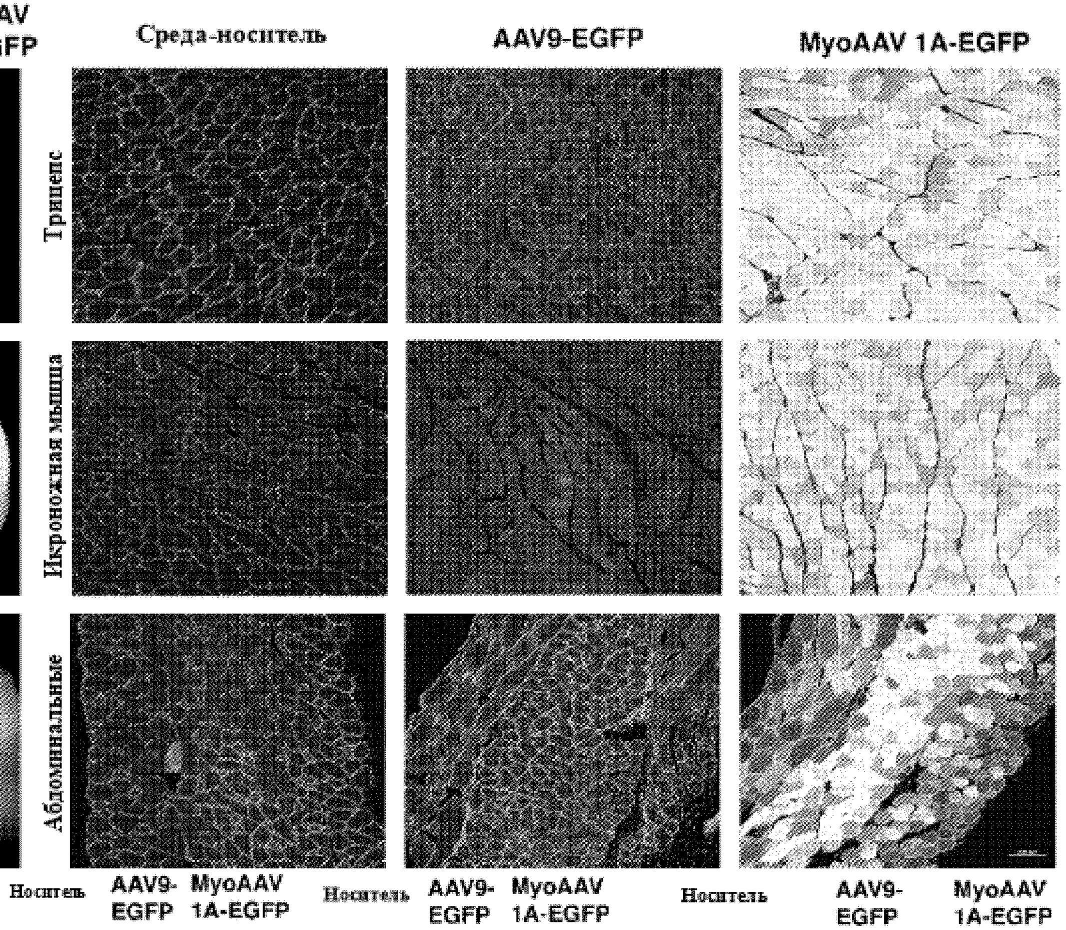
Фиг. 21H



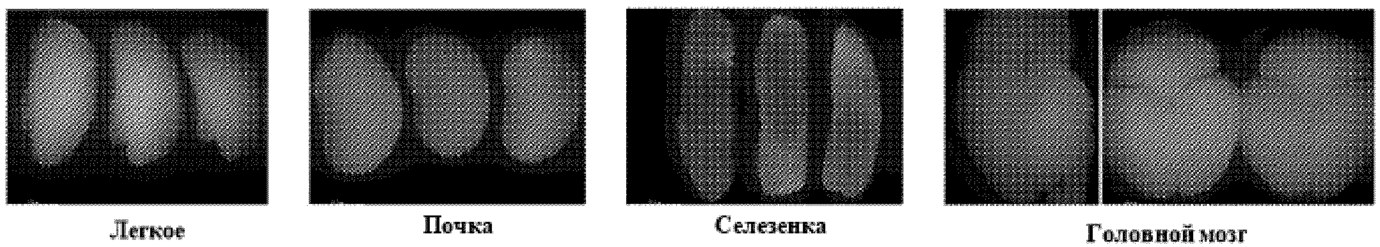
Фиг. 21I



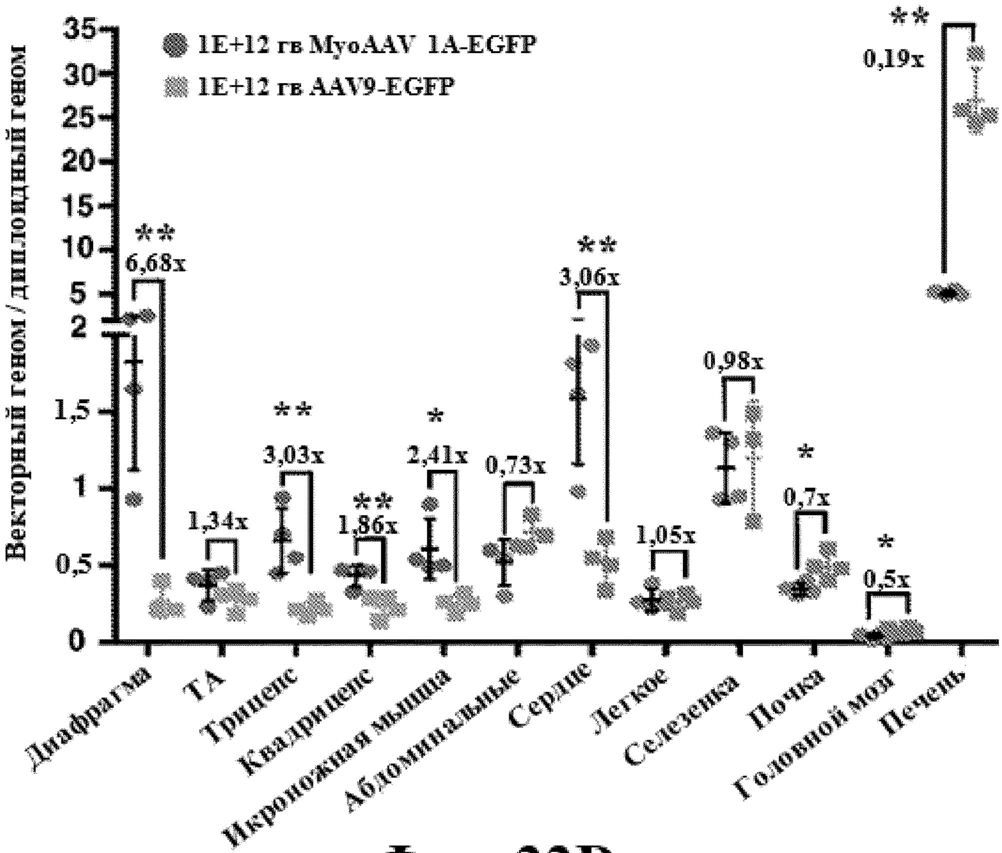
Фиг. 22A



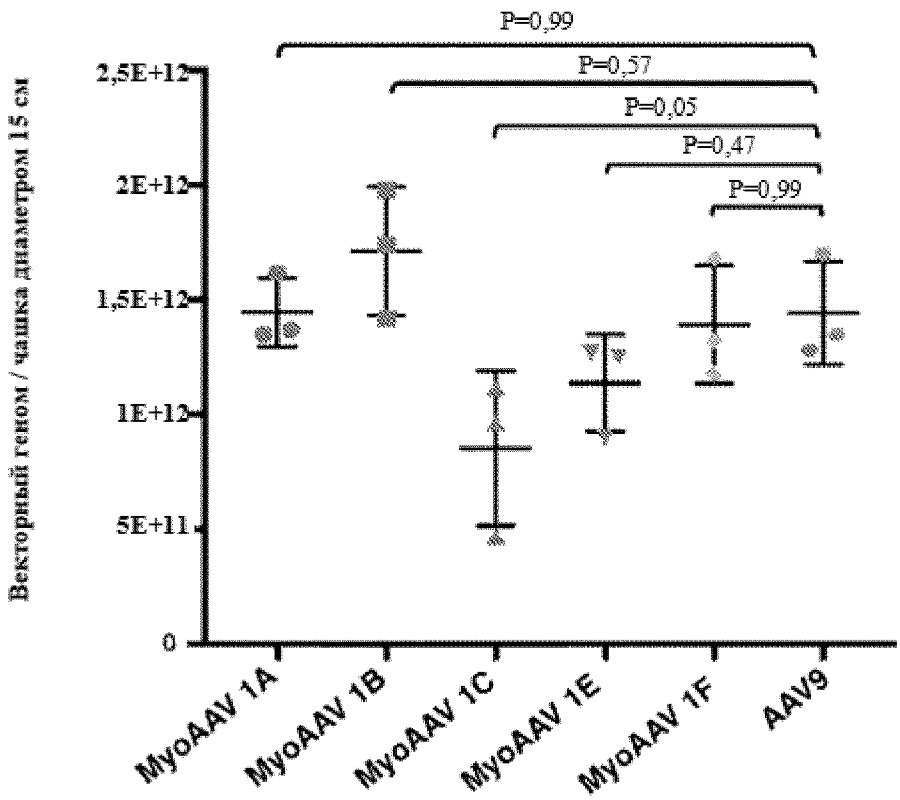
Фиг. 22B



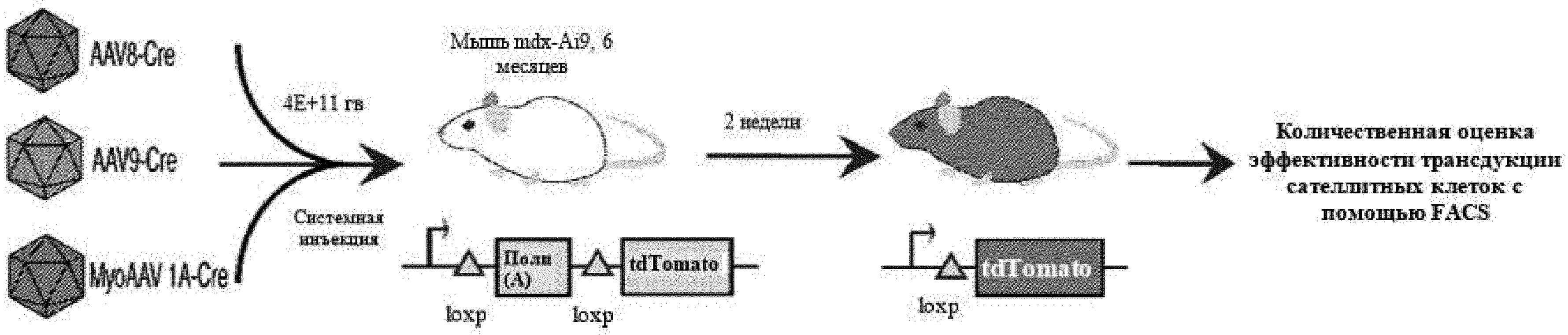
Фиг. 22C



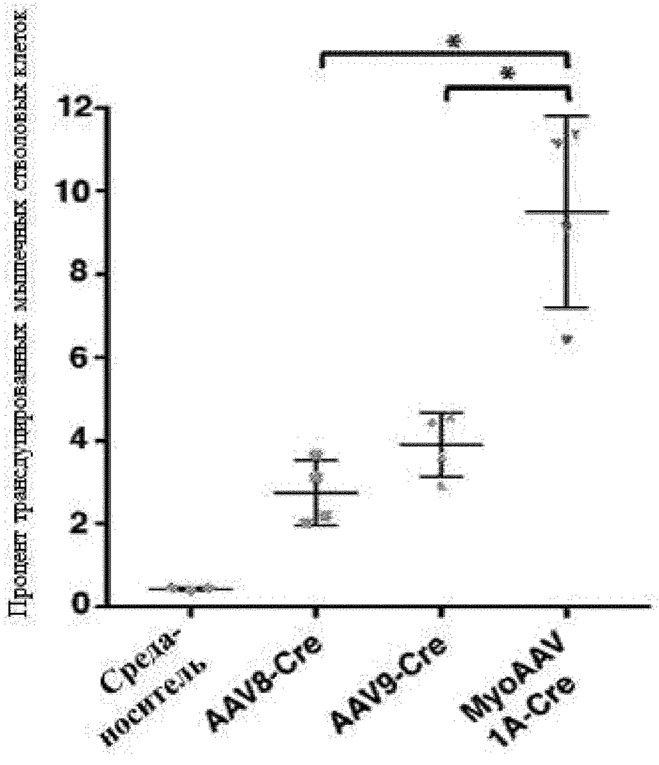
Фиг. 22D



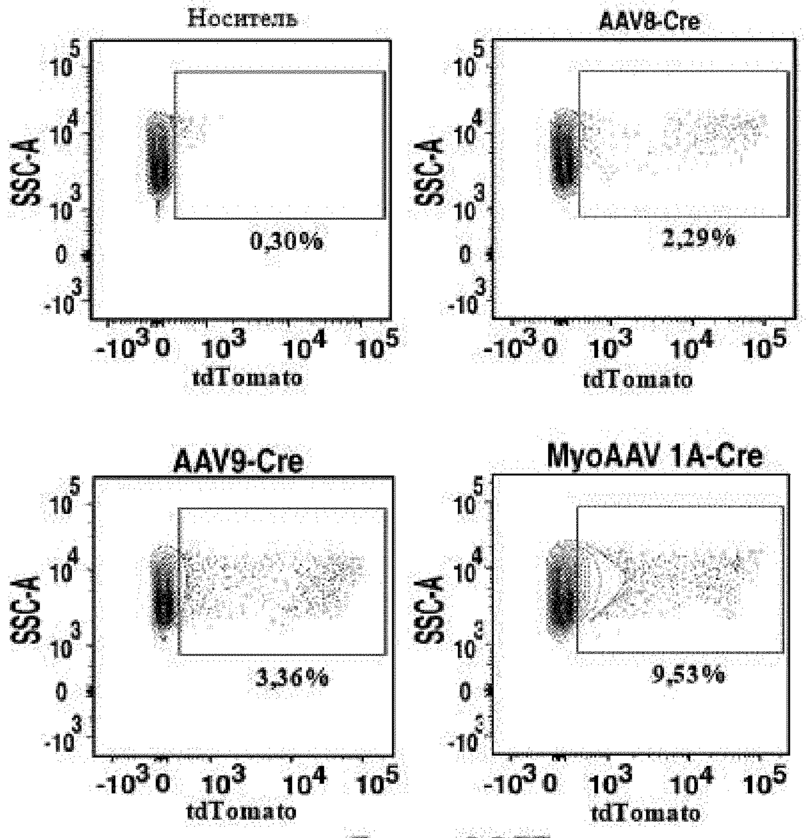
Фиг. 22E



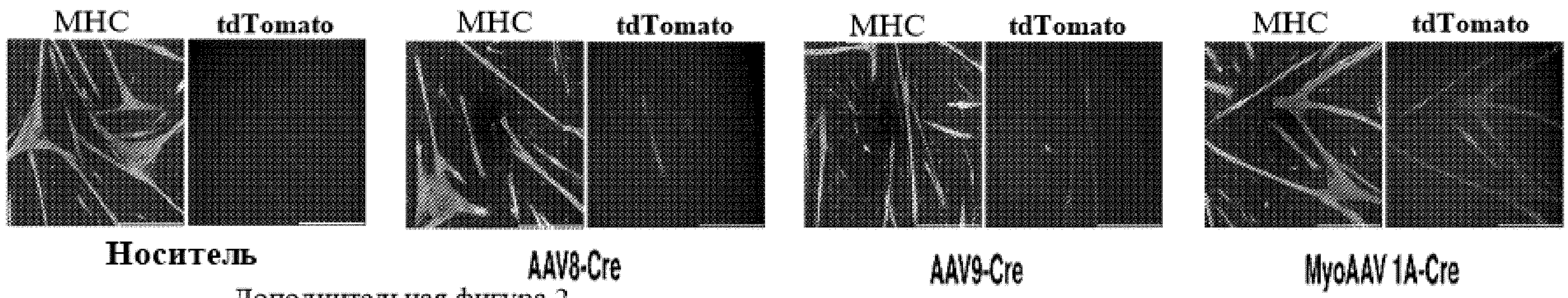
Фиг. 22F



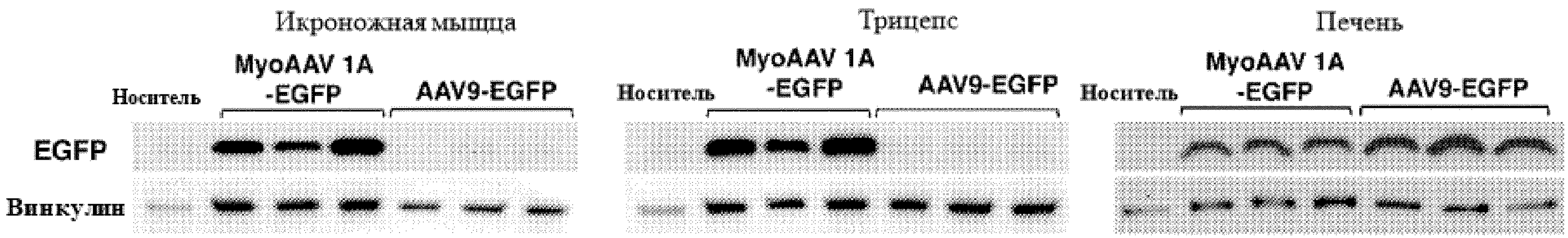
Фиг. 22G



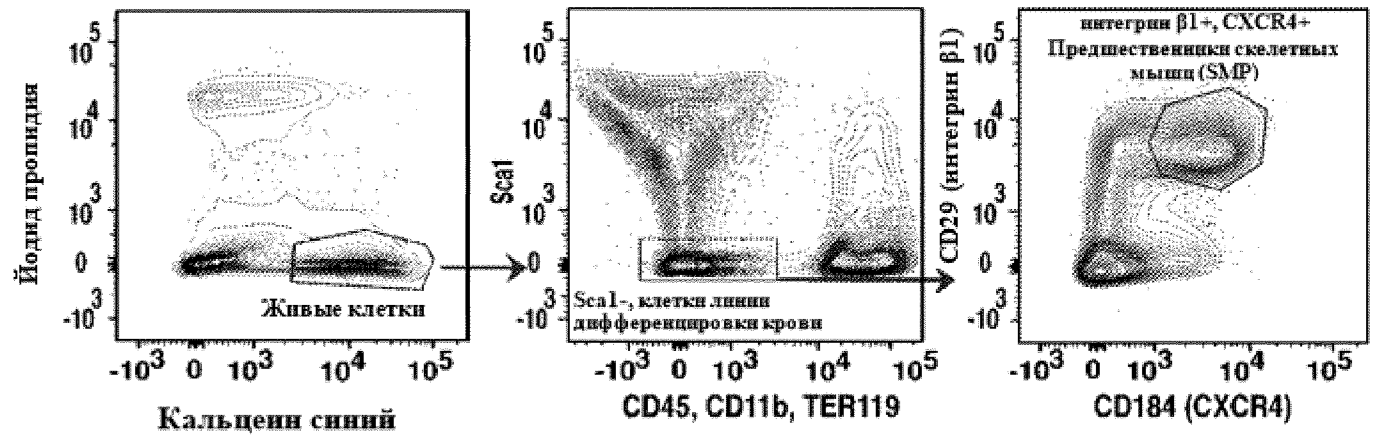
Фиг. 22H



Фиг. 22I

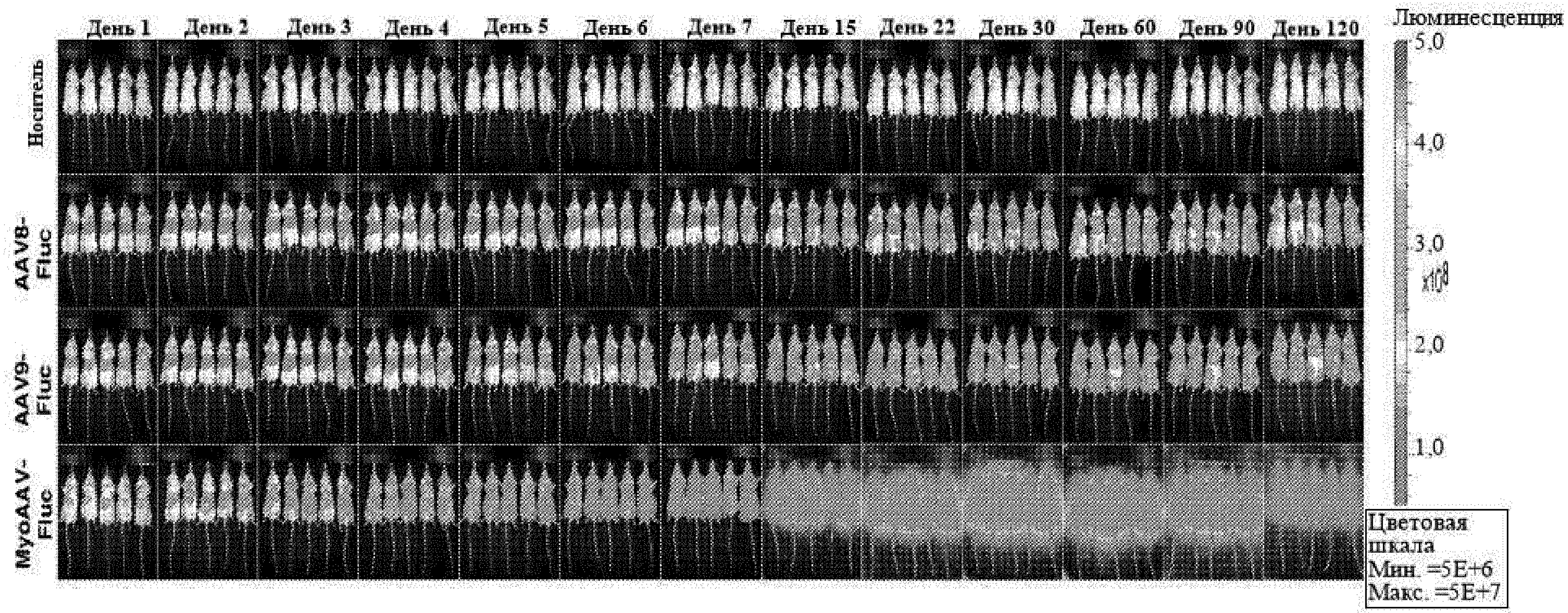


Фиг. 22J

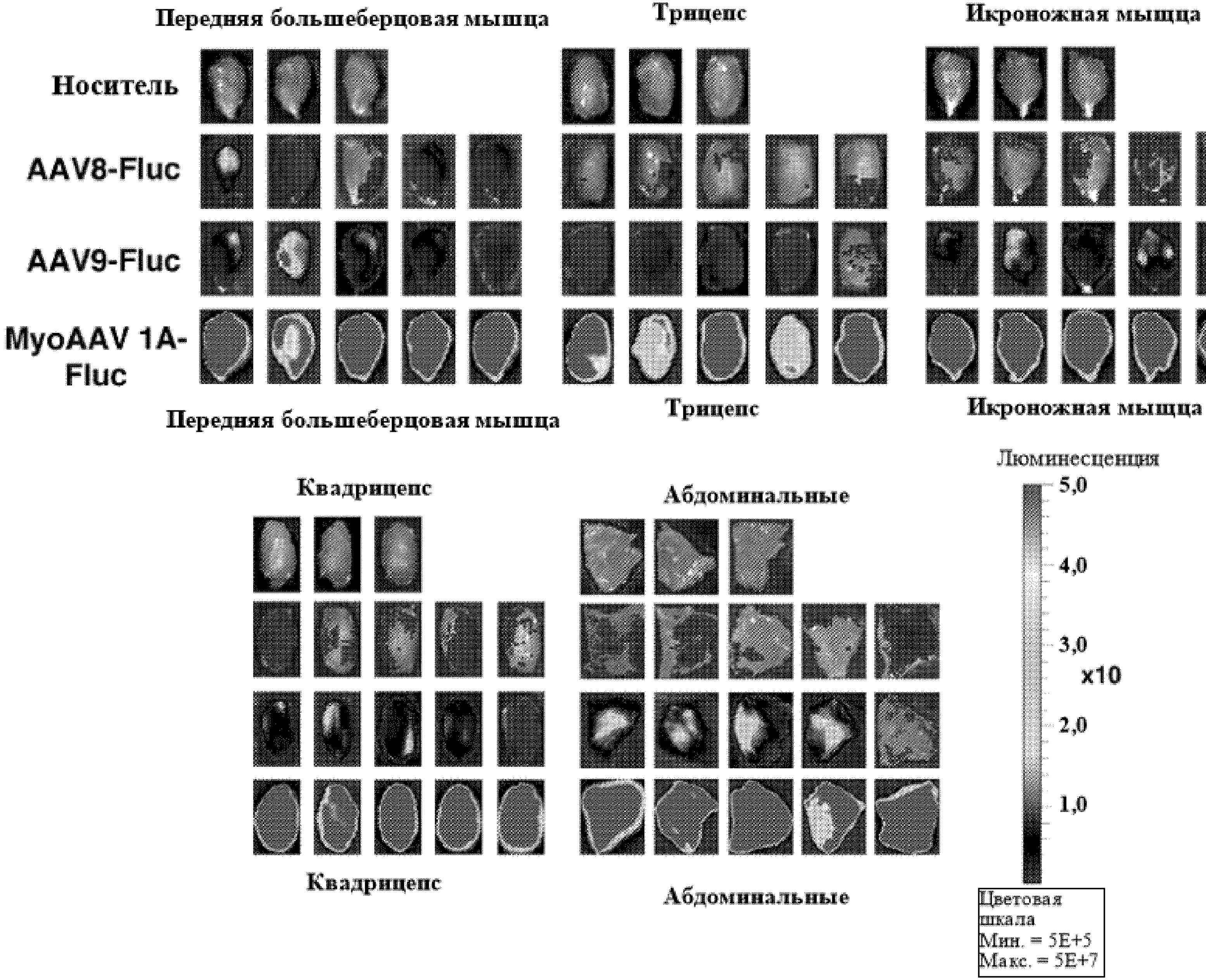


Фиг. 22K

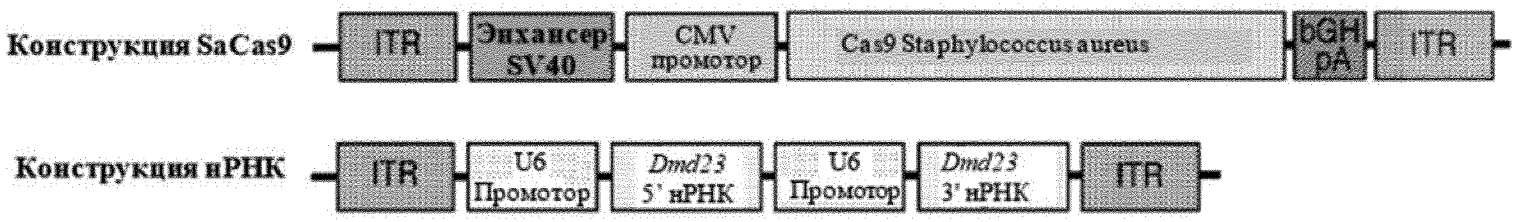
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)


День 1
День 2
День 3
День 4
День 5
День 6
День 7
День 15
День 22
День 30
День 60
День 90
День 120
Носитель
AAV8-Fluc
AAV9-Fluc
MyoAAV-Fluc
Люминесценция
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
Цветовая шкала
Мин. =5E+6
Макс. =5E+7

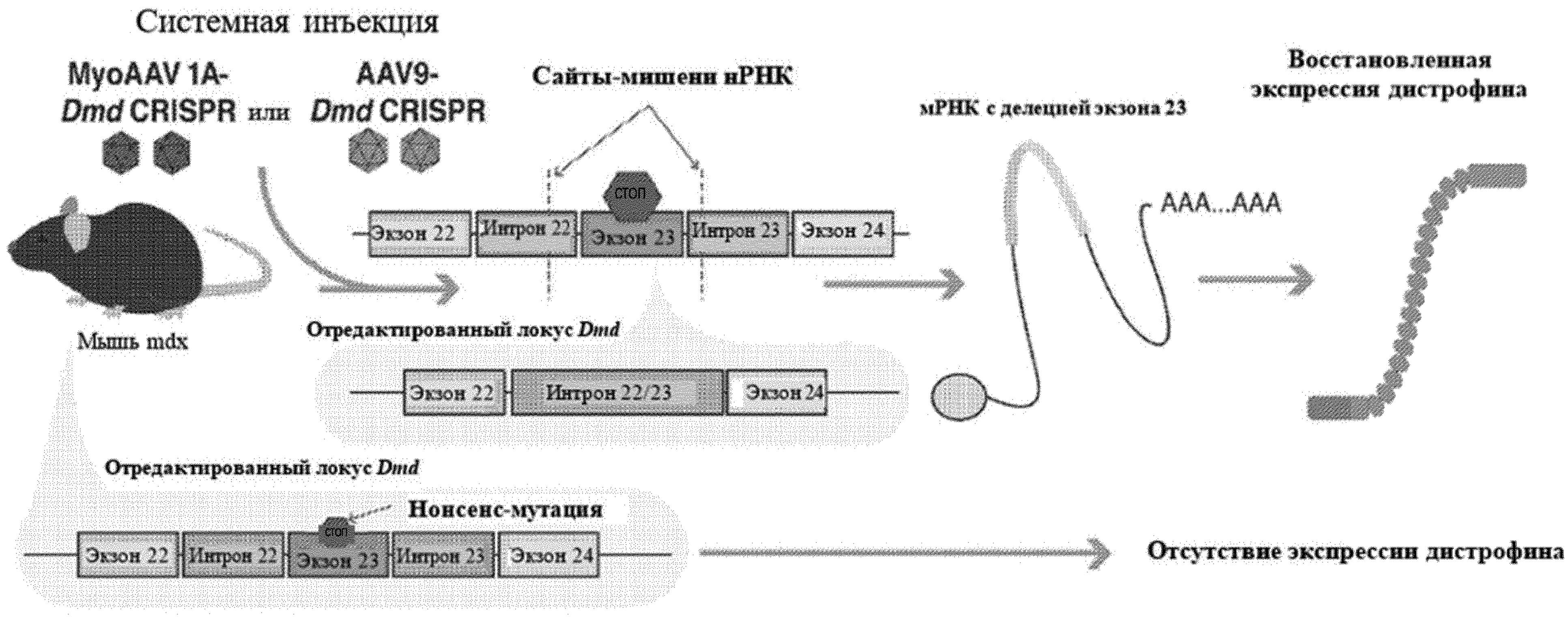
Фиг. 23А


Передняя большеберцовая мышца
Трицепс
Икроножная мышца
Носитель
AAV8-Fluc
AAV9-Fluc
MyoAAV 1A-Fluc
Передняя большеберцовая мышца
Трицепс
Икроножная мышца
Квадрицепс
Абдоминальные
Квадрицепс
Абдоминальные
Люминесценция
5,0
4,0
3,0
x10
2,0
1,0
Цветовая шкала
Мин. = 5E+5
Макс. = 5E+7

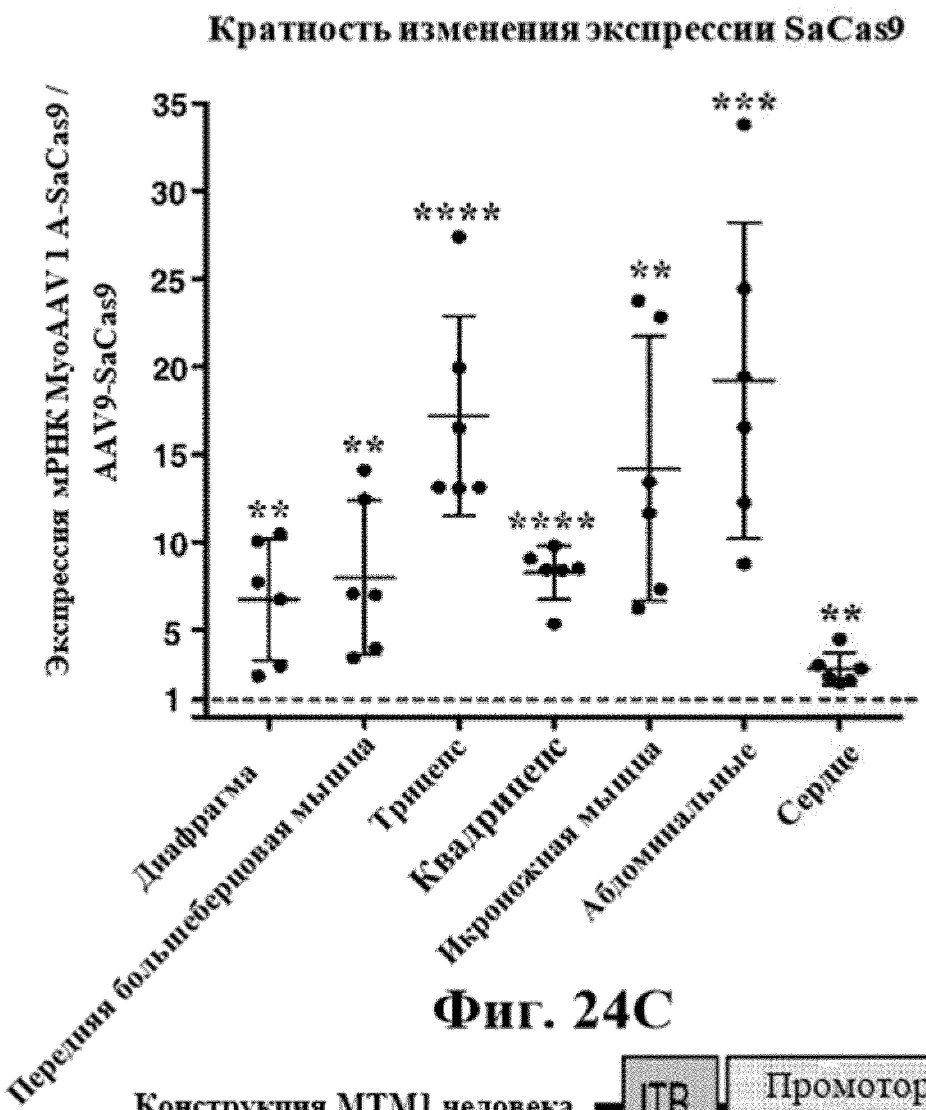
Фиг. 23В



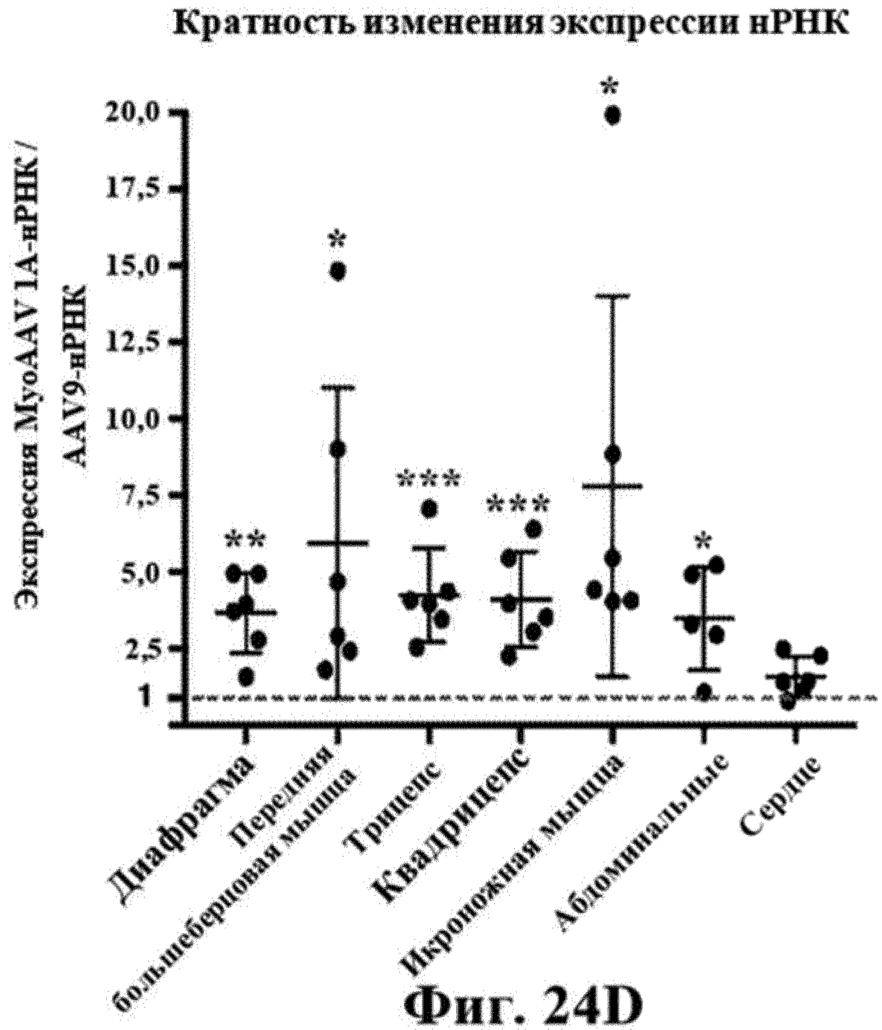
Фиг. 24A



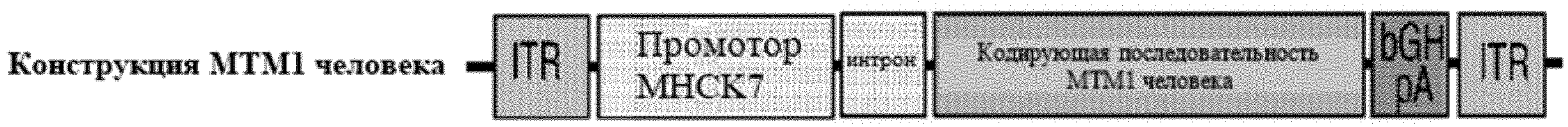
Фиг. 24B



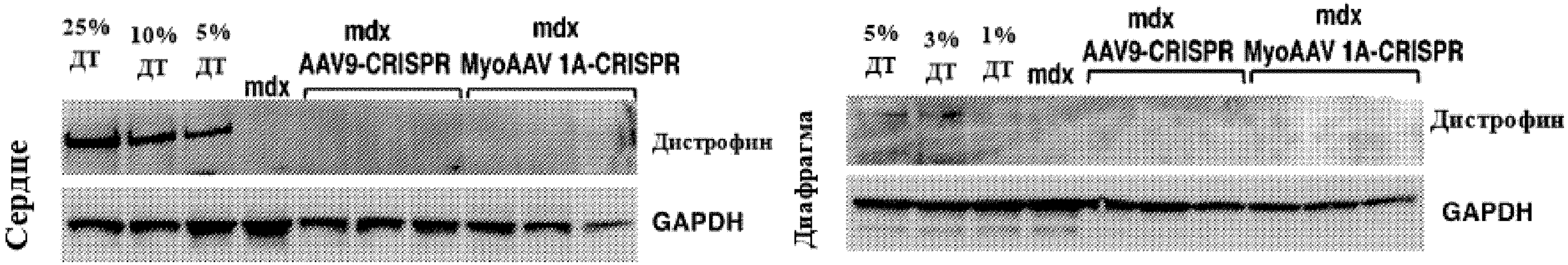
Фиг. 24C



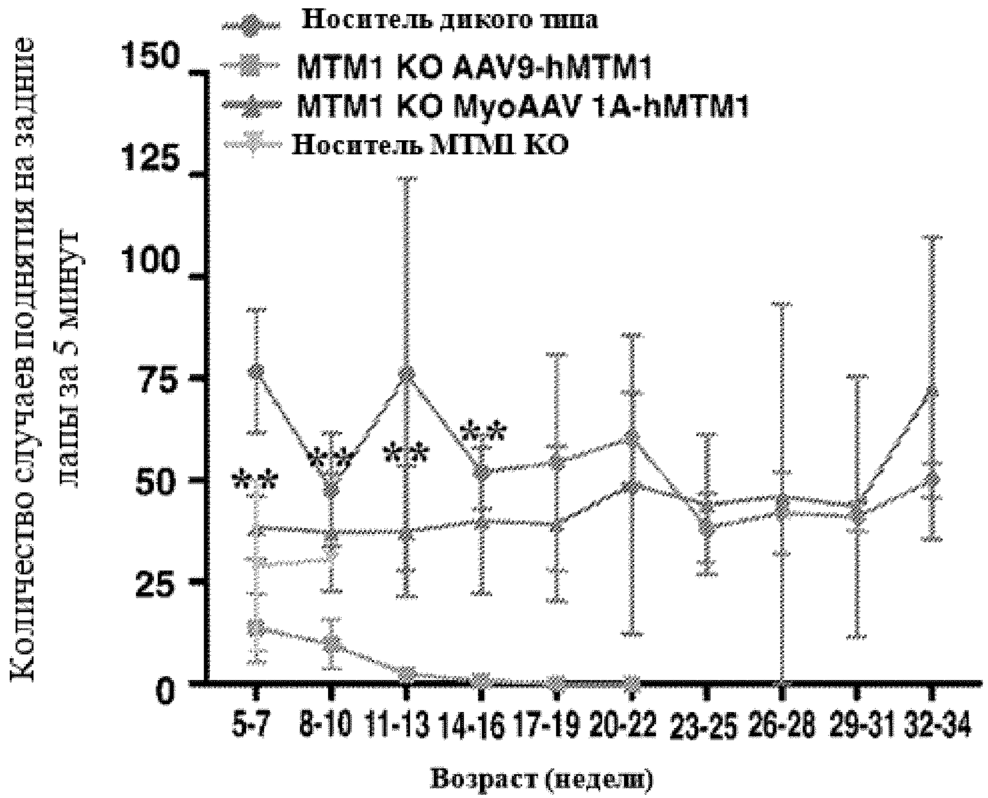
Фиг. 24D



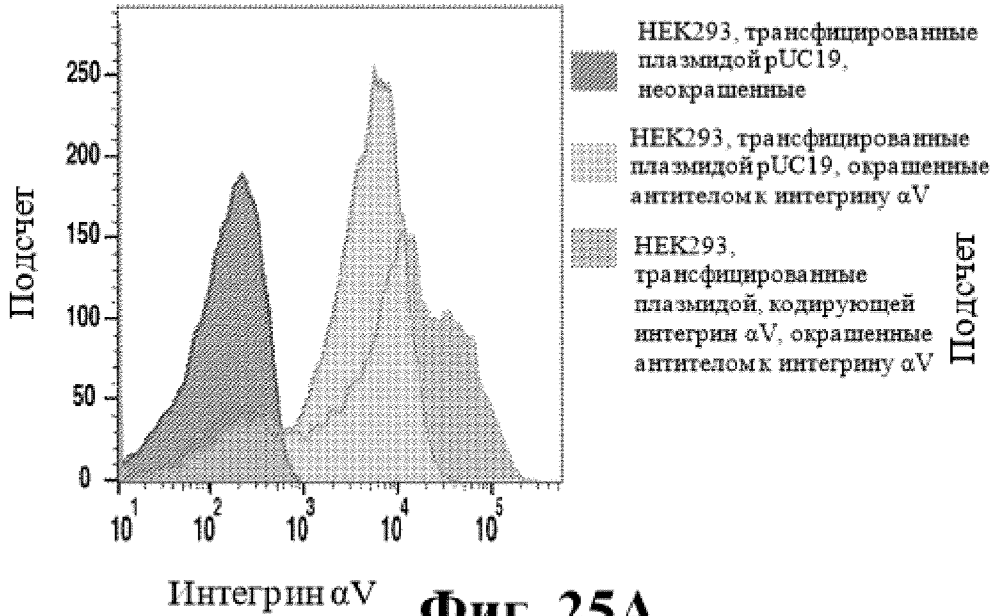
Фиг. 24E



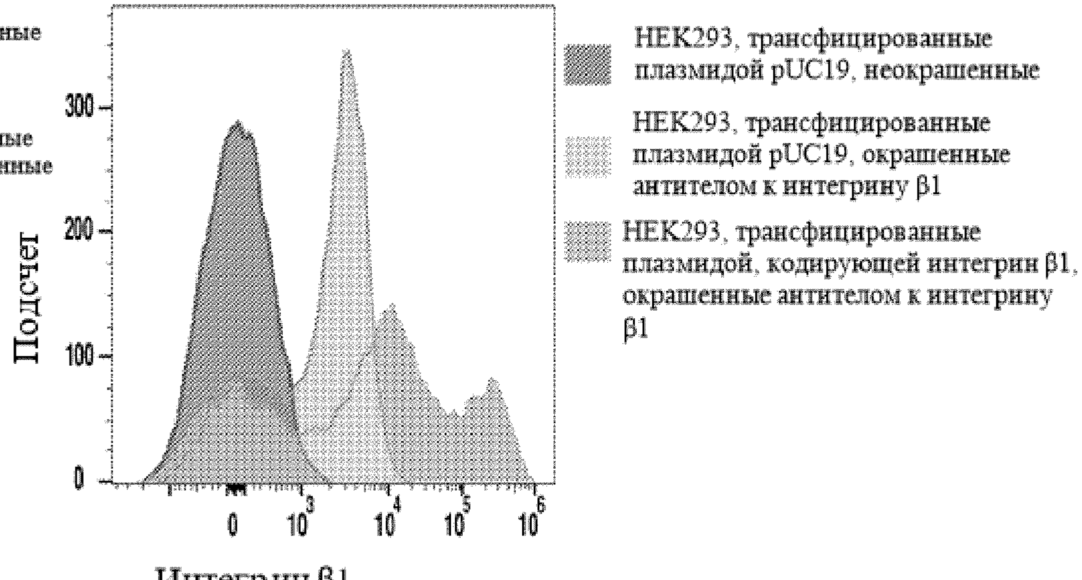
Фиг. 24F



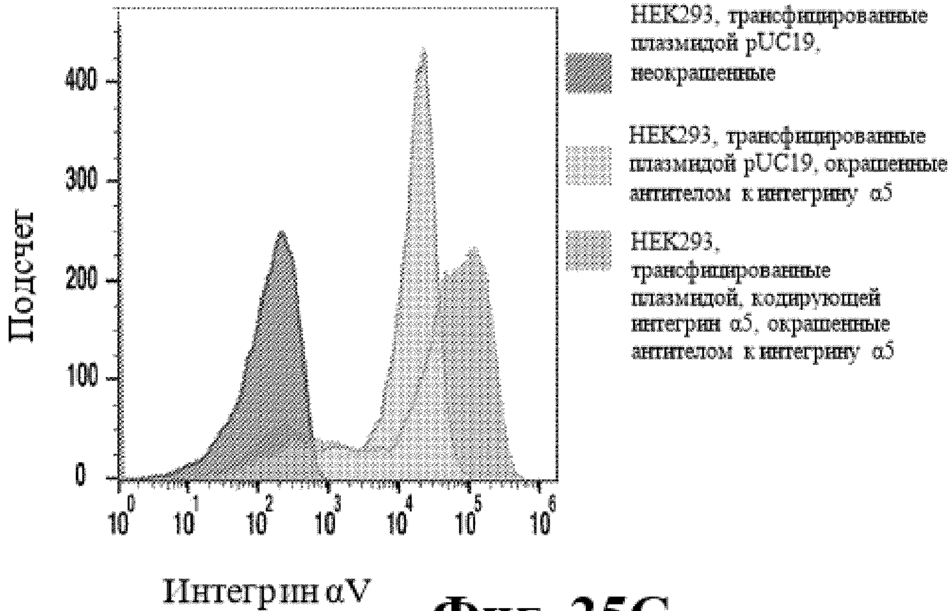
Фиг. 24G



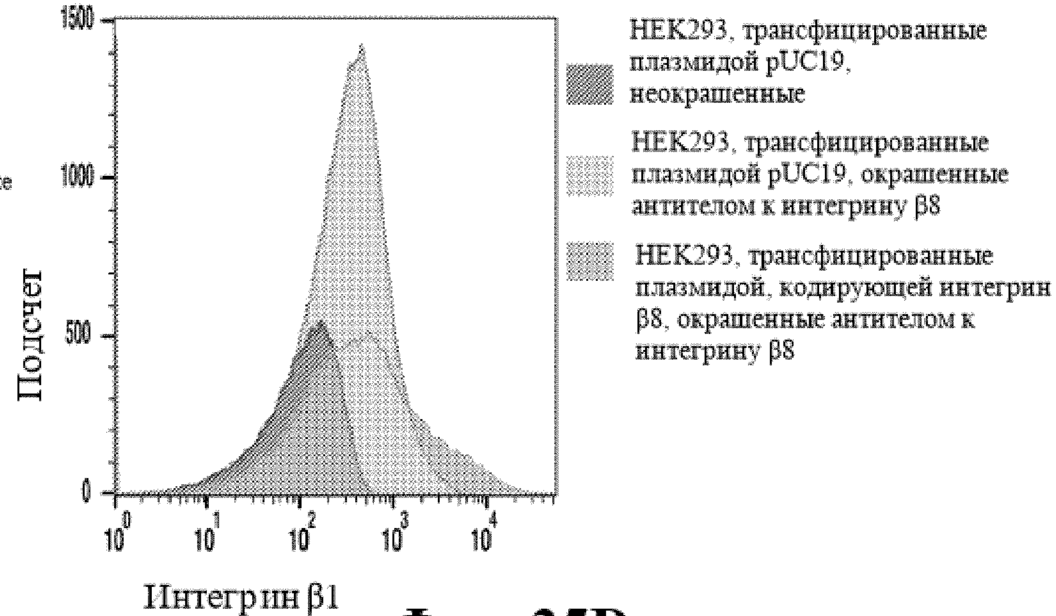
Фиг. 25A



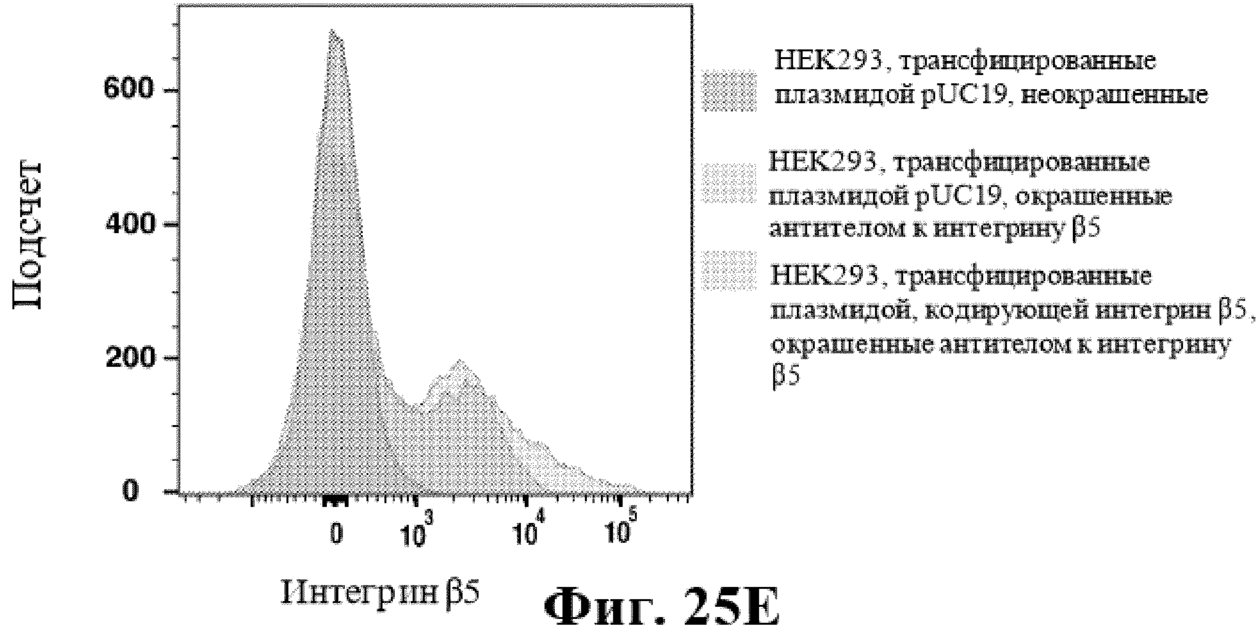
Фиг. 25B



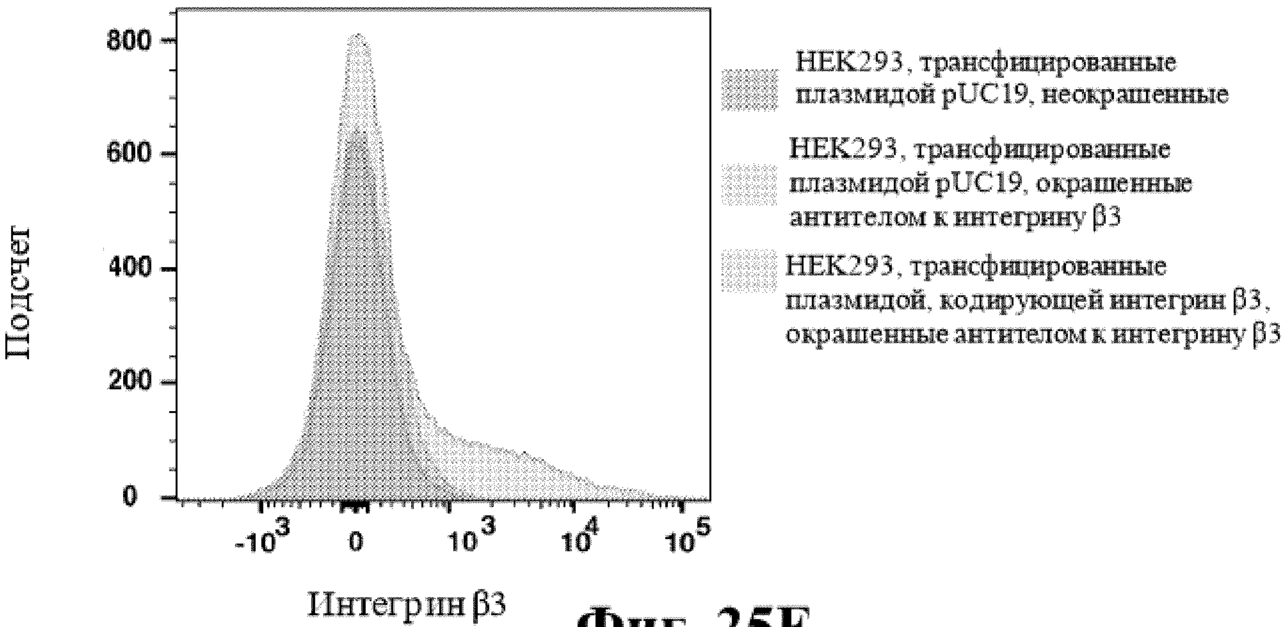
Фиг. 25C



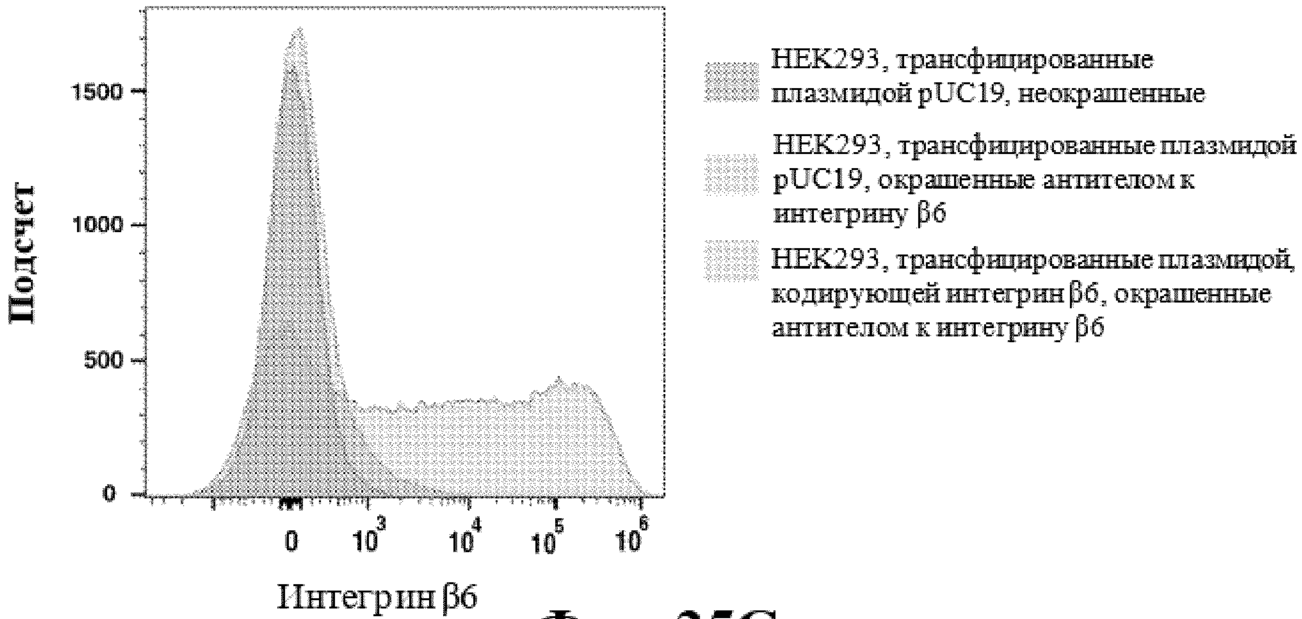
Фиг. 25D



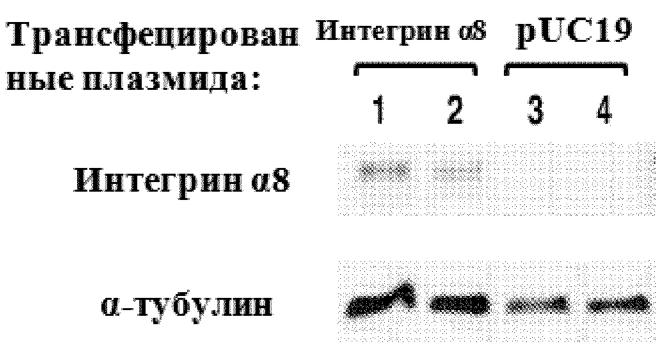
Фиг. 25E



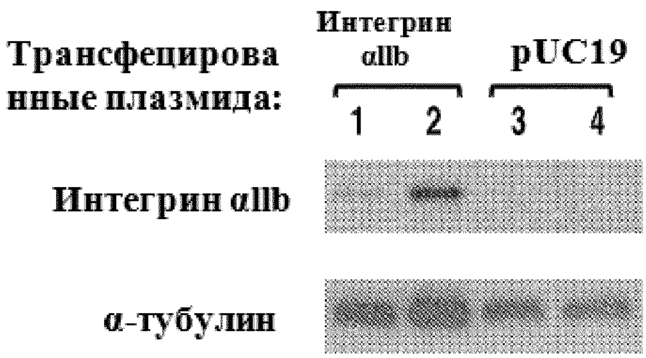
Фиг. 25F



Фиг. 25G

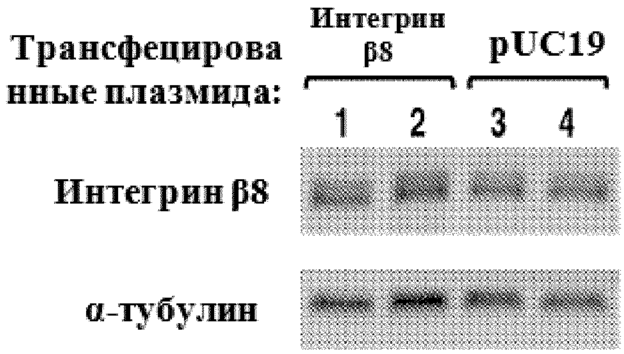


Фиг. 25H

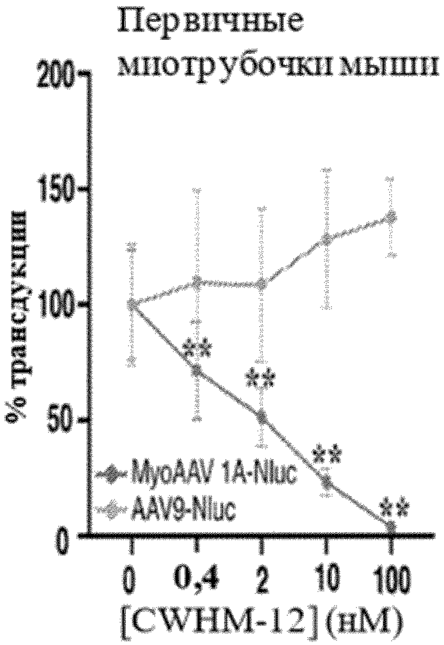


Фиг. 25I

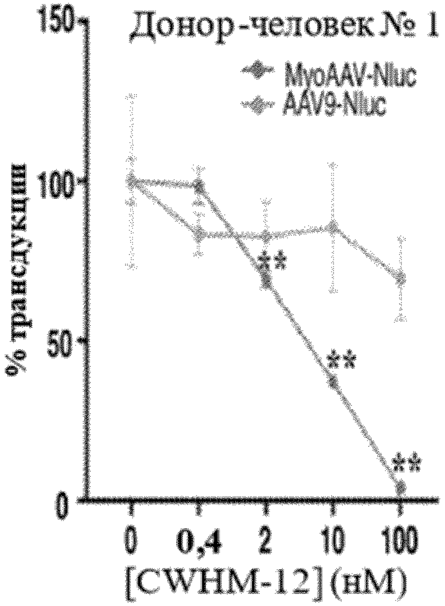
Фиг. 25J



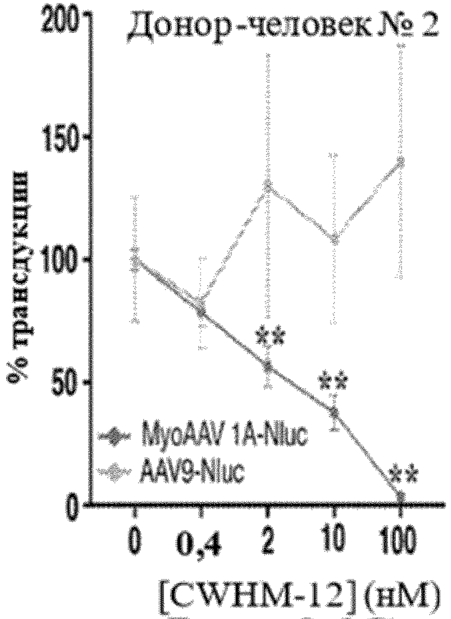
Фиг. 25K



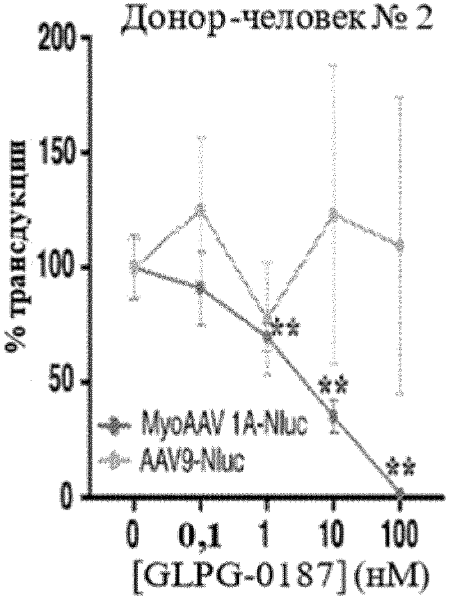
Фиг. 26A



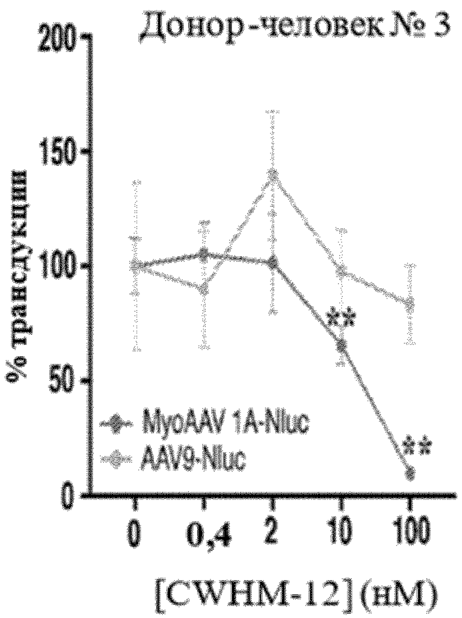
Фиг. 26B



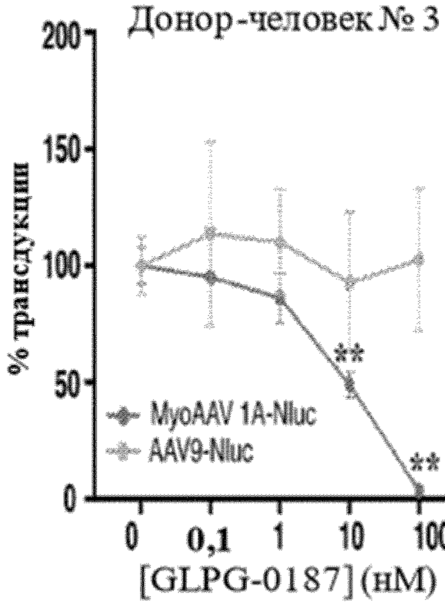
Фиг. 26C



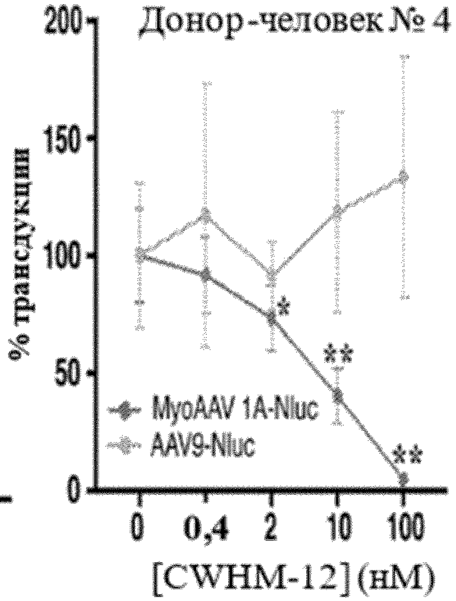
Фиг. 26D



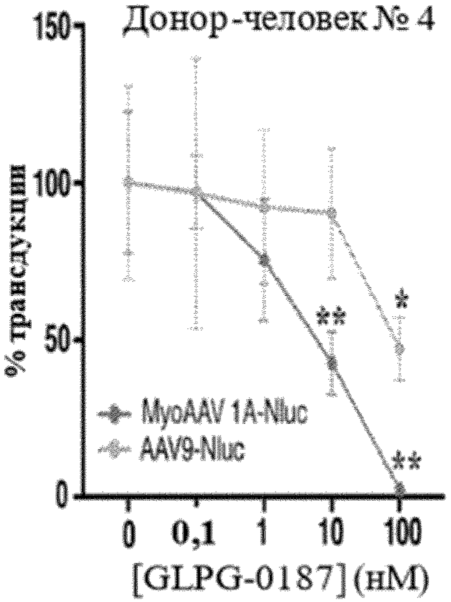
Фиг. 26E



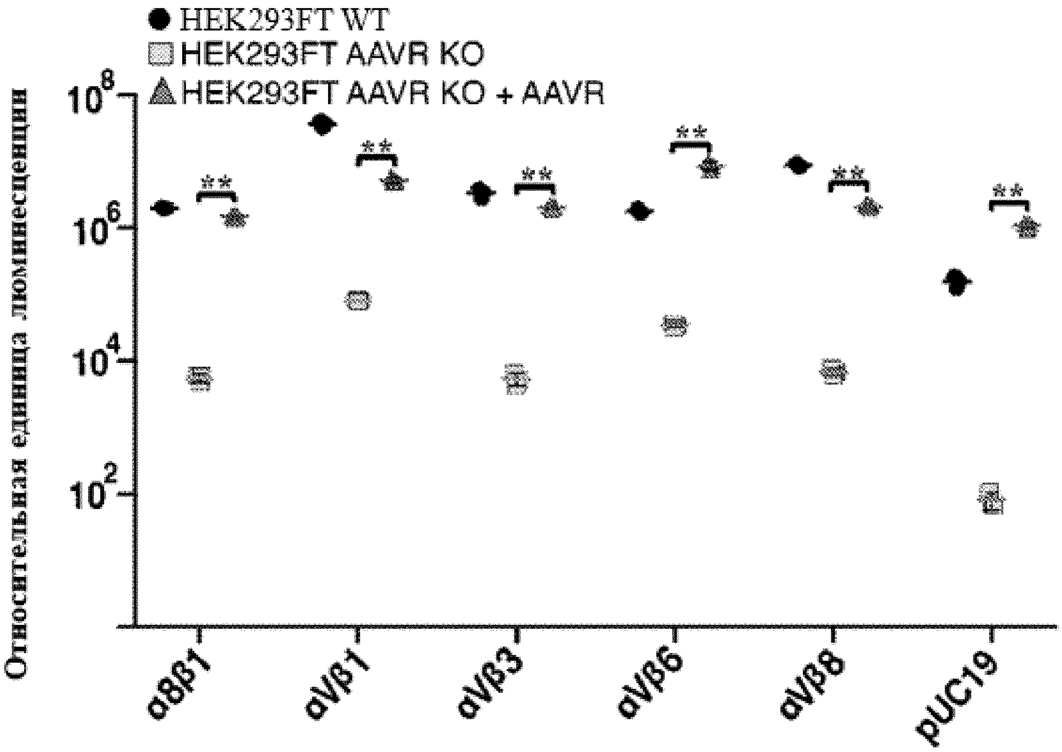
Фиг. 26F



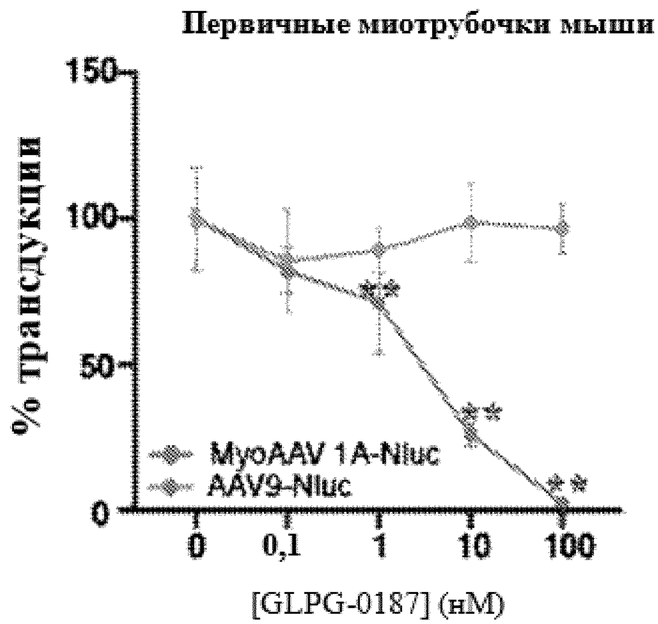
Фиг. 26G



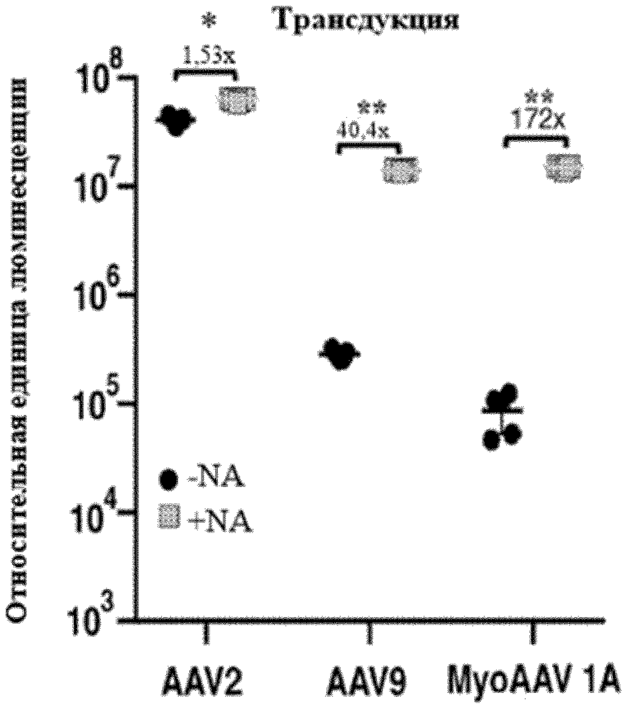
Фиг. 26H



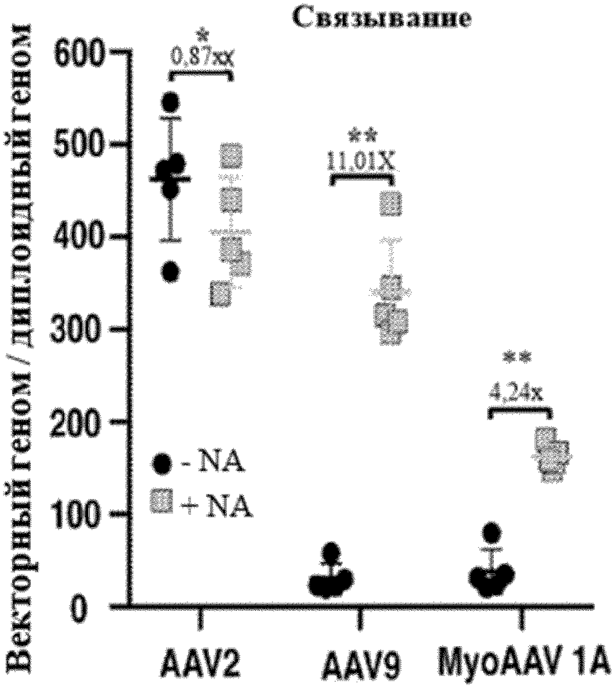
Фиг. 26I



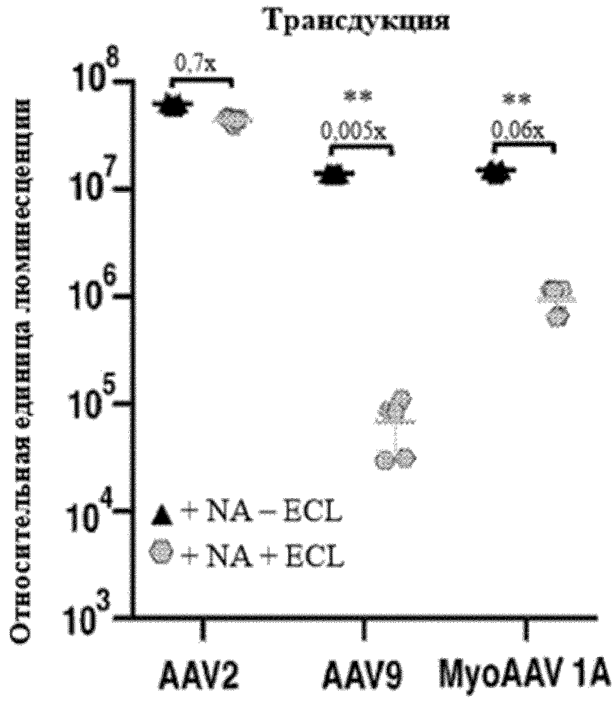
Фиг. 26J



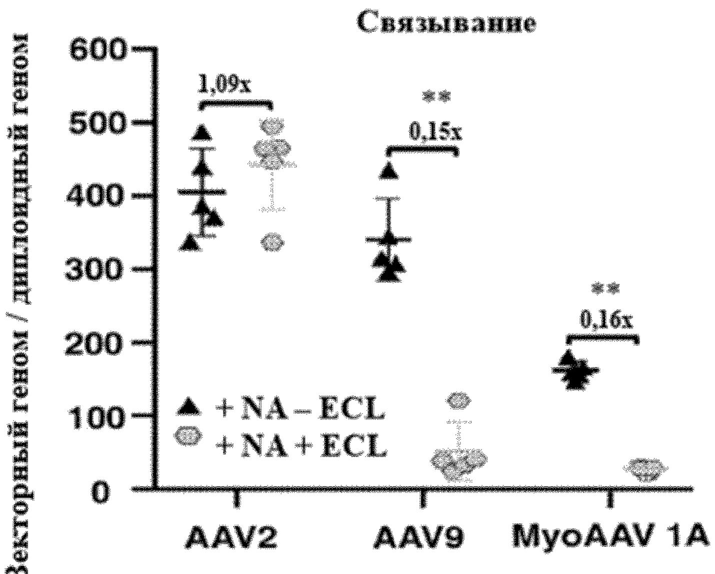
Фиг. 26K



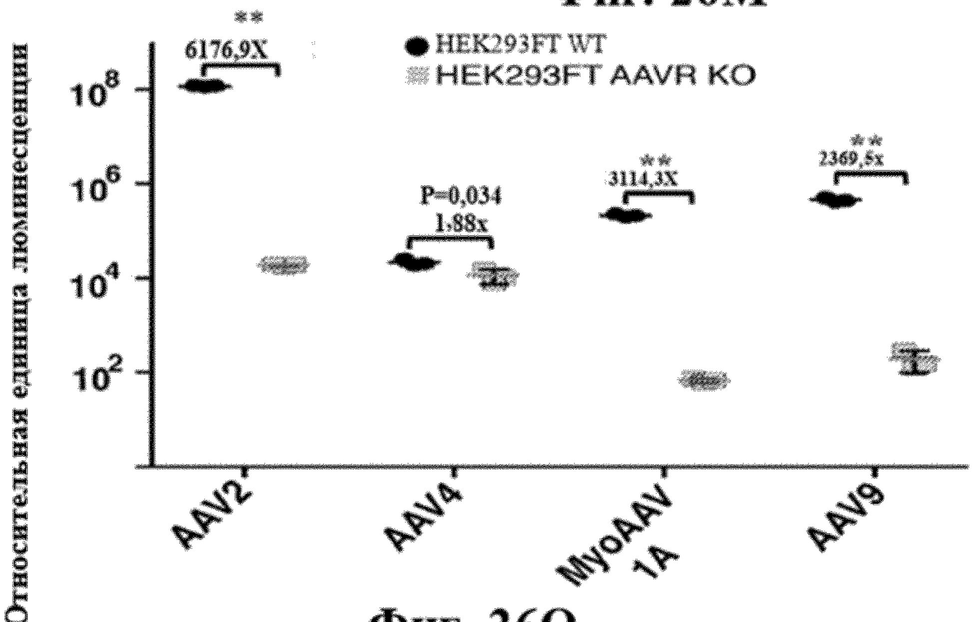
Фиг. 26L



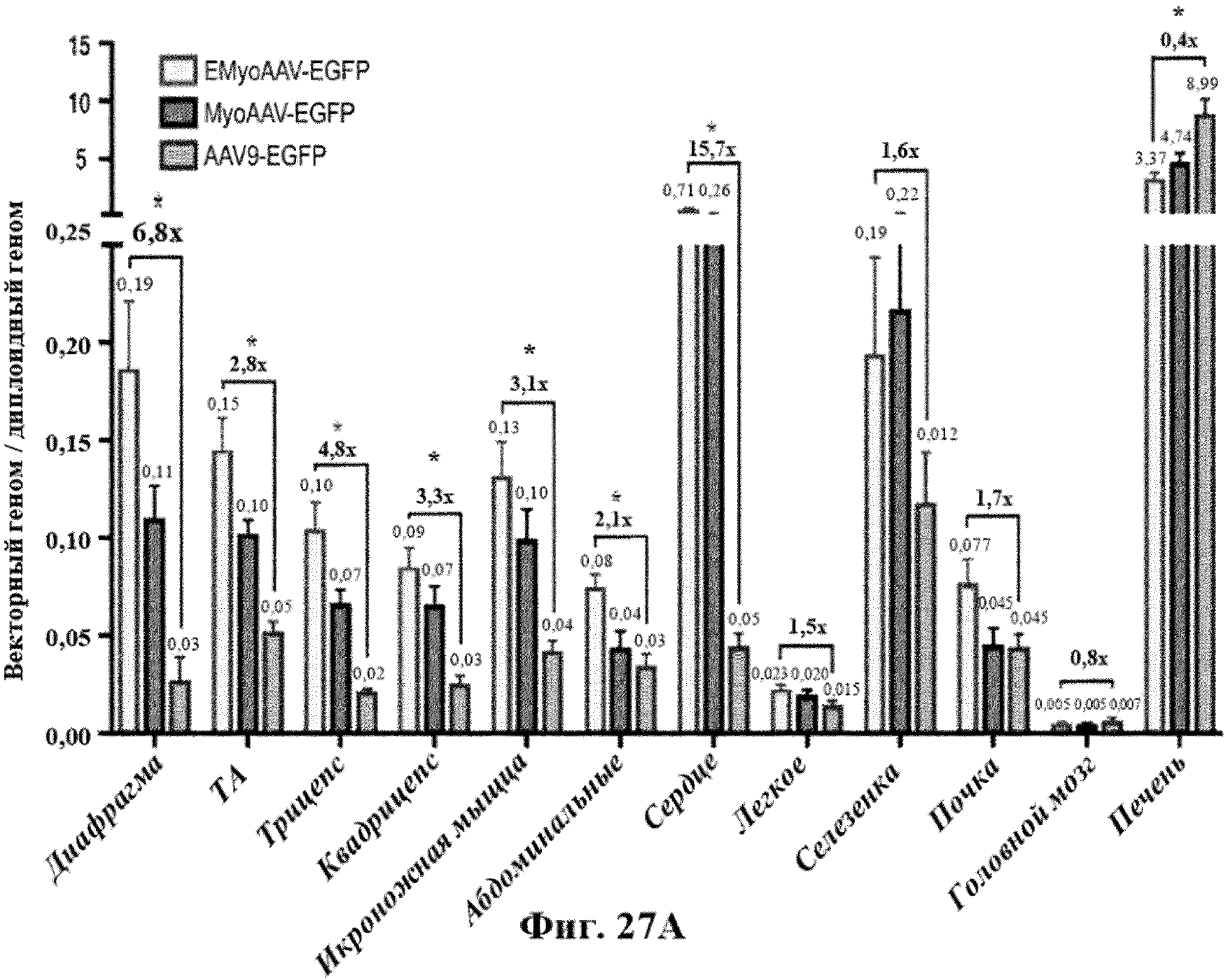
Фиг. 26M



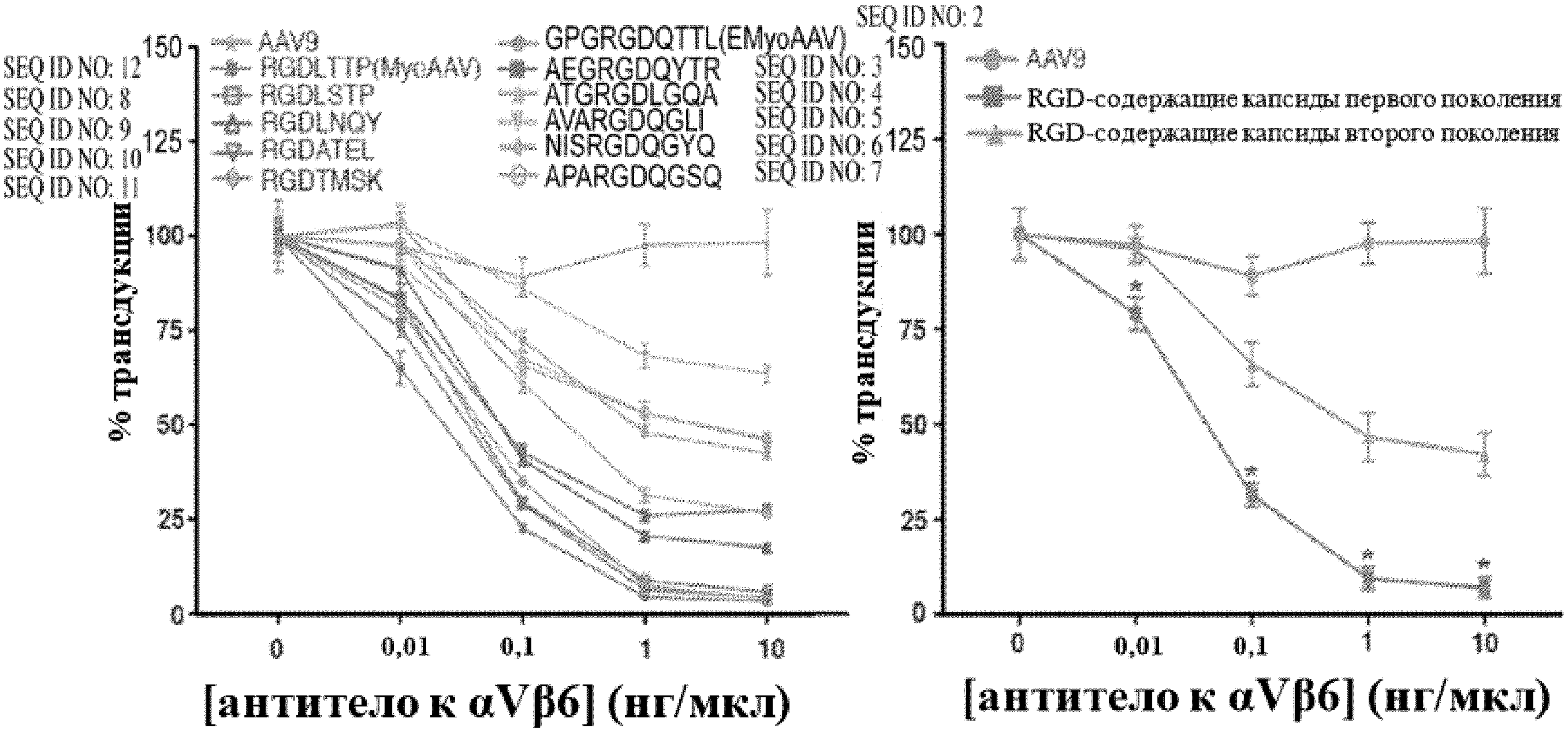
Фиг. 26N



Фиг. 26O


EMyoAAV-EGFP
MyoAAV-EGFP
AAV9-EGFP
Векторный геном / диплоидный геном
15
10
5
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Диафрагма
TA
Трицепс
Квадрицепс
Икроножная мышца
Абдоминальные
Сердце
Легкое
Селезенка
Почка
Головной мозг
Печень
6,8x
2,8x
4,8x
3,3x
3,1x
2,1x
15,7x
1,5x
1,6x
1,7x
0,8x
0,4x
0,19
0,11
0,03
0,15
0,10
0,05
0,10
0,07
0,02
0,09
0,07
0,03
0,13
0,10
0,04
0,08
0,04
0,03
0,71
0,26
0,05
0,023
0,020
0,015
0,19
0,22
0,012
0,077
0,045
0,045
0,005
0,005
0,007
3,37
4,74
8,99

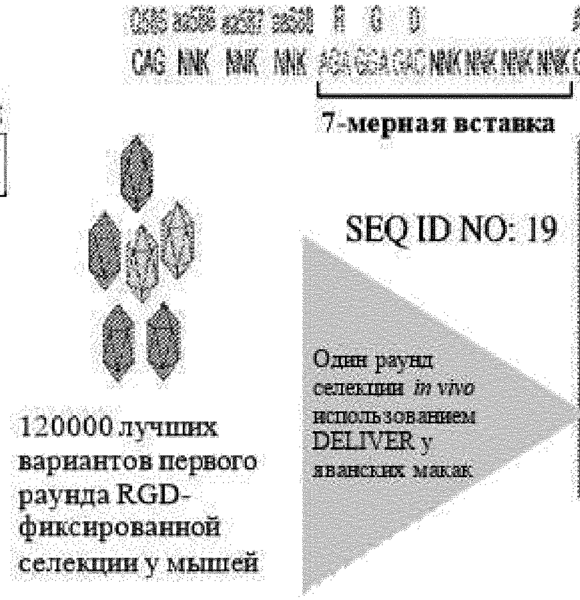
Фиг. 27А


AAV9
SEQ ID NO: 12 RGDLTTP(MyoAAV)
SEQ ID NO: 8 RGDLSTP
SEQ ID NO: 9 RGDLNQY
SEQ ID NO: 10 RGDATEL
SEQ ID NO: 11 RGDTMSK
SEQ ID NO: 2 GPGRGDQTTL(EMyoAAV)
SEQ ID NO: 3 AEGRGDQYTR
SEQ ID NO: 4 ATGRGDLGQA
SEQ ID NO: 5 AVARGDQGLI
SEQ ID NO: 6 NISRGDQGYQ
SEQ ID NO: 7 APARGDQGSQ
% трансдукции
[антитело к αVβ6] (нг/мкл)
AAV9
RGD-содержащие капсиды первого поколения
RGD-содержащие капсиды второго поколения
% трансдукции
[антитело к αVβ6] (нг/мкл)

Фиг. 27B

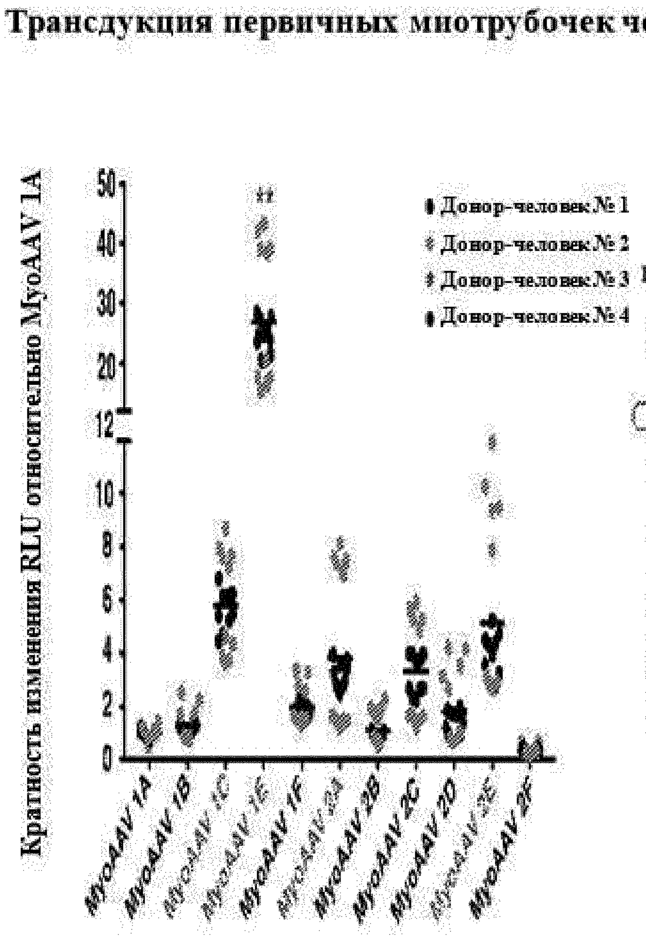
Название варианта	последовательность 7-мера	SEQ ID NO:
MyoAAV 3A	RGDYVGL	22
MyoAAV 3B	RGDYSGL	23
MyoAAV 3C	RGDYSSV	24
MyoAAV 3D	RGDYREL	25
MyoAAV 3E	RGDHGVL	26
MyoAAV 3F	RGDHASW	27

Фиг. 28A

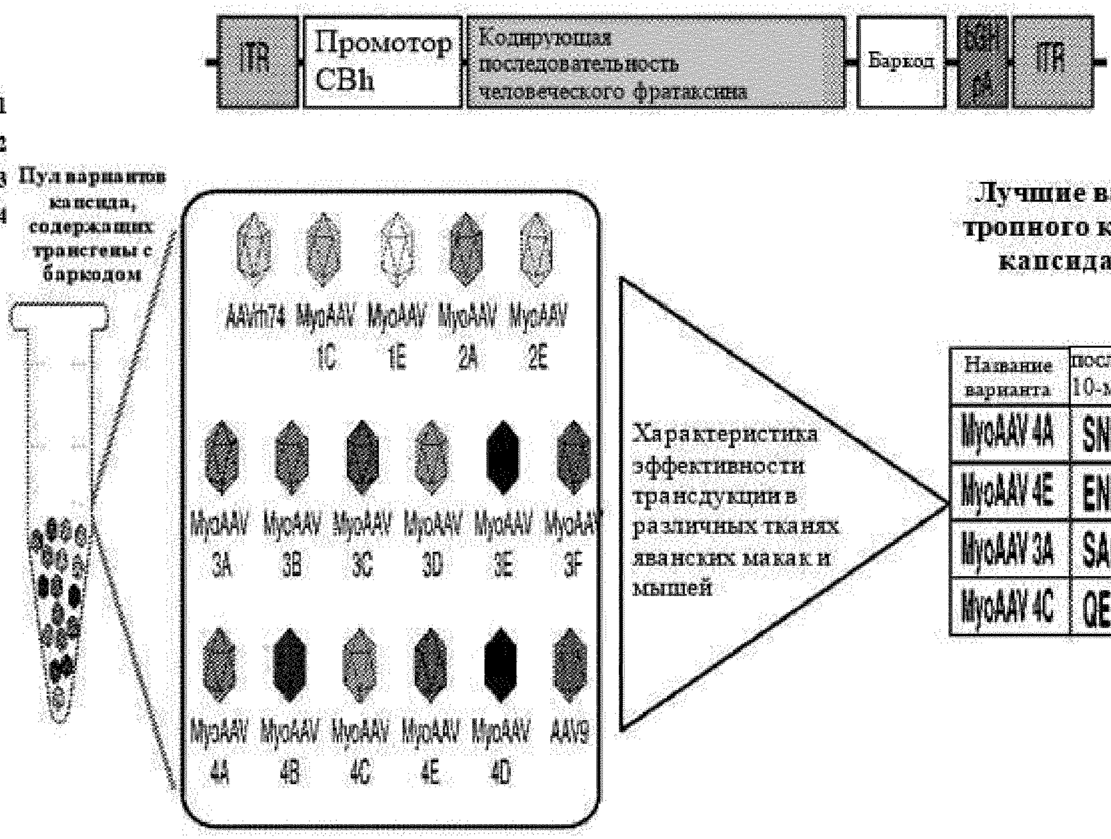


Название варианта	последовательность 10-мера	SEQ ID NO:
MyoAAV 4A	SNSRGDYNSL	28
MyoAAV 4B	STVRGDYTSV	29
MyoAAV 4C	QERRGDYTSM	30
MyoAAV 4D	ASTRGDHGVL	31
MyoAAV 4E	ENRRGDFNNT	32

Фиг. 28B



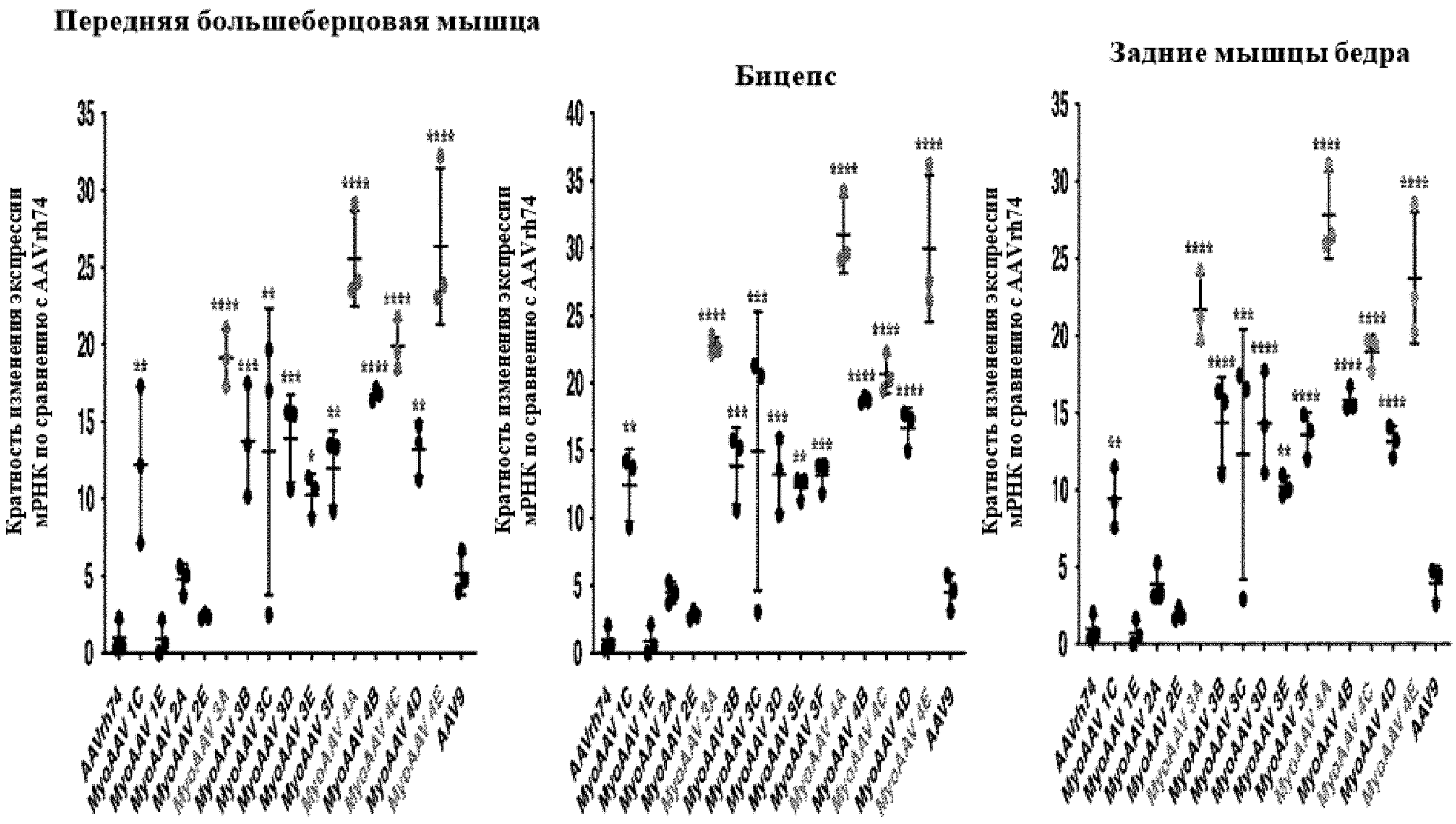
Фиг. 28C



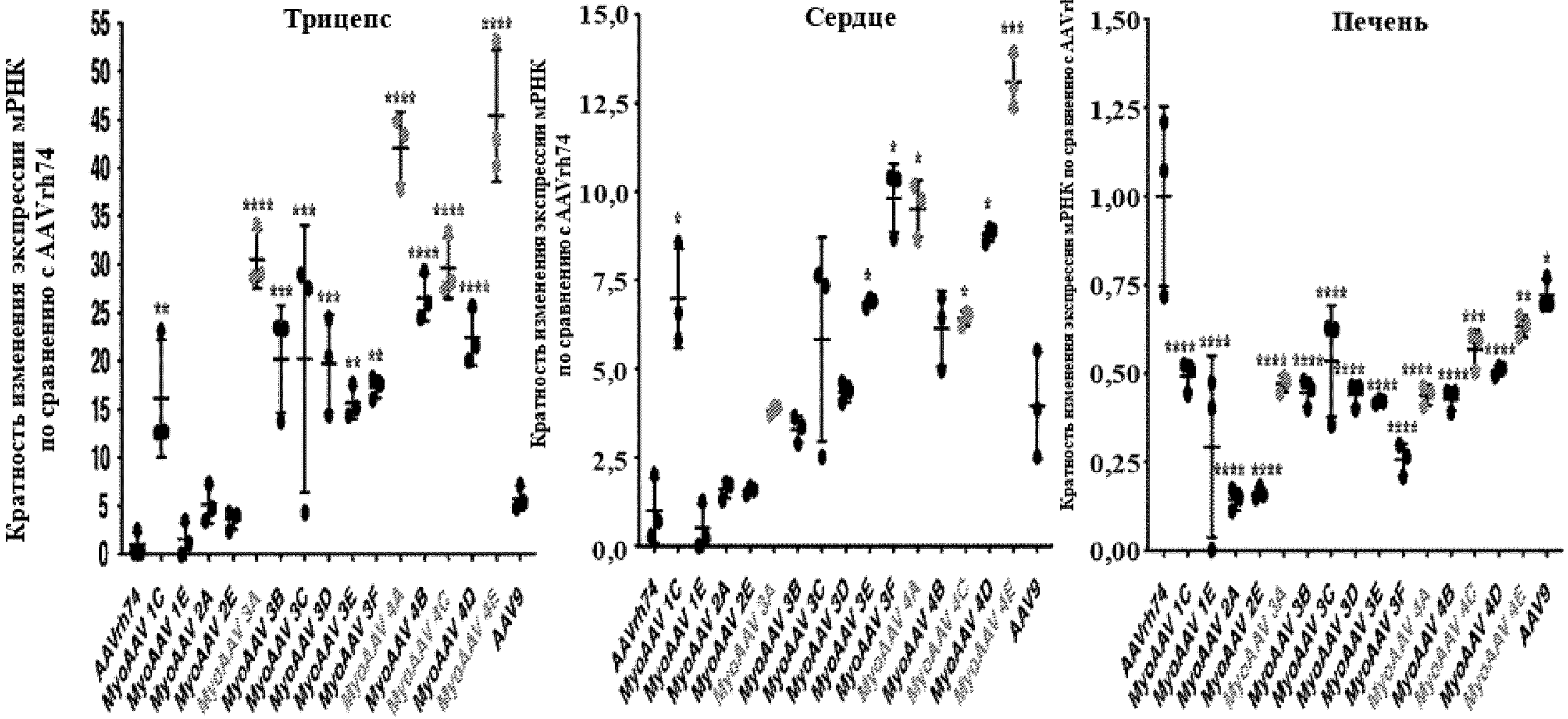
Лучшие варианты тропного к мышцам капсида у NHP

Название варианта	последовательность 10-мера	SEQ ID NO:
MyoAAV 4A	SNSRGDYNSL	28
MyoAAV 4E	ENRRGDFNNT	32
MyoAAV 3A	SAQRGDYVGL	33
MyoAAV 4C	QERRGDYTSM	30

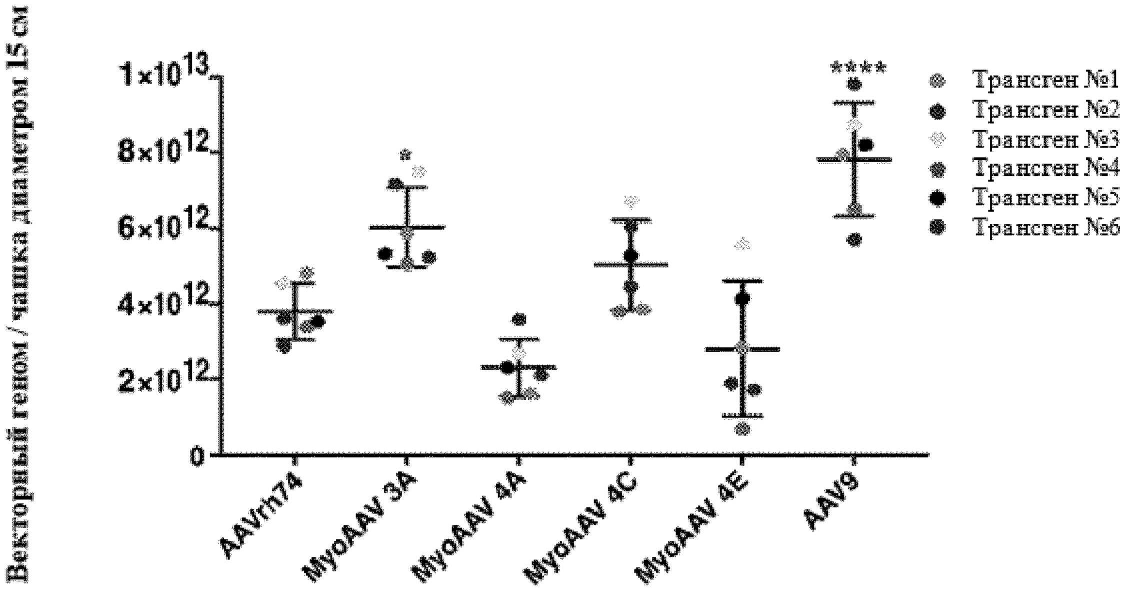
Фиг. 28D


Передняя большеберцовая мышца
Бицепс
Задние мышцы бедра
Кратность изменения экспрессии мРНК по сравнению с AAVrh74
AAVrh74
MyoAAV 1C
MyoAAV 1E
MyoAAV 2A
MyoAAV 2E
MyoAAV 3A
MyoAAV 3B
MyoAAV 3C
MyoAAV 3D
MyoAAV 3E
MyoAAV 3F
MyoAAV 4A
MyoAAV 4B
MyoAAV 4C
MyoAAV 4D
MyoAAV 4E
AAV9

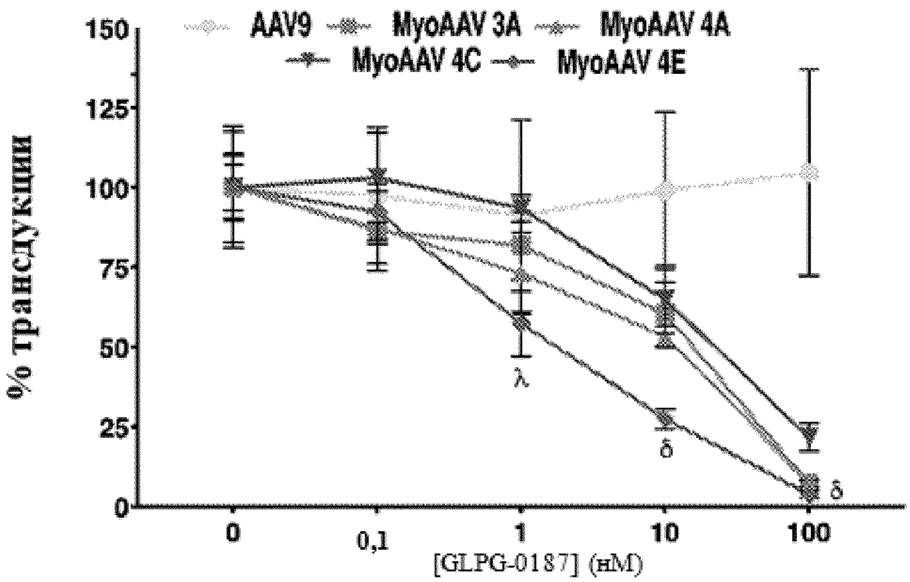
Фиг. 28E



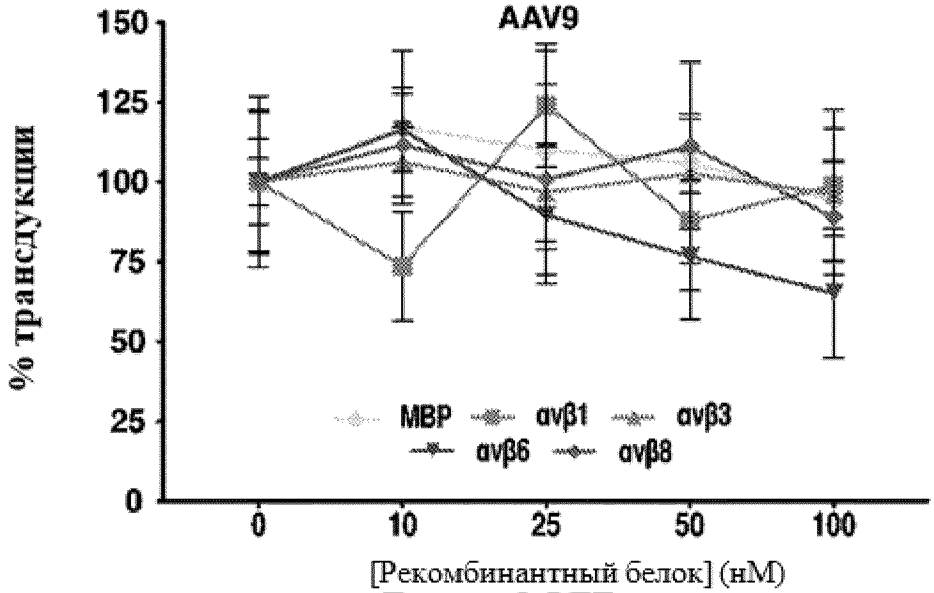
Фиг. 28E (продолжение)



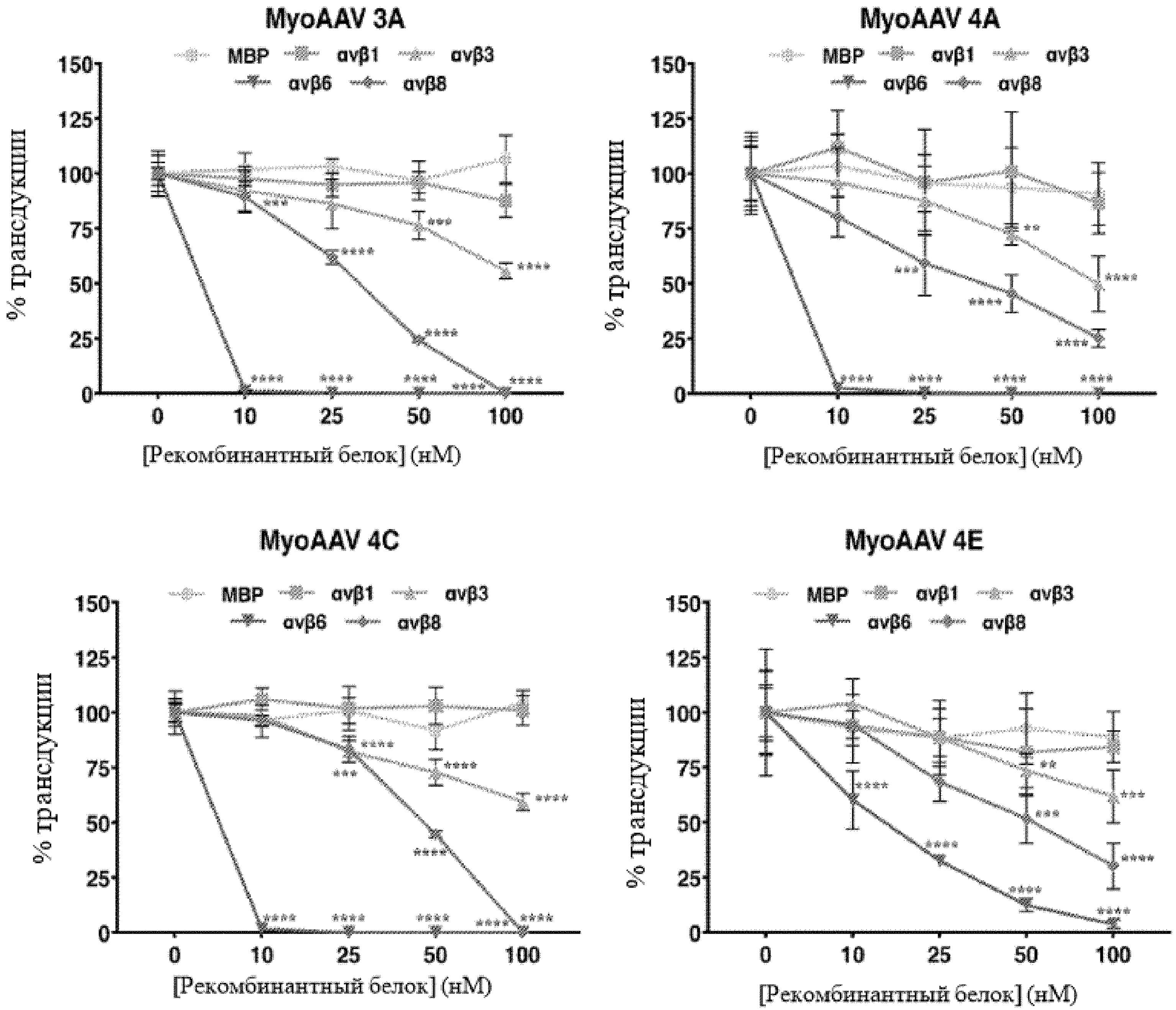
Фиг. 28F



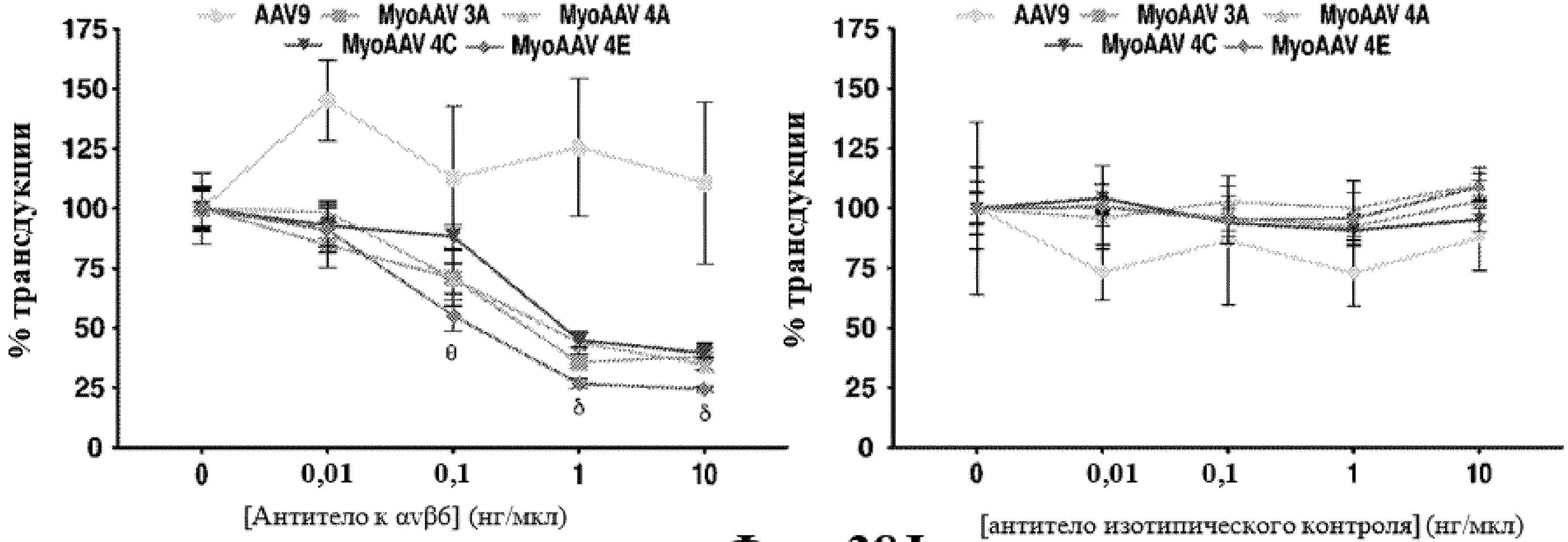
Фиг. 28G



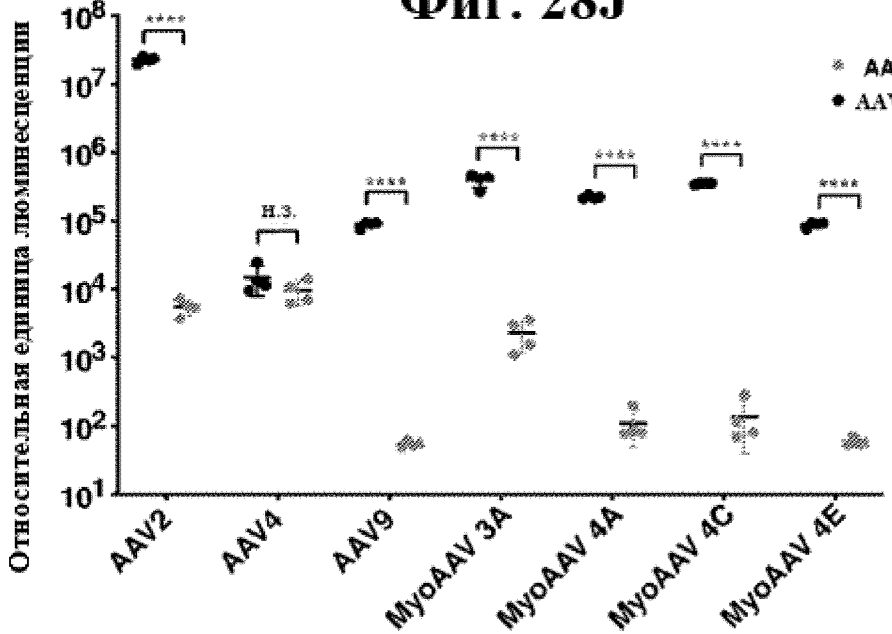
Фиг. 28H


MyoAAV 3A
MBP
αvβ1
αvβ3
αvβ6
αvβ8
% трансдукции
[Рекомбинантный белок] (нМ)
MyoAAV 4A
MBP
αvβ1
αvβ3
αvβ6
αvβ8
% трансдукции
[Рекомбинантный белок] (нМ)
MyoAAV 4C
MBP
αvβ1
αvβ3
αvβ6
αvβ8
% трансдукции
[Рекомбинантный белок] (нМ)
MyoAAV 4E
MBP
αvβ1
αvβ3
αvβ6
αvβ8
% трансдукции
[Рекомбинантный белок] (нМ)

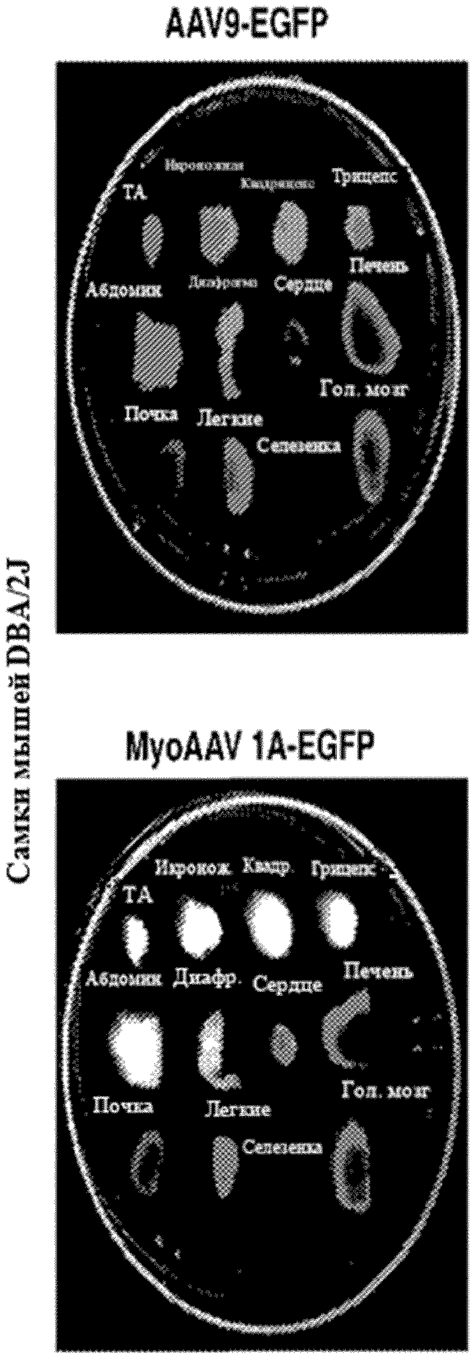
Фиг. 28I



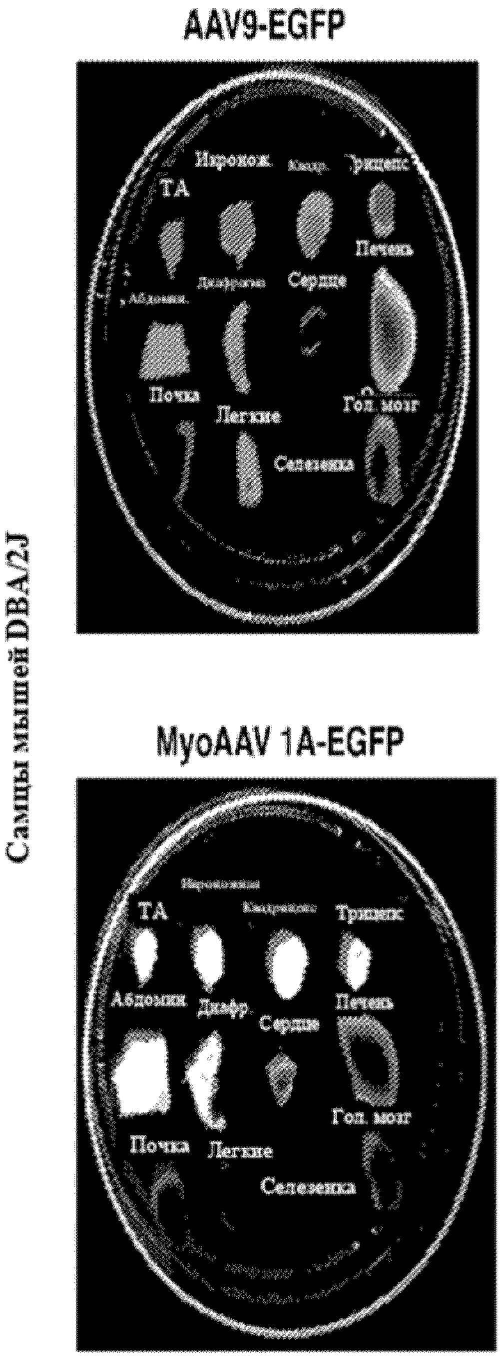
Фиг. 28J



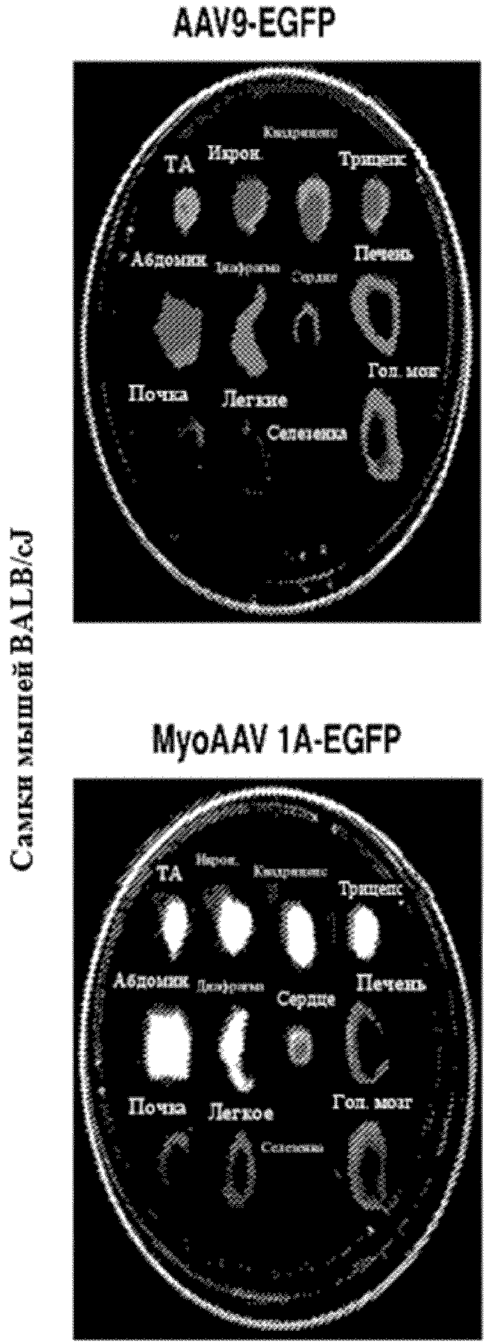
Фиг. 28K



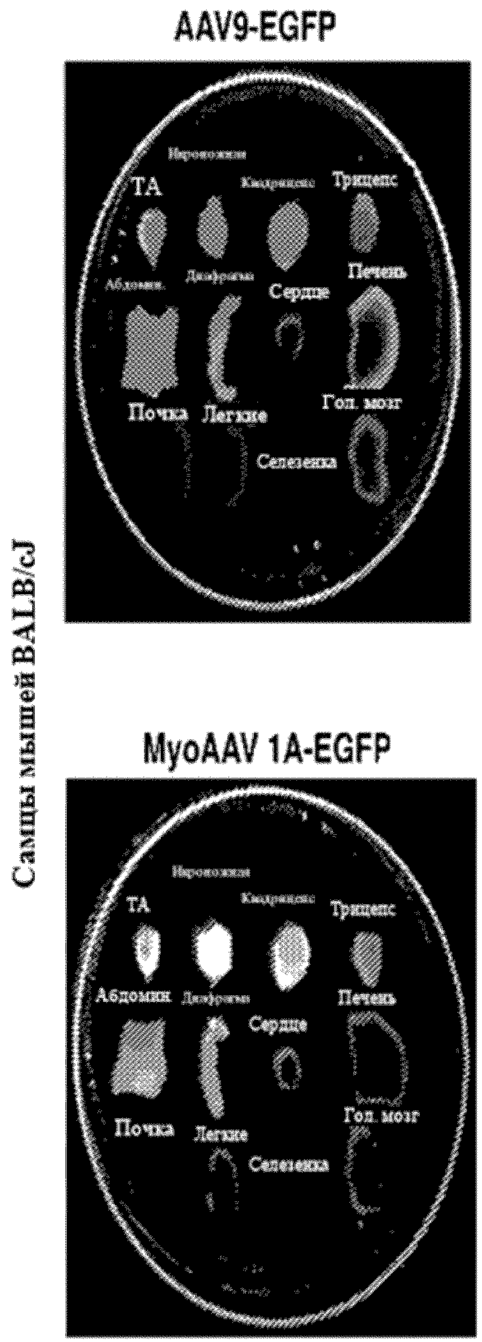
Фиг. 29A



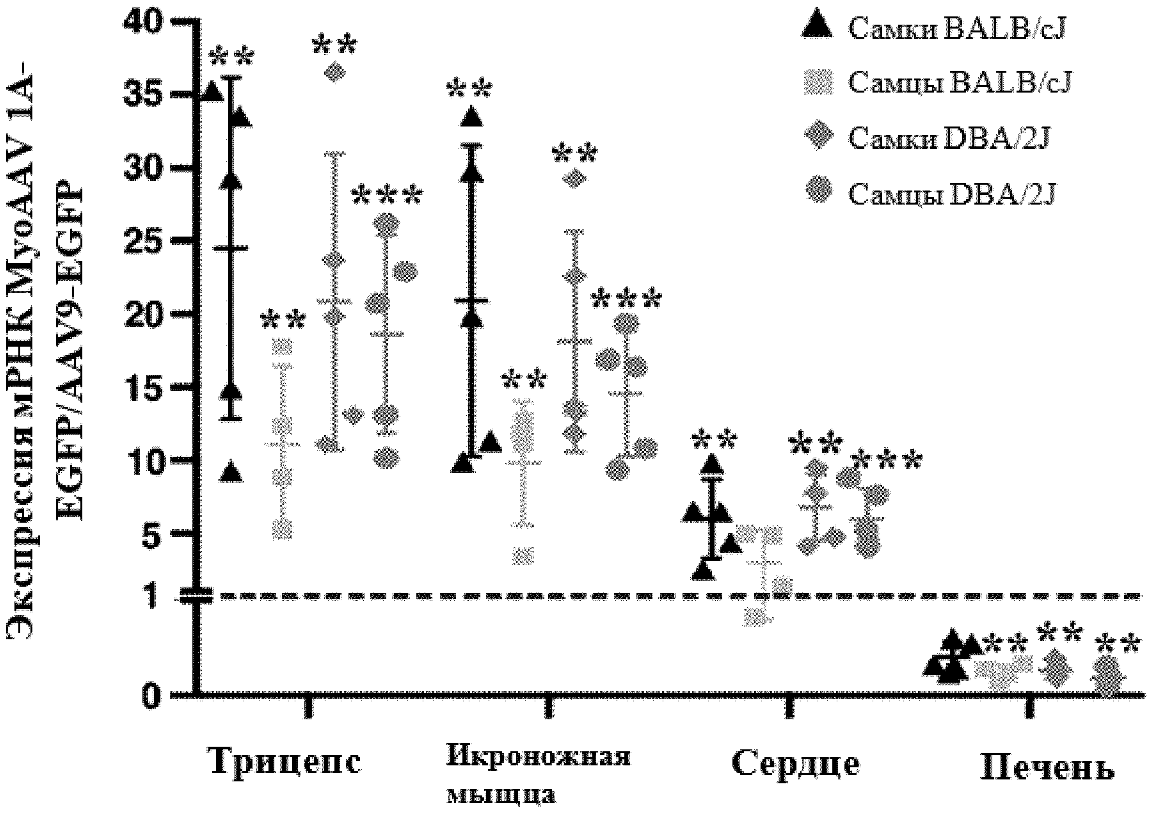
Фиг. 29B



Фиг. 29C

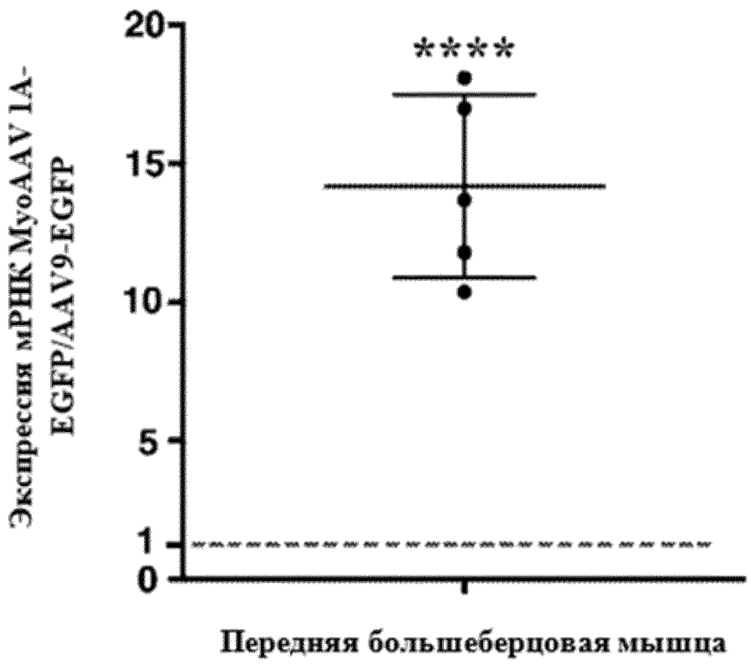


Фиг. 29D

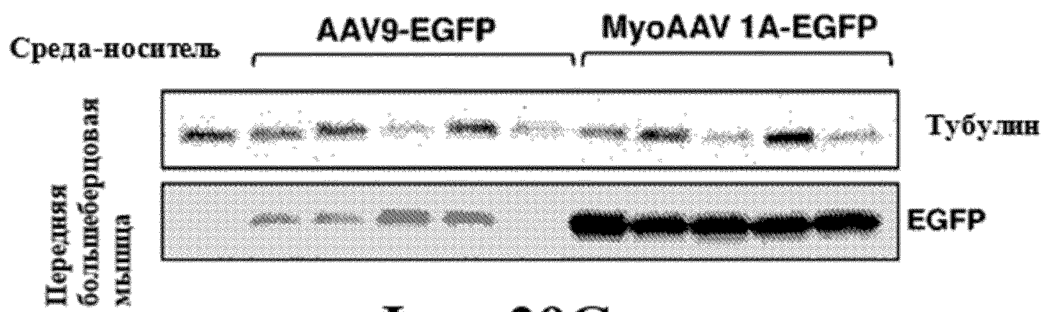


Экспрессия мРНК MyoAAV 1A-EGFP/AAV9-EGFP
40
35
30
25
20
15
10
5
1
0
Самки BALB/cJ
Самцы BALB/cJ
Самки DBA/2J
Самцы DBA/2J
Трицепс
Икроножная мыщца
Сердце
Печень

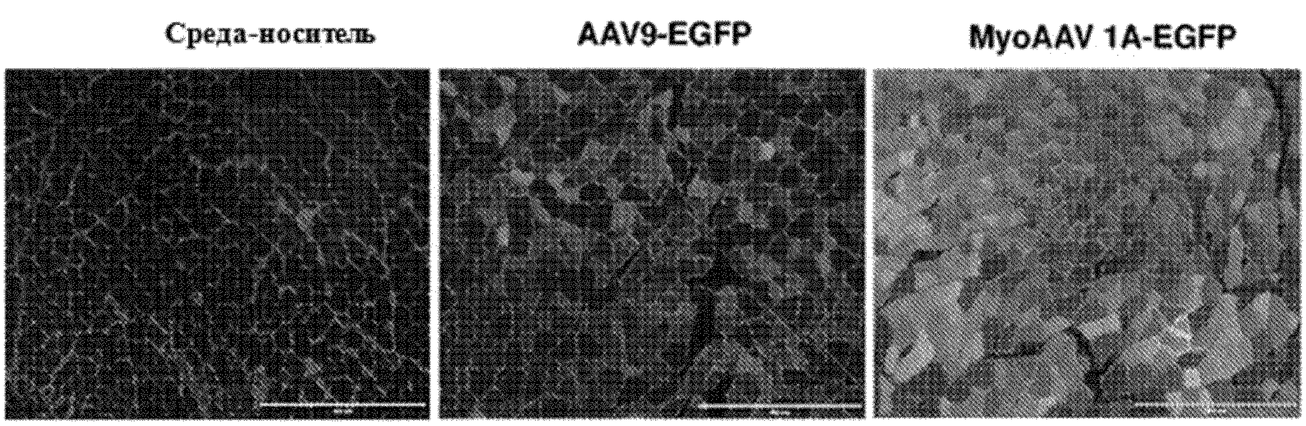
Фиг. 29E



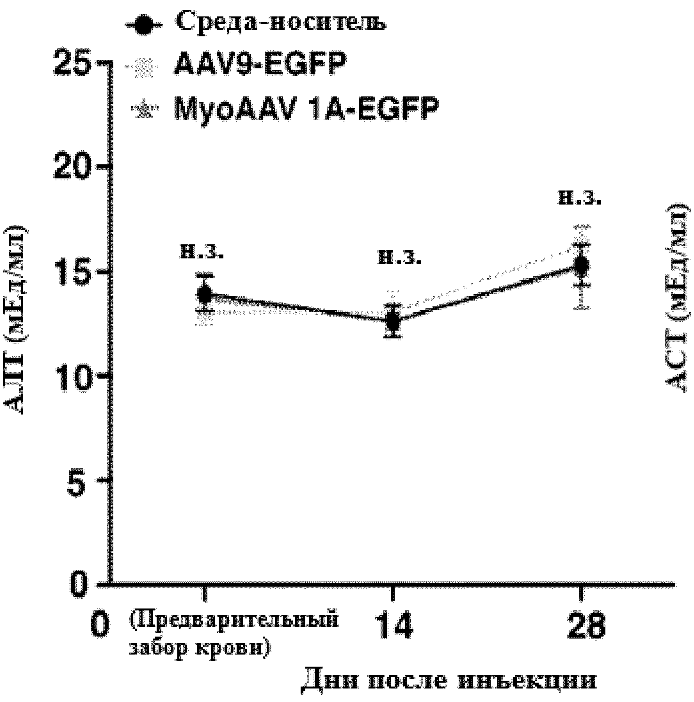
Фиг. 29F



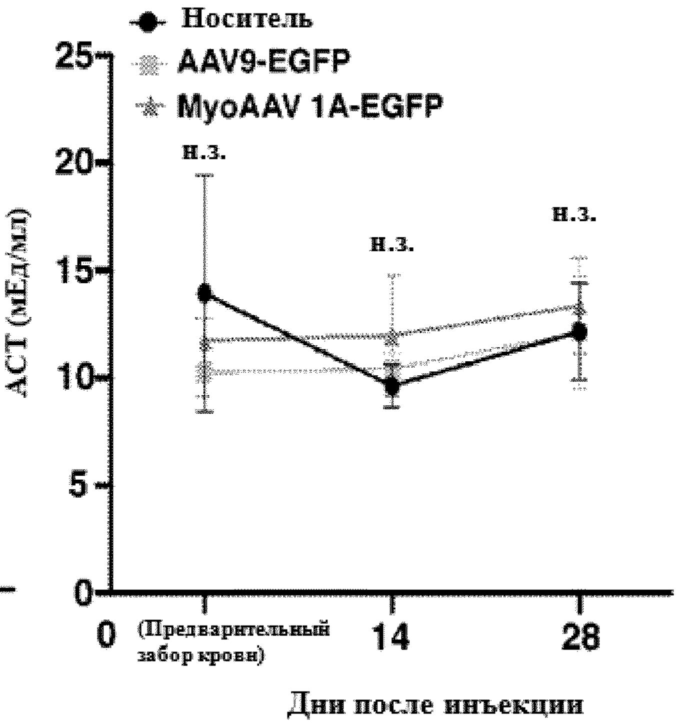
Фиг. 29G



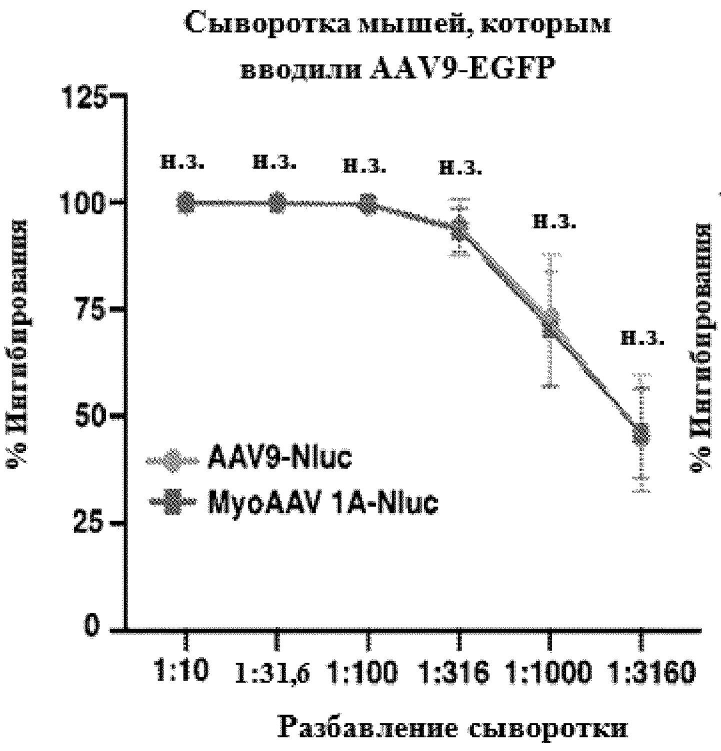
Фиг. 29H



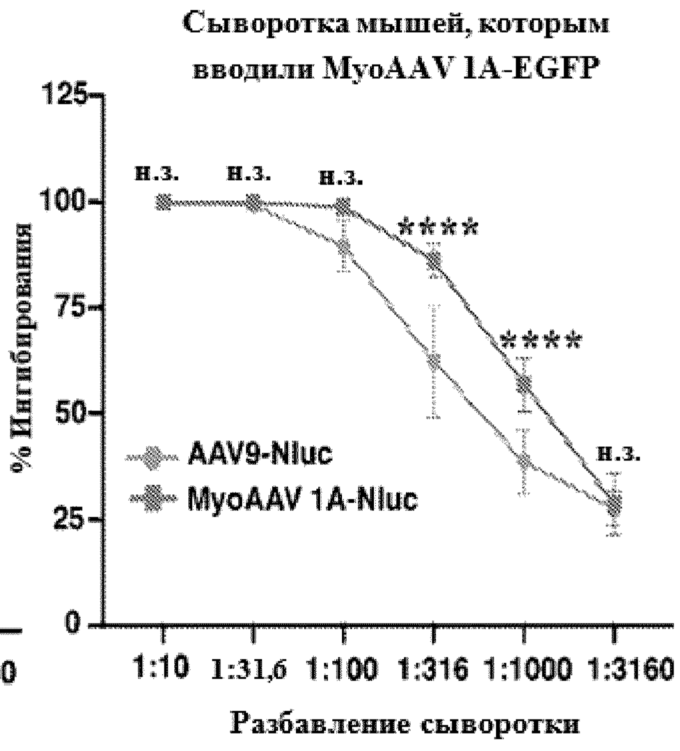
Фиг. 29I



Фиг. 29J



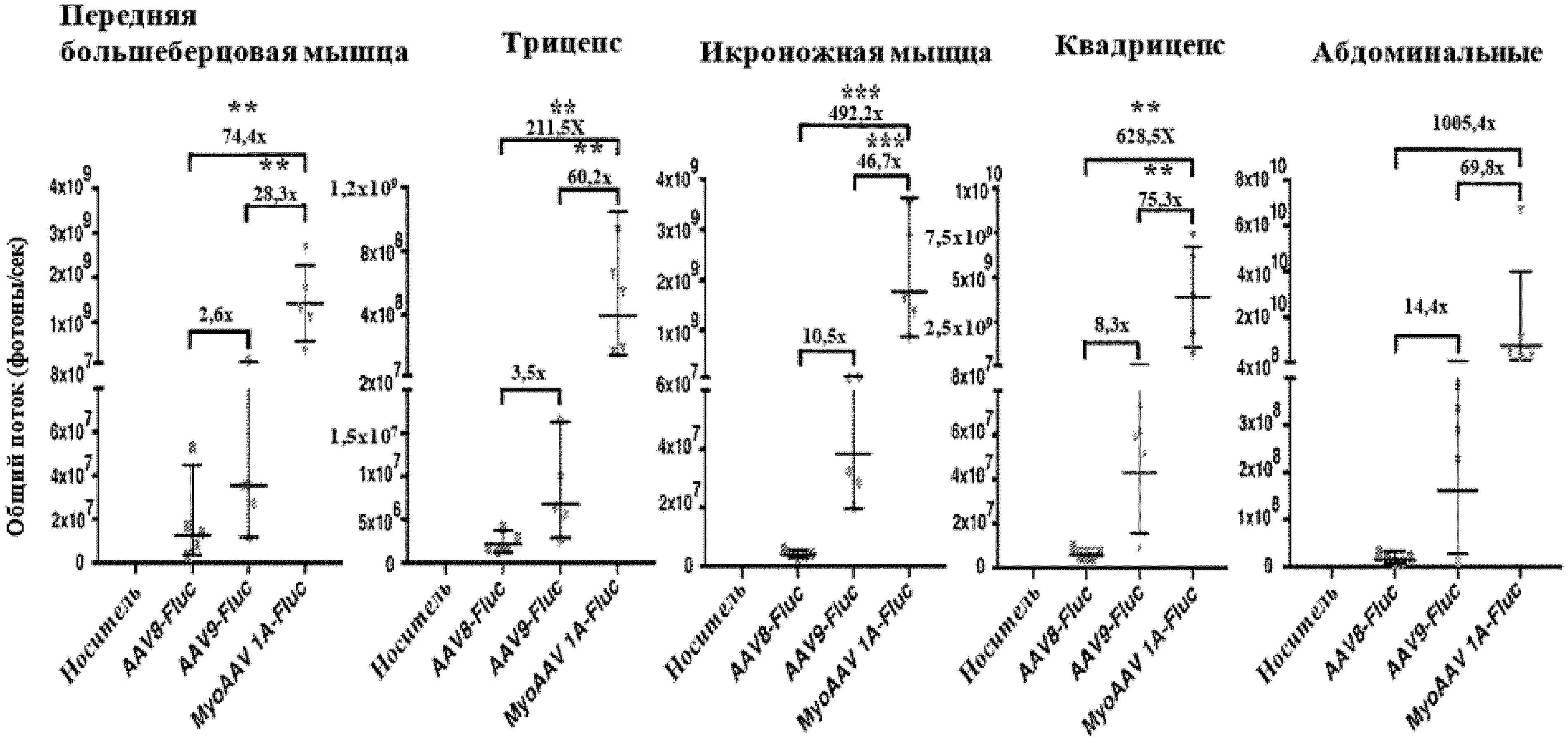
Фиг. 29K



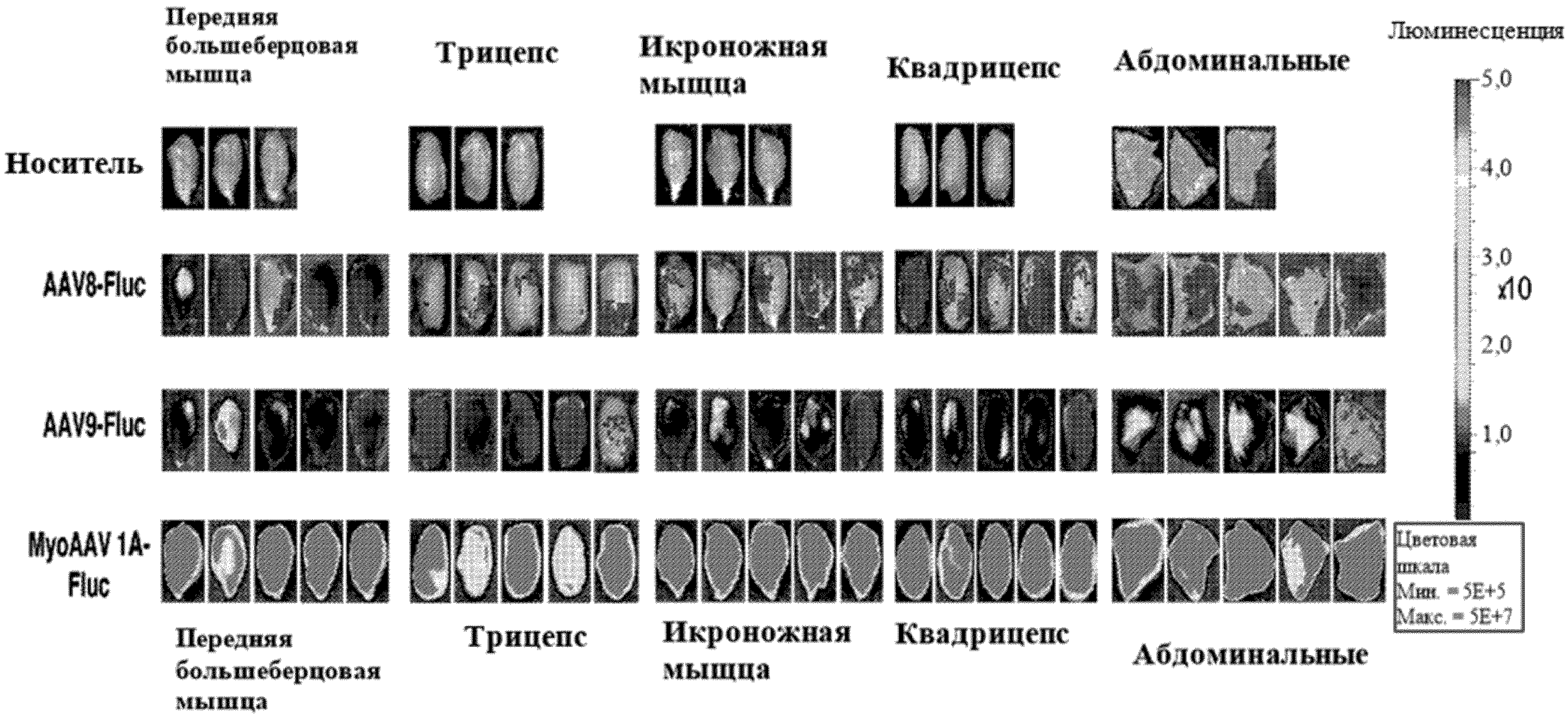
Фиг. 29L


Передняя большеберцовая мышца
Трицепс
Икроножная мышца
Квадрицепс
Абдоминальные
Люминесценция
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
Носитель
AAV8-Fluc
AAV9-Fluc
MyoAAV 1A-Fluc
Цветовая шкала
Мин. =1E+7
Макс. =1E+8

Фиг. 29M


Передняя большеберцовая мышца
Трицепс
Икроножная мышца
Квадрицепс
Абдоминальные
Общий поток (фотоны/сек)
74,4x
28,3x
2,6x
211,5X
60,2x
3,5x
492,2x
46,7x
10,5x
628,5X
75,3x
8,3x
1005,4x
69,8x
14,4x
Носитель
AAV8-Fluc
AAV9-Fluc
MyoAAV 1A-Fluc

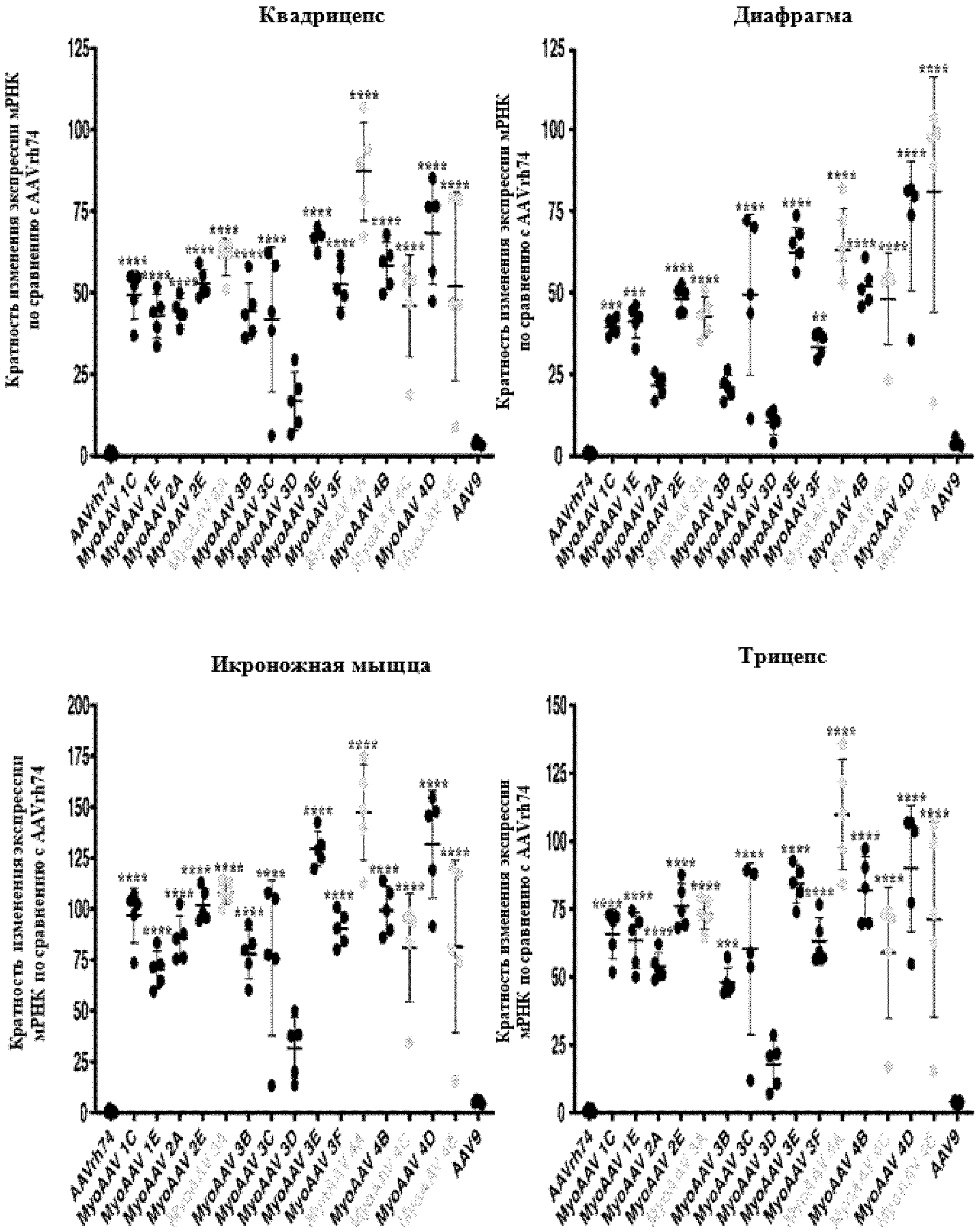
Фиг. 29N



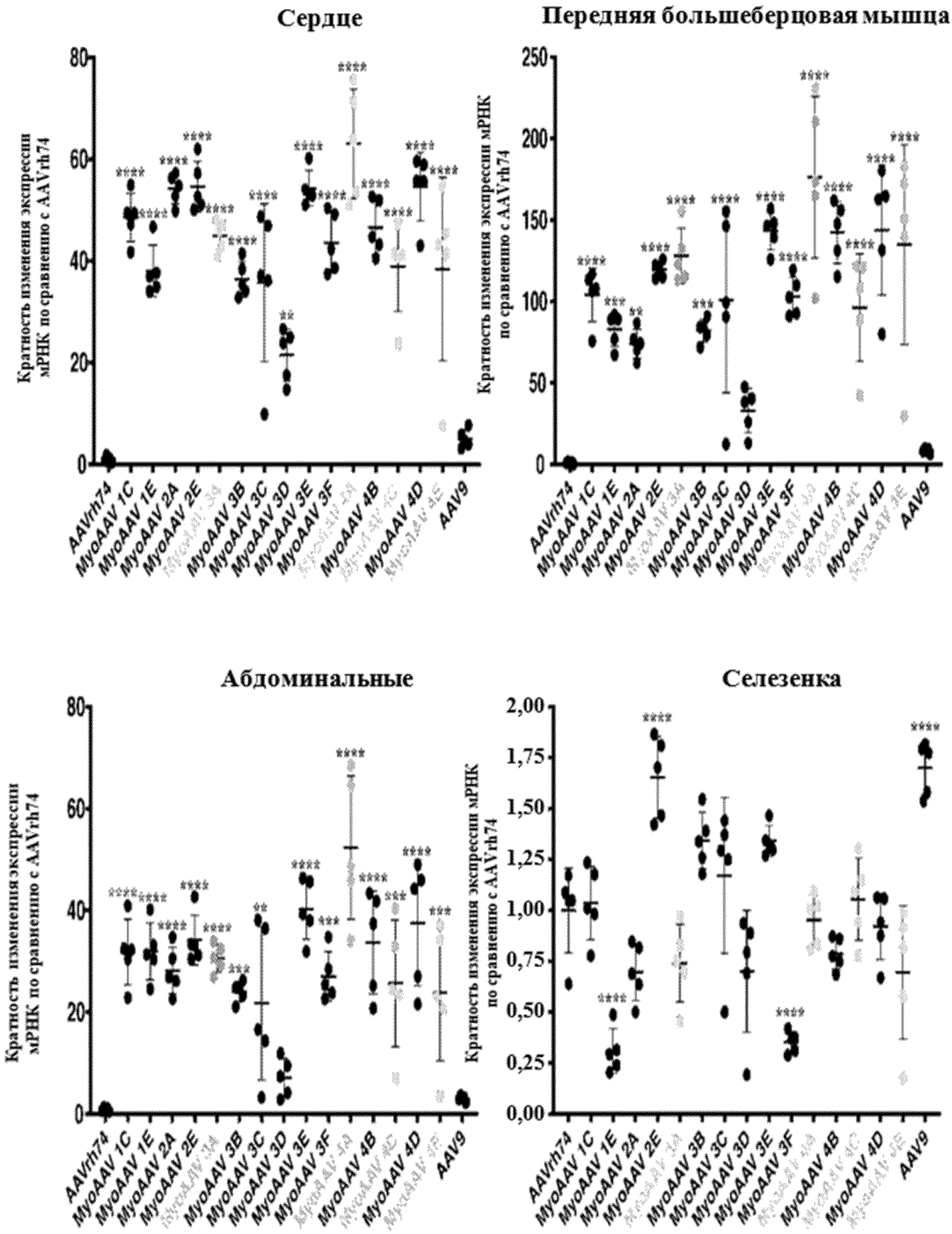
Передняя большеберцовая мышца
Трицепс
Икроножная мышца
Квадрицепс
Абдоминальные
Люминесценция
5,0
4,0
3,0
x10
2,0
1,0
Носитель
AAV8-Fluc
AAV9-Fluc
MyoAAV 1A-Fluc
Цветовая шкала
Мин. = 5E+5
Макс. = 5E+7
Передняя большеберцовая мышца
Трицепс
Икроножная мышца
Квадрицепс
Абдоминальные

Фиг. 29O

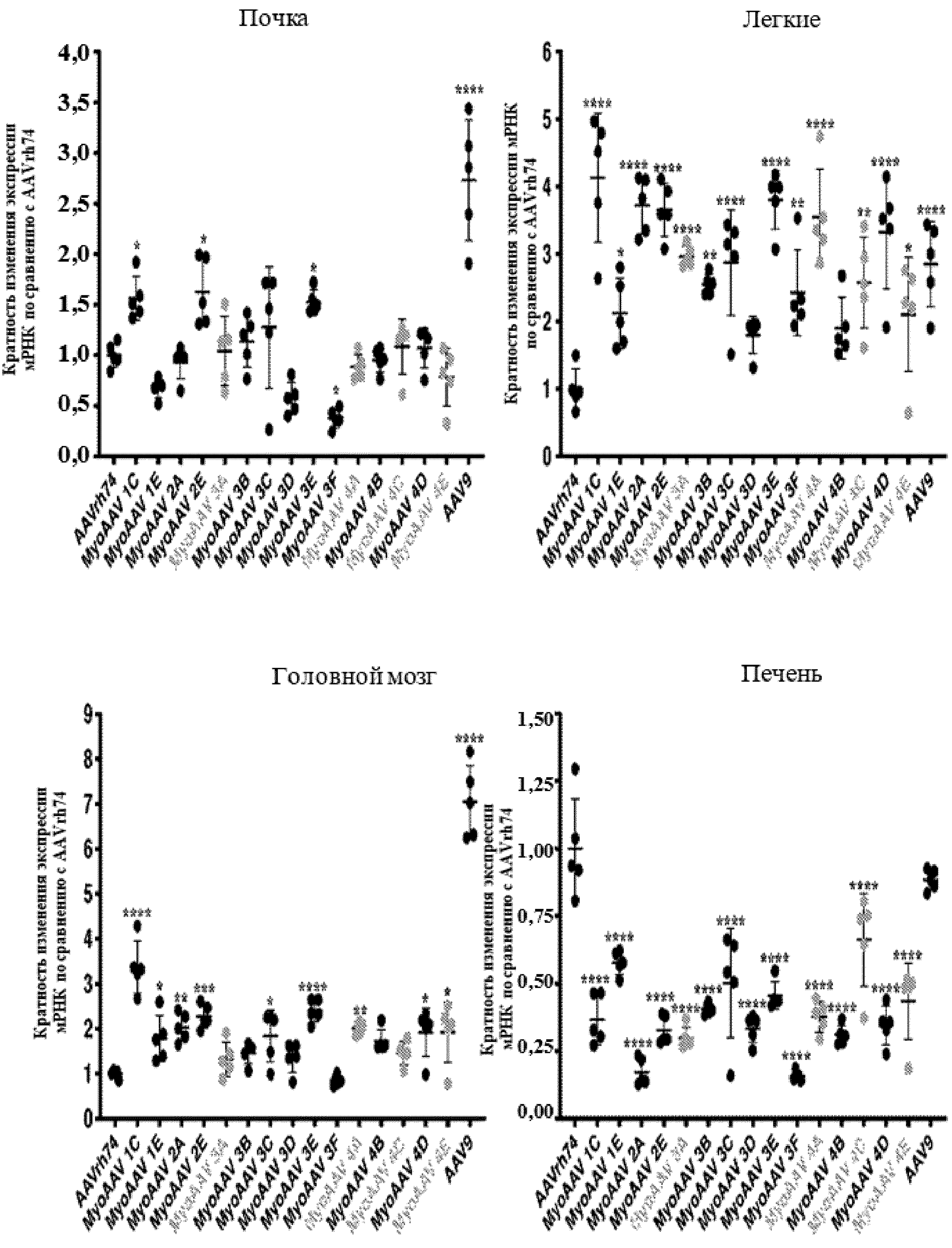
Ткани мыши C57BL/6J



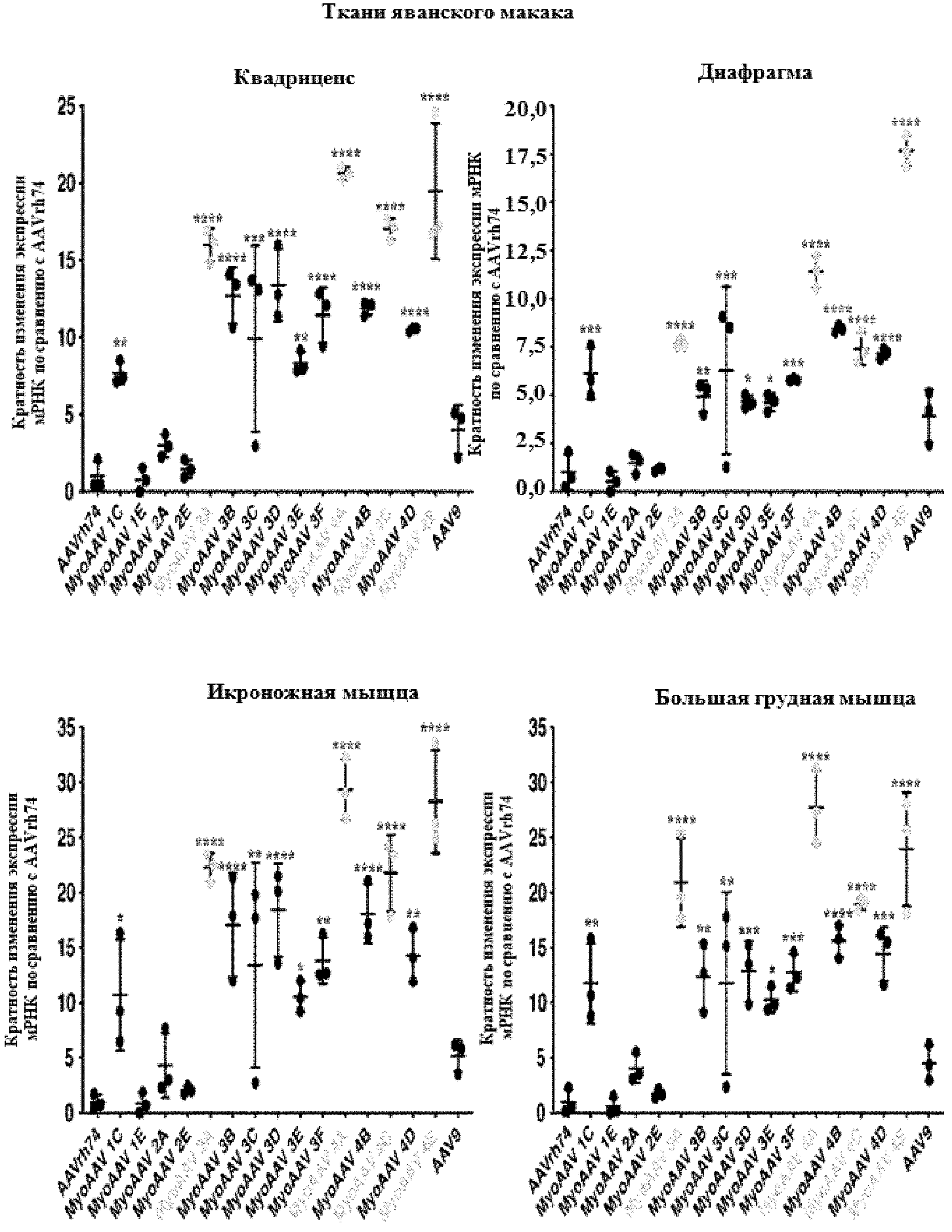
Фиг. 30A



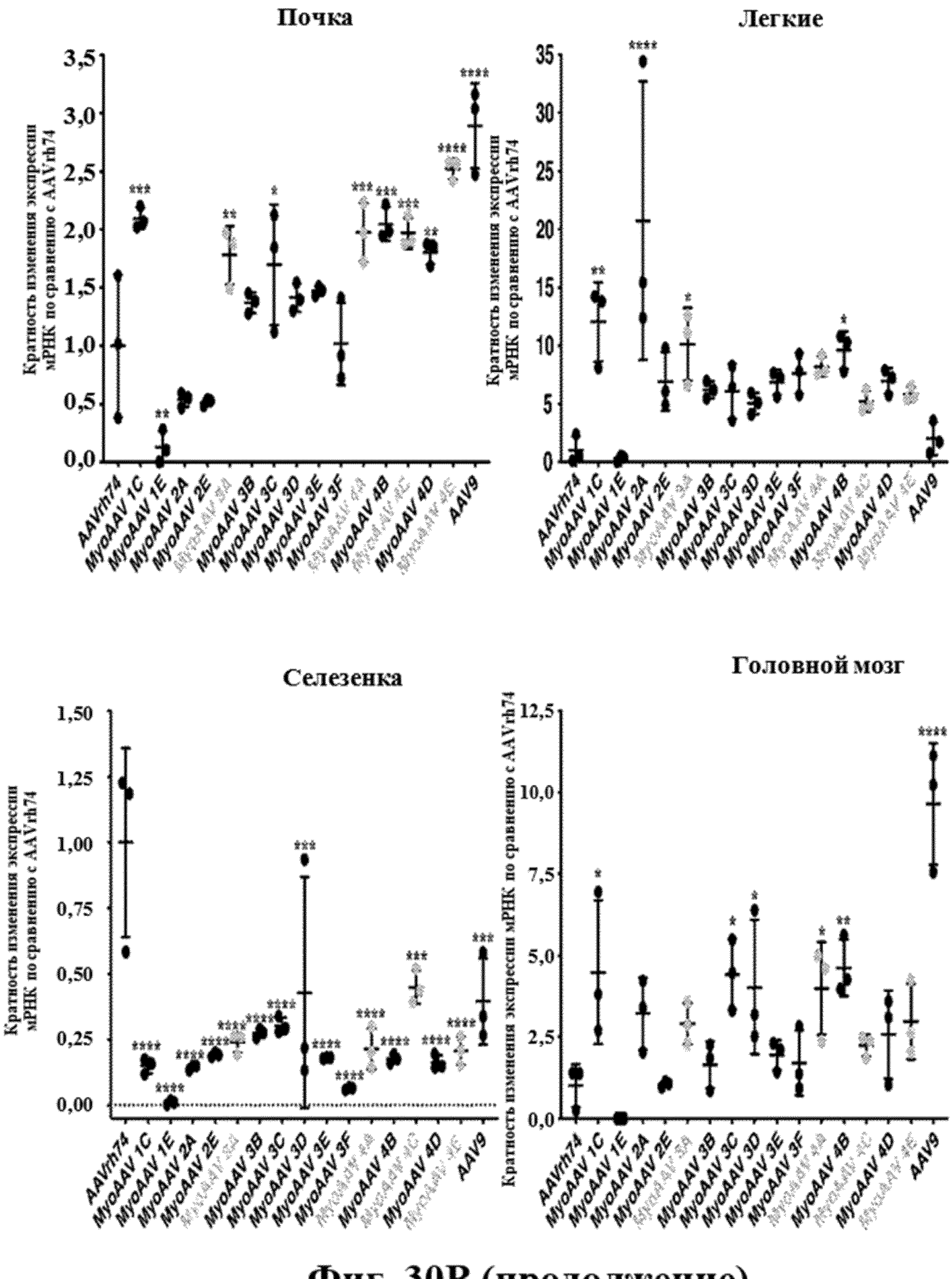
Фиг. 30А (продолжение)



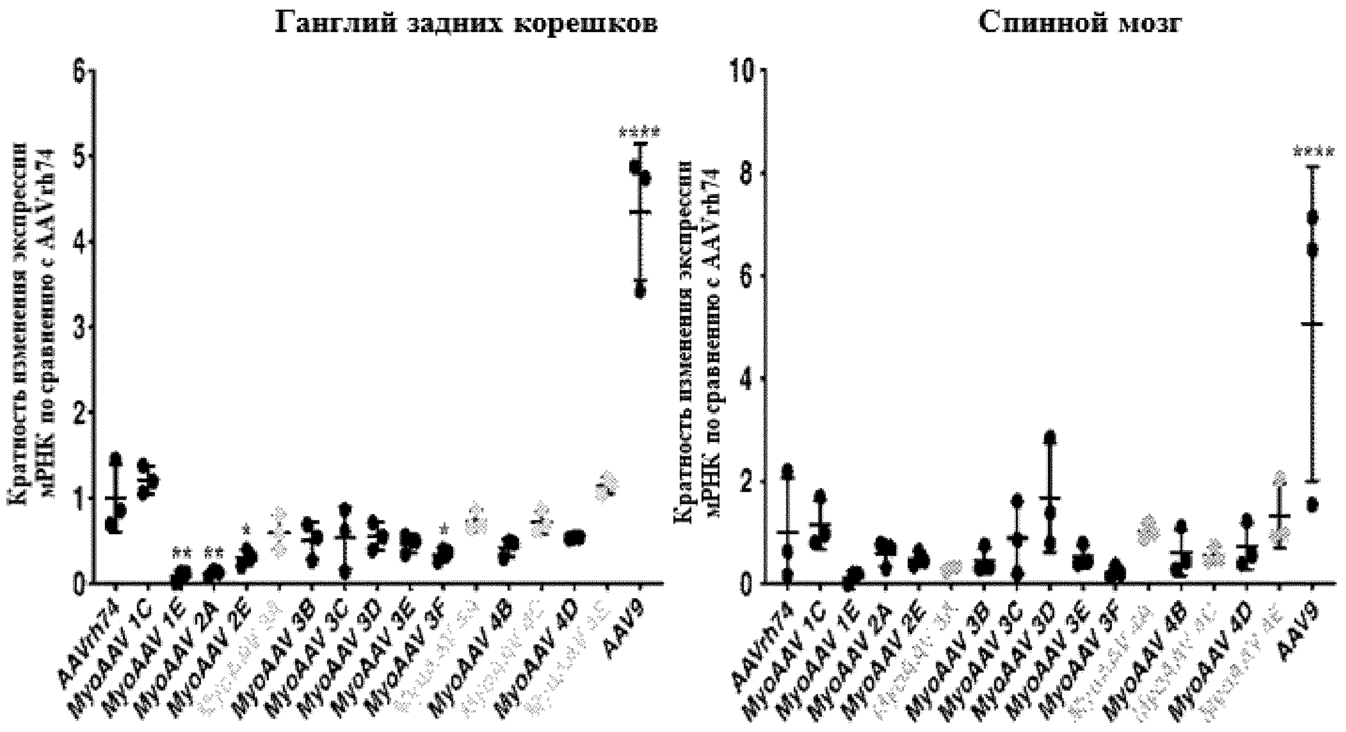
Фиг. 30A (продолжение)


Ткани яванского макака
Квадрицепс
Диафрагма
Икроножная мыщца
Большая грудная мыщца
Кратность изменения экспрессии мРНК по сравнению с AAVrh74
AAVrh74
MyoAAV 1C
MyoAAV 1E
MyoAAV 2A
MyoAAV 2E
MyoAAV 3B
MyoAAV 3C
MyoAAV 3D
MyoAAV 3E
MyoAAV 3F
MyoAAV 4B
MyoAAV 4D
AAV9

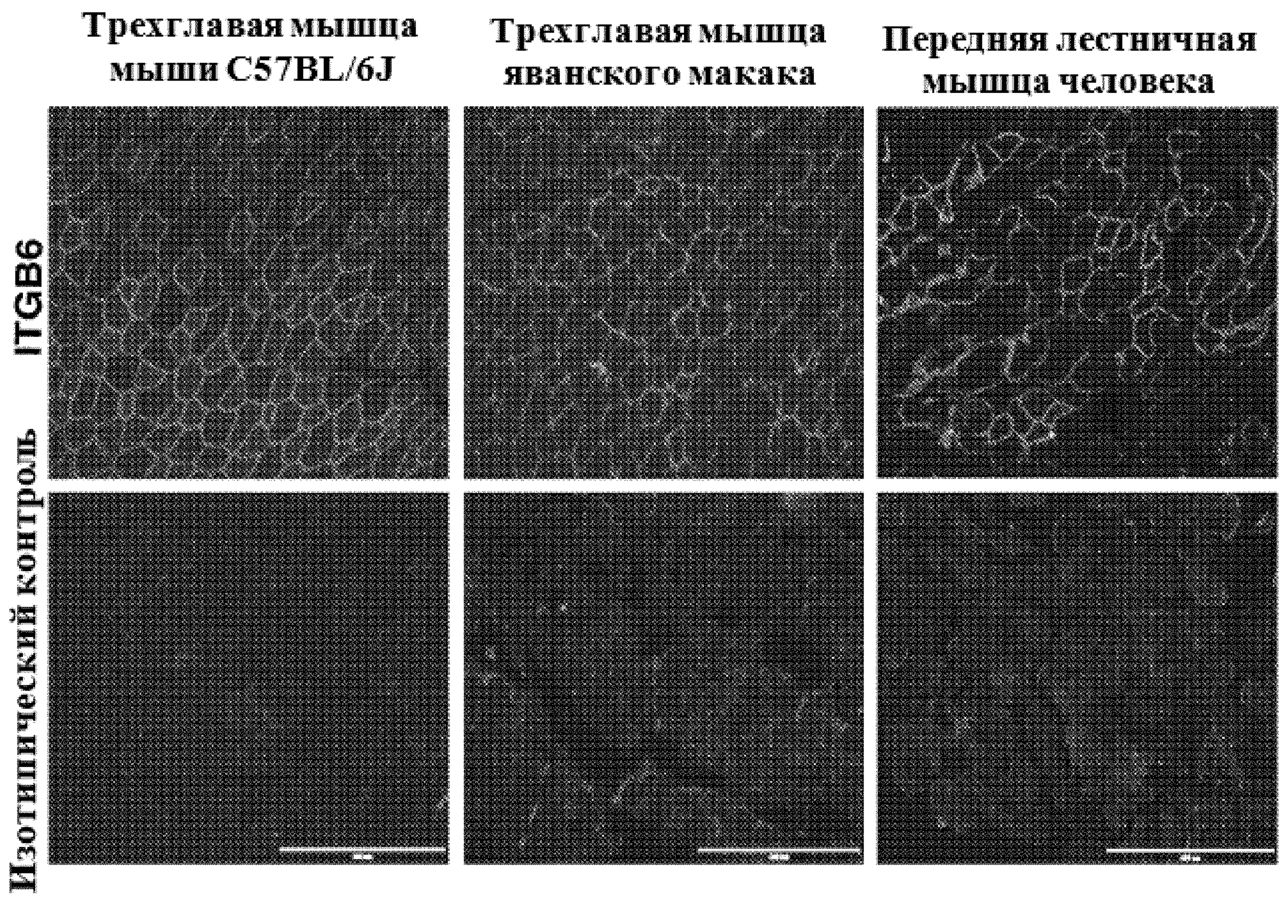
Фиг. 30B



Фиг. 30B (продолжение)



Фиг. 30B (продолжение)



Фиг. 30C