

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290691 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.10

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

(22) Дата подачи заявки
2020.08.28

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) 62/893,460; 62/968,387; 62/976,491;
62/985,597

(71) Заявитель:
Джи ТЕК БАЙО ЭлЭлСи (US)

(32) 2019.08.29; 2020.01.31; 2020.02.14;
2020.03.05

(72) Изобретатель:
Гумруксу Серхат (US)

(33) US

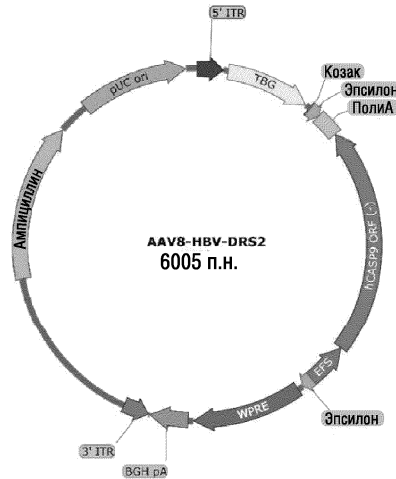
(86) PCT/US2020/048370

(74) Представитель:

(87) WO 2021/041787 2021.03.04

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлены способы и композиции, использующие конструкции рекомбинантных нуклеиновых кислот или вирусоподобную частицу с дефектом по репликации, кодирующую хемокин, цитокин или апоптоз-индуцирующий белок (например, каспазу 9 (Casp9)), или другие токсины в форме, которая может транскрибироваться только при наличии вирусной полимеразы. Эти способы могут быть адаптированы для воздействия на многие вирусные инфекции и снижения или устранения вирусной нагрузки, а также обеспечивают принципиально иное лечение вирусных инфекций.



202290691 A1

202290691 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573368EA/061

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/893,460, поданной 29 августа 2019 г.; предварительной заявки США № 62/968,387, поданной 31 января 2020 г.; предварительной заявки США № 62/976,491, поданная 14 февраля 2020 г.; и предварительной заявки США № 62/985,597, поданной 5 марта 2020 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В описании представлены способы и композиции, использующие рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот или вирусоподобную частицу с дефектом по репликации, кодирующую хемокин, цитокин или апоптоз-индуцирующий белок (например, каспазу 9 (Casp9)), в форме, которая будет транскрибироваться только в присутствии вирусной полимеразы. Эти способы могут быть адаптированы для воздействия на многие вирусные инфекции и снижения или устранения вирусной нагрузки, а также обеспечивают принципиально иное лечение вирусных инфекций.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирусные инфекции являются сложной проблемой глобального общественного здравоохранения. Некоторый прогресс был достигнут в лечении некоторых вирусных инфекций, но многие из этих методов лечения неэффективны или слишком дороги для большей части мира. Например, инфекция, вызванная вирусом гепатита В (HBV), используемая в качестве модели трудноизлечимых хронических вирусных инфекций, остается огромной проблемой общественного здравоохранения. С момента введения вакцинации против HBV риск передачи, включая вертикальную передачу от матери ребенку и горизонтальную передачу, резко снизился. Однако, по оценкам, 248 миллионов человек по-прежнему хронически инфицированы HBV во всем мире. Это ложится тяжелым социально-экономическим бременем на эндемичные регионы и страны. Клинические исходы хронического гепатита В (СНВ) сильно различаются: от спонтанного разрешения гепатита В до тяжелых неблагоприятных последствий, включая развитие печеночной недостаточности, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (НСС). Персистирующее или рецидивирующее некровоспаление печени, опосредованное противовирусным иммунитетом хозяина, является основной причиной прогрессирования заболевания, что в конечном итоге приводит к развитому фиброзу и канцерогенезу печени. Пожизненный риск тяжелых неблагоприятных исходов СНВ достигает 15-40%. Ранняя диагностика и своевременное противовирусное лечение лиц, входящих в группу риска, необходимы для профилактики развития неблагоприятных клинических исходов.

Таким образом, необходимы новые, более эффективные и более широко доступные методы лечения вирусных инфекций, таких как HBV. Одним из сложных аспектов разработки эффективных методов лечения вирусов является их сложный жизненный цикл,

тесно связанный с циклом клетки-хозяина. Например, персистенция HBV в инфицированных гепатоцитах обусловлена наличием ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), матрицы для транскрипции вирусных РНК. Противовирусная терапия аналогами нуклеозидов ингибирует репликацию ДНК HBV в капсидах, присутствующих в цитоплазме инфицированных клеток, но не уменьшает и не разрушает ядерную кзкДНК. Несмотря на некоторый прогресс, противовирусные препараты в настоящее время эффективны только против нескольких вирусных заболеваний.

Таким образом, для изменения направления лечения вирусных инфекций необходимы принципиально иные подходы к лечению.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе представлена последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая: молекулу нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулу нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующую хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию, фланкированные первым и вторым сигналами распознавания вирусной транскрипции, и дополнительно содержащую первый промотор в направлении (5') первого сигнала распознавания вирусной транскрипции и второй промотор, примыкающий и 5' к молекуле нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекуле нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью представляет собой отрицательно-полярную РНК, отрицательно-полярную ДНК, одно- или двухцепочечную ДНК, которая экспрессирует некодирующую отрицательно-полярную РНК или пгРНК, или любую их комбинацию.

В дополнительных вариантах осуществления, сигнал распознавания вирусной транскрипции выбран из вируса, выбранного из вируса с отрицательной цепью, вируса с обратной транскрипцией РНК или вируса с обратной транскрипцией ДНК.

В дополнительных вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит поли-А хвост ниже (3') молекулы нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулы нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию.

В дополнительных вариантах осуществления, апоптоз-индуцирующий белок, выбран из группы, состоящей из BAX, BID, BAK, BAD, каспазы 2, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 11, каспазы 12, цитохрома С, SMAC и апоптоз-индуцирующего фактора, или их комбинации.

В дополнительных вариантах осуществления, первый промотор содержит сильный убиквитиновый промотор или тканеспецифический промотор печени, выбранный из группы, состоящей из TBG (тироксинсвязывающего глобулина), промотора и/или энхансера альбумина, промотора AFP (альфа-фетопротейна), промотора ААТ (альфа-1-антитрипсина), промотора ApoE (*аполипопротеина E*) или промотора PEPCK (фосфоенолпируваткарбоксихиназы).

В дополнительных вариантах осуществления, второй промотор содержит последовательность, связывающую фактор элонгации 1 альфа (EFS).

В дополнительных вариантах осуществления, хемокин выбран из CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2 и CX3CL1.

В дополнительных вариантах осуществления, цитокин выбран из группы, состоящей из IL-15, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, IL-6, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , CD40L, Mig и Crg-2.

В дополнительных вариантах осуществления сигнал распознавания вирусной транскрипции содержит сигнал распознавания эpsilon (SEQ ID NO:1).

В дополнительных вариантах осуществления, вирус представляет собой вирус гепатита В, вирус гепатита D, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус парагриппа человека 1, вирус кори, вирус эпидемического паротита, респираторно-синцитиальный вирус человека, вирус везикулярного стоматита Индианы, вирус бешенства, вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Буньямвера, вирус Хантаан, вирус болезни овец Найроби, вирус сицилийской флеботомной лихорадки, вирус гриппа А, вирус гриппа С, вирус Тогото, вирус опухоли молочной железы мыши, вирус лейкоза мыши, вирус лейкоза птиц, вирус обезьян Мейсона-Пфайзера, вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус иммунодефицита человека 1, спумавирус человека, вирус гепатита В утки и их комбинация.

В дополнительных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты не содержит последовательности (кодирующие или не кодирующие) вирусной полимеразы, обратной транскриптазы, капсида, оболочки, сигнала упаковки или мотива транслокации.

В настоящем документе представлен вектор, содержащий любую из последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе.

В дополнительных вариантах осуществления, вектор содержит вектор доставки или носитель для доставки в клетку млекопитающего.

В дополнительных вариантах осуществления, вектор или носитель содержит VLP, аденоассоциированный вирус (AAV), липосому, наночастицу, мицеллу, полимерную везикулу или полимерному.

В настоящем документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая любую из последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, или любой из векторов, описанных в настоящем документе.

В настоящем документе представлена вирусоподобная частица с дефектом по репликации (VLP), содержащая:

необязательный мотив транслокации (TLM), слитый с капсидным белком из капсида вируса гепатита В или капсида вируса гепатита D; и

молекулу нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулу нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующую хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию, фланкированная первым и вторым сигналом распознавания вирусной транскрипции и дополнительно содержащая первый промотор в направлении (5') первого сигнала распознавания вирусной транскрипции и второго промотора, примыкающего и 5' к молекуле нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекуле нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию.

Кроме того, в настоящем документе представлена вирусоподобная частица с дефектом по репликации (VLP), содержащая:

молекулу нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулу нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующую хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию, фланкированную первым и вторым сигналом распознавания транскрипции вируса-мишени и дополнительно содержащую первый промотор в направлении (5') первого сигнала распознавания вирусной транскрипции, и второй промотор, примыкающий и 5' к молекуле нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекуле нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию, где VLP проявляет тропизм к клеткам-мишеням, инфицированным вирусом.

В дополнительных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью представляет собой отрицательно-полярную РНК, отрицательно-полярную ДНК, одно- или двухцепочечную ДНК, которая экспрессирует некодирующую отрицательно-полярную РНК или пгРНК, или любую их комбинацию.

В дополнительных вариантах осуществления вирусоподобная частица с дефектом по репликации (VLP), дополнительно содержит поли-А хвост в направлении (3') молекулы нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулы нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их сочетание.

В дополнительных вариантах осуществления, первый промотор содержит сильный убиквитиновый промотор или тканеспецифический промотор печени, выбранный из группы, состоящей из ТВГ (тироксинсвязывающий глобулин), промотора и/или энхансера альбумина, промотора АФР (альфа-фетопротейна), промотора ААТ (альфа-1-антитрипсина), промотора АроЕ (*apolipoproteina E*) или промотора РЕРСК (фосфоенолпируваткарбоккиназа).

В дополнительных вариантах осуществления, второй промотор содержит последовательность, связывающую фактор элонгации 1 альфа (EFS).

В дополнительных вариантах осуществления, сигнал распознавания вирусной транскрипции выбран из вируса, выбранного из вируса с отрицательной цепью, вируса с обратной транскрипцией РНК или вируса с обратной транскрипцией ДНК.

В дополнительных вариантах осуществления, сигнал распознавания вирусной транскрипции содержит сигнал распознавания эpsilon (SEQ ID NO:1).

В дополнительных вариантах осуществления, апоптоз-индуцирующий белок, выбран из группы, состоящей из BAX, BID, BAK, BAD, каспазы 2, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 11, каспазы 12, цитохрома C, SMAC и апоптоз-индуцирующего фактора.

В дополнительных вариантах осуществления, хемокин выбран из CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2 и CX3CL1.

В дополнительных вариантах осуществления, цитокин выбран из группы, состоящей из IL-15, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, IL-6, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , CD40L, Mig и Crg-2.

В дополнительных вариантах осуществления вирус представляет собой вирус гепатита В, вирус гепатита D, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус парагриппа человека 1, вирус кори, вирус эпидемического паротита, респираторно-синцитиальный вирус человека, вирус везикулярного стоматита Индиана, вирус бешенства, вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Буньямвера, вирус Хантаан, вирус болезни овец Найроби, вирус сицилийской флеботомной лихорадки, вирус гриппа А, вирус гриппа С, вирус Тогото, вирус опухоли молочной железы мыши, вирус лейкоза мыши, вирус лейкоза птиц, вирус обезьяны Мейсона-Пфайзера, вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус иммунодефицита человека 1, спумавирус человека, вирус гепатита В уток и их комбинацию.

В дополнительных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты не содержит последовательности (кодирующие или некодирующие) для вирусного капсида, полимеразы, обратной транскриптазы, оболочки, упаковочного сигнала или транслокационных мотивов.

Кроме того, представлена фармацевтическая композиция, содержащая любую из вирусоподобных частиц с дефектом, описанных в настоящем документе.

Кроме того, представлен способ лечения вирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, способ, включающий введение субъекту молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, или вектора, описанного в настоящем документе, или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, или вирусоподобной частицы с дефектом по репликации, описанных в настоящем документе.

В дополнительных вариантах осуществления, вирусная инфекция включает инфекцию, вызванную вирусом, классифицированным по Балтиморской классификации IV, V, VI или VII.

В дополнительных вариантах осуществления вирусная инфекция включает инфекцию, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса гепатита В, вируса гепатита D, вируса Эбола, вируса Марбург, вируса парагриппа 1 человека, вируса

кори, вируса эпидемического паротита, респираторно-синцитиального вируса человека, вируса везикулярного стоматита Индианы, вируса бешенства, вируса эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, вируса лимфоцитарного хориоменингита, вируса Буньямвера, вируса Хантаан, вируса болезни овец Найроби, вируса сицилийской флеботомной лихорадки, вируса гриппа А, вируса гриппа С, вируса Тогото, вируса опухоли молочной железы мыши, вируса лейкоза мыши, вируса лейкоза птиц, вируса обезьяны Мейсона-Пфайзера, вируса лейкоза крупного рогатого скота, вируса иммунодефицита человека 1, спумавируса человека, вируса гепатита В уток и их комбинации.

В дополнительных вариантах осуществления вирусная инфекция включает инфекцию, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из гриппа А, В, С и/или любого коронавируса, и/или любого вируса из группы IV Балтиморской классификации.

В дополнительных вариантах осуществления, вирусная инфекция включает инфекцию, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из филовируса, парамиксовируса, морбилливируса, рубулавируса, пневмовируса, везикуловируса, лиссавриуса, эфемеровируса, аренавируса, буньявируса, хантавируса, найровируса, флебовируса, ортогепаднавируса, авигепаднавируса, ретровирусов млекопитающих типа В, ретровирусов млекопитающих типа С, ретровирусов птичьего типа С, ретровирусов типа D, ретровирусов BLV-HTLV, лентивирусов, спумавирусов и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, вирусная инфекция включает инфекцию от коронавируса, такого как вирус, называемый COVID-19, SARS или MERS.

В дополнительных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, вектор, фармацевтическая композиция или вирусоподобная частица с дефектом по репликации при введении проникают в клетку печени.

В дополнительных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, вектор, фармацевтическая композиция или вирусоподобная частица с дефектом по репликации при введении доставляет молекулу нуклеиновой кислоты в клетку печени, и молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется в клетке печени.

В дополнительных вариантах осуществления, у субъекта имеется острая, хроническая или латентная вирусная инфекция.

В дополнительных вариантах осуществления, введение индуцирует иммунный ответ против клетки, инфицированной вирусом, вызывающим вирусную инфекцию.

В дополнительных вариантах осуществления, введение индуцирует апоптоз в клетках, инфицированных вирусом, вызывающим вирусную инфекцию.

Кроме того, представлен способ индукции иммунного ответа против клетки, инфицированной вирусом, у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает контакт субъекта с любой из молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем документе, или векторами, описанными в настоящем документе, или фармацевтическими композициями, описанными в настоящем документе, или

вирусоподобными частицами с дефектом по репликации, описанными в настоящем документе.

Кроме того, представлен способ индукции апоптотического ответа против клетки, инфицированной вирусом, у субъекта, нуждающегося в этом, способ, включающий контакт субъекта с любой из молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем документе, или векторами, описанными в настоящем документе, или фармацевтическими композициями, описанными в настоящем документе, или вирусоподобными частицами с дефектом по репликации, описанными в настоящем документе.

В дополнительных вариантах осуществления, вирус представляет собой HBV, HDV, вирус гепатита А (HAV), вирус гепатита С (HCV) или любую их комбинацию.

Кроме того, представлен способ лечения гепатита В у субъекта, включающий введение субъекту молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, или вектора, описанного в настоящем документе, или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, или вирусоподобной частицы с дефектом по репликации, описанной в настоящем документе.

В дополнительных вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение, по меньшей мере, одного противовирусного агента, ингибитора полимеразы HBV, интерферона, модуляторов TLR, таких как агонисты TLR-7 или агонисты TLR-9, терапевтических вакцин, иммунного активатора определенных клеточных сенсоров вирусной РНК, ингибитора проникновения вируса, ингибитора созревания вируса, модулятора сборки отдельного капсида, противовирусных соединений с другим или неизвестным механизмом, и любой их комбинации.

В дополнительных вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение, по меньшей мере, одного противовирусного агента ЗТС, FTC, L-FMAU, интерферона, адефовира дипивоксила, энтекавира, телбивудина (L-dT), валторцитабина (3'-валинил L-dC), бета.-D-диоксоланилгуанина (DXG), бета.-D-диоксоланил-2,6-диаминопурина (DAPD), бета.-D-диоксоланил-6-хлорпурина (ACP), фамцикловира, пенцикловира, лобукавира, ганцикловира, рибавирина и любой их комбинации.

В дополнительных вариантах осуществления, лечение проводят периодически, в том числе один раз в неделю, один раз каждые 2 недели, один раз каждые 3 недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые 3 месяца, один раз каждые 4 месяца, один раз каждые от 5 месяцев, один раз каждые 6 месяцев или один раз каждые 7 месяцев, или один раз каждые 8 месяцев, или один раз каждые 9 месяцев, или один раз каждые 10 месяцев, или каждые 11 месяцев, или один раз в год в качестве поддерживающей терапии, или так долго как пациенту требуется для достижения стабильного или неопределяемого заболевания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГУРА 1А и **ФИГУРА 1В** включают карту плазмиды и схему рекомбинантной конструкции, показывающую особенности конструкции AAV8-HBV-DRS2 (6005 п.н.).

ФИГУРА 2А, ФИГУРА 2В и ФИГУРА 2С иллюстрируют неограничивающую карту плазмиды, график, показывающий данные о жизнеспособных клетках тестируемых и контрольных конструкций в клетках НерG2 (дикого типа) и клетках НерAD38, а также числовые данные для эксперимента 1.

ФИГУРА 3А и ФИГУРА 3В иллюстрируют неограничивающую карту плазмиды и химическую структуру ингибитора каспазы-9, а также график, показывающий данные о жизнеспособных клетках тестируемых и контрольных конструкций в клетках НерG2 (дикого типа) для эксперимента 2.

ФИГУРА 4А, ФИГУРА 4В и ФИГУРА 4С иллюстрируют неограничивающую карту плазмиды и химическую структуру ингибитора каспазы-9 (ФИГУРА 4А), график, показывающий данные о жизнеспособных клетках тестируемых и контрольных конструкций в клетках НерAD38 (модельные клетки HBV) (ФИГУРА 4В) вместе с числовыми данными для эксперимента 2 (ФИГУРА 4С).

ФИГУРА 5А и ФИГУРА 5В показывают карту плазмиды (ФИГУРА 5А) и сравнительный график (ФИГУРА 5В), демонстрирующий результаты для тестируемых и контрольных конструкций в клетках НерG2 и НерAD38 для эксперимента 2.

ФИГУРА 6А, ФИГУРА 6В и ФИГУРА 6С показывают карту плазмиды для тестовой конструкции AAV-HBV-DRS2 (TBG>HBV-rcCasp9) и химическую структуру ингибитора каспазы-9 (ФИГУРА 6А), и сравнительный график, показывающий данные о жизнеспособных клетках тестируемых и контрольных конструкций в клетках НерG2 по сравнению с клетками НерAD38 (ФИГУРА 6В), а также числовые данные для эксперимента 3 (ФИГУРА 6С).

ФИГУРА 7 представляет собой карту плазмиды и схему конструкции, показывающую особенности конструкции и последовательностей AAV8-HBV-DRS1.

ФИГУРА 8 представляет собой карту плазмиды и схему конструкции, показывающую особенности конструкции и последовательностей AAV8-HBV-DRS2.

ФИГУРА 9 представляет собой схему, иллюстрирующую тестирование *in vivo* с использованием модели мышей для оценки распределения, эффективности, специфичности/функциональности и безопасности таргетируемых рекомбинантных конструкций.

ФИГУРА 10А и ФИГУРА 10В представляют собой схему и график, показывающие, как «векторы захвата/самоубийства гриппа» захватывают вирусный механизм, вызывая апоптоз в инфицированных клетках (ФИГУРА 10А), и результаты *in vitro*, показывающие, что тестируемые конструкции, доставленные в *транс* для вовлечения с гриппозной полимеразой захватывает вирусный механизм, вызывая гибель клеток в клетках, инфицированных гриппом, на 40% быстрее, чем в необработанных инфицированных клетках (ФИГУРА 10В).

ФИГУРА 11А, ФИГУРА 11В и ФИГУРА 11С представляют собой изображения, графики и схемы, показывающие результаты с использованием конструкций захвата HBV в мышинных моделях.

ФИГУРА 12А и **ФИГУРА 12В** представляют собой схемы, показывающие обзор дизайна коронавируса конструкции «захватной РНК».

ФИГУРА 13 иллюстрирует схему, показывающую механизм действия захватной РНК SARS-CoV-2 в клетках, инфицированных SARS-CoV-2.

ФИГУРА 14 иллюстрирует неограничивающую карту плазмиды и схему конструкции, показывающую особенности и последовательность *in vitro* вектора транскрипции Cov-2 Hijack DTA.

ФИГУРА 15 иллюстрирует неограничивающую карту плазмиды и схему конструкции, показывающую особенности и последовательность конструкции захватной РНК для SARS-CoV-2.

ФИГУРА 16А и **ФИГУРА 16В** представляют собой сравнительные графики, показывающие жизнеспособность клеток, инфицированных или не инфицированных SARS-CoV-2, после обработки тестируемыми или контрольными конструкциями.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В некоторых вариантах осуществления, способы и композиции, использующие рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот или вирусоподобные частицы с дефектом по репликации, кодирующие хемокин, цитокин или апоптоз-индуцирующий белок (например, каспаза 9 (Casp9) и другие, представленные в настоящем документе), которые будут транскрибироваться только в присутствии вирусной полимеразы. В некоторых вариантах осуществления, конструкции несут последовательности, кодирующие Casp9, что приводит к уничтожению инфицированных вирусом клеток. Эти способы могут быть адаптированы для воздействия на многие вирусные инфекции и снижения или устранения вирусной нагрузки, а также обеспечивают принципиально иное лечение вирусных инфекций.

Использование вирусного механизма для уничтожения инфицированных вирусом клеток

Не желая быть связанными какой-либо теорией, настоящие способы и композиции основаны, по меньшей мере, частично на использовании вирусного механизма, присутствующего обычно в цитоплазме инфицированной клетки. В некоторых вариантах осуществления, направление или инъекция конструкции рекомбинантной нуклеиновой кислоты или вирусоподобной частицы с дефектом по репликации (VLP) в инфицированную вирусом клетку, где конструкция или VLP содержит конструкцию нуклеиновой кислоты с одноцепочечной РНК, содержащую последовательность, кодирующую хемокин, цитокин или апоптоз-индуцирующий белок, например, Casp 9 (и его промотор), фланкированную сигнальными связывающими последовательностями эpsilon гепатита В, с образованием конструкции, которая будет транскрибироваться только при распознавании обратной транскриптазой гепатита В, будет задействовать последовательность эpsilon для транскрипции сегмента и приведет к трансляции кодирующей последовательности для Casp 9, что вызовет апоптоз клетки, инфицированной гепатитом В. Эти конструкции будут эффективно функционировать как

«вирус-специфические суицидные конструкции», которые в противном случае будут разлагаться в не инфицированных вирусом клетках.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, настоящие композиции и способы охватывают рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот и вирусоподобные частицы с дефектом по репликации, предназначенные для таргетирования клеток, инфицированных гепатитом В. HBV относится к Балтиморской группе VII, которая включает вирусы с двухцепочечной ДНК, которые реплицируются через промежуточную одноцепочечную РНК. Эта небольшая группа вирусов, представленная вирусом гепатита В, имеет двухцепочечный геном с гэпом, который впоследствии заполняется, образуя ковалентно замкнутый круг (кзкДНК), который служит матрицей для продуцирования вирусных мРНК и субгеномной РНК. Прегеномная РНК служит матрицей для вирусной обратной транскриптазы для получения генома ДНК. Эта вирусная полимераза распознает фланкирующие последовательности эpsilon в конструкциях рекомбинантных нуклеиновых кислот и вирусоподобных частиц с дефектом по репликации, описанных в настоящем документе, и приводит к продуцированию токсического агента. Таким образом, только инфицированные вирусом клетки будут уничтожены продуцированием хемокина, цитокина или белка, индуцирующего апоптоз (например, каспазы 9 (Casp9)).

В некоторых вариантах осуществления белок, индуцирующий хемокин, цитокин или апоптоз, фланкирован 5' UTR вируса и 3' UTR вируса, так что нуклеиновая кислота может быть представлена формулой XYZ, где X представляет собой 5' UTR вируса, Y представляет представляющий интерес белок, такой как хемокин, цитокин или апоптоз-индуцирующий белок (*например*, каспаза 9 или другие, предусмотренные в настоящем документе, или фрагмент А дифтерийного токсина), и Z представляет собой 3' UTR вируса. Могут быть промежуточные последовательности между 5' UTR и представляющим интерес белком или 3' UTR и представляющим интерес белком. Когда транскрипт распознается клеткой, он будет продуцировать обратный комплемент 5'-3', кодирующий представляющий интерес белок. Он также может быть доставлен в векторе экспрессии AAV или другом подходящем вирусном векторе.

В некоторых вариантах осуществления, 5' UTR представляет собой 5' лидерную последовательность коронавируса, такого как вирус, называемый COVID-19 (или COVID-19), SARS или MERS. В некоторых вариантах осуществления, 5' UTR содержит последовательность или ее комплемент:

```
ATTAAGGTTTATACCTTCCCAGGTAACAAACCAACCAACTTTCGATCTCTTG
TAGATCTGTTCTCTAAACGAACCTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTCGGCTGCATGCT
TAGTGCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAATTAAGTCTGTCGTTGACAGGACACGAGT
AACTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTGCAGCCGATCATCA
GCACATCTAGGTTTTCGTCCGGGTGTGACCGAAAGGTAAG (SEQ ID NO: 25)
```

В некоторых вариантах осуществления, 3'UTR содержит последовательность или ее комплемент:

CAATCTTTAATCAGTGTGTAACATTAGGGAGGACTTGAAAGAGCCACCACAT
 TTTCACCGAGGCCACGCGGAGTACGATCGAGTGTACAGTGAACAATGCTAGGGAGA
 GCTGCCTATATGGAAGAGCCCTAATGTGTAATAATTTTAGTAGTGCTATCCCCA
 TGTGATTTTAATAGCTTCTTAGGAGAATGACAAAAAACAATCTTGCTAAACACTGT
 CTTTCATG (SEQ ID NO: 26)

В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фрагмент дифтерийного токсина А, содержит (или ее комплемент):

ATGGGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTGATGGAAAACCTT
 TTCTTCGTACCACGGGACTAAACCTGGTTATGTAGATTCCATTCAAAAAGGTATACA
 AAAGCCAAAATCTGGTACACAAGGAAATTATGACGATGATTGGAAAGGGTTTTATA
 GTACCGACAATAAATACGACGCTGCGGGATACTCTGTAGATAATGAAAACCCGCTC
 TCTGGAAAAGCTGGAGGCGTGGTCAAAGTGACGTATCCAGGACTGACGAAGGTTCT
 CGCACTAAAAGTGGATAATGCCGAAACTATTAAGAAAGAGTTAGGTTTAAGTCTCA
 CTGAACCGTTGATGGAGCAAGTCGGAACGGAAGAGTTTATCAAAAAGGTTCCGGTGAT
 GGTGCTTCGCGTGTAGTGCTCAGCCTTCCCTTCGCTGAGGGGAGTTCTAGCGTTGAA
 TATATTAATAACTGGGAACAGGCGAAAGCGTTAAGCGTAGAACTTGAGATTAATTTT
 GAAACCCGTGGAAAACGTGGCCAAGATGCGATGTATGAGTATATGGCTCAAGCCTG
 TGCAGGAAATCGTGTGAGGCGATCAGTAGGTAGCTCATTGTAA (SEQ ID NO: 27)

В некоторых вариантах осуществления, представлена композиция, содержащая последовательность:

ATTAAAGGTTTATACCTTCCCAGGTAACAAACCAACCAACTTTCGATCTCTTG
 TAGATCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTCGGCTGCATGCT
 TAGTGCACCTACGCAGTATAATTAATAACTAATTACTGTTCGTTGACAGGACACGAGT
 AACTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTGCAGCCGATCATCA
 GCACATCTAGGTTTCGTCCGGGTGTGACCGAAAGGTAAGATGGGCGCTGATGATGTT
 GTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTGATGGAAAACCTTTCTTCGTACCACGGGACTAAAC
 CTGGTTATGTAGATTCCATTCAAAAAGGTATACAAAAGCCAAAATCTGGTACACAA
 GGAAATTATGACGATGATTGGAAAGGGTTTTATAGTACCGACAATAAATACGACGC
 TCGGGGATACTCTGTAGATAATGAAAACCCGCTCTCTGGAAAAGCTGGAGGCGTGG
 TCAAAGTGACGTATCCAGGACTGACGAAGGTTCTCGCACTAAAAGTGGATAATGCC
 GAAACTATTAAGAAAGAGTTAGGTTTAAGTCTCACTGAACCGTTGATGGAGCAAGT
 CGGAACGGAAGAGTTTATCAAAAAGGTTCCGGTGATGGTGCTTCGCGTGTAGTGCTCA
 GCCTTCCCTTCGCTGAGGGGAGTTCTAGCGTTGAATATATTAATAACTGGGAACAGG
 CGAAAGCGTTAAGCGTAGAACTTGAGATTAATTTTGAACCCGTGGAAAACGTGGC
 CAAGATGCGATGTATGAGTATATGGCTCAAGCCTGTGCAGGAAATCGTGTGAGGCG
 ATCAGTAGGTAGCTCATTGTAACAATCTTTAATCAGTGTGTAACATTAGGGAGGACT
 TGAAAGAGCCACCACATTTTCACCGAGGCCACGCGGAGTACGATCGAGTGTACAGT
 GAACAATGCTAGGGAGAGCTGCCTATATGGAAGAGCCCTAATGTGTAATAATTT
 TTAGTAGTGCTATCCCCATGTGATTTTAATAGCTTCTTAGGAGAATGACAAAAAACA
 AATCTTGCTAAACACTGTCTTCATG (SEQ ID NO: 28)

которая кодирует 5'UTR, 3'UTR и представляющий интерес белок, который может представлять собой любую последовательность, представленную в настоящем документе. В приведенном выше примере, последовательность кодирует фрагмент А дифтерийного токсина.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фрагмент дифтерийного токсина А, представлена в виде обратного комплемента, который может содержать последовательность:

TTACAATGAGCTACCTACTGATCGCCTGACACGATTTCCCTGCACAGGCTTGAG
CCATATACTCATAACATCGCATCTTGGCCACGTTTTCCACGGGTTTTCAAATTAATCTC
AAGTTCTACGCTTAACGCTTTCGCCTGTTCCCAGTTATTAATATATTCAACGCTAGAA
CTCCCCTCAGCGAAGGGAAGGCTGAGCACTACACGCGAAGCACCATCACCGAACCT
TTTGATAAACTCTTCCGTTCCGACTTGCTCCATCAACGGTTCAGTGAGACTTAAACCT
AACTCTTTCTTAATAGTTTTCGGCATTATCCACTTTTAGTGCGAGAACCTTCGTCAGTC
CTGGATACGTCACCTTTGACCACGCCTCCAGCTTTTCCAGAGAGCGGGTTTTCAATTATC
TACAGAGTATCCCGCAGCGTCGTATTTATTGTCGGTACTATAAAACCCTTTCCAATC
ATCGTCATAATTTCCCTTGTGTACCAGATTTTGGCTTTTGTATACCTTTTTGAATGGAA
TCTACATAACCAGGTTTAGTCCCGTGGTACGAAGAAAAGTTTTCCATCACAAAAGAT
TTAGAAGAATCAACAACATCATCAGCGCCCAT (SEQ ID NO: 29)

В некоторых вариантах осуществления, последовательность представлена в виде обратного комплемента, который может содержать последовательность:

CATGAAGACAGTGTTTAGCAAGATTGTTTTTTTTGTCATTCTCCTAAGAAGCTA
TTAAAATCACATGGGGATAGCACTACTAAAATTAATTTTACACATTAGGGCTCTTCC
ATATAGGCAGCTCTCCCTAGCATTGTTCACTGTACACTCGATCGTACTCCGCGTGGC
CTCGGTGAAAATGTGGTGGCTCTTTCAAGTCCTCCCTAATGTTACACACTGATTA
AAGATTGTTACAATGAGCTACCTACTGATCGCCTGACACGATTTCCCTGCACAGGCTTGA
GCCATATACTCATAACATCGCATCTTGGCCACGTTTTCCACGGGTTTTCAAATTAATCT
CAAGTTCTACGCTTAACGCTTTCGCCTGTTCCCAGTTATTAATATATTCAACGCTAGA
ACTCCCCTCAGCGAAGGGAAGGCTGAGCACTACACGCGAAGCACCATCACCGAACCT
TTTTGATAAACTCTTCCGTTCCGACTTGCTCCATCAACGGTTCAGTGAGACTTAAACC
TAACTCTTTCTTAATAGTTTTCGGCATTATCCACTTTTAGTGCGAGAACCTTCGTCAGT
CCTGGATACGTCACCTTTGACCACGCCTCCAGCTTTTCCAGAGAGCGGGTTTTCAATTAT
CTACAGAGTATCCCGCAGCGTCGTATTTATTGTCGGTACTATAAAACCCTTTCCAAT
CATCGTCATAATTTCCCTTGTGTACCAGATTTTGGCTTTTGTATACCTTTTTGAATGGA
ATCTACATAACCAGGTTTAGTCCCGTGGTACGAAGAAAAGTTTTCCATCACAAAAGA
TTAGAAGAATCAACAACATCATCAGCGCCCATCTTACCTTTCCGGTCACACCCGGAC
GAAACCTAGATGTGCTGATGATCGGCTGCAACACGGACGAAACCGTAAGCAGCCTG
CAGAAGATAGACGAGTTACTCGTGTCTGTCAACGACAGTAATTAGTTATTAATTAT
ACTGCGTGAGTGCACTAAGCATGCAGCCGAGTGACAGCCACACAGATTTTAAAGTT
CGTTTAGAGAACAGATCTACAAGAGATCGAAAGTTGGTTGGTTTTGTTACCTGGGAA
GGTATAAACCTTTAAT (SEQ ID NO: 30)

Хотя представленные в настоящем документе последовательности (выше и ниже) представлены в виде последовательностей ДНК, также представлены соответствующие последовательности РНК.

Термины «последовательность нуклеиновой кислоты» и «молекула нуклеиновой кислоты», используемые в настоящем документе, могут использоваться взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления, представлена последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулу нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующую хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию, фланкированные первым и вторым сигналом распознавания вирусной транскрипции, и дополнительно содержащую первый промотор в направлении (5') первого сигнала распознавания транскрипции вируса и второй промотор, примыкающий и 5' к молекуле нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекуле нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, дифтерийный токсин А (или его фрагмент) или любую их комбинацию. В настоящем документе представлены неограничивающие примеры хемокинов, цитокинов и апоптоз-индуцирующих белков. Фактическим белком, который фланкирован первым и вторым сигналом распознавания вирусной транскрипции, может быть любой подходящий белок. Этот кодируемый белок также может быть заменен любым представляющим интерес белком, а не только тем, который кодирует хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или дифтерийный токсин А (или его фрагмент).

Как представлено в настоящем документе, молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью может представлять собой отрицательно-полярную РНК, отрицательно-полярную ДНК, одно- или двухцепочечную ДНК, которая экспрессирует некодирующую отрицательно-полярную РНК, или пгРНК, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью представляет собой отрицательно-полярную РНК. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью представляет собой отрицательно-полярную ДНК. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью представляет собой одноцепочечную или двухцепочечную ДНК, которая экспрессирует некодирующую отрицательно-полярную РНК. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью представляет собой пгРНК.

Как указано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, сигнал распознавания вирусной транскрипции происходит от или на основе вируса, который представляет собой, например, вирус с отрицательной цепью, вирус с обратной транскрипцией РНК или вирус с обратной транскрипцией ДНК. В некоторых вариантах осуществления, сигнал распознавания вирусной транскрипции представляет собой сигнал распознавания вирусной транскрипции с отрицательной цепью. В некоторых вариантах осуществления, сигнал распознавания вирусной транскрипции представляет собой сигнал

распознавания вирусной транскрипции вируса с обратной транскрипцией РНК. В некоторых вариантах осуществления, сигнал распознавания вирусной транскрипции представляет собой сигнал распознавания вирусной транскрипции вируса с обратной транскрипцией ДНК.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит поли-А хвост в направлении (3') молекулы нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулы нуклеиновой кислоты пгРНК, которая также кодирует представляющий интерес белок, такой как токсин, хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию.

Апоптоз-индуцирующим белком может быть любой белок, который способен индуцировать апоптоз на основании его экспрессии в клетке. Примеры включают, но не ограничены ими, BAX, BID, BAK, BAD, каспазу 2, каспазу 8, каспазу 9, каспазу 10, каспазу 11, каспазу 12, цитохром С, SMAC и фактор, индуцирующий апоптоз, или их комбинации. Таким образом, эти белки могут быть экспрессированы в виде представляющего интерес белка в конструкции, которую вводят инфицированному индивидууму или подвергают контакту с инфицированной клеткой, чтобы вызвать гибель клеток посредством экспрессии этих представляющих интерес белков.

В некоторых вариантах осуществления, представляющий интерес белок не является вирусным белком.

Примеры хемокинов, которые могут использоваться или кодироваться настоящими вариантами осуществления, включают, но не ограничены ими, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2 и/или CX3CL1. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из группы, состоящей из IL-15, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, IL-6, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , CD40L, Mig и Crg-2.

Как представлено в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать промотор, который направляет экспрессию последовательностей нуклеиновой кислоты в клетке. В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой тканеспецифический промотор печени. Примеры тканеспецифических промоторов печени включают, но не ограничены ими, TBG (тироксинсвязывающий глобулин), промотор и/или энхансер альбумина, промотор AFP (альфа-фетопропротеина), промотор AAT (альфа-1-антитрипсина), промотор ApoE (Аполипопротеина E) или промотор PEPCK (фосфоенолпируваткарбоксикиназы). Промоторы можно использовать в качестве первого промотора, упомянутого в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит второй промотор. Неограничивающим примером такого второго промотора является последовательность связывания фактора элонгации 1 альфа (EFS).

В некоторых вариантах осуществления, сигнал (последовательность) распознавания вирусной транскрипции содержит сигнал распознавания эpsilon (SEQ ID NO: 1) или последовательность распознавания коронавируса (такую как найдены в SEQ ID: 25, SEQ ID: 26, SEQ ID: 28 или SEQ ID: 30). Другие сигнальные последовательности распознавания транскрипции вируса также могут быть использованы и заменены последовательностями, специфичными для вируса или вирусной инфекции, подлежащих лечению.

Как представлено в настоящем документе, настоящие варианты осуществления можно использовать для лечения вирусных инфекций. И, в некоторых вариантах осуществления, композиции и способы можно использовать для специфического уничтожения инфицированных вирусом клеток. Преимущество специфического уничтожения инфицированных вирусом клеток заключается в том, что оно может привести к уничтожению только тех клеток, которые содержат вирус. Примеры вирусов, которые можно использовать в качестве сигнала распознавания вирусной транскрипции, включают, но не ограничены ими, коронавирус (например, COVID-19, SARS, MERS), вирус гепатита В, вирус гепатита D, вирус Эбола, вирус Марбурга, вирус 1 парагриппа человека, вирус кори, вирус эпидемического паротита, респираторно-синцитиальный вирус человека, вирус везикулярного стоматита, вирус Индианы, вирус бешенства, вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Буньямвера, вирус Хантаан, вирус болезни овец Найроби, вирус сицилийской флеботомной лихорадки, вирус гриппа А, вирус гриппа С, вирус Тогото, вирус опухоли молочной железы мыши, вирус лейкоза мыши, вирус лейкоза птиц, вирус обезьян Мейсона-Пфайзера, вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус иммунодефицита человека 1, спумавирус человека, вирус гепатита В уток, коронавирус и их комбинацию. Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, выбор сигнальной последовательности распознавания вирусной транскрипции можно использовать для определения того, какой тип вирусной инфекции подлежит лечению. Например, если сигнальная последовательность распознавания транскрипции вируса представляет собой сигнальную последовательность распознавания транскрипции вируса COVID-19, молекулы нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе, будут экспрессироваться только в клетках, инфицированных COVID-19. COVID-19 используется просто в качестве неограничивающего примера и не должен использоваться для ограничения вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты не содержат последовательности (кодирующие или не кодирующие) вирусной полимеразы, обратной транскриптазы, капсида, оболочки, сигнала упаковки или транслокационного

мотива. В некоторых вариантах осуществления, молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты не содержит последовательности (кодирующие или некодирующие) вирусной полимеразы. В некоторых вариантах осуществления, молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты не содержит последовательности (кодирующие или некодирующие) обратной транскриптазы. В некоторых вариантах осуществления, молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты не содержит последовательности (кодирующие или некодирующие) капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления, молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты не содержит последовательности (кодирующие или некодирующие) оболочечного белка. В некоторых вариантах осуществления, молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты не содержит последовательности (кодирующие или некодирующие) для сигнала упаковки. В некоторых вариантах осуществления, молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты не содержит последовательности (кодирующие или некодирующие) для мотива транслокации.

Представленные в настоящем документе молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты могут быть включены в состав вектора. Вектор, например, может представлять собой вектор доставки или носитель для доставки, например, в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку яванского макака (например, обезьяны). В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вектор, который может доставлять молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку человека и клетку яванского макака. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вектор, который может доставлять молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку человека, но не в клетку яванского макака. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вектор, который может доставлять молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку яванского макака, но не в клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки или носитель представляет собой VLP, аденоассоциированный вирус (AAV), липосому, наночастицу, мицеллу, полимерную везикулу или полимерному. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки или носитель представляет собой вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки или носитель представляет собой липосому. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки или носитель представляет собой наночастицу. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки или носитель представляет собой мицеллу. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки или носитель представляет собой полимерную везикулу. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки или носитель представляет собой полимерному. Неограничивающие примеры векторов доставки или носителей включают те, которые описаны в публикации заявки на патент США № 20200206362, публикации заявки на патент США № 20200246267, публикации заявки на патент США № 20170273907 и патенте США № 10,556,018, каждый из которых настоящим полностью включен посредством ссылки.

17. Также в настоящем документе предусмотрены вирусоподобные частицы с дефектом по репликации (VLP), которые могут содержать молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, VLP содержат необязательный мотив транслокации (TLM), слитый с капсидным белком представляющего интерес вируса. Например, капсидный белок может быть капсидом вируса гепатита В или капсидом вируса гепатита D или слитым белком коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления, молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, представленная VLP, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулу нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующую представляющий интерес белок. Как указано в настоящем документе, представляющий интерес белок представляет собой хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, дифтерийный токсин А (или его фрагмент) или их комбинацию. Как представлено в настоящем документе, последовательность, кодирующая представляющий интерес белок, может быть фланкирована первым и вторым сигналами распознавания вирусной транскрипции и дополнительно содержать первый промотор в направлении (5') первого сигнала распознавания вирусной транскрипции, и второй промотор, примыкающий и 5' к молекуле нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекуле нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей представляющий интерес белок (например, хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию). Неограничивающие примеры хемокина, цитокина, индуцирующего апоптоз белок или их комбинация представлены в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, представлена вирусоподобная частица с дефектом по репликации (VLP), которая содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, такую как молекулы, представленные в настоящем документе (например, молекулу нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулу нуклеиновой кислоты пгРНК), кодирующую представляющий интерес белок (например, хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок или их комбинацию), фланкированную первым и вторым сигналом распознавания транскрипции вируса-мишени, и дополнительно содержащую первый промотор в направлении (5') первого сигнала распознавания транскрипции вируса и второй промотор, примыкающий и 5' к молекуле нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекуле нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию, где VLP проявляет тропизм к инфицированным вирусом клеткам-мишеням. Тропизм можно контролировать с помощью экспрессии вирусного белка, который экспрессируется на поверхности VLP, а также путем контроля экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты с помощью источника сигнальных последовательностей распознавания вирусной транскрипции, кодируемых рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты.

Как представлено в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью представляет собой отрицательно-

полярную РНК, отрицательно-полярную ДНК, одноцепочечную или двухцепочечную ДНК, которая экспрессирует некодирующую отрицательно-полярную РНК или пгРНК, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, вирусоподобная частица с дефектом по репликации дополнительно содержит последовательность поли-А хвоста, расположенную в направлении (3') молекулы нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулы нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, вирусоподобная частица с дефектом по репликации содержит промотор (например, первый промотор и второй промотор). В настоящем документе представлены неограничивающие примеры таких промоторов.

Общий дизайн и конструкции и рекомбинантных нуклеиновых кислот и вирусоподобных частиц с дефектом по репликации, описанных в настоящем документе, могут быть адаптированы для охвата вирусов из Балтиморских групп IV, V, VI и VII. Для таргетирования одного из вирусов групп IV-VII используется специфический сигнал распознавания вирусной полимеразы, который может заменить, например, последовательность сигнала распознавания эпсилон (SEQ ID NO:1), как описано для примера HBV. Балтиморские группы описываются следующим образом:

Вирусы Балтиморской группы IV: обладают положительно-полярными одноцепочечными РНК геномами, включая пикорнавирусы (которые представляют собой семейство вирусов, которое включает хорошо известные вирусы, такие как вирус гепатита А, энтеровирусы, риновирусы, полиовирус и вирус ящура), SARS вирус, вирус гепатита С, вирус желтой лихорадки и вирус краснухи. В эту группу также входят коронавирусы, гепевирусы (гепатит Е), а также флавививирусы, такие как вирус Денге, вирус гепатита С, вирус желтой лихорадки и вирус Зика.

Вирусы Балтиморской группы V: вирусы с одноцепочечной РНК; отрицательно-полярные (например, ортомиксовирусы, рабдовирусы).

Вирусы Балтиморской группы VI: положительно-полярные одноцепочечные РНК-вирусы, которые реплицируются через промежуточную ДНК (например, ретровирусы).

Вирусы Балтиморской группы VII: двухцепочечные ДНК-вирусы, которые реплицируются через промежуточную одноцепочечную РНК.

Жизненный цикл и репликация NSV

РНК вирусы с отрицательной цепью (NSV, или вирусы Балтиморской группы V) можно разделить на 21 семейство. Семейства, состоящие из несегментированных геномов, включают Рабдо-, Парамиксо-, Фило- и Борна-, Ортомиксо-, Бунья-, Адринавирус-содержащие геномы из шести-восьми, трех или двух сегментов отрицательно-полярной РНК, соответственно. (См. Palese, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11354-11358, 1996; и Boritz, Eli et al. Journal of Virology. 73 (8): 6937-6945, 1999).

Многие широко распространенные патогены человека, такие как респираторно-

синцитиальный вирус (RSV), вирусы парагриппа, вирусы гриппа, вирус Эбола, вирус Марбург, включены в NSV. Жизненный цикл NSV состоит из нескольких стадий. Вирус сначала заражает клетку-хозяина, связываясь с рецептором клетки-хозяина через вирусный поверхностный гликопротеин. Слияние гликопротеиновой вирусной мембраны с плазматической мембраной клетки-хозяина в кислой среде позволяет высвободить вирусные рибонуклеопротеиновые (RNP) комплексы в цитоплазму. Большинство NSV реплицируются в цитоплазме инфицированных клеток. Вновь синтезированные комплексы RNP собираются со структурными белками вируса на плазматической мембране или на мембранах аппарата Гольджи. Все это сопровождается высвобождением вновь синтезированных вирусов.

Что касается репликации и транскрипции не сегментированного NSV, гены этих NSV состоят из трех регуляторных областей: конечный сигнал гена, межгенная область и стартовый сигнал гена. Одним из примеров конечного сигнала гена является специфический вирус, называемый вирусом везикулярного стоматита (VSV), который содержит конечные сигналы гена, которые являются очень консервативными. Межгенная область очень изменчива и состоит из консервативного динуклеотида, тринуклеотида или областей длиной до 143 нуклеотидов. Различная длина межгенных областей коррелирует с аттенуацией транскрипции, однако различные межгенные области не изменяют экспрессию гена. Стартовые сигналы гена очень специфичны, поскольку первые три нуклеотида имеют решающее значение для экспрессии гена.

Вирус гепатита В (HBV), член семейства *Неpadnaviridae*, представляет собой малый ДНК вирус с необычными свойствами, похожими на ретровирусы. HBV реплицируется через промежуточную РНК и может интегрироваться в геном хозяина. Уникальные особенности цикла репликации HBV придают особую способность вирусу персистировать в инфицированных клетках. Вирусологические и серологические тесты были разработаны для диагностики различных форм HBV-ассоциированных заболеваний и для лечения хронического гепатита В. HBV инфекция приводит к широкому спектру заболеваний печени, начиная от острого (включая фульминантную печеночную недостаточность) и заканчивая хроническим гепатитом, циррозом и гепатоцеллюлярной карциномой. Острая инфекция HBV может протекать бессимптомно или проявляться симптоматическим острым гепатитом. Большинство взрослых, инфицированных вирусом, выздоравливают, но 5-10% не могут избавиться от вируса и становятся хронически инфицированными. У многих хронически инфицированных людей заболевание печени протекает в легкой форме с незначительной или отсутствующей долгосрочной заболеваемостью или смертностью. У других людей с хронической инфекцией HBV развивается активное заболевание, которое может прогрессировать до цирроза и рака печени. Дополнительно, некоторые индивидуумы инфицированы другими вирусами гепатита в дополнение к HBV, такими как гепатит А (HAV), гепатит С (HCV), гепатит D (HDV) или гепатит Е (HEV). Таким образом, лечение HBV поможет преодолеть эти сопутствующие инфекции, особенно HDV, для репликации которого требуется HBV.

Лечение HBV также снизит вероятность онкогенных аномалий и цирроза печени.

Чтобы изобретение было более понятным, некоторые технические и научные термины конкретно определены ниже. Если в этом документе специально не указано иное, все другие технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понятное специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение.

Как используется в настоящем документе, и если не указано иное, термин «примерно» означает $\pm 5\%$ значения, которое он изменяет. Таким образом, примерно 100 означает от 95 до 105. Кроме того, термин «примерно» изменяет термин в ряду терминов, например, «примерно 1, 2, 3, 4 или 5», следует понимать, что термин «примерно» изменяет каждый из членов списка, так что «примерно 1, 2, 3, 4 или 5» можно понимать как означающее «примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4 или примерно 5». То же самое верно для списка, который изменен термином «по меньшей мере» или другим количественным модификатором, таким как, но не ограничиваясь ими, «меньше чем», «больше чем» и подобные.

Используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «a», «an» и «the» включают множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Используемые в настоящем документе термины «содержать», «иметь», «имеет» и «включать» и их родственные значения, используемые в настоящем документе, означают «включая, но не ограничиваясь ими». Хотя различные композиции и способы описываются в терминах «содержащие» различные компоненты или стадии (интерпретируемые как означающие «включая, но не ограничиваясь ими»), композиции, способы и устройства также могут «состоять по существу из» или «состоять из» различных компонентов и стадий, и такую терминологию следует интерпретировать как определение по существу закрытых групп.

Векторные карты типовых конструкций, используемых для тестирования рекомбинантных вариантов, описанных в настоящем документе, показаны на ФИГУРЕ 1А, ФИГУРЕ 1В, ФИГУРЕ 2А, ФИГУРЕ 3А, ФИГУРЕ 4А, ФИГУРЕ 5А, ФИГУРЕ 6А, ФИГУРЕ 7 и ФИГУРЕ 8. В то время как графики результатов тестирования этих конструкций показаны на ФИГУРЕ 2В, ФИГУРЕ 3В, ФИГУРЕ 4В, ФИГУРЕ 4С, ФИГУРЕ 5В, ФИГУРЕ 6В и ФИГУРЕ 6С. Типовые последовательности, применимые в этих конструкциях, представлены в SEQ ID NO: 1-9. Они являются не ограничивающими примерами, и их можно модифицировать или адаптировать в зависимости от представляющего интерес вируса, подлежащего лечению.

Термины «совместное введение» или подобные предназначены для охвата введения выбранных терапевтических агентов одному пациенту, и предназначены для включения схем лечения, в которых средства вводят одним и тем же или другим путем введения или в одинаковое или разное время.

Используемый в настоящем документе термин «агонист» относится к соединению,

присутствие которого приводит к биологической активности белка, такой же, как биологическая активность, возникающая в результате присутствия встречающегося в природе лиганда для белка.

Используемый в настоящем документе термин «частичный агонист» относится к соединению, присутствие которого приводит к биологической активности белка того же типа, что и активность, возникающая в результате присутствия встречающегося в природе лиганда для белка, но меньшей величины.

Используемый в настоящем документе термин «антагонист» относится к соединению, присутствие которого приводит к снижению величины биологической активности белка. В некоторых вариантах осуществления, присутствие антагониста приводит к полному ингибированию биологической активности белка. В некоторых вариантах осуществления, антагонист представляет собой ингибитор.

«Введение» при использовании в сочетании с терапевтической композицией (например, рекомбинантными конструкциями нуклеиновых кислот и вирусоподобным частицам с дефектом по репликации и композициями, содержащими эти продукты) означает введение терапевтического средства непосредственно в ткань-мишень или на нее, или введение терапевтического средства пациенту, где терапевтическое средство положительно воздействует на ткань, которую таргетирует.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» или «пациент» включает, но не ограничен ими, людей и позвоночных животных, не относящихся к человеку, таких как дикие, домашние и сельскохозяйственные животные. В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент, описанные в настоящем документе, представляют собой животное. В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент представляет собой животное, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент представляет собой отличное от человека млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент представляет собой домашнее животное, такое как собака, кошка, корова, свинья, лошадь, овца или коза. В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент представляет собой домашнее животное, такое как собака или кошка. В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент представляет собой домашний скот, такой как корова, свинья, лошадь, овца или коза. В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент представляет собой животное из зоопарка. В другом варианте осуществления, субъект или пациент представляет собой исследовательское животное, такое как грызун, собака или примат, не являющийся человеком. В некоторых вариантах осуществления, субъект или пациент представляет собой трансгенное животное, отличное от человека, такое как трансгенная мышь или трансгенная свинья.

Термин «ингибировать» включает введение терапевтического средства в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения для профилактики

появления симптомов, облегчения симптомов или устранения заболевания, состояния или нарушения.

Под «фармацевтически приемлемым» подразумевается, что носитель, разбавитель или эксципиент должны быть совместимы с другими ингредиентами терапевтического средства и не оказывать вредного воздействия на его реципиента.

Термины «лечить», «леченный» или «лечение», используемые в настоящем документе, относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является ингибирование, профилактика или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания, или для улучшения, ингибирования или иного получения полезных или желаемых клинических результатов. Для целей настоящего изобретения, благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничены ими, улучшение или облегчение симптомов; уменьшение степени состояния, нарушения или заболевания; стабилизация (*m.e.* не ухудшение) состояния, нарушения или заболевания; задержка начала или замедление прогрессирования состояния, нарушения или заболевания; улучшение состояния, нарушения или болезненного состояния; и ремиссия (частичная или полная), поддающаяся обнаружению или не поддающаяся обнаружению, или усиление или улучшение состояния, нарушения или заболевания. Лечение включает получение клинически значимого ответа без чрезмерных уровней побочных эффектов. Лечение также включает увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные части интактных иммуноглобулинов. Антитела могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела.

Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела и относится к антиген-определяющим переменным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничены ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела, антитела scFv и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в настоящем документе термин «антиген» определяется как молекула, вызывающая иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо и то, и другое. Специалисту в данной области техники понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить антигеном. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит

последовательность нуклеотидов или частичную последовательность нуклеотидов, кодирующую белок, вызывающий иммунный ответ, таким образом, кодирует «антиген», как этот термин используется в настоящем документе. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген необязательно должен кодироваться исключительно полной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что варианты осуществления включают, но не ограничены ими, использование частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях для индуцирования желаемого иммунного ответа. Более того, специалист в данной области техники поймет, что антиген вообще не обязательно должен кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть синтезирован или получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничиваться ими, образец ткани, образец ткани, предположительно содержащий вирус, клетку или биологическую жидкость.

Используемый в настоящем документе термин «антиген» определяется как молекула, вызывающая иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо и то, и другое.

Используемый в настоящем документе термин «*ex vivo*» относится к «вне» организма.

«Болезнь» представляет собой состояние здоровья субъекта, при котором субъект не может поддерживать гомеостаз, и при котором, если болезнь не улучшается, то здоровье животного продолжает ухудшаться. Напротив, «нарушение» у субъекта представляет собой состояние здоровья, при котором субъект способен поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья субъекта менее благоприятно, чем оно было бы при отсутствии нарушения. При отсутствии лечения, нарушение не обязательно вызывает дальнейшее ухудшение состояния здоровья субъекта.

«Эффективное количество», используемое в настоящем документе, означает количество, которое обеспечивает терапевтическую или профилактическую пользу.

«Кодирование» относится к неотъемлемому свойству определенных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матрицы для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и вытекающие из этого биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующую цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно приводится в перечнях последовательностей, так и некодирующую цепь, используемую в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, можно отнести к кодирующей белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Используемый в настоящем документе термин «эндогенный» относится к любому материалу из организма, клетки, ткани или системы, или продуцируемому внутри него.

Используемый в настоящем документе термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному из организма, клетки, ткани или системы, или полученному вне его.

Используемый в настоящем документе термин «экспрессия» определяется как транскрипция и/или трансляция конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой ее промотором.

«Вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все известные в данной области техники, такие как космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

«Гомологичный» относится к сходству последовательностей или идентичности последовательностей между двумя полипептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Когда положение в обеих двух сравниваемых последовательностях занято одним и тем же основанием или субъединицей мономера аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то молекулы гомологичны в этом положении. Доля гомологии между двумя последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей, деленного на количество сравниваемых положений $\times 100$. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или гомологичны тогда две последовательности гомологичны на 60%. Например, последовательности ДНК ATTGCC и TATGGC имеют гомологию на 50%. Как правило, сравнение проводят, когда две последовательности выровнены для получения максимальной гомологии.

В некоторых вариантах осуществления, белок по меньшей мере или примерно на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичен последовательностям, представленным в настоящем документе. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. В данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), не заряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), не полярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин,

пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Термин «иммуноглобулин» или «Ig», используемый в настоящем документе, определяется как класс белков, которые функционируют как антитела. Антитела, экспрессируемые В-клетками, иногда называют BCR (В-клеточный рецептор) или антигенный рецептор. В этот класс белков входят пять членов: IgA, IgG, IgM, IgD и IgE.

«Выделенный» означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественным образом присутствующие в живом организме, не являются «выделенными», но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в своем естественном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в не нативной среде, такой как, например, клетка-хозяин. «Выделенный» биологический компонент (такой как нуклеиновая кислота, белок или клетка) был по существу отделен или очищен от других биологических компонентов (таких как клеточный дебрис, другие белки, нуклеиновые кислоты или типы клеток). Биологические компоненты, которые были «выделены», включают компоненты, очищенные стандартными методами очистки.

Профилактика, лечение или облегчение заболевания: «Профилактика» заболевания относится к ингибированию полного развития заболевания. «Лечение» относится к терапевтическому вмешательству, которое ослабляет признак или симптом заболевания или патологического состояния после того, как оно начало развиваться. «Улучшение» относится к уменьшению количества или тяжести признаков или симптомов заболевания.

Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантный» обычно относится к следующему: Рекомбинантная нуклеиновая кислота или белок представляет собой нуклеиновую кислоту или белок, который имеет последовательность, не встречающуюся в природе, или имеет последовательность, созданную искусственным сочетанием двух иначе разделенных сегментов последовательности. Эта искусственная комбинация часто достигается химическим синтезом или искусственным манипулированием выделенными сегментами нуклеиновых кислот, например, методами генной инженерии.

В настоящем документе используются следующие сокращения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот. «А» относится к аденозину, «С» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину, и «U» относится к уридину.

Используемый в настоящем документе термин «лейкоциты» или «белые клетки крови» относится к любой иммунной клетке, включая моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и лимфоциты. Используемый в настоящем документе термин «лимфоциты» относится к клеткам, обычно встречающимся в лимфе, и включает естественные киллеры (NK-клетки), Т-клетки и В-клетки. Специалисту в данной области

техники должно быть понятно, что перечисленные выше типы иммунных клеток можно разделить на дополнительные подмножества.

Термин «инфильтрирующие опухоль лейкоциты», используемый в настоящем документе, относится к лейкоцитам, которые присутствуют в солидной опухоли.

Используемый в настоящем документе термин «образец крови» относится к любому образцу, приготовленному из крови, например плазмы, клеток крови, выделенных из крови, и так далее.

Термин «очищенный образец», используемый в настоящем документе, относится к любому образцу, в котором обогащены одна или несколько клеточных субпопуляций. Образец может быть очищен путем удаления или выделения клеток на основе таких характеристик, как размер, экспрессия белка и т.д.

Фармацевтически приемлемые носители: Фармацевтически приемлемые носители (носители), применимые в настоящем описании, являются обычными. Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15th Edition (1975), описывает композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки одной или нескольких терапевтических композиций и дополнительных фармацевтических агентов.

В общем, природа подходящего носителя или средства доставки будет зависеть от конкретного используемого способа введения. Например, составы для парентерального введения обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин или подобные в качестве носителя. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пиллюль, таблеток или капсул) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннит, лактозу, крахмал или стеарат магния фармацевтической степени чистоты. В дополнение к биологически нейтральным носителям, вводимые фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты и pH-буферные агенты и подобные, например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

В некоторых вариантах осуществления, композиции, будь то растворы, суспензии или другая подобная форма, могут включать одно или несколько из следующих веществ: ДМСО, стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

Заболевания, которые могут лечить описанные в настоящем документе композиции и способы, включают микробные инфекции, такие как вирусная инфекция.

Под «вирусной инфекцией» понимают инфекцию, вызванную присутствием вируса в организме. Вирусные инфекции включают хронические или персистирующие вирусные инфекции, которые представляют собой вирусные инфекции, способные инфицировать хозяина и воспроизводиться в клетках хозяина в течение длительного периода времени - обычно недель, месяцев или лет, прежде чем привести к летальному исходу.

Вирусы, вызывающие хронические инфекции, включают, например, вирус папилломы человека (HPV), вирус простого герпеса и другие вирусы герпеса, вирусы гепатита В и С, а также другие вирусы гепатита, вирус иммунодефицита человека и вирус кори, все из которых могут вызвать важные клинические заболевания. Длительная инфекция может в конечном итоге привести к индукции заболевания, которое может быть, например, в случае рака печени, вызванного вирусом гепатита С, фатальным для пациента. Другие хронические вирусные инфекции, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают любой вирус группы V-VII, который использует вирус-специфическую полимеразу, которую можно использовать в качестве активирующего фермента для транскрипции не активного рекомбинантного нуклеотидного вектора/VLP, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот и вирусоподобные частицы с дефектом по репликации или композиции, содержащие такие конструкции/частицы, можно вводить одновременно с противомикробными, противовирусными и/или другими терапевтическими агентами. альтернативно, конструкции/частицы или композиции, содержащие такие конструкции/частицы, можно вводить в выбранное время до времени введения противомикробных, противовирусных и других терапевтических агентов.

Противовирусные препараты включают, но не ограничены ими, ритонавир, ацикловир, цидофовир, ганцикловир, фоскарнет, зидовудин, рибавирин и гидроксихлорохин.

Противовирусные препараты также включают, помимо прочего, такие препараты для лечения HIV, как:

низкомолекулярные ингибиторы слияния или проникновения HIV включают: бевиримат (DSB; PA-457); Викривирок, Маравирок (антагонист хемокиновых рецепторов» или «ингибитор CCR5»), Т-20 (энфувиртид, Фузеон, разработанный Roche and Trimeris), TRI-1144 и TRI-999 (см. Qian, K et al, Med Res Rev. 2009 Mar; 29(2):369-393 и Haggani and Tilton, Antiviral Res. 2013 May; 98(2):158-70). Подобным образом, примеры анти-HIV mAb включают антитела против CCR5 и CD4, и более конкретно: Ибализумаб (торговое название Trogarzo) представляет собой не иммунодепрессивное гуманизированное моноклональное антитело, которое связывает CD4; PRO 140 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, направленное против CCR5.

Противовирусные агенты для комбинированного лечения могут включать любой

один или комбинацию: ингибитора полимеразы HBV, интерферона, модуляторов TLR, таких как агонисты TLR-7 или агонисты TLR-9, терапевтические вакцины, иммунный активатор определенных клеточных сенсоров вирусной РНК, ингибитор проникновения вируса, ингибитор созревания вируса, особый модулятор сборки капсида, противовирусные соединения с другим или неизвестным механизмом.

Противовирусные агенты также могут быть любыми или комбинацией из: ЗТС, FTC, L-FMAU, интерферона, адефовира дипивоксила, энтекавира, телбивудина (L-dT), валторцитабина (3'-валинил L-dC), .бета.-D-диоксоланил-гуанина (DXG), .бета.-D-диоксоланил-2,6-диаминопурина (DAPD), .бета.-D-диоксоланил-6-хлорпурина (ACP), фамцикловира, пенцикловира, лобукавира, ганцикловира, рибавирина, тенофовира, биктегравира, эмтрицитабина, Биктарви и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество конструкций рекомбинантных нуклеиновых кислот и вирусоподобных частиц с дефектом по репликации или композиции, содержащей такие конструкции/частицы, как описано в настоящем документе, которое приводит к снижению титра вируса на, по меньшей мере, 2,5%, по меньшей мере, 5%, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 15%, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 45%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере 95% или, по меньшей мере 99% у субъекта/пациента/животного, которым вводили конструкции рекомбинантной нуклеиновой кислоты и вирусоподобные частицы с дефектом по репликации или композицию, содержащую такие конструкции/частицы, и подвергали лечению родственным способом, описанным в настоящем документе, относительно к вирусному титру или микробному титру у животного или группы животных (например, двух, трех, пяти, десяти или более животных), которым не вводили конструкции рекомбинантной нуклеиновой кислоты и вирусоподобные частицы с дефектом по репликации, или композицию, содержащую такие конструкции/частицы изобретения.

Примеры способов опосредованного вирусным вектором переноса

В некоторых вариантах осуществления конструкция рекомбинантной нуклеиновой кислоты включена в вирусоподобную частицу (дефектную по своей способности к саморепликации) для обеспечения переноса гена в клетку. Как правило, вирус просто подвергается воздействию соответствующей клетки-хозяина в физиологических условиях, что обеспечивает поглощение вируса. (См. патент США № 9,089,520). Настоящие способы могут быть адаптированы для использования различных вирусных векторов или вирусоподобных частиц для доставки рекомбинантных конструкций к желаемой клеточной мишени, как обсуждается ниже, и включают системы аденовирусных векторов, которые оптимизированы, чтобы быть не компетентными или не реплицирующими VLP.

1. Аденовирус

Аденовирус особенно подходит для использования в качестве вектора переноса генов из-за его генома ДНК среднего размера, простоты манипуляций, высокого титра,

широкого диапазона клеток-мишеней и высокой инфекционности. Вирусный геном размером примерно 36 т.п.н. ограничен инвертированными концевыми повторами (ITR) длиной 100-200 пар оснований (п.н.), в которых содержатся цис-действующие элементы, необходимые для репликации и упаковки вирусной ДНК. Ранние (E) и поздние (L) области генома, содержащие разные единицы транскрипции, делятся по началу репликации вирусной ДНК.

Область E1 (E1A и E1B) кодирует белки, ответственные за регуляцию транскрипции вирусного генома и некоторых клеточных генов. Экспрессия области E2 (E2A и E2B) приводит к синтезу белков для репликации вирусной ДНК. Эти белки участвуют в репликации ДНК, поздней экспрессии генов и выключении клетки-хозяина (Renan, M. J. (1990) *Radiother Oncol.*, 19, 197-218). Продукты поздних генов (L1, L2, L3, L4 и L5), включая большинство вирусных капсидных белков, экспрессируются только после значительного процессинга одного первичного транскрипта, выдаваемого главным поздним промотором (MLP). MLP (расположенный на 16,8 единицы картирования) особенно эффективен во время поздней фазы инфекции, и все мРНК, высвобождаемые из этого промотора, имеют 5' трехкомпонентную лидерную (TL) последовательность, что делает их полезными для трансляции.

В некоторых случаях полезно максимизировать переносимый объем AAV, чтобы можно было включить большие сегменты ДНК. Также очень желательно уменьшить токсичность и иммунологическую реакцию, связанную с некоторыми аденовирусными продуктами. Эти две цели до некоторой степени совпадают в том смысле, что устранение аденовирусных генов служит обоим целям.

Большое смещение ДНК возможно, поскольку все цис элементы, необходимые для репликации вирусной ДНК, локализованы в инвертированных концевых повторах (ITR) (100-200 п.н.) на обоих концах линейного вирусного генома. Плазмиды, содержащие ITR, могут реплицироваться в присутствии не дефектного аденовируса (Hay, R. T., et al., *J Mol. Biol.* 1984 Jun. 5; 175(4):493-510). Следовательно, делеция этих элементов в аденовирусном векторе предотвратит независимую репликацию.

Кроме того, упаковочный сигнал для вирусной инкапсуляции локализован между 194-385 п.н. (0,5-1,1 единицы картирования) на левом конце вирусного генома (Hearing et al., J. (1987) *Viol.*, 67, 2555-2558). Этот сигнал имитирует сайт узнавания белка в лямбда ДНК бактериофага, где специфическая последовательность, близкая к левому концу, но вне последовательности когезионного конца, опосредует связывание с белками, которые необходимы для встраивания ДНК в головную структуру. E1 векторы замещения Ad продемонстрировали, что фрагмент размером 450 п.н. (0-1,25 единиц картирования) на левом конце вирусного генома может направлять упаковку в клетки 293 (Levrero et al., *Gene*, 101:195-202, 1991).

Ранее было показано, что некоторые области аденовирусного генома могут быть включены в геном клеток млекопитающих, и кодируемые ими гены экспрессируются. Эти клеточные линии способны поддерживать репликацию аденовирусного вектора, который

лишен аденовирусной функции, кодируемой клеточной линией. Имеются также сообщения о комплементации аденовирусных векторов с дефектом по репликации "вспомогательными" векторами, например, вирусом дикого типа или условно дефектными мутантами.

Для получения VLP/аденовирусных векторов с дефектом по репликации *in vitro*, эти дефектные векторы могут быть дополнены, в процессе, хелперным вирусом. Однако это не позволяет выделять векторы с дефектом по репликации, поскольку присутствие хелперного вируса, необходимого для обеспечения функций репликации, могло бы загрязнить любой препарат. Таким образом, необходим дополнительный элемент, который добавил бы специфичности к репликации и/или упаковке вектора с дефектом по репликации. Этот элемент получают из упаковочной функции аденовируса.

Было показано, что сигнал упаковки для аденовируса существует в левом конце обычной карты аденовирусов (Tibbetts et. al. (1977) Cell, 12, 243-249). Более поздние исследования показали, что мутант с делецией в области E1A (194-358 п.н.) генома плохо рос даже в клеточной линии, которая дополняла раннюю (E1A) функцию (Hearing and Shenk, (1983) J. Mol. Biol. 167, 809-822). Когда компенсирующую аденовирусную ДНК (0-353 п.н.) рекомбинировали в правый конец мутанта, вирус упаковывался нормально. Дальнейший мутационный анализ идентифицировал короткий, повторяющийся, зависящий от положения элемент в левом конце генома Ad5. Было обнаружено, что одной копии повтора достаточно для эффективной упаковки, если он присутствует на любом конце генома, но не при перемещении внутрь молекулы Ad5 ДНК (Hearing et al., J. (1987) Virol., 67, 2555-2558).

Используя мутированные версии сигнала упаковки, можно создавать вспомогательные вирусы, которые упаковываются с разной эффективностью. Как правило, мутации представляют собой точечные мутации или делеции. Когда хелперные вирусы с низкой эффективностью упаковки выращивают в хелперных клетках, вирус упаковывается, хотя и с меньшей скоростью по сравнению с вирусом дикого типа, тем самым обеспечивая размножение хелпера. Однако, когда эти хелперные вирусы выращивают в клетках вместе с вирусом, который содержит сигналы упаковки дикого типа, сигналы упаковки дикого типа распознаются предпочтительно по сравнению с мутированными версиями. Учитывая ограниченное количество фактора упаковки, вирус, содержащий сигналы дикого типа, упаковывается селективно по сравнению с хелперами. Если предпочтение достаточно велико, можно получить упаковки, приближающиеся к гомогенности.

Чтобы улучшить тропизм конструкций ADV для определенных тканей или видов, последовательности рецептор-связывающих волокон часто могут быть заменены между аденовирусными изолятами. Например, лиганд Коксаки-аденовирусного рецептора (CAR), обнаруженный в аденовирусе 5, может быть заменен последовательностью CD46-связывающего волокна из аденовируса 35, создавая вирус со значительно улучшенной аффинностью связывания с гемопозитическими клетками человека. Полученный

«псевдотипированный» вирус, Ad5f35, стал основой для нескольких клинически разработанных вирусных изолятов. Более того, существуют различные биохимические способы модификации волокна, позволяющие перенаправить вирус на клетки-мишени. Способы включают использование бифункциональных антител (с одним концом, связывающим лиганд CAR, и одним концом, связывающим последовательность-мишень), и метаболическое биотинилирование волокна для обеспечения ассоциации с настроенными химерными лигандами на основе авидина. Альтернативно, можно присоединить лиганды (например, анти-CD205) с помощью гетеробифункциональных линкеров (например, ПЭГ-содержащих) к аденовирусной частице.

2. Ретровирус

Ретровирусы представляют собой группу одноцепочечных РНК-вирусов, характеризующихся способностью превращать свою РНК в двухцепочечную ДНК в инфицированных клетках с помощью процесса обратной транскрипции (Coffin, (1990) In: *Virology*, ed., New York: Raven Press, pp. 1437-1500). Полученная ДНК затем стабильно интегрируется в клеточные хромосомы как провирус и направляет синтез вирусных белков. Интеграция приводит к сохранению последовательностей вирусных генов в реципиентной клетке и ее потомках. Геном ретровируса содержит три гена - *gag*, *pol* и *env*, которые кодируют капсидные белки, полимеразный фермент и компоненты оболочки соответственно. Последовательность, обнаруженная выше гена *gag*, называемая *psi*, действует как сигнал для упаковки генома в вирионы. Две последовательности длинных концевых повторов (LTR) присутствуют на 5' и 3' концах вирусного генома. Они содержат сильные промоторные и энхансерные последовательности, а также необходимы для интеграции в геном клетки-хозяина (Coffin, 1990).

Чтобы сконструировать ретровирусный вектор, нуклеиновую кислоту, кодирующую промотор, встраивают в вирусный геном вместо определенных вирусных последовательностей, чтобы получить вирус, дефектный по репликации. Для получения вирионов конструируют упаковочную клеточную линию, содержащую гены *gag*, *pol* и *env*, но без компонентов LTR и *psi* (Mann et al., (1983) *Cell*, 33, 153-159). Когда рекомбинантная плазмида, содержащая кДНК человека, вместе с ретровирусными последовательностями LTR и *psi* вводится в эту клеточную линию (например, путем осаждения фосфатом кальция), последовательность *psi* позволяет упаковывать РНК транскрипт рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем секретируются в культуральную среду (Nicolas, J. F., and Rubenstein, J. L. R., (1988) In: *Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez and Denhardt, Eds.). Nicolas and Rubenstein; Temin et al., (1986) In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188; Mann et al., 1983). Среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы, собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Ретровирусные векторы способны инфицировать широкий спектр типов клеток. Однако интеграция и стабильная экспрессия многих типов ретровирусов требуют деления клеток-хозяев (Paskind et al., (1975) *Virology*, 67, 242-248). Подход, предназначенный для

обеспечения специфического нацеливания на ретровирусные векторы, недавно был разработан на основе химической модификации ретровируса путем химического добавления остатков галактозы к вирусной оболочке. Эта модификация может сделать возможным специфическое инфицирование клеток, таких как гепатоциты, через асиалогликопротеиновые рецепторы, если это необходимо.

Был разработан другой подход к таргетированию рекомбинантных ретровирусов, в котором использовали биотинилированные антитела против белка оболочки ретровируса и против специфического клеточного рецептора. Антитела сочетали через компоненты биотина с использованием стрептавидина (Roux et al., (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 9079-9083). Используя антитела против антигенов главного комплекса гистосовместимости класса I и класса II, было продемонстрировано инфицирование различных клеток человека, несущих эти поверхностные антигены, экотропным вирусом *in vitro* (Roux et al., 1989).

3. Аденоассоциированный вирус

AAV использует линейную одноцепочечную ДНК длиной примерно 4700 пар оснований. Инвертированные концевые повторы примыкают к геному. В геноме присутствуют два гена, что приводит к ряду различных генных продуктов. Первый, ген *сар*, продуцирует три различных белка вириона (VP), обозначенных как VP-1, VP-2 и VP-3. Второй, ген *гер*, кодирует четыре неструктурных белка (NS). Один или несколько из этих продуктов гена *гер* ответственны за трансактивацию транскрипции AAV.

Три промотора в AAV обозначаются их расположением, в единицах картирования, в геноме. Это, слева направо, p5, p19 и p40. Транскрипция дает начало шести транскриптам, по два иницируются на каждом из трех промоторов, при этом один из каждой пары подвергается сплайсингу. Сайт сплайсинга, полученный из единиц картирования 42-46, одинаков для каждого транскрипта. Четыре не структурных белка, по-видимому, происходят из более длинного транскрипта, и все три белка вириона возникают из самого маленького транскрипта.

AAV не связан с каким-либо патологическим состоянием у человека. Интересно, что для эффективной репликации AAV требуются «вспомогательные» функции от таких вирусов, как вирус простого герпеса I и II, цитомегаловирус, вирус псевдобешенства и, конечно же, аденовирус. Наиболее охарактеризованным из помощников является аденовирус, и было показано, что многие «ранние» функции этого вируса помогают репликации AAV. Считается, что низкий уровень экспрессии белков *гер* AAV сдерживает структурную экспрессию AAV, и считается, что заражение хелперным вирусом устраняет этот блок.

Концевые повторы вектора AAV могут быть получены путем переваром эндонуклеазы рестрикции AAV или плазмиды, такой как p201, которая содержит модифицированный геном AAV (Samulski et al., J. Virol., 61:3096-3101 (1987)), или другими способами, включая, но не ограничиваясь ими, химический или ферментативный синтез концевых повторов на основе опубликованной последовательности AAV.

Например, с помощью анализа делеции можно определить минимальную последовательность или часть ITR AAV, которые необходимы для обеспечения функционирования, т.е. стабильной и сайт-специфической интеграции. Также можно определить, какие незначительные модификации последовательности допустимы при сохранении способности концевых повторов направлять стабильную сайт-специфическую интеграцию.

Векторы на основе AAV оказались безопасными и эффективными средствами доставки генов *in vitro*, и эти векторы разрабатываются и тестируются на доклинических и клинических стадиях для широкого спектра применений в потенциальной генной терапии, как *ex vivo*, так и *in vivo*. (Carter and Flotte, (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 770; 79-90; Chattejee, et al., (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 770, 79-90; Ferrari et al., (1996) *J. Virol.*, 70, 3227-3234; Fisher et al., (1996) *J. Virol.*, 70, 520-532; Flotte et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90, 10613-10617, (1993); Goodman et al. (1994), *Blood*, 84, 1492-1500; Kaplitt et al., (1994) *Nat'l Genet.*, 8, 148-153; Kaplitt, M. G., et al., *Ann Thorac Surg.* 1996 December; 62(6):1669-76; Kessler et al., (1996) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 93, 14082-14087; Koeberl et al., (1997) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 94, 1426-1431; Mizukami et al., (1996) *Virology*, 217, 124-130).

Опосредованный AAV эффективный перенос генов и экспрессия в легких привели к клиническим испытаниям лечения муковисцидоза (Carter and Flotte, 1995; Flotte et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90, 10613-10617, (1993)). Точно так же, перспективы лечения мышечной дистрофии путем AAV-опосредованной доставки гена дистрофина в скелетные мышцы, болезни Паркинсона путем доставки гена тирозингидроксилазы в мозг, гемофилии В путем доставки гена фактора IX в печень и, потенциально, инфаркта миокарда с помощью гена сосудистого эндотелиального фактора роста в сердце, кажутся многообещающими, поскольку недавно было показано, что AAV-опосредованная экспрессия трансгена в этих органах является высокоэффективной (Fisher et al., (1996) *J. Virol.*, 70, 520-532; Flotte et al., 1993; Kaplitt et al., 1994; 1996; Koeberl et al., 1997; McCown et al., (1996) *Brain Res.*, 713, 99-107; Ping et al., (1996) *Microcirculation*, 3, 225-228; Xiao et al., (1996) *J. Virol.*, 70, 8098-8108).

Проблемы, связанные с направленной на печень генной терапией, заключаются в эффективном таргетировании гепатоцитов, стабильности генома вектора и стабильном высоком уровне экспрессии. Многие из этих препятствий можно преодолеть с помощью векторами переноса генов аденоассоциированных вирусов (AAV). Первый вектор переноса гена AAV, разработанный для использования *in vivo*, был основан на серотипе AAV2. AAV2 обладает широким тропизмом и относительно эффективно трансдуцирует многие типы клеток, включая гепатоциты, *in vivo*. Капсидный белок определяет серологический профиль, и, по меньшей мере, 12 серотипов AAV приматов уже охарактеризованы. Важно отметить, что псевдотипирование рекомбинантного вектора AAV различными капсидными белками может резко изменить тропизм. И AAV8, и AAV9 обладают более высокой аффинностью к гепатоцитам по сравнению с AAV2. В частности, AAV8 может трансдуцировать в 3-4 раза больше гепатоцитов и доставлять в 3-4 раза

больше геномов на трансдуцированную клетку по сравнению с AAV2 (см. Mark S. Sands, *Methods Mol. Biol.* 2011; 807: 141-157). В зависимости от дозы, AAV8 может трансдуцировать до 90-95% гепатоцитов в печени мыши после инъекции через портальную вену. Интересно, что сопоставимые уровни трансдукции могут быть достигнуты после внутривенной инъекции. Прямая внутривенная инъекция вектора AAV также обеспечивает относительно высокий уровень долгосрочной экспрессии. Дополнительную специфичность можно придать, используя специфичные для печени промоторы в сочетании с капсидными белками AAV8. В дополнение к лечению первичных дефектов гепатоцитов, иммунные реакции на трансгенные продукты могут быть сведены к минимуму путем обхода фиксированных тканевых макрофагов печени, клеток Купфера и ограничения экспрессии гепатоцитами. Способность таргетировать гепатоциты благодаря серотипу AAV и использованию специфичных для печени промоторов позволяет тестировать новые терапевтические подходы.

4. Лентивирусные векторы

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантную нуклеиновую кислоту или неспособные к репликации VLP трансдуцируют в клетки-мишени путем электропорации или путем трансфекции нуклеиновых кислот, белков, сайт-специфических нуклеаз, самореплицирующихся РНК-вирусов или лентивирусных векторов с дефицитом интеграции (о таких векторах см. патент США № 10,131,876).

В некоторых вариантах осуществления, трансдукция осуществляется с помощью лентивирусов, гамма-, альфа-ретровирусов или аденовирусов или с помощью электропорации или трансфекции нуклеиновыми кислотами (ДНК, мРНК, миРНК, антагомиры, ODN), белками, сайт-специфическими нуклеазами (цинк-пальцевыми нуклеазами, TALEN, CRISPR), самореплицирующимися РНК-вирусами (например, вирусом энцефалопатии лошадей) или лентивирусными векторами с дефицитом интеграции.

В дополнительных вариантах осуществления, доставку рекомбинантной нуклеиновой кислоты или VLP с дефектом по репликации можно осуществлять путем трансдукции указанных клеток лентивирусными векторами (см., Cockrell Adam S et al., "Gene delivery by lentivirus vectors", *Molecular Biotechnology*, vol. 36, No. 3, Jul. 2007)

Лентивирусные векторы с псевдотипом VSVG обеспечивают эффективную трансдукцию при автоматизированном методе производства. Однако настоящие способы полностью подходят для использования любого типа лентивирусного вектора (например, вируса кори (ML-LV), вируса лейкоза обезьян гиббонов (GALV), эндогенного ретровируса кошек (RD114), эндогенного ретровируса бабуинов (BaEV), производных псевдотипированных оболочек). Можно использовать другие вирусные векторы, такие как гамма- или альфа-ретровирусные векторы. При необходимости могут быть добавлены реагенты, усиливающие трансдукцию, с использованием автоматизированного производства, описанного в настоящем изобретении.

5. Другие вирусные векторы

Другие вирусные векторы могут быть использованы в качестве конструкций экспрессии в настоящих способах и композициях. Векторы, полученные из вирусов, таких как вирус коровьей оспы (Ridgeway, (1988) In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, pp. 467-492; Baichwal and Sugden, (1986) In, Gene Transfer, pp. 117-148; Coupar et al., Gene, 68:1-10, 1988) используют вирусы оспы канареек и вирусы герпеса. Эти вирусы предлагают несколько возможностей для переноса генов в различные клетки млекопитающих.

Способы лечения заболевания

Настоящие способы также охватывают способы лечения или профилактики вирусного заболевания или состояния, при которых введение рекомбинантных нуклеиновых кислот, продуктов VLP или фармацевтических композиций может осуществляться в различных эффективных количествах.

Термин «разовая доза» в отношении инокулята относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве разовых доз для млекопитающих, где каждая единица содержит заранее определенное количество фармацевтической композиции, рассчитанное для получения желаемого иммуногенного эффекта, в сочетании с требуемым разбавителем. Спецификации стандартной дозы инокулята диктуются уникальными характеристиками фармацевтической композиции и конкретным достигаемым иммунологическим эффектом и зависят от них.

Эффективное количество рекомбинантных нуклеиновых кислот, продуктов VLP или их фармацевтических композиций должно быть таким, чтобы более 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 97% инфицированных вирусом, например, HBV, Covid-19 и т. д. инфицированных клеток погибали. Термин также является синонимом «достаточного количества».

Эффективное количество для любого конкретного применения может варьироваться в зависимости от таких факторов, как заболевание или состояние, которое лечат, конкретная вводимая композиция, размер субъекта и/или тяжесть заболевания или состояния. Эффективное количество конкретной композиции, представленной в настоящем документе, можно определить эмпирически, не требуя ненужных экспериментов.

Термины «контактирующий» и «воздействующий» применительно к клетке, ткани или организму используются в настоящем документе для описания процесса, с помощью которого доставляются фармацевтическая композиция и/или другой агент, такой как, например, противовирусный агент, к клетке, ткани или организму-мишени или располагаются в непосредственном соседстве с клеткой, тканью или организмом-мишенью. Для достижения уничтожения или стаза клеток, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, продукты VLP или их фармацевтические композиции и/или дополнительный агент(ы) доставляют в одну или несколько клеток в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения инфицированных вирусом клеток или профилактики их деления. Введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты, продуктов VLP или

фармацевтической композиции может предшествовать, быть одновременным и/или следовать за другим агентом(ами) с интервалами от минут до недель. В вариантах осуществления, где фармацевтическую композицию и другой(ие) агент(ы) наносят по отдельности на клетку, ткань или организм, обычно следует гарантировать, что между моментами каждой доставки не истекает значительный период времени, так что фармацевтическая композиция и агент(ы) по-прежнему будут способны оказывать выгодное комбинированное воздействие на клетку, ткань или организм. Например, в таких случаях предполагается, что клетка, ткань или организм могут контактировать с двумя, тремя, четырьмя или более модальностями по существу одновременно (т.е. в течение менее примерно минуты) с фармацевтической композицией. В других аспектах, один или несколько агентов можно вводить по существу одновременно, в течение от примерно 1 минуты до примерно 24 часов, до примерно 7 дней, до примерно 1 до примерно 8 недель или более, и в любом диапазоне, вытекающем из этого, до и/или после введения рекомбинантной нуклеиновой кислоты, VLP или фармацевтических продуктов. Кроме того, могут применяться различные схемы комбинирования представленной в настоящем документе фармацевтической композиции и одного или нескольких агентов.

Составы и пути введения пациентам

Там, где предполагается клиническое применение, необходимо приготовить фармацевтические композиции - конструкции экспрессии, векторы экспрессии, слитые белки, трансфицированные или трансдуцированные клетки в форме, подходящей для предполагаемого применения. Как правило, это влечет за собой приготовление композиций, которые по существу не содержат пирогены, а также другие примеси, которые могут быть вредными для человека или животных.

Рекомбинантные нуклеиновые кислоты, продукты VLP или их фармацевтические композиции можно доставлять, например, в дозах примерно 1-5 миллионов частиц на дозу. Могут быть предоставлены флаконы или другие контейнеры, содержащие продукт, например, с объемом на флакон от примерно 0,25 мл до примерно 10 мл, например, примерно 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мл, например, примерно 2 мл.

Как правило, может потребоваться применение подходящих солей и буферов, когда рекомбинантные нуклеиновые кислоты или продукты VLP вводят пациенту. Фраза «фармацевтически или фармакологически приемлемый» относится к молекулярным соединениям и композициям, которые не вызывают побочных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животному или человеку. Фармацевтически приемлемый носитель включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и подобные. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно. За исключением случаев, когда любая обычная среда или агент несовместимы с векторами или клетками, предполагается их использование в терапевтических композициях. В композиции также могут быть

включены дополнительные активные ингредиенты.

После составления, растворы будут вводиться способом, совместимым с дозированным составом, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Композиции легко вводятся в различных дозированных формах, таких как растворы для инъекций, капсулы для высвобождения лекарственного средства и подобные. Для парентерального введения в водном растворе, например, раствор может быть соответствующим образом забуферен, если это необходимо, и жидкий разбавитель сначала делается изотоническим с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим, можно использовать стерильные водные среды. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса, либо ввести в предполагаемое место инфузии (см., например, «Remington's Pharmaceutical Sciences», 15th Edition, страницы 1035-1038 и 1570-1580). Некоторое изменение дозировки обязательно будет иметь место в зависимости от состояния субъекта, которого лечат. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определяет соответствующую дозу для отдельного субъекта. Кроме того, для введения человеку препараты могут соответствовать стандартам стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты, как того требуют стандарты FDA Office of Biologics.

Композиции могут быть составлены для аэрозольной доставки субъекту. Для аэрозольной доставки, описанные композиции могут быть приготовлены в водных растворах, таких как вода, или в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Раствор может содержать один или несколько агентов для составов, таких как суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты.

Системы доставки по настоящему изобретению, которые доставляют полинуклеотиды по настоящему изобретению в нужную клетку субъекта, не ограничиваются VLP по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит вектор аденоассоциированного вируса (AAV), липосому, наночастицу, мицеллу, полимерную везикулу или полимерсому.

В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит вектор, полученный из AAV. Векторы AAV являются одними из наиболее часто используемых векторов для генной терапии. AAV представляет собой небольшой безоболочечный вирус класса II, чей геном закодирован в одной длинной одноцепочечной молекуле ДНК. Векторы, полученные из AAV, обладают способностью прикрепляться и проникать в клетку-мишень, переносить генетический материал в ядро и экспрессировать эту информацию в течение продолжительных периодов времени при общем отсутствии токсичности. Векторы, полученные из AAV, обычно не кодируют компоненты AAV, необходимые для сайт-специфической интеграции в геном хозяина, и обычно сохраняются в виде внехромосомных элементов. Векторы AAV также способны в

некоторой степени избирательно таргетировать ткани и органы. Таким образом, векторы AAV представляют собой возможный механизм доставки полинуклеотидов одноцепочечной ДНК по настоящему описанию в желаемую клетку субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть упакованы в не вирусную систему доставки для доставки в желаемую клетку-мишень субъекта. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды по настоящему изобретению упакованы в наночастицу, мицеллу, полимерную везикулу или полимерному для доставки в желаемую клетку-мишень субъекта. В некоторых вариантах осуществления, эти продукты могут быть составлены в виде аэрозоля для доставки с помощью ингалятора или в виде наночастиц. Дополнительные пути доставки включают: местный, чрескожный, внутривенный, подкожный и интратекальный. В некоторых вариантах осуществления, наночастица инкапсулирует оцРНК, кодирующую терапевтическое средство, которое затем можно вводить системно или локально, например, с помощью аэрозольной доставки. Аэрозольная доставка может быть использована для доставки терапевтического средства в легкие пациента, инфицированного вирусом, как представлено в настоящем документе, таким как коронавирус.

Кроме того, ожидается, что у некоторых пациентов это лечение будет периодически повторяться для уменьшения или устранения любых оставшихся вирусов/вирионов. Такое периодическое лечение может варьироваться от одного раза в неделю, одного раза каждые 2 недели, одного раза каждые 3 недели, одного раза каждый месяц до одного раза каждые два месяца, до одного раза каждые 3 месяца, до одного раза каждые 4 месяца, до одного раза каждые 5 месяцев, до одного раза каждые 6 месяцев, или до одного раза каждые 7 месяцев или до одного раза каждые 8 месяцев, или до одного раза каждые 9 месяцев, или до одного раза каждые 10 месяцев, или каждые 11 месяцев, или один раз в год в качестве поддерживающей терапии так долго, как потребуется пациенту для достижения стабильного состояния или не диагностируемого заболевания.

Комбинированная и чередующаяся терапия

Было признано, что лекарственно-резистентные варианты многих вирусных инфекций, включая HIV, HBV и HCV, могут возникать после длительного лечения противовирусным средством. Лекарственная резистентность чаще всего возникает в результате мутации гена, который кодирует белок, такой как фермент, используемый при репликации вируса, и чаще всего в случае HIV, обратную транскриптазу, протеазу или ДНК-полимеразу, и в случае HBV, ДНК полимеразу или, в случае HCV, РНК полимеразу, протеазу или геликазу. Недавно было продемонстрировано, что эффективность лекарственного средства против HIV инфекции может быть продлена, усилена или восстановлена путем введения соединения в комбинации или чередования со вторым и, возможно, третьим противовирусным соединением, вызывающим мутацию, отличную от мутации, вызванной главным лекарственным средством. Соединения, которые можно использовать для комбинирования, выбирают из группы, состоящей из ингибитора HBV

полимеразы, интерферона, модуляторов TLR, таких как агонисты TLR-7 или агонисты TLR-9, терапевтических вакцин, иммунного активатора определенных клеточных сенсоров вирусной РНК, ингибитора проникновения вируса, ингибитора созревания вируса, отдельного модулятора сборки капсида, противовирусных соединений с другим или неизвестным механизмом и их комбинации. Альтернативно, фармакокинетика, биораспределение или другие параметры лекарственного средства могут быть изменены с помощью такой комбинированной или чередующейся терапии. В целом, комбинированная терапия обычно предпочтительнее чередующейся терапии, поскольку она вызывает множественные одновременные воздействия на вирус.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает схему контроля гибели клеток путем поддержания пациента на противовирусном лечении, таком как тенофовир и т.д., во время доставки конструкции; затем циклическое прекращение противовирусного лечения пациента на периоды или время в диапазоне от 2 недель до 1 месяца, что позволяет репликацию вируса и ограничивает гибель вирусных клеток, чтобы не возникала подавляющая ситуация гибели вирусных клеток печени или гибель подобных клеток.

После такого цикла пациент возвращается к противовирусному лечению, позволяющему восстановить ткань; и повторение цикла каждые 8 недель, каждые 12 недель, каждые 16 недель, каждые 20 недель и т. д. до тех пор, пока есть польза для пациента.

Дополнительные соединения для комбинированной или чередующейся терапии для лечения HBV включают ЗТС, FTC, L-FMAU, интерферон, адефовир дипивоксил, энтекавир, телбивудин (L-dT), валторцитабин (3'-валинил L-dC), .бета.-D-диоксоланилгуанин (DXG), .бета.-D-диоксоланил-2,6-диаминопурин (DAPD) и .бета.-D-диоксоланил-6-хлорпурин (ACP), фамцикловир, пенцикловир, лобукавир, ганцикловир и рибавирин.

НАБОРЫ

Дополнительно, некоторые компоненты или варианты этих рекомбинантных нуклеиновых кислот, продукты VLP или их фармацевтические композиции могут быть предоставлены в наборе. Например, любые рекомбинантные нуклеиновые кислоты или продукты VLP могут быть представлены в замороженном виде и упакованы в виде набора отдельно или вместе с отдельными контейнерами любых других агентов, полученных на стадиях предварительной подготовки или последующей подготовки, и необязательными инструкциями по применению.

Некоторые варианты осуществления также относятся к любой из вышеупомянутых композиций в наборе. В некоторых вариантах осуществления, набор может включать ампулы, одноразовые шприцы, капсулы, флаконы, пробирки и подобные. В некоторых вариантах осуществления, набор может содержать контейнер с одной дозой или контейнер с несколькими дозами, содержащий состав для местного применения в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, каждый дозированный контейнер может содержать одну или

несколько стандартных доз. В некоторых вариантах осуществления, набор может включать аппликатор. В некоторых вариантах осуществления, наборы включают все компоненты, необходимые для стадий подготовки/лечения. В некоторых вариантах осуществления, клеточные композиции могут содержать консерванты или не содержать консерванты (например, в одноразовом контейнере). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты или продукты VLP могут быть приготовлены и заморожены на желаемой стадии, подходящей для доставки в больницу или лечебный центр.

Кроме того, у некоторых пациентов ожидается, что любой из способов или схем лечения будет периодически повторяться для усиления ответа иммунной системы на вирусный агент/ы. Такое периодическое лечение может варьироваться от одного раза в неделю, месяц, до одного раза каждые два месяца, до одного раза каждые 3 месяца, до одного раза каждые 4 месяца, до одного раза каждые 5 месяцев, до одного раза каждые 6 месяцев, или до одного раза каждые 7 месяцев или до одного раза каждые 8 месяцев, или до одного раза каждые 9 месяцев, или до одного раза каждые 10 месяцев, или каждые 11 месяцев, или один раз в год в качестве поддерживающей терапии до тех пор, пока это требуется пациенту.

Хотя изобретение было описано в отношении различных предпочтительных вариантов осуществления, оно не предназначено для ограничения ими, но, скорее, специалисты в данной области техники признают, что в него могут быть внесены изменения и модификации, которые находятся в пределах сути изобретения и объема прилагаемых пунктов формулы изобретения.

В некоторых вариантах осуществления, тестовые конструкции, описанные в настоящем документе, используют AAV8 в качестве вектора доставки, поскольку он таргетирует клетки печени; неспецифическое таргетирование будет протестировано в различных контрольных группах, как указано. TBG (тироксин-связывающий глобулин) используется в качестве специфичного для печени промотора, он включается специфическими факторами транскрипции, вырабатываемыми только в клетках печени. Это будет стимулировать экспрессию рекомбинантного транскрипта, который имеет обратную комплементарную структуру и, следовательно, считается нефункциональным и подвергается дальнейшей деградации без присутствия сигнала распознавания вирусной транскрипции, которым в настоящем случае является эpsilon последовательность (SEQ ID NO: 1).

Эти эксперименты предназначены для демонстрации того, что тестовые конструкции будут экспрессироваться только в HBV-инфицированных клетках печени, где присутствует ДНК-полимераза HBV, и взаимодействовать со встроенными последовательностями распознавания транскрипции HBV Эpsilon и транскрибировать HBV-транскрипт «вирусного самоубийства». После этого процесса, смысловые транскрипты HBV (которые представляют собой смысловые транскрипты, распознаваемые эpsilon последовательностью, кодирующей Casp9) теперь могут быть

транскрибированы и транслированы механизмом клетки-хозяина для кодирования Casp 9, которая находится под сильным конститутивно активным промотором EFS, который инициирует запрограммированную гибель клеток - апоптоз инфицированных вирусом клеток-хозяев, избавляя любую другую не инфицированную клетку от апоптоза.

Эти результаты проиллюстрированы схемами, картами, графиками и таблицами на ФИГУРЕ 1-12 и более подробно пояснены ниже в примерах 1-6.

ПРИМЕР 1

НерAD38 представляет собой клеточную линию, которая реплицирует вирус гепатита В человека (HBV) в условиях, которые можно регулировать тетрациклином. В присутствии антибиотика эта клеточная линия свободна от вируса из-за подавления синтеза прегеномной (пг) РНК. При удалении тетрациклина из культуральной среды клетки экспрессируют вирусную пгРНК, накапливают в цитоплазме субвирусные частицы, содержащие промежуточные ДНК, характерные для вирусной репликации, и выделяют в супернатант вирусоподобные частицы. Поскольку клеточная линия НерAD38 может продуцировать высокие уровни ДНК HBV, она должна быть полезна для анализа цикла вирусной репликации, который зависит от синхронизированного синтеза вирусной ДНК. Кроме того, эта клеточная линия была преобразована в высокопроизводительный клеточный анализ, который позволяет проводить крупномасштабный скрининг различных библиотек соединений на наличие новых классов ингибиторов репликации HBV. См. Ladner S.K. et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Aug;41(8):1715-20. Таким образом, клеточная линия НерAD38 представляет собой подходящую модель системы *in vitro* для изучения вируса гепатита В человека (HBV).

Нер G2 представляет собой бессмертную клеточную линию, полученную из ткани печени 15-летнего американского подростка европейского происхождения с хорошо дифференцированной гепатоцеллюлярной карциномой. Эти клетки являются эпителиальными по морфологии, имеют модальное число хромосом 55 и не являются онкогенными у голых мышей. Клетки секретируют различные основные белки плазмы, например альбумин, и белки острой фазы фибриноген, альфа-2-макроглобулин, альфа-1-антитрипсин, трансферрин и пламиноген. Их успешно выращивают в крупномасштабных системах культивирования. Поверхностные антигены вируса гепатита В на этих клетках не обнаружены. Гепатит G2 будет реагировать на стимуляцию гормоном роста человека. Таким образом, клетки Нер G2 являются подходящей моделью системы *in vitro* для изучения поляризованных гепатоцитов человека.

Для тестирования «вирус-специфических цитотоксических» конструкций, описанных в настоящем документе, использование клеток НерG2 служит контролем нормальных, здоровых клеток печени. Поскольку клетки НерG2 представляют собой клетки печени, не инфицированные HBV, они не должны подвергаться влиянию теста на дефект по репликации: AAV8-HBV-DRS1 (EF1a > HBV-rcCasp9), использованный в эксперименте 1, с результатами, показанными на ФИГУРЕ 2А и ФИГУРЕ 2С.

Напротив, клеточную линию НерAD38 используют в качестве модели HBV+ для

тестирования одной из описанных в настоящем документе «вирус-специфических цитотоксических» конструкций: конструкции с дефектом по репликации: AAV8-HBV-DRS1 (EF1a > HBV-rcCasp9) (вектор, показанный на ФИГУРЕ 2А). Результаты, показанные для эксперимента 1, группы 1-3, показывают, что тестовая конструкция группы 2 AAV8-HBV-DRS1 (EF1a > HBV-rcCasp9) в клетках HepAD38 демонстрирует вируса-специфичную гибель клеток, как показано в графических данных на ФИГУРЕ 2В, и соответствующие количества клеток и их жизнеспособность описаны на ФИГУРЕ 2С.

ПРИМЕР 2

Кроме того, в эксперименте 2, показанном на ФИГУРЕ 3А и ФИГУРЕ 3В, а также ФИГУРЕ 4А, ФИГУРЕ 4В и 4С, конструкцию AAV8-HBV-DRS1 (EF1a > HBV-rcCasp9) дополнительно тестируют в клетках HepG2 и клетках HepAD38, и в некоторых тестируемых группах используют ингибитор каспазы-9 Z-LEHD-FMK, чтобы проиллюстрировать, что уничтожение было результатом экспрессии Casp9 (См. группу 3 и группу 5). Результаты этих экспериментов иллюстрируют вирус-специфичную гибель клеток в клетках группы 2 HepAD38, которые демонстрируют практически 80% степень гибели клеток. ФИГУРА 5А представляет собой векторную карту, и ФИГУРА 5В представляет собой комбинированный график, показывающий эффекты тестируемых конструкций и различных контролей в клетках HepG2 и клетках HepAD38, чтобы подчеркнуть резкую гибель клеток в клетках HepAD38, инфицированных конструкции AAV8-HBV-DRS1 (EF1a > HBV-rcCasp9).

ПРИМЕР 3

Наконец, в эксперименте 3 протестирована конструкция AAV8-HBV-DRS2 (TBG > HBV-rcCasp9). Эта конструкция содержит специфичный для печени промотор, тироксинсвязывающий глобулин (ТГВ). Результаты этих экспериментов иллюстрируют вирус-специфичную гибель клеток в клетках HepAD38 группы 2, которые демонстрируют уровень гибели клеток почти 80% (ФИГУРА 6А и ФИГУРА 6В). В этой группе, клетки группы 1 не трансдуцированы, клетки группы 2 являются тестируемыми клетками, трансдуцированными AAV8-HBV-DRS2 (TBG > HBV-rcCasp9); клетки группы 3 являются ими же, с добавлением ингибитора Casp9 z-LEHD.fmk; клетки группы 4 контактируют только с ингибитором Casp9 z-LEHD.fmk в качестве контроля; клетки группы 5 трансдуцированы конструкцией, содержащей GFP, для дальнейшего отслеживания экспрессии конструкции; клетки группы 6 трансдуцированы той же конструкцией GFP и также инкубированы с ингибитором Casp9 z-LEHD.fmk.

Контрольные группы тестируемый вектор+ингибитор Casp9 в экспериментах 2-3 показали, что гибель клеток инициируется каспазой-9, а не токсичностью вектора/ДНК.

Контрольные группы GFP-AAV в экспериментах 2-3 показали, что гибель клеток не была связана с токсичностью AAV.

ПРИМЕР 4

В эксперименте 4 клетки, инфицированные HBV или продуцирующие HBV, обрабатывают РНК HBV, как описано в настоящем документе, и рассчитывают средний

процент гибели клеток на основе жизнеспособности клеток. К 4 дню, средняя гибель клеток различных HBV продуцирующих клеток составила 92% (от 88,6% до 95,8%). В не инфицированных клетках не наблюдается значительной гибели клеток. Ингибиторы RT и пан-каспазы по отдельности предотвращают гибель клеток в инфицированных клетках, обработанных AAV. Эти результаты показывают, что конструкция РНК HBV избирательно убивает инфицированные или продуцирующие HBV клетки.

ПРИМЕР 5

ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА МОДЕЛЯХ ГЕПАТИТА МЫШЕЙ IN VIVO

Эти конструкции были дополнительно протестированы на *in vivo* мышинной модели, и результаты иллюстрируют вирус-специфичную гибель клеток для тестируемых конструкций AAV8-HBV-DRS1 (EF1a > HBV-rcCasp9) и AAV8-HBV-DRS2 (TBG > HBV-rcCasp9) (ФИГУРА 9).

В приведенном выше разделе показаны результаты новой *in vitro* экспериментальной проверки концепции по включению полимеразы вируса гепатита В (HBV) (pol) для индукции апоптоза инфицированных гепатоцитов. Модель трансгенных мышей HBV также используют для оценки *in vivo* эффективности и специфичности механизма этих конструкций и подхода.

Способы

Частицы AAV упаковывают с запатентованной векторной конструкцией, которая экспрессирует не функциональную некодирующую (нк)РНК, фланкированную последовательностями, специфичными для домена обратной транскриптазы (RT) HBV pol (HBV pol/RT). нкРНК распознается с помощью pol/RT HBV и подвергается обратной транскрипции в двухцепочечную (дц)ДНК, которая закодирована для сверхэкспрессии каспазы-9 (casp-9) (ФИГУРА 1А и ФИГУРА 1В). Трансгенным мышам HBV, по пять на группу, вводят частицы AAV, экспрессирующие векторы под промотором EF1a или специфичного для печени тироксинсвязывающего глобулина (TBG), вектора GFP или плацебо. Ежедневно контролируют периферическую кровь на ферменты печени и HBeAg. Сердце, легкие, почки и печень собирают на 14 или 28 день и оценивают распределение AAV VP в тканях с помощью ИНС и вестерн-блоттинга. Casp-9, продукты расщепления каспазы и двойное окрашивание коровых белков HBV с помощью casp-9 также оценивают с помощью ИНС. Кроме того, HBV pol-экспрессирующие или не экспрессирующие клетки HepG2-Red-Fluc имплантируют в печень бестимусных мышей с матригелем для облегчения локального роста опухоли. Затем мышей обрабатывают AAV, экспрессирующими тестируемый вектор. В различные моменты времени мышам вводят субстрат D-люциферина для количественной оценки изменений размера опухоли с помощью системы визуализации IVIS Lumina S5.

Результаты

Органы, взятые у трансгенных мышей на 14-й день после лечения, показали значительную экспрессию casp-9 в клетках печени и почек, экспрессирующих HBV, но не в клетках, не экспрессирующих HBV. В тканях почек мышей, обработанных вектором,

несущим промотор TBG, не было повышенной экспрессии casp-9 по сравнению с необработанными и контрольными GFP. Кроме того, клетки в других органах, которые были окрашены положительно для лечения частицами AAV, не проявляли сверхэкспрессии casp-9. Печень, собранная на 28 день после лечения, показала диффузные области инфильтрации апоптозными нейтрофилами в группах лечения, но не в контрольной группе (ФИГУРА 11А). На 4 неделе в группах лечения уровень ALT увеличился в 1,8-2,2 раза, и уровень AST увеличился в 1,4 раза по сравнению с контролем GFP-AAV и плацебо. (ФИГУРА 11В). Значимых изменений периферического HBeAg не было. Будут оценены результаты исследования лечения ксенотрансплантации голых мышей.

Выводы

Новый вектор AAV для захвата HBV pol специфически индуцирует сверхэкспрессию Casp-9 и апоптоз в HBV-экспрессирующих клетках *in vitro* и *in vivo*. Схематический обзор этого процесса показан на ФИГУРЕ 11С. Отсутствие снижения периферического HBeAg ожидалось, поскольку регенерирующая ткань печени у трансгенных мышей конститутивно экспрессирует антиген. Эти данные указывают на потенциально новый путь лечения или излечения инфекции HBV.

Последовательности

SEQ ID NO:1: Эпсилон сигнал РНК полимеразы HBV

UGUUCAUGUCCUACUGUUCAAGCCUCCAAGCUGUGCCUUGGGUGGCUUUG
GGGCAUGGACA

SEQ ID NO:2: промотор EFS

GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGA
AGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTA
AACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA
ACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC
CAGAACACAGG

SEQ ID NO:3: ORF каспазы 9 (Casp9) человека

ATGGACGAAGCGGATCGGCGGCTCCTGCGGCGGTGCCGGCTGCGGCTGGTGG
AAGAGCTGCAGGTGGACCAGCTCTGGGACGCCCTGCTGAGCCGCGAGCTGTTCAGG
CCCCATATGATCGAGGACATCCAGCGGGCAGGCTCTGGATCTCGGCGGGATCAGGC
CAGGCAGCTGATCATAGATCTGGAGACTCGAGGGAGTCAGGCTCTTCSTTTGTTCAT
CTCCTGCTTAGAGGACACAGGCCAGGACATGCTGGCTTCGTTTTCTGCGAACTAACAG
GCAAGCAGCAAAGTTGTCGAAGCCAACCCTAGAAAACCTTACCCACAGTGGTGCTCA
GACCAGAGATTTCGCAAACCAGAGGTTCTCAGACCGGAAACACCCAGACCAGTGGAC
ATTGGTTCTGGAGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCA
GATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAAT
GTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGT
GAGAAGTTGCGGCGTTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGAC
CTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGG

TGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCT
 GCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTTCGGTCGAGAAGA
 TTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTC
 TTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCC
 ACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTC
 CAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCC
 AGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCA
 AGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACT
 CTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGA
 TTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAC
 ATCATAA

SEQ ID NO:4: обратный комплемент Casp9

TTATGATGTTTTAAAGAAAAGTTTTTCCGGAGGAAATTAAGCAACCAGGC
 ATCTGTTTATAAATCCCTTTCACCGAAACAGCATTAGCGACCCTAAGCAGGAGGGAC
 TGCAGGTCTTCAGAGTGAGCCCACTGCTCAAAGATGTCGTCCAGGGTCTCAACGTAC
 CAGGAGCCACTCTTGGGGTCCCTCCAGGAAACAAAACCTGGGAAAGTAGAGTAGGA
 CACAAAGATGTCAGTGGGTGTGGGCAAACCTAGATATGGCGTCCAGCTGGTTCGAAGG
 TCCTCAAACCTCCTGGAACGGGGTGGCATCTGGCTCGGGGTTACTGCCAGGGGACT
 CGTCTTCAGGGGAAGTGGAGGCCACCTCAAACCCATGGTCTTTCTGCTCCCCACCAC
 AGGCCTGGATGAAAAAGAGCTTGGGCTTCCCTCCCAGGCTGGGGCAGCTGGTCCCA
 TTGAAGATGTTCACAATCTTCTCGACCGACACAGGGCATCCATCTGTGCCGTAGACA
 GCCCCTGGGAACTGCAGGTGGCTGGCCTGACAGCCGTGAGAGAGAATGACCACCAC
 GCAGCAGTCCAGAGCACCGTGGTCTGCTGCGCCAGCTCCAGCAAAGCCAGCACCA
 TTTTCTTGGCAGTCAGGTCGCCCTTACCTCCACCATGAAATGCAGCGAGGAGAAGC
 GACGCCGCAACTTCTCACAGTCGATGTTGGAGCCAGTGCGGGTGCGGAGCCCGGAC
 TCACGGCAGAAGTTCACATTGTTGATAATGAGGCAGTGGCCACAGGGCTCCATGCTC
 AGGATGTAAGCCAAATCTGCATTTCCCCTCAAACCTCTCAAGAGCACCGACATCACCA
 AATCCTCCAGAACCAATGTCCACTGGTCTGGGTGTTTCCGGTCTGAGAACCTCTGGT
 TTGCGAATCTCTGGTCTGAGCACCCTGGGGTAAGGTTTTCTAGGGTTGGCTTCGAC
 AACTTTGCTGCTTGCCTGTTAGTTCGCAGAAACGAAGCCAGCATGTCCTGGCCTGTG
 TCCTCTAAGCAGGAGATGAACAAAGGAAGAGCCTGACTCCCTCGAGTCTCCAGATC
 TATGATCAGCTGCCTGGCCTGATCCCGCCGAGATCCAGAGCCTGCCCGCTGGATGTC
 CTCGATCATATGGGGCCTGAACAGCTCGCGGCTCAGCAGGGCGTCCCAGAGCTGGT
 CCACCTGCAGCTCTTCCACCAGCCGCAGCCGGCACCGCCGCAGGAGCCCGCCGATCC
 GCTTCGTCCAT

SEQ ID NO:5: обратный комплемент промотора EFS.

CCTGTGTTCTGGCGGCAAACCCGTTGCGAAAAAGAACGTTACGGCGACTAC
 TGCACTTATATACGGTTCTCCCCACCCTCGGGAAAAAGGCGGAGCCAGTACACGA
 CATCACTTTCCAGTTTACCCCGCGCCACCTTCTCTAGGCACCGGATCAATTGCCGA
 CCCCTCCCCCAACTTCTCGGGGACTGTGGGCGATGTGCGCTCTGCCCACTGACGGG

CACCGGAGCC

SEQ ID NO:6: SV40 поли-А

ACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAAT
TTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCA
ATGTATCTTATCATGTCTGGCTCT

SEQ ID NO:7: обратный комплемент поли-А SV40.

AGAGCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGA
ATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAA
CCATTATAAGCTGCAATAAACAAGT

SEQ ID NO:8: Конструкция (транскрипт): (1746 п.н.)

ATGTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTG
GGGCATGGACAAGAGCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAC
AACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTT
ATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTTATGATGTTTTAAAGAAAAGTTT
TTCCGGAGGAAATTAAGCAACCAGGCATCTGTTTATAAATCCCTTTCACCGAAAC
AGCATTAGCGACCCTAAGCAGGAGGGACTGCAGGTCTTCAGAGTGAGCCCACTGCT
CAAAGATGTCGTCCAGGGTCTCAACGTACCAGGAGCCACTCTTGGGGTCCCTCCAGG
AAACAAAACCTGGGAAAGTAGAGTAGGACACAAAGATGTCACTGGGTGTGGGCAA
ACTAGATATGGCGTCCAGCTGGTTCGAAGGTCCTCAAACCTTCCTGGAACGGGGTGG
CATCTGGCTCGGGGTTACTGCCAGGGGACTCGTCTTCAGGGGAAGTGGAGGCCACC
TCAAACCCATGGTCTTTCTGCTCCCCACCACAGGCCTGGATGAAAAAGAGCTTGGGC
TTCCCTCCAGGCTGGGGCAGCTGGTCCCATTGAAGATGTTTACAATCTTCTCGACC
GACACAGGGCATCCATCTGTGCCGTAGACAGCCCCTGGGAACTGCAGGTGGCTGGC
CTGACAGCCGTGAGAGAGAATGACCACCACGCAGCAGTCCAGAGCACCGTGGTCTT
GCTGCGCCAGCTCCAGCAAAGCCAGCACCATTTTCTTGGCAGTCAGGTCCGCCCTTCA
CCTCCACCATGAAATGCAGCGAGGAGAAGCGACGCCGCAACTTCTCACAGTCGATG
TTGGAGCCAGTGCGGGTGCAGGAGCCCGGACTCACGGCAGAAGTTCACATTGTTGAT
AATGAGGCAGTGGCCACAGGGCTCCATGCTCAGGATGTAAGCCAAATCTGCATTTT
CCCTCAAACCTCTCAAGAGCACCGACATCACCAAATCCTCCAGAACCAATGTCCACTG
GTCTGGGTGTTTCCGGTCTGAGAACCTCTGGTTTGCGAATCTCTGGTCTGAGCACCA
CTGGGGTAAGGTTTTCTAGGGTTGGCTTCGACAACCTTTGCTGCTTGCCTGTTAGTTCC
CAGAAACGAAGCCAGCATGTCCTGGCCTGTGTCCTCTAAGCAGGAGATGAACAAAG
GAAGAGCCTGACTCCCTCGAGTCTCCAGATCTATGATCAGCTGCCTGGCCTGATCCC
GCCGAGATCCAGAGCCTGCCCCGCTGGATGTCCTCGATCATATGGGGCCTGAACAGCT
CGCGGCTCAGCAGGGCGTCCCAGAGCTGGTCCACCTGCAGCTCTTCCACCAGCCGCA
GCCGGCACCGCCGAGGAGCCGCGGATCCGCTTCGTCCATCCTGTGTTCTGGCGGCA
AACCCGTTGCGAAAAAGAACGTTACGGCGACTACTGCACTTATATACGGTTCTCCC
CCACCCTCGGGAAAAAGGCGGAGCCAGTACACGACATCACTTTCCAGTTTACCCC
GCGCCACCTTCTCTAGGCACCGGATCAATTGCCGACCCCTCCCCCAACTTCTCGGG
GACTGTGGGCGATGTGCGCTCTGCCCACTGACGGGCACCGGAGCCTGTTTCATGTCCT

ACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGGCATGGACATAA

SEQ ID NO: 9

Последовательность обратного комплемента «промотора EFS, управляющего геном zsGreen», фланкированная между эpsilon сигналами HBV:

ATGTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTG
GGGCATGGACAAGAGCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAC
AACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTT
ATTTGTAACCATTTATAAGCTGCAATAACAAGTTTAGGGCAAGGCGGAGCCGGAGG
CGATGGCGTGTCTCGGTCAGGTGCCACTTCTGGTTCTTGGCGTCTGCTGCGGTCTCGC
GGGTCAGCTTGTGCTGGATGAAGTGCCAGTCGGGCATCTTGCGGGGCACGGACTTG
GCCTTGTACACGGTGTGCAACTGGCAGCGCAAGCGGCCACCGTCCTTCAGCAGCAG
GTACATGCTCACGTGCGCCCTTCAAGATGCCCTGCTTGGGCACGGGGATGATCTTCTC
GCAGGAGGGCTCCCAGTTGTCGGTCATCTTCTTCATCACGGGGCCGTCGGCGGGGAA
GTTACGCCGTAGAACTTGGACTCGTGGTACATGCAGTTCTCCTCCACGCTCACGGT
GATGTCGGCGTTGCAGATGCACACGGCGCCGTCCTCGAACAGGAAGGAGCGGTCCC
AGGTGTAGCCGGCGGGGCAGGAGTTCTTGAAGTAGTCGACGATGTCCTGGGGGTAC
TCGGTGAACACGCGGTTGCCGTACATGAAGGCGGCGGACAAGATGTCCTCGGCGAA
GGGCAAGGGGCCGCCCTCCACCACGCACAGGTTGATGGCCTGCTTGCCTTGAAGG
GGTAGCCGATGCCCTCGCCGGTGTACGAACCTTGTGGCCGTCACGCAGCCCTCCA
TGCGGTACTTCATGGTCATCTCCTTGGTCAGGCCGTGCTTGGACTGGGCCATCCTGT
GTTCTGGCGGCAAACCCGTTGCGAAAAAGAACGTTACGGCGACTACTGCACTTAT
ATACGGTTCTCCCCACCTCGGGAAAAAGGCGGAGCCAGTACACGACATCACTTTC
CCAGTTTACCCCGCGCCACCTTCTCTAGGCACCGGATCAATTGCCGACCCCTCCCC
CAACTTCTCGGGGACTGTGGGCGATGTGCGCTCTGCCACTGACGGGCACCGGAGC
CTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGGCATG
GACATAA

ПРИМЕР 6

Грипп-специфичная конструкция Casp9 и эксперименты

Следующие последовательности и конструкции используют для тестирования конструкций, предназначенных для лечения вирусов гриппа. Поскольку вирус гриппа представляет собой одноцепочечный отрицательно-полярный РНК вирус, который использует полимеразный комплекс гриппа для экспрессии вирусных белков или репликации своего вирусного генома, сконструирована векторная конструкция, экспрессирующая отрицательно-полярную некодирующую (нк)РНК для привлечения полимеразы гриппа (подобно тем, которые сконструированы специально для HBV, как описано в примерах 1-4). нкРНК «захватывает» механизм вируса, вызывая апоптоз именно в инфицированных клетках, что является потенциальным противовирусным лечением (ФИГУРА 10А и ФИГУРА 10В).

Способы

Аденоассоциированный вирус (AAV) упаковывают с новым вектором,

экспрессирующим нкРНК (что можно рассматривать как «захватную РНК» гриппа или вектор самоубийства РНК для инфицированных гриппом клеток), который транскрибирует обратную комплементарную цепь маркера zsGreen (AAV.infv.rcZsGreen) или ген каспазы-9 (casp9) (AAV.infv.rcCasp9) между областями некодирующей последовательности (NCS) геномной РНК гриппа, которые являются высококонсервативными в нескольких штаммах вируса гриппа. Варианты осуществления этих последовательностей показаны ниже как SEQ ID NO: 10-24. Клетки Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) инфицируют вирусом гриппа А Н1N1 или Н3N2 или вирусом гриппа В при 0,1 MOI в качестве системы *in vitro* для тестирования этих конструкций (нк)РНК гриппа. Инфицированные и не инфицированные гриппом клетки MDCK трансдуцируют вектором AAV.infv.rcZsGreen и AAV.infv.rcCasp9 в присутствии и в отсутствие ингибитора casp9 Z-LEHD-FMK для определения функциональности захвата вектора или вектора самоубийства РНК для инфицированных гриппом клеток. Для определения экспрессии zsGreen используют проточную цитометрию. Жизнеспособность и пролиферацию клеток оценивают ежедневно с помощью FACS, анализа аннексина и автоматического подсчета клеток.

Результаты

Все инфицированные гриппом клетки, трансдуцированные вектором AAV.infv.rcZsGreen, успешно продуцируют белок zsGreen, подтверждая, что конструкции захвата/самоубийства РНК распознаются и транскрибируются полимеразным комплексом в каждом штамме гриппа. Инфекция гриппа убила 60-68% необработанных клеток к 6 дню. 91-95% инфицированных клеток, обработанных вектором захвата/самоубийства casp9 через 24 часа после инфицирования гриппом, погибли на 3 день после обработки. Ингибирование Casp-9 в векторе, спасенном культурой, вызывает гибель клеток и увеличивает продолжительность жизни инфицированных клеток до 5-6 дней (ФИГУРА 10B). В не инфицированных контрольных группах не было значительной гибели клеток.

Выводы

Вектор, доставленный в *trans* для взаимодействия с полимеразой гриппа, захватывает механизм вируса и вызывает гибель инфицированных гриппом клеток на 40% быстрее, чем не обработанные инфицированные клетки. Этот эффект наблюдают у вирусных штаммов, вероятно, из-за консервативной природы полимеразы гриппа. Этот новый подход может быть использован для разработки эффективного лечения гриппа.

Последовательности

SEQ ID NO:10

3' Некодирующая область вектора

5' CCTGCTTTTGCT 3'

SEQ ID NO: 11

5' Некодирующая область вектора

5' AGTAGAAACAAGG 3'

SEQ ID NO:12

Грипп-специфичный вектор Casp9

AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTATCATTATGATGTTTTAAAGAAAAGTTTTT
 CCGGAGGAAATTAAGCAACCAGGCATCTGTTTATAAATCCCTTTCACCGAAACAG
 CATTAGCGACCCTAAGCAGGAGGGACTGCAGGTCTTCAGAGTGAGCCCACTGCTCA
 AAGATGTCGTCCAGGGTCTCAACGTACCAGGAGCCACTCTTGGGGTCCCTCCAGGA
 AACAAAACCTGGGAAAGTAGAGTAGGACACAAAGATGTCACTGGGTGTGGGCAAA
 CTAGATATGGCGTCCAGCTGGTCGAAGGTCCCTCAAACCTTCCTGGAACGGGGTGGC
 ATCTGGCTCGGGGTACTGCCAGGGGACTCGTCTTCAGGGGAAGTGGAGGCCACCT
 CAAACCCATGGTCTTTCTGCTCCCCACCACAGGCCTGGATGAAAAAGAGCTTGGGCT
 TCCCTCCCAGGCTGGGGCAGCTGGTCCCATTGAAGATGTTACAATCTTCTCGACCG
 ACACAGGGCATCCATCTGTGCCGTAGACAGCCCCTGGGAACTGCAGGTGGCTGGCC
 TGACAGCCGTGAGAGAGAATGACCACCACGCAGCAGTCCAGAGCACCGTGGTCCTG
 CTGCGCCAGCTCCAGCAAAGCCAGCACCATTTTTCTTGGCAGTCAGGTGCGCCCTCAC
 CTCCACCATGAAATGCAGCGAGGAGAAGCGACGCCGCAACTTCTCACAGTCGATGT
 TGGAGCCAGTGCGGGTGCGGAGCCCGACTCACGGCAGAAGTTCACATTGTTGATA
 ATGAGGCAGTGGCCACAGGGCTCCATGCTCAGGATGTAAGCCAAATCTGCATTTCCC
 CTCAAACCTCTCAAGAGCACCGACATCACCAAATCCTCCAGAACCAATGTCCACTGGT
 CTGGGTGTTTCCGGTCTGAGAACCTCTGGTTTGCGAATCTCTGGTCTGAGCACCACT
 GGGGTAAGGTTTTCTAGGGTTGGCTTCGACAACTTTGCTGCTTGCCTGTTAGTTCGCA
 GAAACGAAGCCAGCATGTCCTGGCCTGTGTCCTCTAAGCAGGAGATGAACAAAGGA
 AGAGCCTGACTCCCTCGAGTCTCCAGATCTATGATCAGCTGCCTGGCCTGATCCCGC
 CGAGATCCAGAGCCTGCCCCGCTGGATGTCCTCGATCATATGGGGCCTGAACAGCTCG
 CGGCTCAGCAGGGCGTCCCAGAGCTGGTCCACCTGCAGCTCTTCCACCAGCCGCAGC
 CGGCACCGCCGCAGGAGCCGCGGATCCGCTTCGTCCATTCCCCTGCTTTTGCT

Ключевые особенности 5':

SEQ ID NO:13: 5'-некодирующая область вектора: AGTAGAAACAAGG

SEQ ID NO:14: неспецифическая буферная последовательность GTG.

SEQ ID NO:15: повтор U₅₋₇, который будет «заикаться» в сигнале поли-А во время обратной транскрипции: TTTTTT

SEQ ID NO:16: неспецифическая буферная последовательность, наиболее распространенная среди видов гриппа: ATCA

SEQ ID NO:17: стоп-кодон «конечного +смыслового транскрипта Casp9»: TTA

Ключевые особенности 3':

SEQ ID NO:18: Стартовый кодон «конечного+смыслового транскрипта Casp9»:
 CAT

SEQ ID NO:19: неспецифическая буферная последовательность: TCC

SEQ ID NO:20: 3' некодирующая область вектора: CCTGCTTTTGCT

SEQ ID NO: 21

Транскрипт (-)оцРНК для распознавания полимеразного комплекса гриппа и обратной транскрипции

(транскрипт, выраженный тестовым вектором)

AGUAGAAACAAGGGUGUUUUUAUCAUUAUGAUGUUUAAAGAAAAGUU
 UUUUCCGGAGGAAAUAAAGCAACCAGGCAUCUGUUUAUAAAUCCCUUUCACCG
 AAACAGCAUUAGCGACCCUAAGCAGGAGGGACUCGAGGUCUUCAGAGUGAGCCCA
 CUGCUCAAAGAUGUCGUCCAGGGUCUCAACGUACCAGGAGCCACUCUUGGGGUCC
 CUCCAGGAAACAAAACCUGGGAAAGUAGAGUAGGACACAAAGAUGUCACUGGGU
 GUGGGCAAACUAGAU AUGGCGUCCAGCUGGUCGAAGGUCCUCAAACCUUCCUGGA
 ACGGGGUGGCAUCUGGCUCGGGGUUACUGCCAGGGGACUCGUCUUCAGGGGAAG
 UGGAGGCCACCUCAAACCAUGGUCUUUCUGUCUCCCCACCACAGGCCUGGAUGAA
 AAAGAGCUUGGGCUUCCUCCCAGGCUGGGGCAGCUGGUCCAUUGAAGAUGUUC
 ACAUUCUUCUCGACCGACACAGGGCAUCAUCUGUGCCGUAGACAGCCCCUGGGA
 ACUGCAGGUGGCUGGCCUGACAGCCGUGAGAGAGAAUGACCACCACGCAGCAGUC
 CAGAGCACCGUGGUCCUGCUGCGCCAGCUCAGCAAAGCCAGCACCAUUUUCUUG
 GCAGUCAGGUCGCCCUCACCUCCACCAUGAAAUGCAGCGAGGAGAAGCGACGCC
 GCAACUUCUCACAGUCGAUGUUGGAGCCAGUGCGGGUGCGGAGCCCGGACUCACG
 GCAGAAGUUCACAUUGUUGAUAAUGAGGCAGUGGCCACAGGGCUCCAUGCUCAG
 GAUGUAAGCCAAAUCUGCAUUUCCCCUCAACUCUCAAGAGCACCGACAUCACCA
 AAUCCUCCAGAACCA AUGUCCACUGGUCUGGGUGUUUCCGGUCUGAGAACCUCUG
 GUUUGCGAAUCUCUGGUCUGAGCACCCACUGGGGUAAGGUUUUCUAGGGUUGGCU
 UCGACAACUUUGCUGCUUGCCUGUUAGUUCGCAGAAACGAAGCCAGCAUGUCCUG
 GCCUGUGUCCUCUAAGCAGGAGAUGAACAAGGAAGAGCCUGACUCCUCGAGUC
 UCCAGAUCUAUGAUCAGCUGCCUGGCCUGAUCCCGCCGAGA UCCAGAGCCUGCCC
 GCUGGAUGUCCUCGAUCAUAUGGGGGCCUGAACAGCUCGCGGCUCAGCAGGGCGUC
 CCAGAGCUGGUCCACCUGCAGCUCUCCACCAGCCGCAGCCGGCACCGCCGCAGG
 AGCCGCCGAUCCGCUUCGUCCA UUCCCCUGCUUUUGCU

Общая структура вектора

В некоторых вариантах осуществления, общая структура вектора имеет следующую формулу:

SEQ ID NO:22-ORF-SEQ ID NO:23, где

SEQ ID NO:22 представляет собой AGTAGAAACAAGGGTGT TTTTATCATTA;

ORF представляет собой любую кодирующую белок последовательность; и

SEQ ID NO:23 представляет собой CATTCCTGCTTTTGCT.

SEQ ID NO: 24**Конструкция маркера GFP (вместо Casp9) для экспериментального обнаружения**

AGTAGAAACAAGGGTGT TTTTATCATTA CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG
 AGTGATCCCGGCGGCGGT CACGA ACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTT
 GGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCA
 CGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCTG
 CCGTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGT

CGGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGA
 TGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTACCAGGGTGT
 CGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGA
 TGGTGCGCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCT
 TCATGTGGTCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGTCACG
 AGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTTCAG
 CTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCGTT
 TACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCC
 CTTGCTCACCATTCCCCTGCTTTTGCT

ПРИМЕР 7

В этом эксперименте, клетки Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) не инфицированы, инфицированы вирусом гриппа А (H1N1 или H3N2) или вирусом гриппа В. Затем не инфицированные и инфицированные клетки обрабатывают частицами AAV, содержащими захватную РНК, кодирующую casp9 человека, или частицами AAV, содержащими GFP. Проводят три независимых эксперимента, каждый в трех повторах.

Экспрессию Casp9 и продукты ее расщепления (каспазы 3 и 7) измеряют с помощью проточной цитометрии. Экспрессия Casp9 увеличилась в 4 раза при инфицировании гриппом H1N1 по сравнению с неинфицированными клетками. Захватная РНК AAV не влияет на не инфицированные клетки, но при использовании на инфицированных клетках «захватной» РНК AAV увеличивал casp9 в 10 раз по сравнению с не инфицированными клетками и в 3 раза по сравнению с не обработанными инфицированными клетками.

Эффективность захватной РНК AAV измеряют ежедневно путем мониторинга жизнеспособности и пролиферации клеток с помощью автоматического подсчета клеток и анализа FACS. Обработка неинфицированных клеток «захватной» РНК AAV не влияет на жизнеспособность клеток. Однако обработка клеток, инфицированных гриппом В, H1N1 или H3N2, с помощью захватной РНК AAV увеличивает жизнеспособность клеток на 120 часов по сравнению с не обработанными инфицированными клетками или инфицированными клетками, обработанными GFP AAV.

Долю инфицированных клеток в культуре отслеживают с помощью внутриклеточного окрашивания нуклеопротеинов гриппа с использованием анализа FACS. Лечение захватной РНК AAV снижает долю клеток, инфицированных H1N1, H3N2 или гриппом В, на 72 часа и полностью ликвидирует инфекцию гриппа за 96 часов.

Эти результаты показывают, что захватная РНК AAV, который экспрессирует каспазу-9, эффективно уничтожает гриппозную инфекцию в культуре клеток.

ПРИМЕР 8

Дизайн коронавируса конструкции

Синтез субгеномной (-)оцРНК из (+)оцРНК посредством полимеразы CoV (РНК-зависимой РНК-полимеразы или RdRp). Коронавирусный RdRp останавливается на сигналах межгенного переключателя матрицы донора и переносится с помощью

механизма выбора копирования на очень похожий акцепторный сайт вблизи 5' конца генома для копирования 5' концевой лидера. Последовательности регуляции транскрипции (TRS) функционируют как сигнал переключения матрицы. TRS представляет собой 5'ACGAAC3' (SEQ ID NO: 31) на положительной цепи и 3'UGCUUG5' (SEQ ID NO: 32) на отрицательной цепи. Если субгеномная мРНК (сгмРНК) все еще содержит несколько TRS, RdRp воспринимает новую сгмРНК как небольшой геном, инициирует синтез отрицательной цепи на нем и переключает матрицу на сигнал внутреннего донора, чтобы создать матрицу отрицательной цепи для синтеза более короткой внутренней вложенной сгмРНК. Лидерная последовательность РНК (60-80 нуклеотидов) всегда остается на 3' конце субгеномной отрицательной цепи и 5' конце субгеномной мРНК.

Субгеномная (-)оцРНК является промежуточным продуктом для производства новых мРНК для синтеза вирусного белка. Таким образом, можно сконструировать коронавиральные «захватные РНК», которые представляют собой (-)оцРНК, которые имитируют последовательности лидерной РНК и TRS, но несут отрицательную цепь представляющего интерес гена (например, каспазы-9). Обзор этой стратегии показан на ФИГУРЕ 12А и ФИГУРЕ 12В.

Стандартные способы

Стандартные способы молекулярной биологии описаны Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Стандартные способы также появляются в Ausbel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, в которых описывается клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белков (том 3) и биоинформатика (том 4).

Описаны способы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию (Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, продуцирование слитых белков, гликозилирование белков (см., например, Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описаны продуцирование, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using*

Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, см. выше). Доступны стандартные методики для характеристики взаимодействий лиганд/рецептор (см., например, Coligan, et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, запись в базе данных (например, последовательности Genbank или записи GeneID), заявка на патент или патент были конкретно и индивидуально указаны для включения посредством ссылки. Это заявление о включении посредством ссылки предназначено заявителями в соответствии с 37 CFR §1.57(b)(1) для связи с каждой отдельной публикацией, записью в базе данных (например, последовательностями Genbank или записями GeneID), заявкой на патент или патентом, каждое из которых четко обозначено в соответствии с 37 CFR §1.57(b)(2), даже если такое цитирование не находится непосредственно рядом со специальным заявлением о включении посредством ссылки. Включение специальных заявлений о включении посредством ссылки, если таковые имеются, в спецификацию никоим образом не ослабляет это общее заявление о включении посредством ссылки. Цитирование ссылок в настоящем документе не означает признание того, что ссылка относится к известному уровню техники, а также не является признанием содержания или даты этих публикаций или документов.

ПРИМЕР 9

В этом эксперименте, синтетическую РНК («захватная РНК»), которая была сконструирована для распознавания SARS-CoV-2 РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), тестируют на ее способность уничтожать инфекцию SARS-CoV-2 в клеточной культуре. После распознавания, захватную РНК транскрибируют во фрагмент А дифтерийного токсина (DT-A), чтобы специфически индуцировать апоптоз в инфицированных клетках, что может быть потенциальным лечением (ФИГУРА 13).

Способы

Аденоассоциированный вирус (AAV) упаковывают с новым вектором, экспрессирующим SARS-CoV-2 захватную РНК (ФИГУРА 15), который содержит обратную комплементарную цепь кДНК DT-A и вторичные структуры онРНК SARS-CoV-2. Клетки Vero инфицируют штаммом SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 при 0,1 MOI. Инфицированные и не инфицированные SARS-CoV-2 клетки Vero трансдуцируют тестируемыми (ФИГУРА 15) или контрольными (GFP) AAV. Не инфицированные клетки Jurkat, HEK и VHK-21 также трансдуцируют тестируемым AAV для дальнейшего исследования потенциальных эффектов захватной РНК вне мишени в не инфицированных клетках. Гибель и жизнеспособность клеток оценивают ежедневно с помощью FACS и автоматического подсчета клеток. Уничтожение инфекции в клеточных культурах устанавливают путем наблюдения за цитопатическими эффектами (CPE) посредством визуализации клеток и с помощью FACS посредством внутриклеточного окрашивания вирусных белков. Продуцирование DT-A в инфицированных и не инфицированных

клетках измеряют с помощью вестерн-блоттинга (WB) анализа супернатантов культур и клеточных лизатов. Те же самые эксперименты повторяют путем трансфекции клеток *in vitro* транскрибированной захватной РНК (ФИГУРА 14) в различных концентрациях (0-100 нг). Также создают стабильные клеточные линии vero и jurkat, экспрессирующие RdRp SARS-CoV-2, для оценки RdRp-специфичной экспрессии захватной РНК.

Результаты

Инфекция SARS-CoV-2 успешно уничтожена в культурах в течение 48 часов после тестовой трансдукции AAV, что подтверждено анализами пролиферации клеток и отсутствием CPE на изображениях клеток, а также анализом FACS (ФИГУРА 16А). Те же результаты наблюдают в течение 24 часов после трансфекции захватной РНК. Тестовые AAV или захватные РНК не влияют на не инфицированные клетки (ФИГУРА 16В). Аналогичные результаты наблюдают в клеточных линиях, экспрессирующих RdRp, что подтверждает предполагаемый механизм действия.

Заключение

РНК, доставленная или экспрессированная в транс для взаимодействия с RdRp SARS-CoV-2, захватила механизм вируса и вызвала быструю гибель инфицированных клеток, но не не инфицированных клеток. Трансляция захватной РНК в убивающую молекулу DT-A зависит от вирусного RdRp, что продемонстрировано на нескольких различных клеточных линиях, что подтверждает специфичность и чувствительность лечения. Этот новый подход может быть использован для разработки эффективного лечения для искоренения инфекции COVID-19.

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны в настоящем документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и прилагаемых фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая:

молекулу нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулу нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующую хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, дифтерийный токсин А (или его фрагмент) или любую их комбинацию, фланкированные первым и вторым сигналом распознавания вирусной транскрипции;

первый промотор в направлении (5') первого сигнала распознавания вирусной транскрипции; и

второй промотор, примыкающий к 5' к молекуле нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекуле нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, дифтерийный токсин А (или его фрагмент) или любую их комбинацию.

2. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1, где молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью представляет собой отрицательно-полярную РНК, отрицательно-полярную ДНК, одноцепочечную или двухцепочечную ДНК, которая экспрессирует некодирующую отрицательно-полярную РНК, или любую их комбинацию.

3. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, в которой первый и второй сигнал распознавания вирусной транскрипции выбраны из вируса, выбранного из вируса с отрицательной цепью, вируса с обратной транскрипцией РНК или вируса с обратной транскрипцией ДНК.

4. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащая поли-А хвост в направлении (3') молекулы нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулы нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, или их комбинацию.

5. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что апоптоз-индуцирующий белок, выбран из группы, состоящей из ВАХ, ВІD, ВАК, ВАD, каспазы 2, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 11, каспазы 12, цитохрома С, SМАС и фактора, индуцирующего апоптоз, или любой их комбинации.

6. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5, где первый промотор содержит сильный убиквитиновый промотор или тканеспецифичный промотор печени, выбранный из группы, состоящей из ТВG (тироксинсвязывающего глобулина), промотора и/или энхансера альбумина, промотора АFР (альфа-фетопротеина), промотора ААТ (альфа-1-антитрипсина), промотора АроЕ (аполипопротеина Е) или промотора РЕРСК (фосфоенолпируваткарбоксикиназы).

7. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-6, где второй промотор содержит связывающую последовательность фактора элонгации 1 альфа (ЕFS).

8. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7, где хемокин выбран из ССL1, ССL2, ССL3, ССL4, ССL5, ССL6, ССL7, ССL8, ССL9, ССL10, ССL11, ССL12, ССL13, ССL14, ССL15, ССL16, ССL17, ССL18, ССL19, ССL20, ССL21,

CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2 и CX3CL1.

9. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-8, где цитокин выбран из группы, состоящей из IL-15, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, IL-6, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , CD40L, Mig и Ctg-2.

10. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.3, где сигнал распознавания вирусной транскрипции содержит сигнал распознавания эпсилон, как указано в SEQ ID NO:1, или последовательность распознавания коронавируса, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID: 25, SEQ ID: 26, SEQ ID: 28 и SEQ ID: 30.

11. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.3, где вирус представляет собой коронавирус, вирус гепатита В, вирус гепатита D, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус парагриппа 1 человека, вирус кори, вирус эпидемического паротита, респираторно-синцитиальный вирус человека, вирус везикулярного стоматита Индианы, вирус бешенства, вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Буньямвера, вирус Хантаан, вирус болезни овец Найроби, вирус сицилийской флeботомной лихорадки, вирус гриппа А, вирус гриппа С, вирус Тогото, вирус опухоли молочной железы мыши, вирус лейкоза мыши, вирус лейкоза птиц, вирус обезьяны Мейсона-Пфайзера, вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус иммунодефицита человека 1, спумавирус человека, вирус гепатита В уток, коронавирус и любую их комбинацию.

12. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-11, где молекула нуклеиновой кислоты не содержит последовательности (кодирующие или некодирующие) для вирусной полимеразы, обратной транскриптазы, капсида, оболочки, сигнала упаковки или мотива транслокации.

13. Вектор, содержащий последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-12.

14. Вектор по п.13, отличающийся тем, что вектор содержит вектор доставки или носитель для доставки в клетку млекопитающего.

15. Вектор доставки или носитель по п.14, отличающийся тем, что вектор или носитель содержит VLP, аденоассоциированный вирус (AAV), липосому, наночастицу, мицеллу, полимерную везикулу или полимерсому.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая любую из последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот по пп.1-12 или любой из векторов по пп.13-15.

17. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации (VLP), содержащая: необязательный мотив транслокации (TLM), слитый с капсидным белком из капсида вируса гепатита В или капсида вируса гепатита D, или слитого белка коронавируса; и

молекулу нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулу нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующую хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок,

дифтерийный токсин А (или его фрагмент) или любую их комбинацию, фланкированные первым и вторым сигналом распознавания вирусной транскрипции;

первый промотор по направлению к (5') первого сигнала распознавания вирусной транскрипции; и

второй промотор, примыкающий и 5' к молекуле нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекуле нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, дифтерийный токсин А (или его фрагмент) или любую их комбинацию.

18. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации (VLP), содержащая:

молекулу нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулу нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующую хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, дифтерийный токсин А (или его фрагмент) или любую их комбинацию, фланкированные первым и вторым сигналом распознавания транскрипции вируса-мишени;

первый промотор по направлению к (5') первого сигнала распознавания вирусной транскрипции; и

второй промотор, примыкающий и 5' к молекуле нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекуле нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок, дифтерийный токсин А (или его фрагмент) или любую их комбинацию, где VLP проявляет тропизм к клеткам-мишеням, инфицированным вирусом.

19. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по п.17 или 18, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью представляет собой отрицательно-полярную РНК, отрицательно-полярную ДНК, одноцепочечную или двухцепочечную ДНК, которая экспрессирует некодирующую отрицательно-полярную РНК, или любую их комбинацию.

20. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по любому из пп. 17-19, дополнительно содержащая поли-А хвост в направлении к (3') молекулы нуклеиновой кислоты с отрицательной цепью или молекулы нуклеиновой кислоты пгРНК, кодирующей хемокин, цитокин, апоптоз-индуцирующий белок или их комбинацию.

21. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по любому из пп. 17-20, отличающаяся тем, что первый промотор содержит сильный убиквитиновый промотор или тканеспецифический промотор печени, выбранный из группы, состоящей из ТВГ (тироксинсвязывающий глобулин), промотор и/или энхансер альбумина, промотор АFGP (альфа-фетопротейн), промотор ААТ (альфа-1-антитрипсин), промотор ApoE (аполипопротеин E) или промотор PEPCK (фосфоенолпируваткарбоксикиназы).

22. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по любому из пп.17-21, отличающаяся тем, что второй промотор содержит последовательность связывания фактора элонгации I альфа (EFS).

23. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по любому из пп.17-22, отличающаяся тем, что сигнал распознавания вирусной транскрипции выбран из вируса,

выбранного из вируса с отрицательной цепью, вируса с обратной транскрипцией РНК или вируса с обратной транскрипцией ДНК.

24. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по п.23, отличающаяся тем, что сигнал распознавания вирусной транскрипции содержит сигнал распознавания эпсилон (SEQ ID NO:1) или последовательность распознавания вируса коронавируса, такую как SEQ ID: 25 или SEQ ID: 26.

25. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по любому из пп. 17-24, отличающаяся тем, что апоптоз-индуцирующий белок, выбран из группы, состоящей из BAX, BID, BAK, BAD, каспазы 2, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 11, каспазы 12, цитохрома С, SMAC и фактора, индуцирующего апоптоз.

26. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по любому из пп. 17-25, отличающаяся тем, что хемокин выбран из CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2 и CX3CL1.

27. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по любому из пп.17-26, отличающаяся тем, что цитокин выбран из группы, состоящей из IL-15, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, IL-6, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , CD40L, Mig и Crg-2.

28. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по любому из пп. 17-27, отличающаяся тем, что вирус представляет собой коронавирус, вирус гепатита В, вирус гепатита D, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус парагриппа 1 человека, вирус кори, вирус эпидемического паротита, респираторно-синцитиальный вирус человека, вирус везикулярного стоматита Индианы, вирус бешенства, вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Буньямвера, вирус Хантаан, вирус болезни овец Найроби, вирус сицилийской флеботомной лихорадки, вирус гриппа А, вирус гриппа С, вирус Тогото, вирус опухоли молочной железы мыши, вирус лейкоза мыши, вирус лейкоза птиц, вирус обезьяны Мейсона-Пфайзера, вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус иммунодефицита человека 1, спумавирус человека, вирус гепатита В уток, и любую их комбинацию.

29. Вирусоподобная частица с дефектом по репликации по любому из пп.17-28, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты не содержит последовательностей (кодирующих или некодирующих) вирусного капсида, полимеразы, обратной транскриптазы, оболочки, упаковочного сигнала или мотивов транслокации.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая вирусоподобную частицу с дефектом по репликации по любому из пп.17-29.

31. Способ лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12 или вектора по любому из пп. 13-15, фармацевтических композиций по пп. 16 или 30, или вирусоподобной частицы с дефектом по репликации по любому из

пп. 17-29.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что вирусная инфекция включает инфекцию, вызванную вирусом, классифицированным по Балтиморской классификации IV, V, VI или VII.

33. Способ по п.32, отличающийся тем, что вирусная инфекция включает инфекцию, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из коронавируса, вируса гепатита В, вируса гепатита D, вируса Эбола, вируса Марбург, вируса парагриппа 1 человека, вируса кори, вируса эпидемического паротита, респираторно-синцитиального вируса человека, вируса везикулярного стоматита Индианы, вируса бешенства, вируса эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, вируса лимфоцитарного хориоменингита, вируса Буньямера, вируса Хантаан, вируса болезни овец Найроби, вируса сицилийской флеботомной лихорадки, вируса гриппа А, вируса гриппа С, вируса Тогото, вируса опухоли молочной железы мыши, вируса лейкоза мыши, вируса лейкоза птиц, вируса обезьяны Мейсона-Пфайзера, вируса лейкоза крупного рогатого скота, вируса иммунодефицита человека 1, спумавируса человека, вируса гепатита В уток, и любую их комбинацию.

34. Способ по п.32, отличающийся тем, что вирусная инфекция включает заражение вирусом, выбранным из группы, состоящей из филовируса, парамиксовируса, морбилливируса, рубулавируса, пневмовируса, везикуловируса, лиссавриуса, эфемеровируса, аренавируса, буньявируса, хантавируса, найровируса, флебовируса, ортогепаднавируса, авигепаднавируса, ретровирусов млекопитающих типа В, ретровирусов млекопитающих типа С, ретровирусов птичьего типа С, ретровирусов типа D, ретровирусов BLV-HTLV, лентивирусов, спумавирусов и их комбинации.

35. Способ по п.31, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, вектор, фармацевтическая композиция или вирусоподобная частица, неспособная к репликации, при введении попадает в клетку печени.

36. Способ по п.35, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, вектор, фармацевтическая композиция или вирусоподобная частица, не способная к репликации, при введении доставляет молекулу нуклеиновой кислоты в клетку печени, и молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется в клетке печени.

37. Способ по любому из пп.31-36, отличающийся тем, что у субъекта имеется острая, хроническая или латентная вирусная инфекция.

38. Способ по любому из пп.31-37, отличающийся тем, что введение индуцирует иммунный ответ против клетки, инфицированной вирусом, вызывающим вирусную инфекцию.

39. Способ по любому из пп.31-38, отличающийся тем, что введение индуцирует апоптоз в клетках, инфицированных вирусом, вызывающим вирусную инфекцию.

40. Способ индукции иммунного ответа против клетки, инфицированной вирусом, у нуждающегося в этом субъекта, включающий контакт субъекта с молекулой рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12 или вектором по любому по

одному из пп. 13-15, или фармацевтическими композициями по пп. 16 или 30, или вирусоподобной частицей с дефектом по репликации по любому из пп. 17-29.

41. Способ индукции апоптотического ответа против клетки, инфицированной вирусом, у нуждающегося в этом субъекта, включающий контакт субъекта с фармацевтической композицией, содержащей молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12, или вектор по любому из пп. 13-15, или фармацевтические композиции по пп. 16 или 30, или вирусоподобную частицу с дефектом по репликации по любому из пп. 17-29.

42. Способ по любому из пп.31-41, отличающийся тем, что вирус представляет собой коронавирус, грипп, HBV, HDV, вирус гепатита А (HAV), вирус гепатита С (HCV) или любую их комбинацию.

43. Способ лечения гепатита В, гриппа или коронавирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12 или вектора по любому из пп. 13-15, или фармацевтических композиций по пп. 16 или 30, или вирусоподобной частицы с дефектом по репликации по любому из пп. 17-29.

44. Способ по любому из пп.31-43, дополнительно включающий введение, по меньшей мере, одного противовирусного агента, ингибитора полимеразы HBV, интерферона, модуляторов TLR, таких как агонисты TLR-7 или агонисты TLR-9, терапевтических вакцин, иммунного активатора определенных клеточных сенсоров вирусной РНК, ингибитора проникновения вируса, ингибитора созревания вируса, модулятора сборки отдельного капсида, противовирусных соединений с отличающимся или неизвестным механизмом и любой их комбинации.

45. Способ по п.44, дополнительно включающий введение, по меньшей мере, одного противовирусного агента ЗТС, FTC, L-FMAU, интерферона, адефовира дипивоксила, энтекавира, телбивудина (L-dT), валторцитабина (3' -валинил L-dC), .бета.-D-диоксоланил-гуанина (DXG), .бета.-D-диоксоланил-2,6-диаминопурина (DAPD), .бета.-D-диоксоланил-6-хлорпурина (ACP), фамцикловира, пенцикловира, лобукавира, ганцикловира, рибавирина, тенофовира, биктегравира, эмтрицитабина, биктарви и любых их комбинаций.

46. Способ индукции апоптотического ответа против клетки, инфицированной вирусом гриппа, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий контакт субъекта с молекулой рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12 или вектором по любому из пп. любой из пп. 13-15, или фармацевтическими композициями по пп. 16 или 30, или вирусоподобной частицы с дефектом по репликации по любому из пп. 17-29.

47. Способ по любому из пп.31-41, отличающийся тем, что вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А, гриппа В, гриппа С или любую их комбинацию.

48. Способ лечения гриппа у субъекта, включающий введение субъекту молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12, или вектора по любому из пп. 13-15, или фармацевтических композиций по пп. 16 или 30, или вирусоподобной

частицы с дефектом по репликации по любому из пп. 17-29.

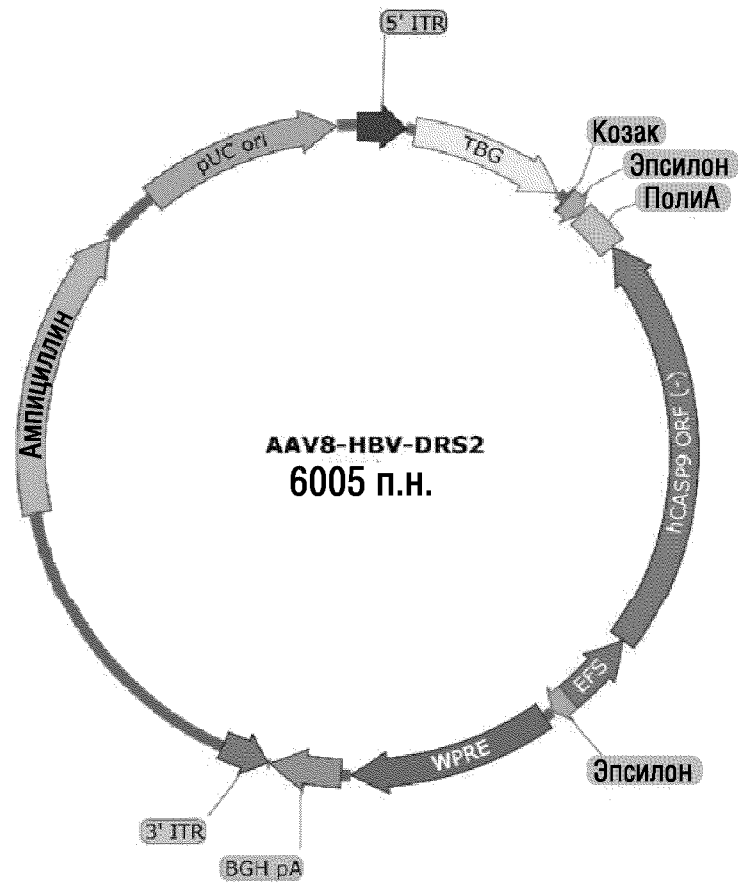
49. Способ по любому из пп. 31-43, дополнительно включающий введение, по меньшей мере, одного противовирусного средства ЗТС, FTC, L-FMAU, интерферона, адефовира дипивоксила, энтекавира, телбивудина (L-dT), валторцитабина (3'-валинил L-dC), .бета.-D-диоксоланил-гуанина (DXG), .бета.-D-диоксоланил-2,6-диаминопурина (DAPD), .бета.-D-диоксоланил-6-хлорпурина (ACP), фамцикловира, пенцикловира, лобукавира, ганцикловира, рибавирина, тенофовира, биктегравира, эмтрицитабина, биктарви и любых их комбинаций.

50. Способ индукции апоптотического ответа против клетки, инфицированной коронавирусом, у нуждающегося в этом субъекта, включающий контакт субъекта с молекулой рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12 или вектором по любому по одному из пп. 13-15, или фармацевтических композиций по пп. 16 или 30, или вирусоподобной частицы с дефектом по репликации по любому из пп. 17-29.

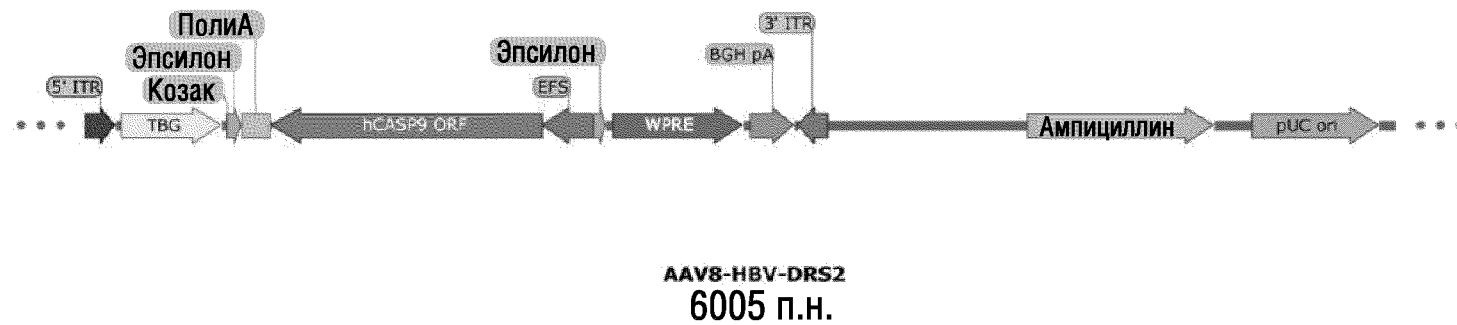
51. Способ лечения коронавирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12, или вектора по любому из пп. 13-15, или фармацевтических композиций. по пп. 16 или 30, или вирусоподобной частицы с дефектом по репликации по любому из пп. 17-29.

52. Способ по любому из пп.31-51, отличающийся тем, что лечение проводят периодически, в том числе один раз в неделю, один раз каждые 2 недели, один раз каждые 3 недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые 3 месяца, один раз каждые 4 месяца, один раз каждые от 5 месяцев, один раз каждые 6 месяцев или один раз каждые 7 месяцев, или один раз каждые 8 месяцев, или один раз каждые 9 месяцев, или один раз каждые 10 месяцев, или каждые 11 месяцев, или один раз в год в качестве поддерживающей терапии, или так долго как пациенту требуется для достижения стабильного или неопределяемого заболевания..

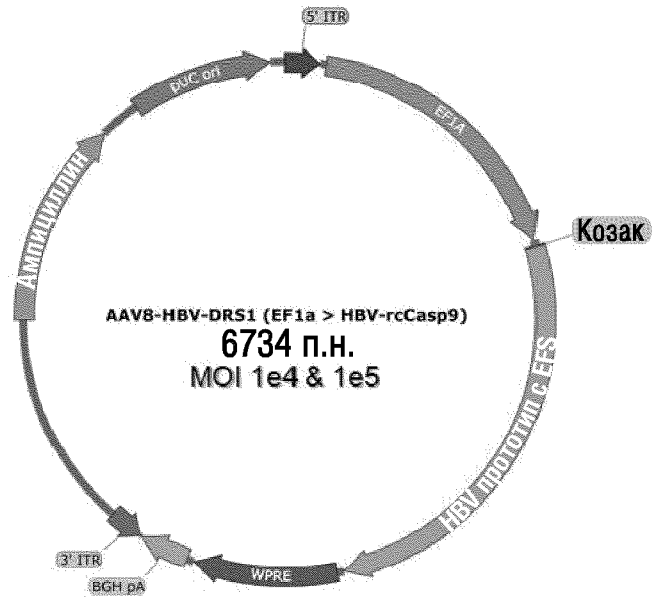
ФИГ.1А



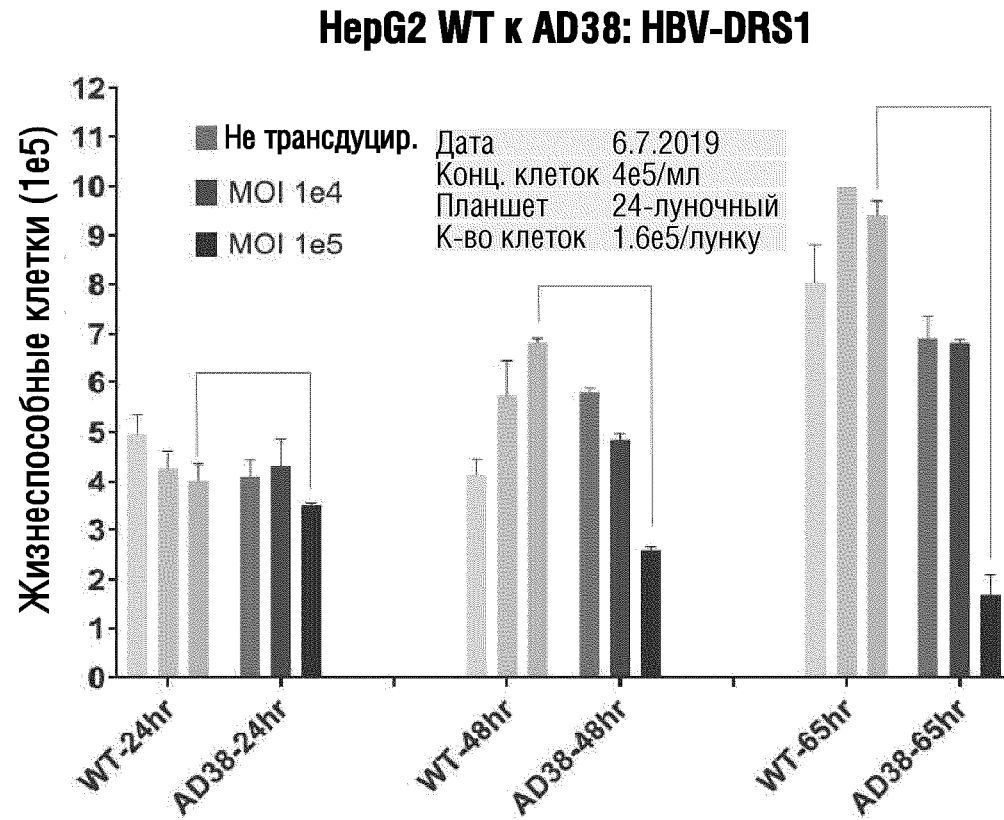
ФИГ.1В



ФИГ.2А



ФИГ.2В



ФИГ.2С

Эксперимент 1

Дата 6.7.2019
 Конц. клеток 4e5/мл
 Планшет 24-луночный
 Кол-во клеток 1.6e5/лунку
AAV8-HBV-DRS1 (EF1a > HBV-rcCasp9)

Группа 1 не трансдуцированные
 Группа 2 MOI 1e4
 Группа 3 MOI 1e5

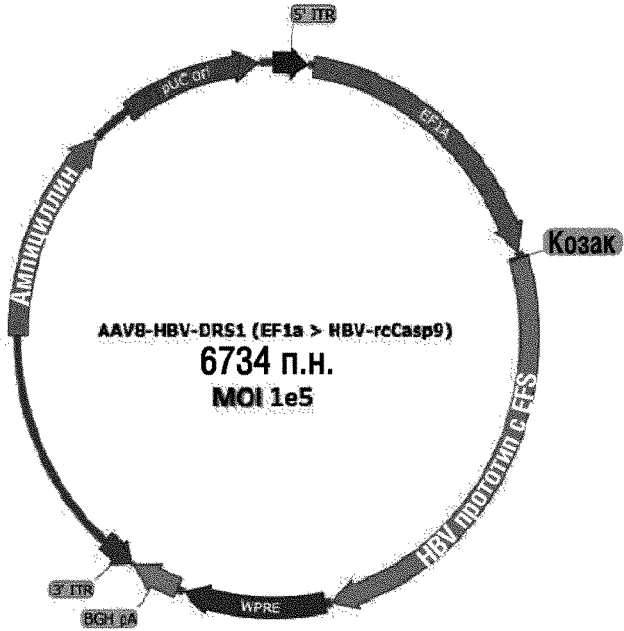
	НерG2			НерAD38			
	Всего(e5)	Жизне- способные, %	Живые(e5)	Всего(e5)	Жизне- способные, %	Живые(e5)	
24 ч				24 ч			
Группа 1	5.29	98.7	5.23	Группа 1	4.41	98.4	4.34
	4.78	98.1	4.69		4.1	94.6	3.88
Группа 2	4.11	98.2	4.03	Группа 2	4.01	98.7	3.95
	4.61	98	4.51		4.86	96.7	4.7
Группа 3	3.82	99.2	3.79	Группа 3	3.73	94.8	3.53
	4.33	98.3	4.26		3.63	85.8	3.47
	НерG2			НерAD38			
	Всего(e5)	Жизне- способные, %	Живые(e5)	Всего(e5)	Жизне- способные, %	Живые(e5)	
48 ч				48 ч			
Группа 1	5.05	86.5	4.36	Группа 1	6.12	95.7	5.86
	4.49	87.1	3.91		6	95.6	5.73

ФИГ.2С

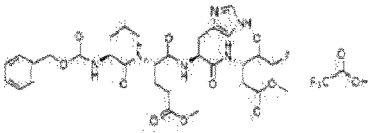
Группа 2	6.52	95.9	6.25	Группа 2	5.36	92.1	4.93
	5.51	94.5	5.21		5.29	89.4	4.73
Группа 3	7.08	96	6.79	Группа 3	2.98	88.7	2.64
	7.1	97.1	6.89		3	84.2	2.53

65 ч	HerG2			65 ч	HerAD38		
	Всего(е5)	Жизне- способные, %	Живые(е5)		Всего(е5)	Жизне- способные, %	Живые(е5)
Группа 1	9.17	93.7	8.59	Группа 1	7.96	90.8	7.23
	8.09	93.2	7.49		7.13	92.5	6.6
Группа 2	10.3	96.9	10	Группа 2	7.54	89.8	6.77
	10.2	97.7	10		7.79	88.2	6.87
Группа 3	9.93	96.9	9.62	Группа 3	2.05	69.5	1.42
	9.71	95	9.22		2.51	79	1.98

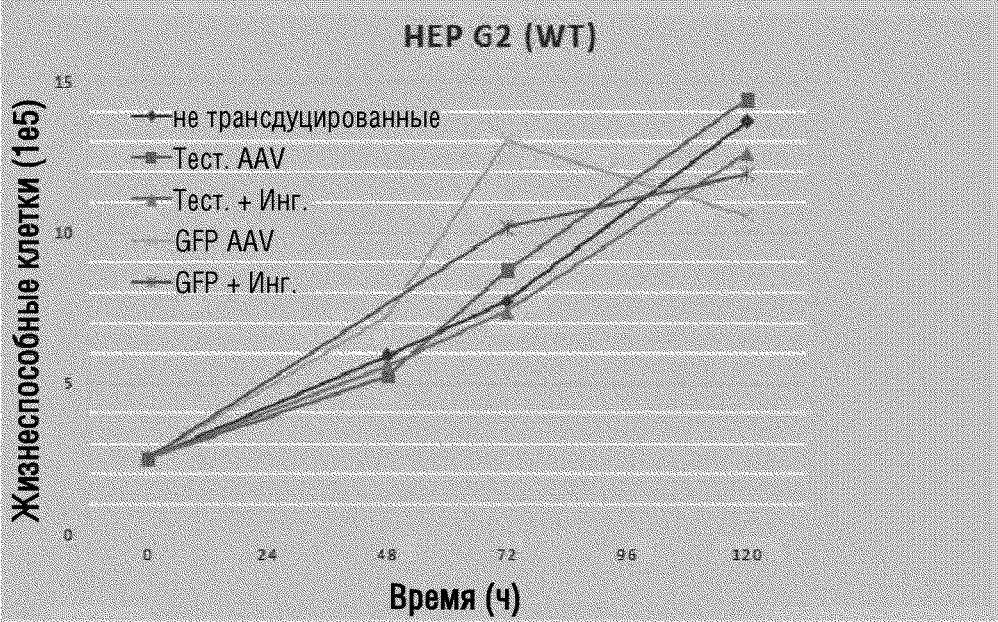
ФИГ.3А



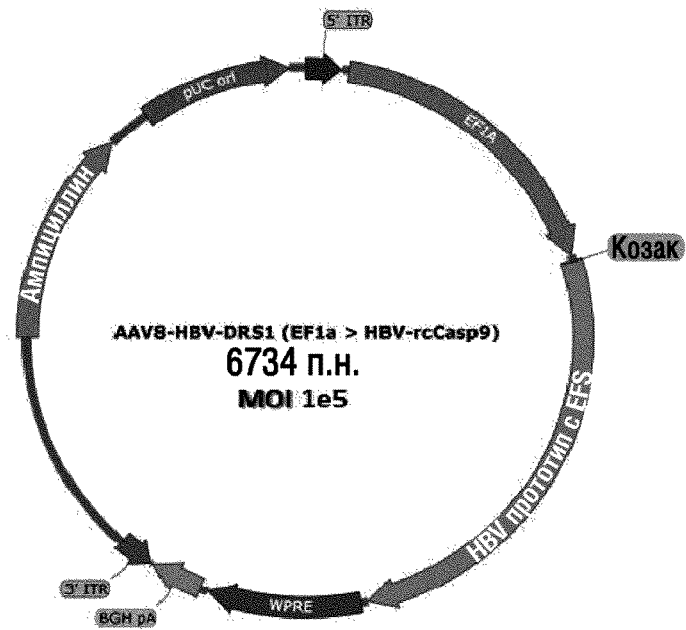
Z-LEHD-FMK, ингибитор каспазы-9



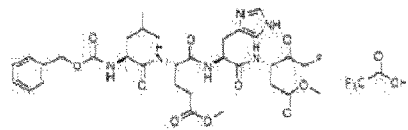
ФИГ.3В



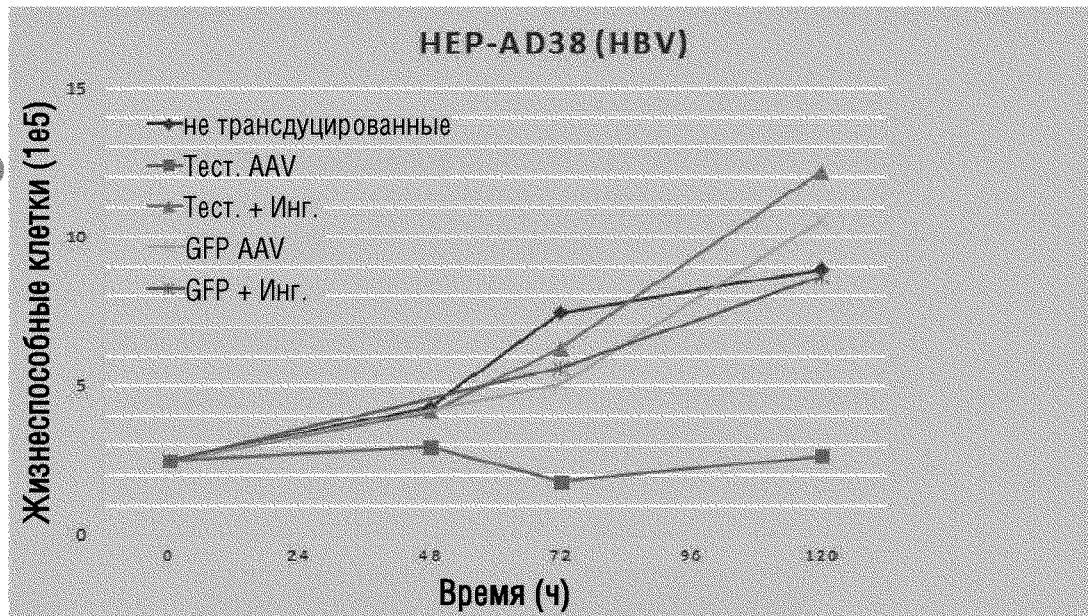
ФИГ.4А



Z-LEHD-FMK, ингибитор каспазы-9



ФИГ.4В



ФИГ.4С

Эксперимент 2

Дата 6.12.2019
Конц. клеток 2.5e5/мл
Планшет 96-луночный
Кол-во клеток 25e3/лунку
Тест. вирус AAV8-HBV-DRS1 (Ef1a > HBV-rcCasp9)
Группа 1 Не трансдуцированные
Группа 2 Тестируемый AAV MOI 1e5
Группа 3 Тестируемый AAV MOI 1e5 + z-LEHD.fmk
Группа 4 GFP AAV MOI 1e5
Группа 5 GFP AAV MOI 1e5 + z-LEHD.fmk

48 ч	Всего (e5)	HepG2	
		Жизнеспос. %	Живые (e5)
Группа 1	5.73	93.3	5.34
	5.82	95.5	5.55
	7.14	95.7	6.84
Группа 2	4.47	84.8	3.81
	6.51	87.9	5.73
	6.75	92.5	6.24
Группа 3	6.84	87.6	6
	6.18	85.6	5.31
	6.54	83.6	5.46
Группа 4	8.04	96.2	7.74
	8.16	97.3	7.92
	6.24	95.1	5.94
Группа 5	N/A		

48 ч	Всего (e5)	HepAD38	
		Жизнеспос. %	Живые (e5)
Группа 1	4.44	90	4.02
	4.26	92.4	3.96
	5.43	88.8	4.83
Группа 2	3.63	81	2.93
	4.38	79.3	3.48
	3.48	79.1	2.44
Группа 3	5.31	84	4.44
	4.41	83	3.66
	5.07	84.4	4.26
Группа 4	N/A		
Группа 5	N/A		

ФИГ.4С

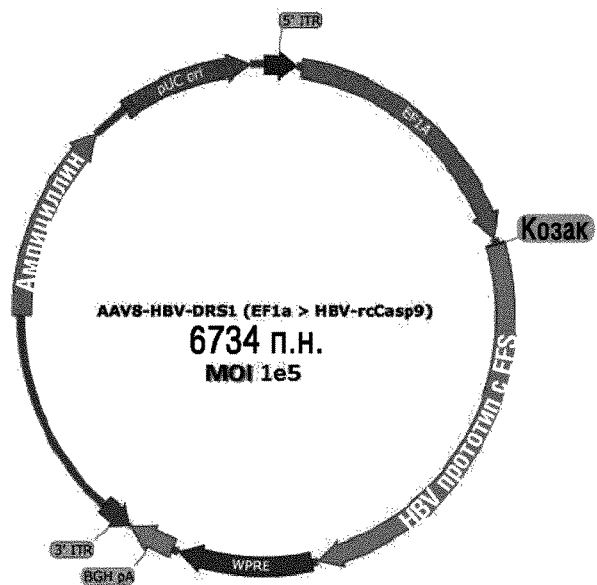
72 ч	Всего (е5)	HepG2	
		Жизнеспособ. %	Живые (е5)
Группа 1	7.41	96.4	7.14
	8.58	96.9	8.31
Группа 2	9.54	96	9.15
	9.72	95.3	8.31
Группа 3	7.71	96.3	7.44
	7.5	98.1	7.35
Группа 4	14.58	98.8	14.4
	12.09	97.4	11.76
Группа 5	11.52	95.3	10.98
	9.54	98.3	9.39

72 ч	Всего (е5)	HepAD38	
		Жизнеспособ. %	Живые (е5)
Группа 1	7.23	95	6.87
	7.23	93.3	6.75
	9.18	95.4	8.76
Группа 2	2.73	97.8	2.67
	1.77	96.5	1.71
	1.01	98	0.99
Группа 3	6.75	94.9	6.42
	6.63	96	6.36
	6.51	92.1	6
Группа 4	5.4	98.5	5.34
	5.64	97.8	5.52
	4.47	96.3	4.32
Группа 5	5.91	94.3	5.55
	5.22	96.5	5.04
	6.3	98.4	6.18

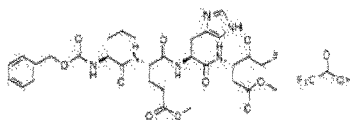
120 ч	Всего (е5)	HepG2	
		Жизнеспособ. %	Живые (е5)
Группа 1	13.56	91	12.32
	15.84	94	14.88
	15.16	91.3	13.84
Группа 2	13.2	94.1	12.4
	15.64	91.9	14.4
	18.28	89.9	16.44
Группа 3	13.68	96.4	13.2
	13.64	95.8	13.04
	12.36	94.1	11.64
Группа 4	11.24	90.1	10.12
	12.8	89	11.4
	11.52	88.3	10.2
Группа 5	14.64	92.5	13.52
	13.32	92.3	12.28
	10.64	94	10

120 ч	Всего (е5)	HepAD38	
		Жизнеспособ. %	Живые (е5)
Группа 1	8.76	97.2	8.52
	9.92	97.2	9.64
	8.84	97.3	8.6
Группа 2	2.7	88	2.37
	3.13	83.6	2.61
	3.3	90	2.97
Группа 3	13.48	93.8	12.64
	14.64	94.5	13.84
	10.72	94.5	10.12
Группа 4	11.36	95.6	10.88
	11.08	97.1	10.76
	10.32	97.3	10.04
Группа 5	8.88	98.1	8.72
	12.2	97.8	9.56
	8	95.9	7.68

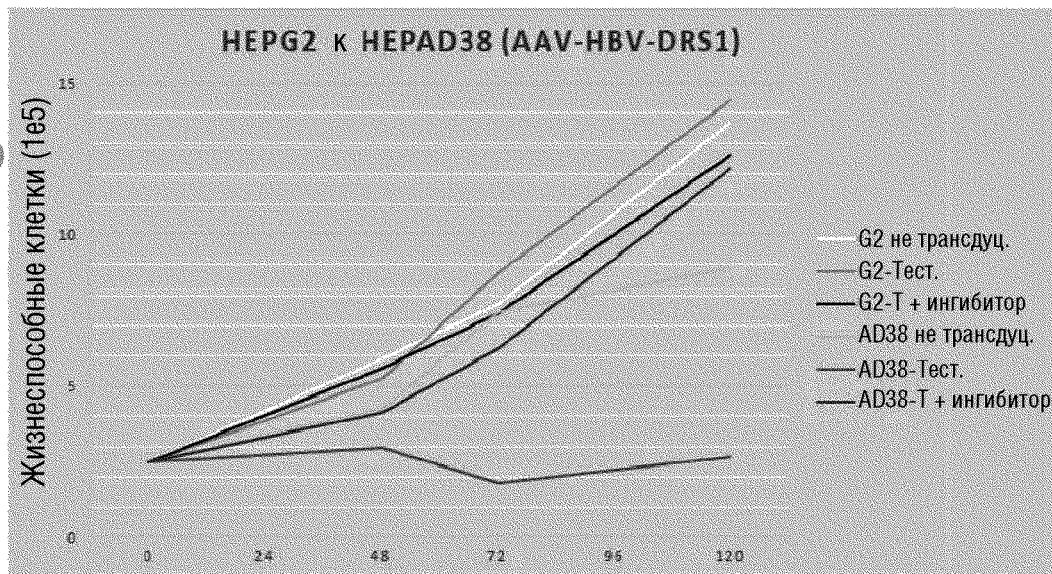
ФИГ.5А



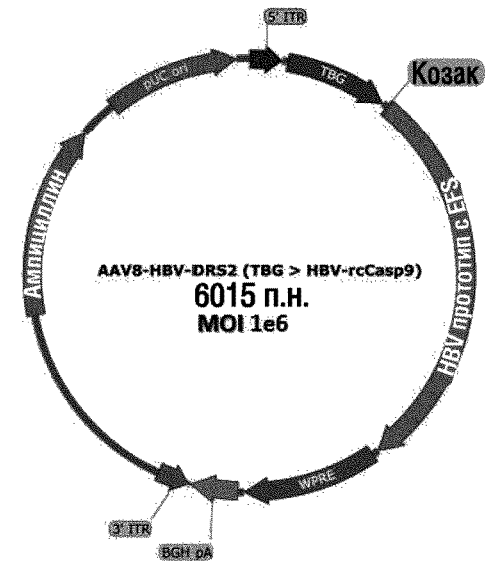
Z-LEHD-FMK, ингибитор каспазы-9



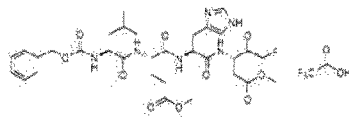
ФИГ.5В



ФИГ.6А

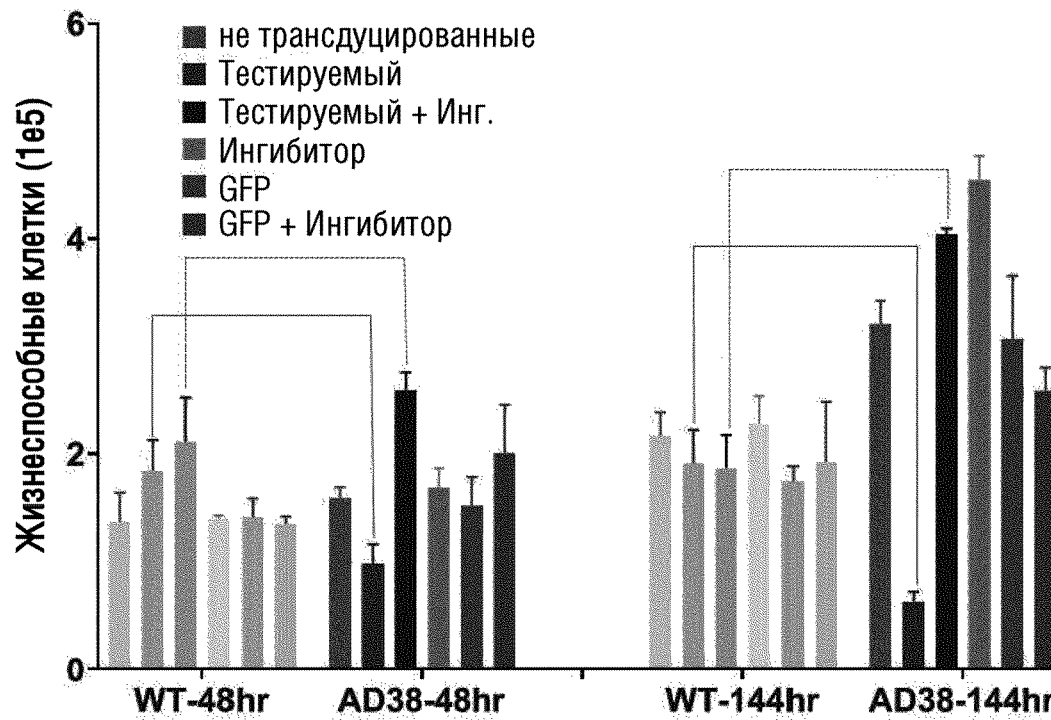


Z-LEHD-FMK, ингибитор каспазы-9



ФИГ.6В

НерG2 WT к AD38: HBV-DRS2*



ФИГ.6С

Эксперимент 3

Дата 6.17.2019
Конц. клеток 2.5e5/мл
Планшет 24-луночный
Кол-во клеток 1e5/лунку
Тест. вирус AAV8-HBV-DRS2 (TBG >HBV-rcCasp9)

Группа 1 Не трансдуцированные
Группа 2 Тестируемый AAV MOI 1e6
Группа 3 Тестируемый AAV MOI 1e6 + z-LEHD.fmk
Группа 4 z-LEHD.fmk
Группа 5 GFP AAV MOI 1e3
Группа 6 GFP AAV MOI 1e6 + z-LEHD.fmk

	НерG2			48 ч	НерAD38		
	Всего(е5)	Жизне-способные, %	Живые(е5)		Всего(е5)	Жизне-способные, %	Живые(е5)
48 ч Группа 1	2.2	75.2	1.66	Группа 1	2.28	64.6	1.47
	1.98	57.1	1.13		2.26	73.2	1.65
	1.74	76.7	1.33		2.2	75.2	1.65
Группа 2	2.8	71.7	2	Группа 2	1.68	63.9	1.07
	2.81	71.9	2.02		1.9	58.5	1.11
	2.12	71.8	1.52		1.57	50	0.78
Группа 3	2.67	75	2	Группа 3	3.6	66.9	2.41
	3.45	74.3	2.57		4.14	66.2	2.73
	2.43	72.9	1.77		3.75	70.3	2.64

ФИГ.6С

	НерG2			НерAD38			
	144 ч	Жизне- Всего(е5) способные, %	Живые(е5)	144 ч	Жизне- Всего(е5) способные, %	Живые(е5)	
Группа 4	2.1	65.4	1.37	Группа 4	2.21	75.7	1.67
	2.02	71	1.43		2.34	64.7	1.52
	1.9	73.4	1.4		2.55	73.8	1.88
Группа 5	2.06	61	1.26 >>>>>>>>	Группа 5	1.9	75.5	1.43 >>>>>>>> Экспрессия GFP в обеих клетках 89%
	1.92	83.2	1.6		2.58	70.3	1.82
	1.7	82.1	1.39		1.88	69.9	1.31
Группа 6	2.04	62.6	1.28 >>>>>>>>	Группа 6	2.75	84.6	2.32 >>>>>>>> Экспрессия GFP в обеих клетках 88%
	2.12	66.7	1.41		2.82	78.1	2.21
	2.18	63	1.37		2.2	67.9	1.49
Группа 1	2.28	95.2	2.18	Группа 1	3.38	97.6	3.3
	1.98	98.6	1.95		3.46	96.9	3.36
	2.5	95.1	2.38		3.06	96.8	2.96
Группа 2	2.44	90.1	2.2	Группа 2	0.594	88.6	0.526
	2.42	80.5	1.96		0.742	90.9	0.674
	1.75	90.6	1.59		0.782	89.7	0.702
Группа 3	2.4	92.7	2.22	Группа 3	4.14	96.7	4
	1.93	87.4	1.68		4.16	96.8	4.02
	2.04	84.1	1.71		4.28	95.6	4.1
Группа 4	2.22	97	2.14	Группа 4	4.74	97.2	4.62
	2.64	97.9	2.58		4.84	97.7	4.72

ФИГ.6С

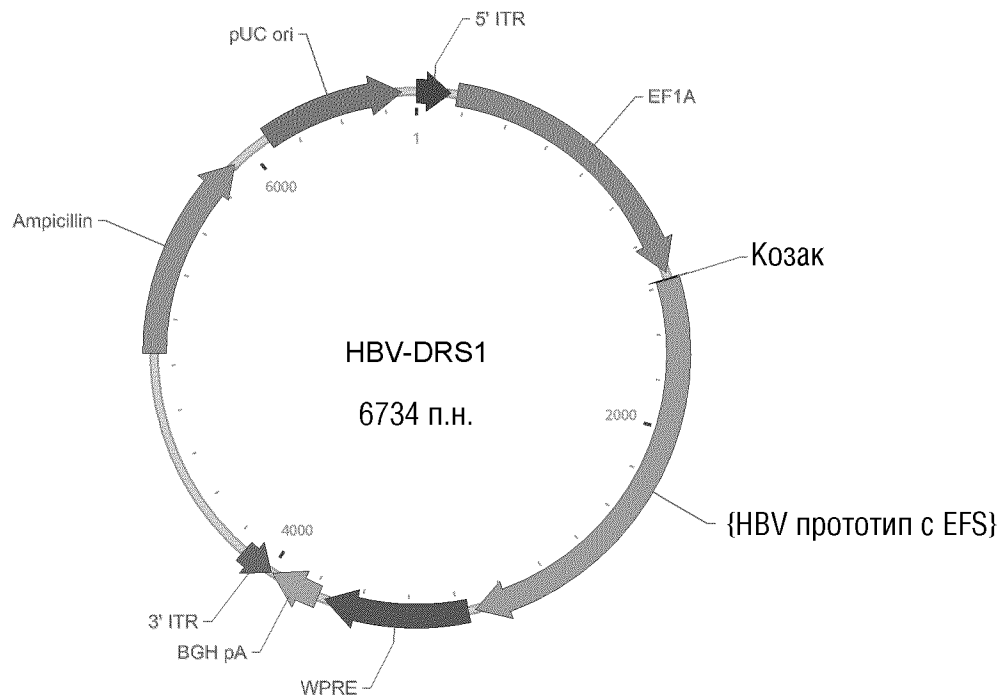
	2.28	94.1	2.14		4.56	94.6	4.3	
Группа 5	1.74	91.3	1.6	>>>>>>>>	Группа 5	3.76	96	3.6 >>>>>>>> Экспрессия GFP в обеих клетках 39%
	1.87	95	1.78			3.28	96.3	3.16
	1.99	93.8	1.87			2.58	94.8	2.44
Группа 6	1.44	93.5	1.35	>>>>>>>>	Группа 6	2.5	93.7	2.4 >>>>>>>> Экспрессия GFP в обеих клетках 34%
	2.56	95.8	2.46			2.9	97.2	2.82
	2.1	94.2	1.97			2.68	94.9	2.54

ФИГ.7

Данные вектора

ID вектора	HBV-DRS1
Наименование вектора	pAAV[Exp]-EF1A>{HBV Prototype with EFS};WPRE
Размер	6734 п.н.
Тип вектора	AAV вектор экспрессии гена млекопитающих
Вставленный промотор	EF1A
Вставленная ORF	{HBV-Casp6 с EFS}
Кол-во копий плазмиды	Высокое
Резистент. к антибиотику	Ампициллин
Клонирующий хозяин	Stb13 (или альтернативный штамм)

Карта вектора



Компоненты вектора

Наименование	Положение	Размер (п.н.)	Тип	Описание	Примечание по применению
5' ITR	■ 1-141	141	ITR	AAV 5' инвертированный концевой повтор (функциональный эквивалент 5' ITR дикого типа)	Позволяет репликацию вирусного генома и его упаковку в вирус
EF1A	■ 169-1347	1179	Промотор	Промотор эукариотного фактора элонгации трансляции 1 α 1 человека	Сильный промотор
Козак	■ 1372-1377	6	Разный	Последоват. инициации трансляции Козака	Способствует инициации трансляции стартового кодона ATG ниже последоват. Козака
{HBV-Casp9 с EFS}	■ 1378-3123	1746	ORF	Нет	Нет

Наименование	Положение	Размер (п.н.)	Тип	Описание	Примечание по применению
WPRE	■ 3154-3751	598	Разный	Посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков	Улучшает стабильность вируса в упаковывающих клетках, приводит к более высокому титру упаковок вируса; улучшает более высокую экспрессию трансгенов
BGN pA	■ 3782-3989	208	Сигнал поли-А	Сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота	Позволяет терминацию транскрипции и полиаденилирование мРНК, транскрибируемую Pol II РНК полимеразы
3' ITR	■ КОМПЛЕМЕНТ (3997-4137)	141	ITR	AAV 3' инвертированный концевой повтор	Позволяет репликацию вирусного генома и его упаковку в вирус
Ампициллин	■ 5054-5914	861	ORF	Ген резистентности к ампициллину	Позволяет E. Coli быть резистентной к ампициллину
pUC ori	■ 6085-6673	589	Rep_начало	pUC точка начала репликации	Способствует репликации плазмиды в E. Coli; регулирует кол-во высококопийной плазмиды (500-700)

Последовательность вектора

```

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCCG CCGGGCAAAG CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCG GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TTCTAGACAA CTTTGATAG AAAAGTTGGG CTCGGTGCC CGTCAGTGGG CAGAGCGCAC
201 ATCGCCACACA GTCCCGGAGA AGTTGGGGGG AGGGGTGCGG AATTGAACCG GTGCCTAGAG AAGGTGGCGC GGGTAAACT GGGAAAGTGA TGTCTGTAC
301 TGCTCCGCC TTTTCCCGA GGGTGGGGA GAACCGTATA TAAGTGCAGT AGTCGCCGTG AACGTCTTT TTCGCAACGG GTTGGCCGCC AGAACACAGG
401 TAAGTGCCTG GTGTGGTTC CGCGGCCCTG GCCTCTTAC GGGTTATGGC CTTGCGTGC CTTGAATTAC TTCCACSTGG CTGAGTACG TGATCTTGA
501 TCCCAGCTT CCGGTGGAA GTGGTGGGA GAGTTCGAGG CCTGCGCTT AAGGAGCCCC TTCGCTCGT GCTTGAGTTG AGGCTGGCC TGGGCGCTGG
601 GCGCCCGCG TGCGAATCTG GTGGCACCTT CGCGCCTGTC TCCTGCTTT CGATAAGTCT CTAGCCATTT AAAATTTTGG ATGACCTGCT GCGACGCTTT
701 TTTTCTGGCA AGATAGTCTT GTAATGCGG GCCAAGATCT GCACACTGGT ATTTCGGTTT TTGGGGCCG GGGCGGCAGC GGGGCCGTG CGTCCCAGCG
801 CACATGTTG GCGAGGCGGG GCCTGCGAGC GCGGCCACCG AGAATCGGAC GGGGTAGTC TCAAGCTGGC CGGCTGCTC TGTGCTGGT TCTCGCGCCG
901 CCGTGTATCG CCCCAGCTG GCGGCAAGG CTGCCCCGGT CGGCACCACT TCCTGAGCG GAAAGATGGC CGCTTCCCG CCCTGTGCA GGGAGCTCAA
1001 AATGGAGGAC GGGCGCTCG GGAGAGCGGG CCGGTGAGTC ACCACACAA AGGAAAGGG CCTTCCGTC CTCAGCCGTC GCTTCATGTG ACTCCACGGA
1101 GTACCGGGCG CCGTCCAGGC ACCTCGATTA GTTCTCGAGC TTTTGGAGTA CGTCTCTTT AGGTTGGGG GAGGGTTTT ATCGGATGGA GTTCCCAC
1201 ACTGAGTGGG TGGAGACTGA AGTTAGGCCA GCTTGGCACT TGATGTAAT CTCTTGAA TTTGCCCTTT TTGAGTTGG ATCTTGGTTC ATTCTCAAGC
1301 CTCAGACAGT GGTTCAAAGT TTTTCTTTC CATTCAGGT GTCGTGACAA GTTTGACAA AAAAGCAGGC TGCCACCATG TGTTCATGTC CTAATGTTCA
1401 AGCCTCCAAG CTGTGCTTTG GGTGGCTTTG GGGCATGGAC AAGAGCCAGA CATGATAAGA TACATGATG AGTTTGGACA AACCAAACT AGAATGCAGT
1501 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGTAATGTC TTTATTTGTA ACCATATAA GCTGCAATAA ACAAGTTTAT GATGTTTTAA AGAAAAGTTT
1601 TTTCCGAGG AAATTAAGC AACAGGCAT CTGTTTATAA ATCCCTTCA CCGAAACAGC ATTAGCGACC CTAAGCAGGA GGGACTGCAG GTCTTCAGAG
1701 TGAGCCCACT GCTCAAAGAT GTCGTCCAGG GTCTCAACGT ACCAGGAGCC ACTCTTGGG TCCCTCCAGG AAACAAAACC TGGAAAGTA GAGTAGGACA
1801 CAAAGATGTC ACTGGTGTG GGCAAACTAG ATATGGCGTC CAGCTGGTCG AAGTCTCTA AACCTTCTG GAACGGGGTG GCATCTGGCT CGGGTTACT
1901 GCCAGGGGAC TCGTCTCAG GGAAGTGA GGCACCTCA AACCCATGTT CTTCTGCTC CCCACCACAG GCCTGGATGA AAAAGAGCTT GGGCTTCCCT
2001 CCCAGGCTGG GGCAGCTGGT CCCATTGAAG ATGTTACAA TCTTCTCGAC CGACACAGGG CATCCATCTG TGCCGTAGAC AGCCCTGGG AACTGCAGGT
2101 GGTGCGCTG ACAGCCGTGA GAGAGAATGA CCACCAAGCA GCAGTCCAGA GCACCGTGGT CCTGTGCGC CAGTCCAGC AAAGCCAGCA CCATTTCTT
2201 GGCAGTCAAG TCGCCCTCA CCTCCACCAT GAAATGCAGC GAGGAGAAGC GACCGCGCAA CTTCTCACAG TCGATGTTGG AGCCAGTGG GGTGCGGAGC
2301 CCGACTCAC GGCAGAAGT CACATTGTTG ATAATGAGGC AGTGGCCACA GGGCTCCATG CTCAGGATGT AAGCCAAATC TGCATTTCCC CTCAAACTCT
2401 CAAGAGCACC GACATACCA AATCTCCAG AACCAATGTC CACTGGTCTG GGTGTTCCG GTCTGAGAAC CTCTGGTTTG CGAATCTCTG GTCTGAGCAC
2501 CACTGGGTA AGGTTTCTA GGGTTGGCTT CGACAATTT GTCTGTGCC TGTAGTTCG CAGAAACGAA GCCAGCATGT CCTGGCTGT GTCTCTAAG
2601 CAGGAGATGA ACAAAGGAAG AGCCTGACTC CCTCGAGTCT CCAGATCTAT GATCAGTGC CTGGCTGAT CCCCGGAGA TCCAGAGCCT GCCCGCTGGA
2701 TGTCTCGAT CATATGGGC CTGAACAGCT CGCGCTCAG CAGGGCGTCC CAGAGCTGGT CCACSTGCAG CTCTTCCACC AGCCGAGCC GGCACCGCG
2801 CAGGAGCCG CGATCCGCTT CGTCCATCCT GTGTCTGGC GGCAAAACCG TTGCGAAAAA GAAAGTTTAC GGGGACTACT GCACTTATAT ACGGTTCTCC
2901 CCCACCTCG GAAAAAAGC GGAGCCAGTA CACGACATCA CTTTCCAGT TTACCCCGG CCACSTTCTC TAGCACCGG ATCAATGGC GACCCCTCC
3001 CCCAACTCT CGGGACTGT GGGCGATGT CGCTCTGCC ACTGACGGG ACCCGAGCT GTTCATGTCC TACTGTCAA GCCTCAAAGC TGTGCTTGG
3101 GTGGCTTGG GGCATGGACA TAAACCCAGC TTTCTGTAC AAAGTGGAA TTCCGATAAT CAACCTCTG ATTACAAAT TTGTGAAAGA TTGACTGGTA
3201 TTCTTAAC TAATGCTCCT TTTACGCTAT GTGGATACG TGCTTAAAT CTTTGTATC ATGCTATGCT TTCCCGTATG GCTTTCATTT TCTCTCTT
3301 GTATAAATCC TGGTTGCTGT CTCTTATGA GGAGTTGTGG CCCGTTGTCA GGCAACGTGG CGTGGTGTGC ACTGTGTTTG CTGACGCAAC CCCACTGGT
3401 TGGGGCATG CCACCACCTG TCAGCTCCTT TCCGGGACTT TCCTTTCC CTTCCCTATT GCCAGGCGG AACTCATCGC CGCTGCCTT GCCCGCTGCT
3501

```

3601 GGACAGGGGC TCGGCTGTTG GGCACTGACA ATTCCTGGGT GTTGTCGGGG AAGCTGACGT CCTTTCCATG GCTGCTCGCC TGTGTTGCCA CCTGGATTCT
 3701 GCGCGGGACG TCCTTCTGCT ACGTCCTTC GGCCCTCAAT CCAGCGGACC TTCTTCCCG CGGCCTGCTG CCGGCTCTGC GGCCTCTTCC CGCTCTTCGC
 3801 CTTCGCCCTC AGACGAGTCG GATCTCCCTT TGGGCCGCT CCCCGCATCG GGAATTCCTA GAGCTCGCTG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA
 3901 GCCATCTGTT GTTTGCCCTT CCCCCGTGCC TTCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCAC TGTCCTTCC TAATAAAATG AGGAAATGTC ATCGCATTGT
 4001 CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT GGGTGGGGG AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGAGA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAG GGCCGCAGGA
 4101 ACCCCTAGTG ATGGAGTTGG CCACTCCCTC TCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGG GCGACCAAAG GTCGCCCGAC GCCCGGGCTT TGCCCGGGCG
 4201 GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC GCGCAGCTGC CTGCAAGGGC GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT TTACACCCGC ATACGTCAAA
 4301 GCAACCATAG TACGCGCCCT GTAGCGGCCG ATTAAGCGCG GCGGGGTGG TGGTTACCGG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCTT AGCGCCCGCT
 4401 CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTCTCGCC ACGTTCCGCG GCTTTCCTCG TCAAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATT AGTGTCTTAC
 4501 GGCACCTCGA CCCCAAAAA CTTGATTTGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
 4601 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAACTGG AACAACACTC AACTCTATCT CGGGCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATT TGCCGATTC GGTCTATTGG
 4701 TTAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAT ATTAACGTTT ACAATTTTAT GGTGCACCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
 4801 CCGCATAGTT AAGCCAGCCC CGACACCCGC CAACACCCGC TGACCGCCCC TGACGGGCTT GTCTGCTCCC GGCATCCGCT TACAGACAAG CTGTGACCGT
 4901 CTCCGGGAGC TGCATGTGTC AGAGGTTTTC ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGACGAAA GGCCCTCGTG ATACGCCTAT TTTTATAGGT TAATGTATG
 5001 ATAATAATGG TTTCTTAGAC GTCAAGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGATATCCG
 5101 TCATGAGACA ATAACCCTGA TAAATGCTTC AATAATATG AAAAAGGAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTCGCC CTTATTCCTT TTTTTGCGGC
 5201 ATTTTGCTT CCTGTTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAG ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC
 5301 AACAGCGGTA AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTTAAAGTTC TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTATTG
 5401 ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTCGCCGCA TACACTATTC TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC
 5501 AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT
 5601 TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACCTGC CTTGATCGTT GGGAACCGGA GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCTGTAG
 5701 CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAACTATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGGC AACAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAAG
 5801 ACCACTTCTG CGCTCGGCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGA AGCCCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA
 5901 GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA
 6001 TTAAGCATTG GTAACCTGCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAC TTCAATTTTA ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT
 6101 TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAAAG TGAGTTTTCG TCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT
 6201 CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAA AAACACCCGC TACCAGCGGT GGTTTGTGTT CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTCCG AAGGTAACCTG
 6301 GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG TTCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT
 6401 GCTAATCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGCTTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCACA GCGGTCGGGC
 6501 TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG
 6601 AAGGGAGAAA GGCGGACAGG TATCCGCTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC
 6701 TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTACGG
TTCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTGTCTCAC ATGT

Валидация рестрикцией ферментного перевара

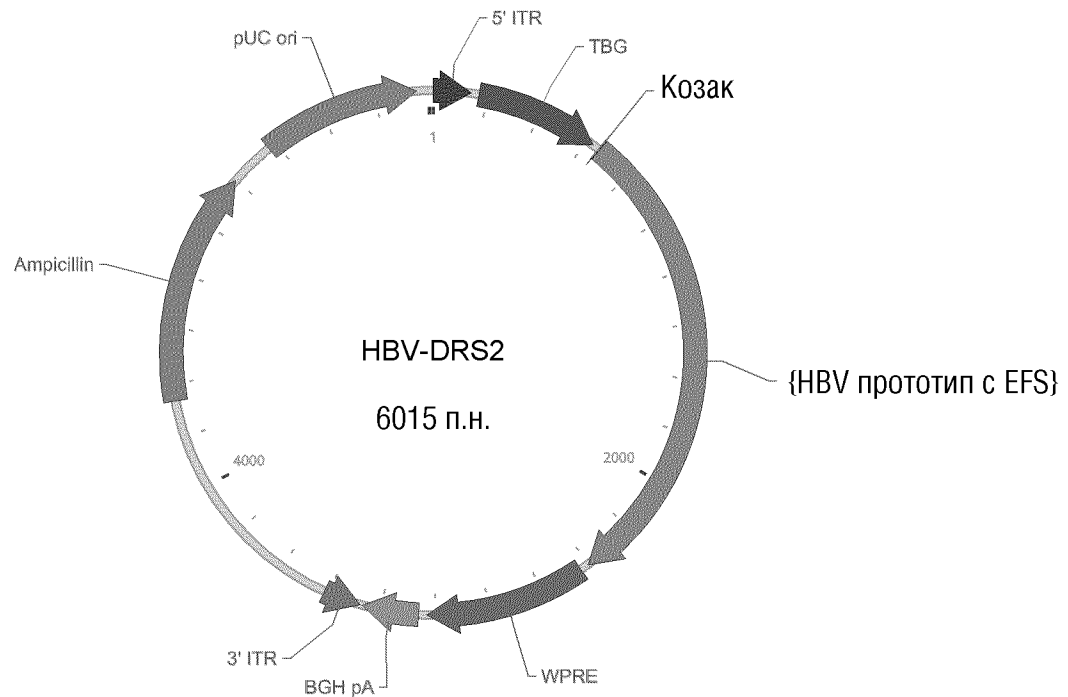
Ферменты рестрикции	Сайты отрезания	Фрагменты ДНК (п.н.)
NcoI	1945, 3567	1622, 5112
ApaLI	3368, 4673, 5170, 6416	1305, 497, 1246, 3686
EcoRI	3149, 3753	604, 6130
ApaLI+NcoI	1945, 3368, 3567, 4673, 5170, 6416	1423, 199, 1106, 497, 1246, 2263
ApaLI+EcoRI	3149, 3368, 3753, 4673, 5170, 6416	219, 385, 920, 497, 1246, 3467

ФИГ.8

Данные вектора

ID вектора	HBV-DRS2
Наименование вектора	pAAV[Exp]-TBG>{HBV prototype with EFS}:WPRE
Размер	6015 п.н.
Тип вектора	AAV вектор экспрессии гена млекопитающих
Вставленный промотор	TBG
Вставленная ORF	{HBV-Casp6 с EFS}
Кол-во копий плазмиды	Высокое
Резистент. к антибиотику	Ампициллин
Клонирующий хозяин	Stb13 (или альтернативный штамм)

Карта вектора



Компоненты вектора

Наименование	Положение	Размер (п.н.)	Тип	Описание	Примечание по применению
5' ITR	■ 1-141	141	ITR	AAV 5' инвертированный концевой повтор (функциональный эквивалент 5' ITR дикого типа)	Позволяет репликацию вирусного генома и его упаковку в вирус
TBG	■ 169-628	460	Промотор	Промотор тироксин-связывающего глобулина человека	Тканеспецифичность: печень. Специфичность к типу клеток: гепатоциты
Козак	■ 653-658	6	Разный	Последовательность инициации трансляции Козака	Способствует инициации трансляции старт-кодона ATG ниже последоват. Козака
{HBV-Casp9 с EFS}	■ 659-2404	1746	ORF	Нет	Нет

Наименование	Положение	Размер (п.н.)	Тип	Описание	Примечание по применению
WPRE	■ 2435-3032	598	Разный	Посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков	Улучшает стабильность вируса в упаковывающих клетках, приводит к более высокому титру упаковок вируса; улучшает более высокую экспрессию трансгенов
BGH pA	■ 3063-3270	208	Сигнал поли-А	Сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота	Позволяет терминацию транскрипции и полиаденилирование мРНК, транскрибируемую Pol II РНК полимеразы
3' ITR	■ КОМПЛЕМЕНТ (3278-3418)	141	ITR	AAV 3' инвертированный концевой повтор	Позволяет репликацию вирусного генома и его упаковку в вирус
Ампициллин	■ 4335-5195	861	ORF	Ген резистентности к ампициллину	Позволяет E. Coli быть резистентной к ампициллину
pUC ori	■ 5366-5954	589	Rep_начало	pUC точка начала репликации	Способствует репликации плазмиды в E. Coli; регулирует кол-во высококопийной плазмиды (500-700)

Последовательность вектора

```

1  CCTGCAGGCA  GCTGCGCGCT  CGCTCGCTCA  CTGAGGCCGC  CCGGGCAAAG  CCCGGCGCTC  GGGCGACCTT  TGGTCGCCCC  GCCTCAGTGA  GCGAGCGAGC
101  GCGCAGAGAG  GGAGTGGCCA  ACTCCATCAC  TAGGGGTTC  TTCTAGACAA  CTTGTATAG  AAAAGTTGGG  GCTGGAAGCT  ACCTTTGACA  TCATTTCCTC
201  TCGCAATGCA  TGTATAATTT  CTACAGAACC  TATTAGAAAG  GATCACCCAG  CCTCTGCTTT  TGTACAACTT  TCCCTTAAAA  AACTGCCAAT  TCCACTGCTG
301  TTTGGCCCAA  TAGTGAGAAC  TTTTTCCTGC  TGCTCTTGG  TGCTTTTGGC  TATGGCCCTT  ATTCTGCTGT  CTGAAGACAC  TCTTGCCAGC  ATGACTTAA
401  ACCCTCCAG  CTCTGACAA  CCTCTTTCTC  TTTTGTTTA  CATGAAGGT  CTGGCAGCCA  AAGCAATCAC  TCAAAGTCA  AACCTTATCA  TTTTTGCTT
501  TGTCTCTTT  GGCCTTGGT  TTGTACATCA  GCTTTGAAA  TACCATCCCA  GGGTAAATGC  TGGGGTAAAT  TTATAACTAA  GAGTGTCTA  GTTTTGCAAT
601  ACAGGACATG  CTATAAAAA  GGAAGATCA  AGTTTGACA  AAAAAAGCAG  CTGCCACCAT  GTGTTCATGT  CCTACTGTT  AAGCCTCCAA  GCTGTGCCTT
701  GGGTGGCTTT  GGGGCATGGA  CAAGAGCCAG  ACATGATAAG  ATACATTGAT  GAGTTTGGAC  AAACCACAAC  TAGAATGCAG  TGAATAAAAT  GCTTTATTTG
801  TGAATTTGT  GATGCTATT  CTTTATTGT  AACCATATA  AGCTGCAATA  AACAAAGTTA  TGATGTTTA  AAGAAAAGTT  TTTTCCGGAG  GAAATTAAG
901  CAACCAGGCA  TCTGTTTATA  AATCCCTTTC  ACCGAAACAG  CATTAGCGAC  CCTAAGCAGG  AGGGACTGCA  GGTCTTCAGA  GTGAGCCAC  TGCTCAAAGA
1001  TGTCTCCAG  GGTCTCAACG  TACCAGGAGC  CACTCTTGGG  GTCCCTCCAG  GAAACAATA  CTGGGAAAGT  AGAGTAGGAC  ACAAAGATGT  CACTGGGTGT
1101  GGGCAAATA  GATATGGCGT  CCAGCTGGTC  GAAGTCTCT  AAACCTTCT  GGAACGGGT  GGCATCTGGC  TCGGGTTAC  TGCCAGGGGA  CTCGTCTCA
1201  GGGGAAGTGG  AGGCCACCTC  AAACCATGG  TCTTCTGCT  CCCACCACA  GGCCTGGATG  AAAAAGAGCT  TGGGCTTCCC  TCCAGGCTG  GGCAGCTGG
1301  TCCCATGAA  GATGTTTACA  ATCTTCTCGA  CCGACACAGG  GCATCCATCT  GTGCCGTAGA  CAGCCCTGG  GAACTGCAGG  TGGCTGGCCT  GACAGCCGTG
1401  AGAGAGAATG  ACCACCACGC  AGCAGTCCAG  AGCACCGTGG  TCCTGCTGG  CCAGTCCAG  CAAAGCCAGC  ACCATTTTCT  TGGCAGTCA  GTCGCCCTTC
1501  ACCTCCACCA  TGAATGCGAG  CGAGGAGAAG  CGACGCGCA  ACTTCTACA  GTCGATGTTG  GAGCCAGTGC  GGTGCGGAG  CCGGACTCA  CGGCAGAAGT
1601  TCACATGTT  GATAATGAGG  CAGTGGCCAC  AGGGTCCAT  GCTCAGGATG  TAAGCCAAAT  CTGCATTTCC  CCTCAAATC  TCAAGAGCAC  CGACATCACC
1701  AAATCCTCCA  GAACCAATGT  CCACTGGTCT  GGGTGTTTCC  GGTCTGAGAA  CCTCTGGTTT  CGAATCTCT  GGTCTGAGCA  CCACTGGGGT  AAGGTTTCT
1801  AGGGTTGGCT  TCGACAATTT  TGCTGCTTGC  CTGTAGTTC  GCAGAACA  AGCCAGCATG  TCCTGGCTG  TGCTCTTAA  GCAGGAGATG  AACAAAGGAA
1901  GAGCCTGACT  CCCTCGAGTC  TCCAGATCTA  TGATCAGCTG  CCTGGCTGA  TCCCGCCGAG  ATCCAGAGCC  TGCCCGCTGG  ATGCTCTCGA  TCATATGGGG
2001  CCTGAACAGC  TCGCGGCTCA  GCAGGGCGTC  CCAGAGCTGG  TCCACCTGCA  GCTCTTCCAC  CAGCCGAGC  CGGCACCGCC  GCAGGAGCCG  CCGATCCGCT
2101  TCGTCCATCC  TGTGTTCTGG  CGGCAAACCC  GTTGCAGAAA  AGAACGTTCA  CGGCGACTAC  TGCACTTATA  TACGTTTCT  CCCCACCTC  GGGAAAAAGG
2201  CGGAGCCAGT  ACACGACATC  ACTTCCAG  TTTACCCCGC  GCCACCTTCT  CTAGGCACCG  GATCAATGCG  CGACCCCTCC  CCCCACCTC  TCGGGGACTG
2301  TGGGCGATGT  GCGCTCTGCC  CACTGACGGG  CACCGGAGCC  TGTTCATGTC  CTAAGTTTCA  AGCCTCCAAG  CTGTGCTTGG  GGTGGCTTTG  GGCATGGAC
2401  AATAACCCAG  CTTTCTTGTA  CAAAGTGGGA  ATTCCGATA  TCAACCTCTG  GATTACAAAA  TTTGTGAAAG  ATTGACTGGT  ATTCTTAACT  ATGTTGCTCC
2501  TTTTACGCTA  TGTGGATACG  CTGCTTTAAT  GCSTTTGTAT  CATGCTATG  CTCCCGTAT  GGCTTTCATT  TTCTCTCTCT  TGTATAAATC  CTGGTTGCTG
2601  TCTCTTATG  AGGAGTTGTG  GCCCGTTGTC  AGGCAACGTG  GCGTGGTGTG  CACTGTGTTT  GCTGACGCAA  CCCCCTGCTG  TTGGGGCATT  GCCACCCT
2701  GTCAGCTCCT  TTCCGGGACT  TTCGCTTTC  CCTCCCTAT  TGCCACGGCG  GAACCTATCG  CCGCTGCT  TGCCCGCTGC  TGGACAGGGG  CTCGGCTGT
2801  GGGCACTGAC  AATTCCTGG  TGTGTCTGGG  GAAGCTGAGC  TCCTTCCAT  GGCTGCTCGC  CTGTGTTGCC  ACCTGGATTC  TGCCGGGAC  GTCCTTCTGC
2901  TACGTCCTTT  CGGCCCTCAA  TCCAGCGGAC  CTTCTTCC  GGGGCTGT  GCCGCTCTG  CGGCTCTTC  CGGCTCTFCG  CTTTCCCTCT  CAGACGAGTC
3001  GGATCTCCCT  TTGGGCGGCC  TCCCGGCATC  GGAATTCCT  AGAGCTCGCT  GATCAGCTC  GACTGTGCTT  TCTAGTTGCC  AGCCATCTGT  TGTGCTCCC
3101  TCCCCGCTGC  CTTCTTGGC  CCTGGAAGGT  GCCACTCCCA  CTGCTCTTC  CTAATAAAAT  GAGGAAATG  CATCGCATG  TCTGAGTAGG  TGTCACTTA
3201  TTTTGGGGG  TGGGGTGGGG  CAGGACAGCA  AGGGGAGGA  TTGGGAAGAG  AATAGCAGGC  ATGCTGGGGA  GGGCCGAGG  AACCCCTAGT  GATGGAGTTG
3301  GCCACTCCCT  CTCTGCGGCT  TCGCTCGCTC  ACTGAGGCGG  GCGCAGCAA  GGTGCGCCGA  CGCCCGGCT  TTCCCGGGG  GGCCTCAGT  AGCGAGCGAG
3401  CGCGCAGCTG  CCTGCAGGG  CGCCTGATGC  GGTATTTTCT  CCTTACGCAT  CTGTGCGGTA  TTTACACCCG  CATACTCAA  AGCAACCATA  GTACGCGCC
3501

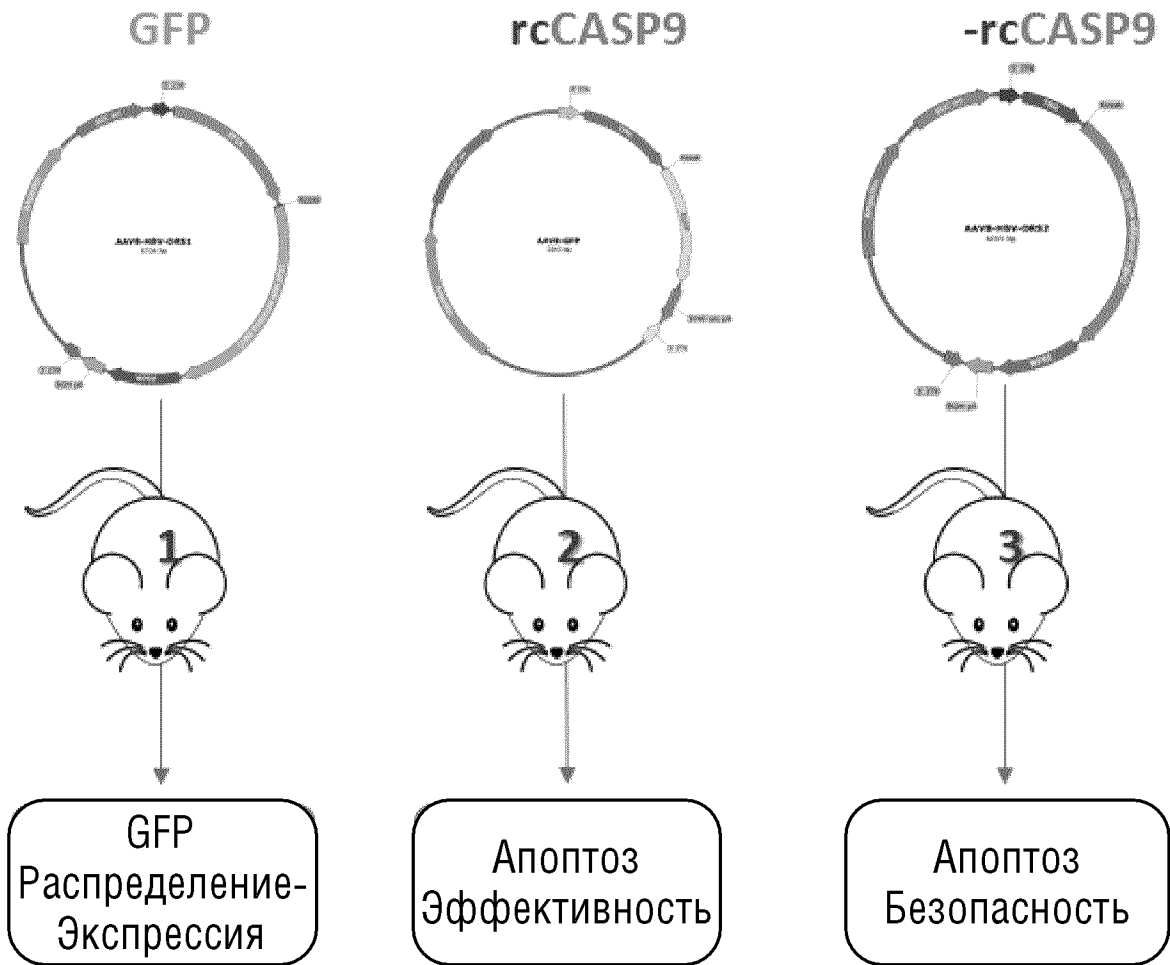
```


3601 TGTAGCGGCG CATTAAGCGC GGCGGGGTG GTGGTTACGC GCAGCGTGAC CGCTACACTT GCCAGCGCCT TAGCGCCCGC TCCTTTCGCT TTCTTCCCTT
 3701 CCTTTCCTGC CACGTTGCGC GGCTTTCCCC GTCAAGCTCT AAATCGGGGG CTCCCTTTAG GGTTCCGATT TAGTGCCTTA CGGCACCTCG ACCCAAAAA
 3801 ACTTGATTG GGTGATGGT CACGTAGTGG GCCATCGCCC TGATAGACGG TTTTTCGCCC TTTGACGTTG GAGTCCACGT TCTTTAATAG TGGACTCTTG
 3901 TTCCAAACTG GAACAACACT CAACTCTATC TCGGGCTATT CTTTTGATTT ATAAGGGATT TTGCCGATTT CGGTCTATTG GTTAAAAAAT GAGCTGATTT
 4001 AACAAAAATT TAACGCGAAT TTTAACAAAA TATTAACGTT TACAATTTTA TGGTGCACCT TCAGTACAAT CTGCTCTGAT GCCGCATAGT TAAGCCAGCC
 4101 CCGACACCCG CCAACACCCG CTGACGCGCC CTGACGGGCT TGTC TGCTCC CGGCATCCGC TTACAGACAA GCTGTGACCG TCTCCGGGAG CTGCATGTGT
 4201 CAGAGGTTTT CACCGTCATC ACCGAAACGC GCGAGACGAA AGGGCCTCGT GATACGCCTA TTTTTATAGG TTAATGTCAT GATAATAATG GTTTCTTAGA
 4301 CGTCAGGTGG CACTTTTCGG GGAAATGTGC GCGGAACCCC TATTTGTTTA TTTTTCTAAA TACATTCAAA TATGTATCCG CTCATGAGAC AATAACCTCG
 4401 ATAAATGCTT CAATAATATT GA AAAAGGAA GAGTATGAGT ATTCAACATT TCCGTGTGCG CCTTATTCCC TTTTTTGCGG CATTTTGCTC TCCTGTTTTT
 4501 GCTCACCCAG AAACGCTGGT GAAAGTAAAA GATGCTGAAG ATCAGTTGGG TGCACGAGTG GGTTACATCG AACTGGATCT CAACAGCGGT AAGATCCTTG
 4601 AGAGTTTTTCG CCCCGAAGAA CGTTTTCCAA TGATGAGCAC TTTTAAAGTT CTGCTATGTG GCGCGGTATT ATCCCGTATT GACGCGGGGC AAGAGCAACT
 4701 CGGTGCGCGC ATACACTATT CTCAGAATGA CTTGGTTGAG TACTCACCAG TCACAGAAAA GCATCTTACG GATGGCATGA CAGTAAGAGA ATTATGCAGT
 4801 GCTGCCATAA CCATGAGTGA TAACACTGCG GCCAACTTAC TTCTGACAAC GATCGGAGGA CCGAAGGAGC TAACCGCTTT TTTGCACAAC ATGGGGGATC
 4901 ATGTAACTCG CCTTGATCGT TGGGAACCGG AGCTGAATGA AGCCATACCA AACGACGAGC GTGACACCAC GATGCCTGTA GCAATGGCAA CAACGTTGCG
 5001 CAAACCTATTA ACTGGCGAAC TACTTACTCT AGCTTCCCGG CAACAATTA TAGACTGGAT GGAGGCGGAT AAAGTTGCAG GACCACTTCT GCGCTCGGCC
 5101 CTTCCGGGTG GCTGGTTTAT TGCTGATAAA TC TGGAGCCG GTGAGCGTGG AAGCCGCGGT ATCATTGCAG CACTGGGGCC AGATGGTAAG CCCTCCCGTA
 5201 TCGTAGTTAT TACACGACG GGGAGTCAGG CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG CTGAGATAGG TGCCTCACTG ATTAAAGCATT GGTAACTGTC
 5301 AGACCAAGTT TACTCATATA TACTTTAGAT TGATTTAAAA CTTCATTTTT AATTTAAAAG GATCTAGGTG AAGATCCTTT TTGATAATCT CATGACCAAA
 5401 ATCCCTTAAC GTGAGTTTTC GTTCCACTGA GCGTCAGACC CCGTAGAAAA GATCAAAGGA TCTTCTTGTG ATCCTTTTTT TCTGCGCGTA ATCTGCTGCT
 5501 TGCAAAACAAA AAAACCACCG CTACCAGCGG TGGTTTGTIT GCCGGATCAA GAGCTACCAA CTCTTTTTCC GAAGGTAAC GGCTTCAGCA GAGGCGAGAT
 5601 ACCAAATACT GTTCTCTAG TGTAGCCGTA GTTAGGCCAC CACTTCAAGA ACTCTGTAGC ACCGCCTACA TACCTCGCTC TGCTAATCCT GTTACCAGTG
 5701 GCTGCTGCCA GTGGCGATAA GTCGTGTCTT ACCGGTTTGG ACTCAAGACG ATAGTTACCG GATAAAGCGC AGCGGTGCGG CTGAACGGGG GGTTCGTGCA
 5801 CACAGCCGAG CTTGGAGCGA ACGACCTACA CGAACTGAG ATACSTACAG CGTGAGCTAT GAGAAAGCGC CACGCTTCCC GAAGGGAGAA AGGCGGACAG
 5901 GATCCCGGTA AGCGGCAGGG TCGGAACAGG AGAGCGCAGC AGGGAGCTTC CAGGGGAAA CGCCTGGTAT CTTTATAGTC CTGTGCGGTT TCGCCACCTC
 6001 TGACTTGAGC GTCGATTTTT GTGATGCTCG TCAGGGGGGC GGAGCCTATG GAAAAACGCC AGCAACGCGG CCTTTTTACG GTTCTTGGCC TTTTTGTGCG
CTTTTGCTCA CATGT

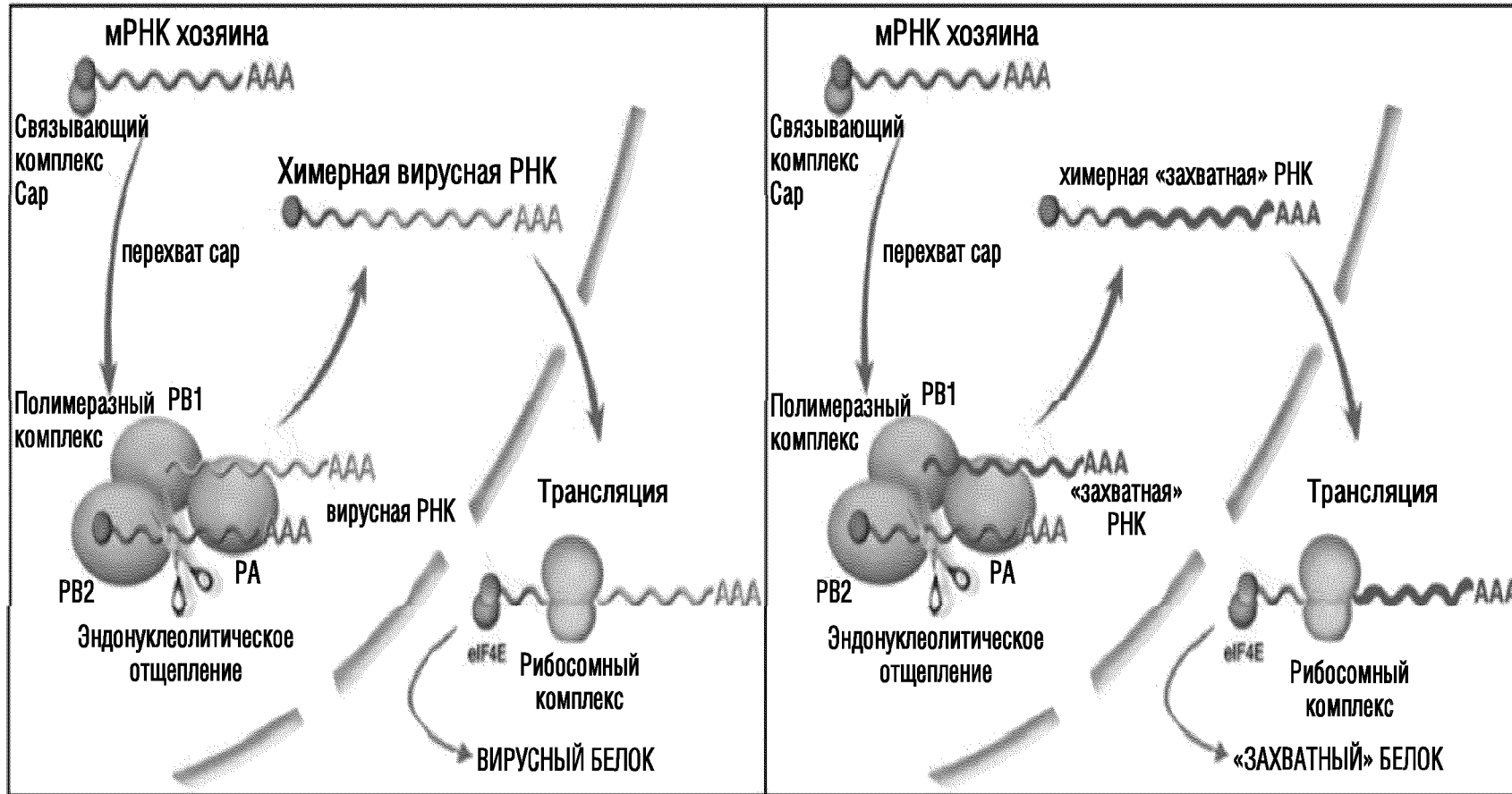
Валидация рестрикцией ферментного перевара

Ферменты рестрикции	Сайты отрезания	Фрагменты ДНК (п.н.)
XhoI	1914	6015
NdeI	1994	6015
XmnI	322, 1313, 4523	991, 3210, 1814
NcoI	1226, 2848	1622, 4393
ApaI	2649, 3954, 4451, 5697	1305, 497, 1246, 2967
ApaI+XhoI	1914, 2649, 3954, 4451, 5697	735, 1305, 497, 1246, 2232
ApaI+NdeI	1994, 2649, 3954, 4451, 5697	655, 1305, 497, 1246, 2312
ApaI+XmnI	322, 1313, 2649, 3954, 4451, 4523, 5697	991, 1336, 1305, 497, 72, 1174, 640
ApaI+NcoI	1226, 2649, 2848, 3954, 4451, 5697	1423, 199, 1106, 497, 1246, 1544

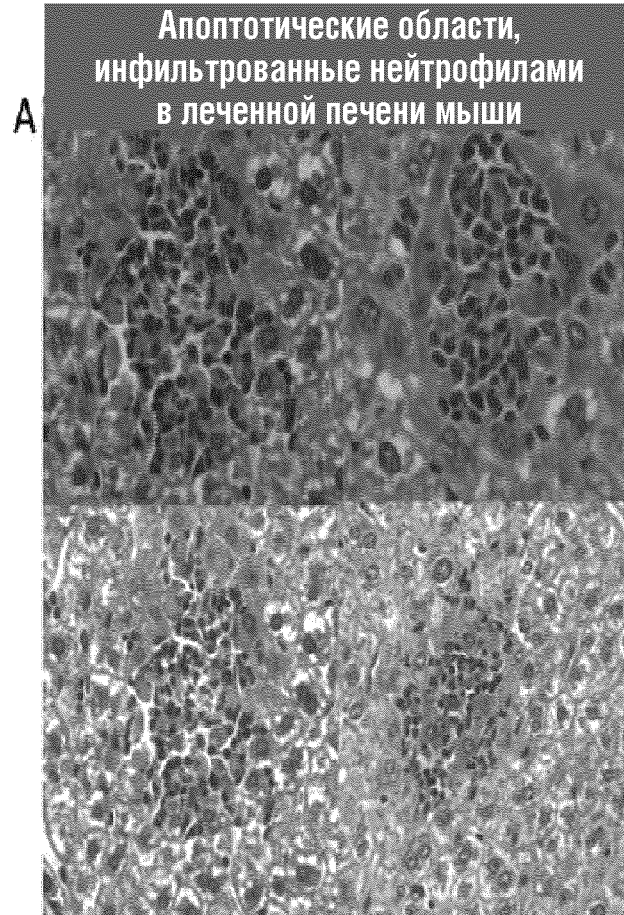
ФИГ.9



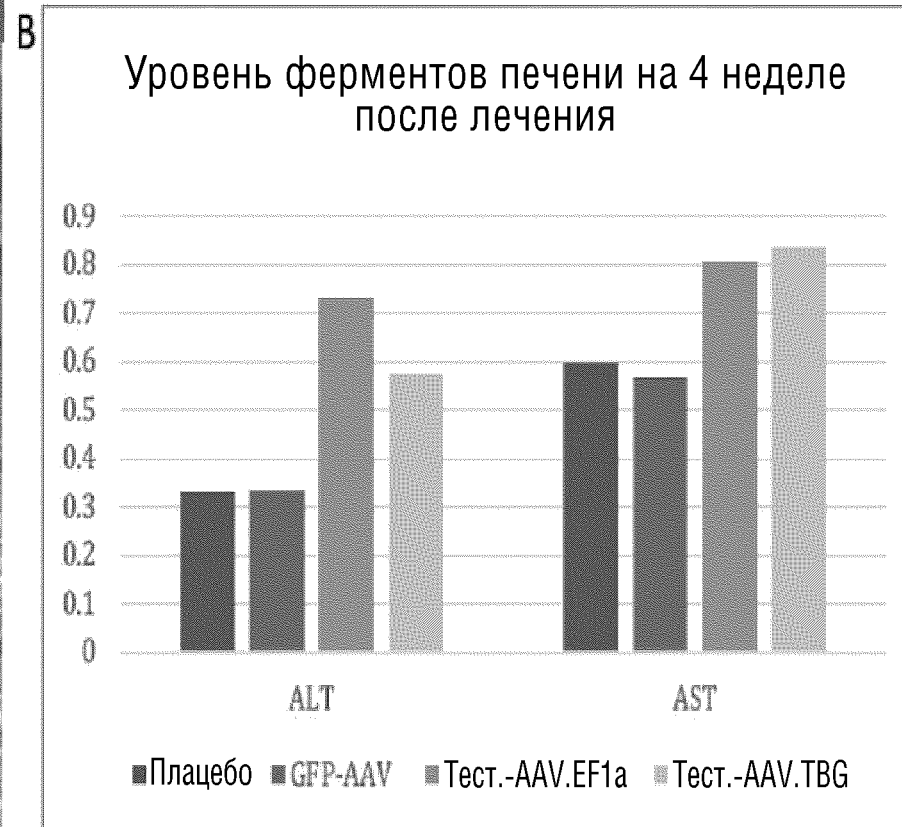
ФИГ.10А



ФИГ.11А

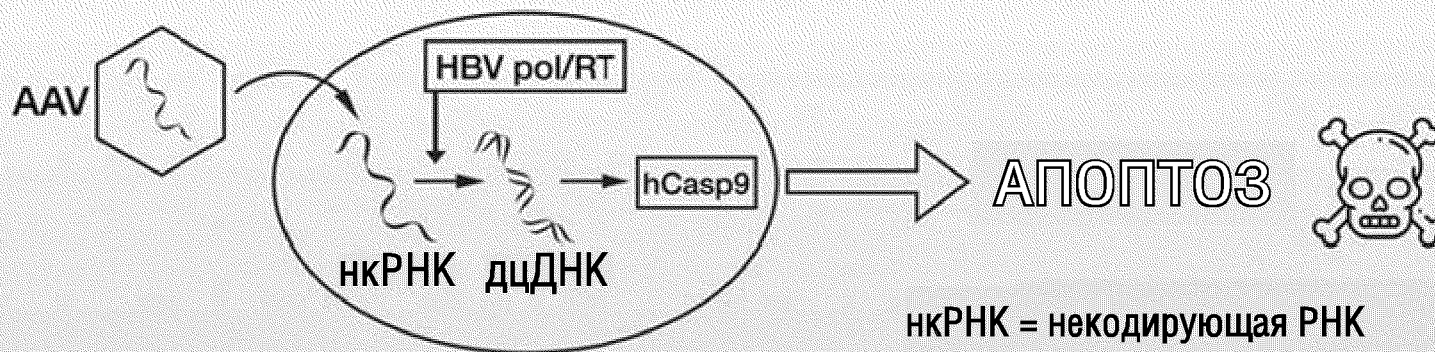


ФИГ.11В



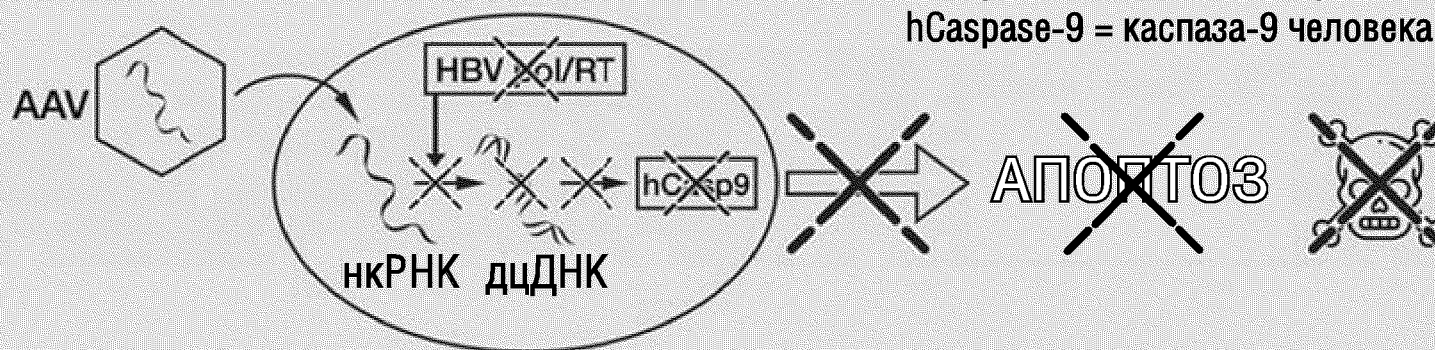
ФИГ.11С

HBV-инфицированный гепатоцит

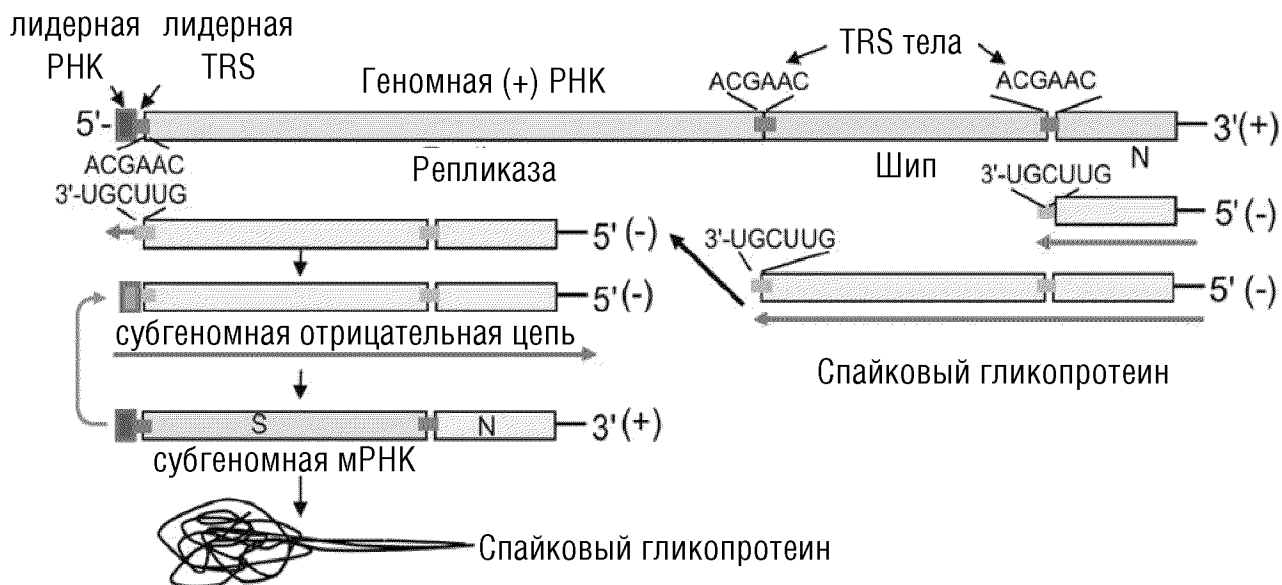


нкРНК = некодирующая РНК
дцДНК = двухцепочечная ДНК
AAV = аденоассоциированный вирус
HBV pol/RT = HBV полимеразы
hCaspase-9 = каспаза-9 человека

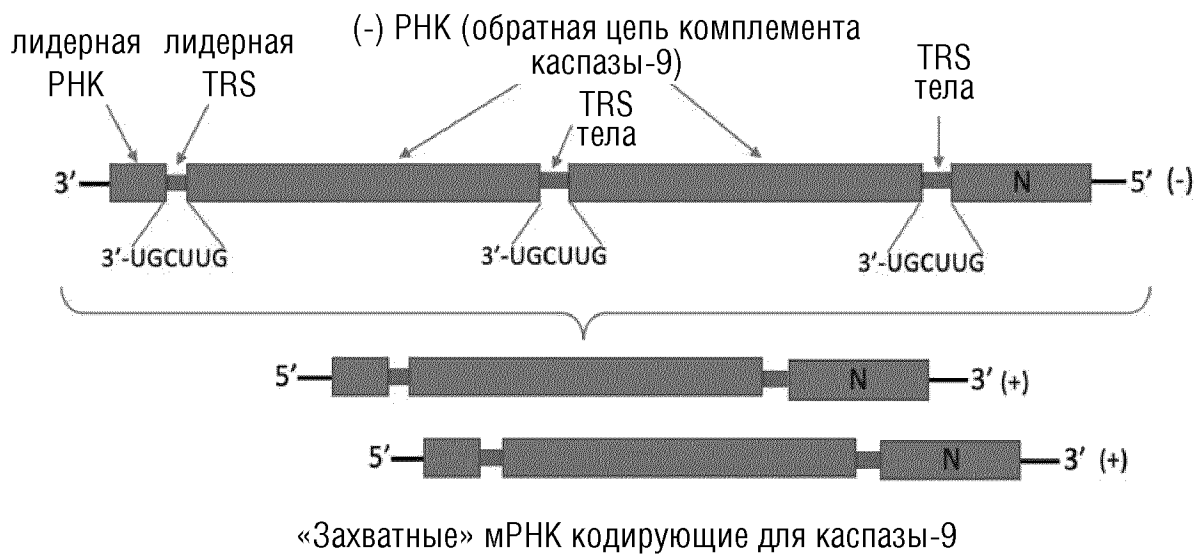
Неинфицированный гепатоцит



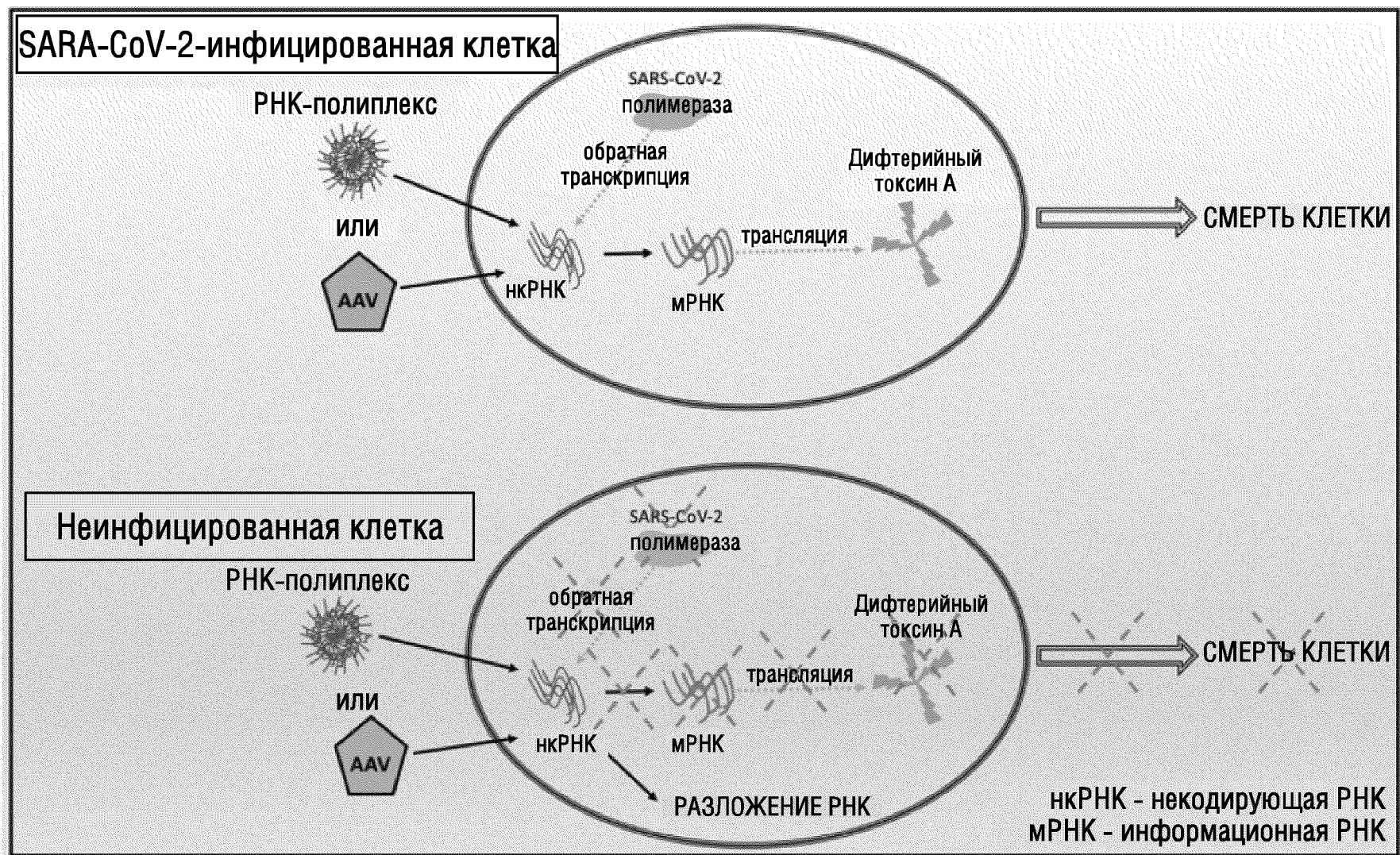
ФИГ.12А



ФИГ.12В



ФИГ.13

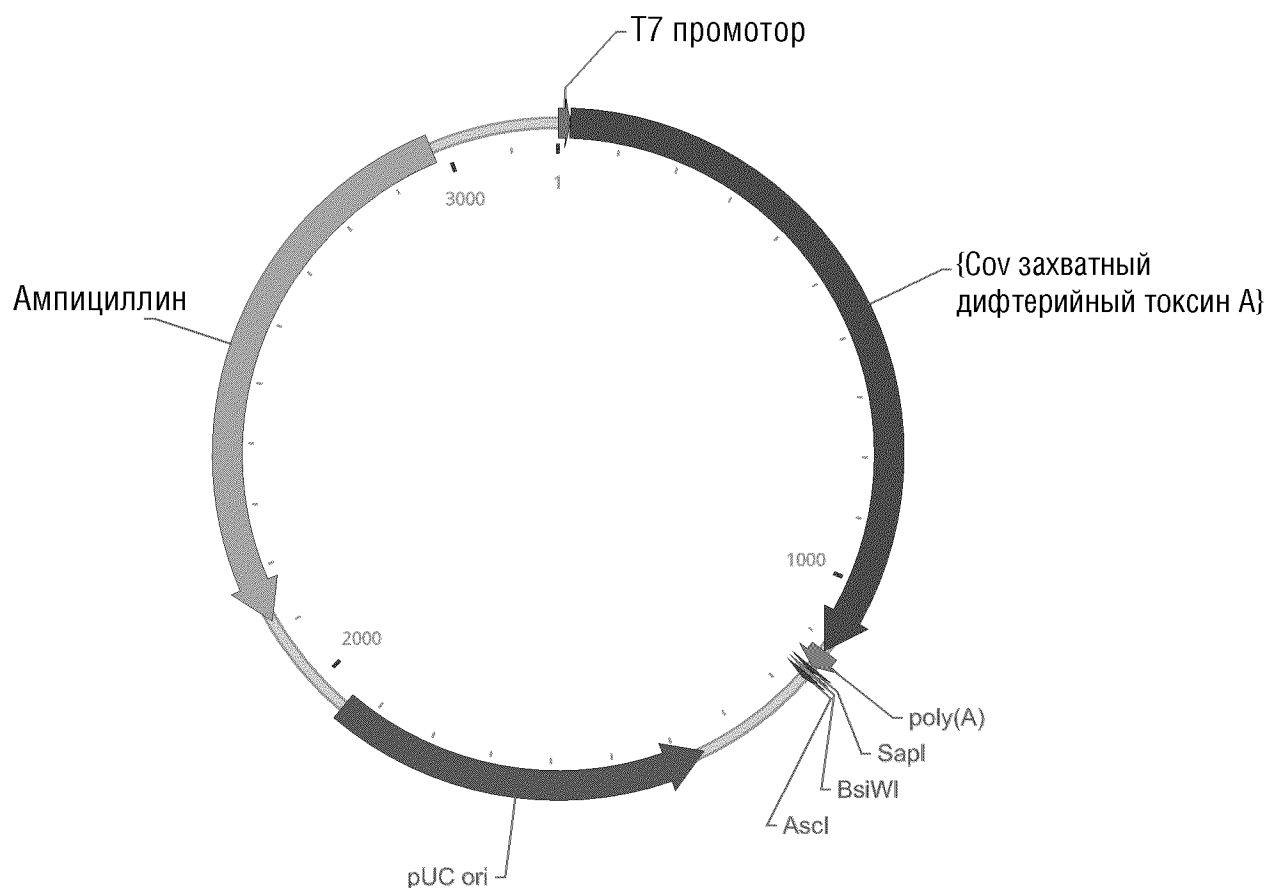


ФИГ.14

Данные вектора

ID вектора	CoV-2 Hijack DTA
Наименование вектора	pT7[мРНК]-{Cov захватный дифтерийный токсин A}
Размер вектора	3177 п.н.
Тип вектора	вектор транскрипции in vitro (для мРНК)
Вставленная транскрибированная последовательность	{Cov захватный дифтерийный токсин A}
Кол-во копий плазмиды	Высокое
Резистент. к антибиотику	Ампициллин
Клонирующий хозяин	VB ультрастабильный (или альтернативный штамм)

Карта вектора



Наименование	Положение	Размер (п.н.)	Тип	Описание	Примечание по применению
T7 промотор	■ 1-19	19	Промотор	T7 промотор	Управляет транскрипцией высокого уровня нижестоящего гена в клетках-хозяевах E. Coli, которые экспрессируют T7 РНК полимеразу; также может применяться для in vitro транскрипции
{ Сов захватный дифтер. токсин А }	■ 20-1116	1097	Транскрибируемая последовательность	Нет	Нет
поли(А)	■ 1117-1146	30	Разный	Полиаденилил.	Позволяет стабильность мРНК
SapI	■ 1148-1154	7	Разный	Сайт рестрикции SapI	Позволяет линейаризацию вектора
BsiWI	■ 1155-1160	6	Разный	Сайт рестрикции BsiWI	Позволяет линейаризацию вектора
AscI	■ 1161-1168	8	Разный	Сайт рестрикции AscI	Позволяет линейаризацию вектора
pUC ori	■ комплемент (1358-1946)	589	Rep_начало	pUC точка начала репликации	Способствует репликации плазмиды в E. Coli; регулирует количество высококопийной плазмиды (500-700)
Ампициллин	■ комплемент (2117-2977)	861	ORF	Ген резистентности к ампициллину	Позволяет E. Coli быть резистентной к ампициллину

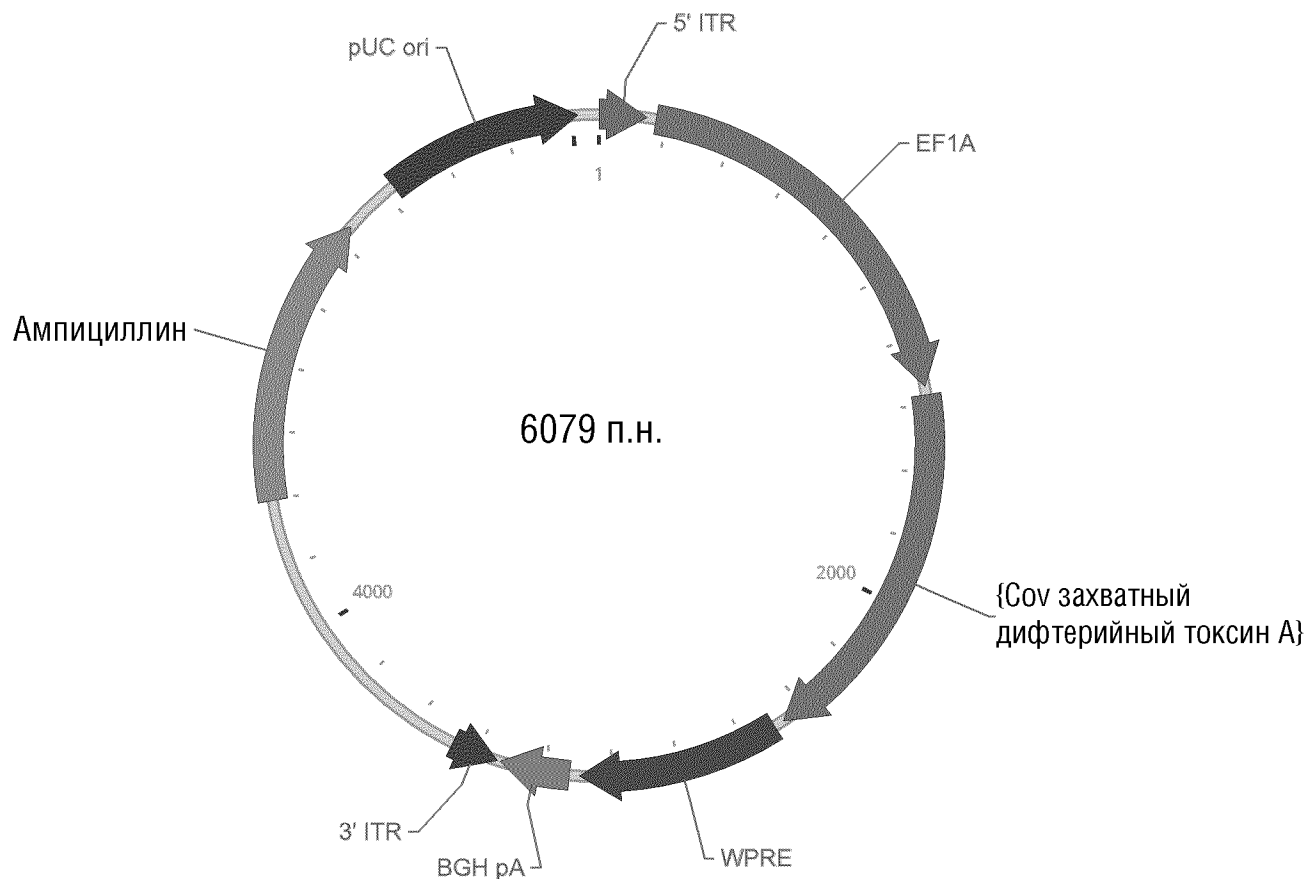
1 TAATACGACT CACTATAGGC ATGAAGACAG TGTTTAGCAA GATTGTTTT TTGTCATTCT CCTAAGAAGC TATTAANAATC
81 ACATGGGGAT AGCACTACTA AAATTAATTT TACACATTAG GGCTCTTCCA TATAGGCAGC TCTCCCTAGC ATTGTTCACT
161 GTACACTCGA TCGTACTCCG CGTGGCCTCG GTGAAAATGT GGTGGCTCTT TCAAGTCCTC CCTAATGTTA CACACTGATT
241 AAAGATTGTT ACAATGAGCT ACCTACTGAT CGCCTGACAC GATTTCCTGC ACAGGCTTGA GCCATATACT CATACATCGC
321 ATCTTGGCCA CGTTTTCCAC GGGTTTCAAA ATTAATCTCA AGTTCTACGC TTAACGCTTT CGCCTGTTC CAGTTATTAA
401 TATATTCAAC GCTAGAACTC CCCTCAGCGA AGGGAAGGCT GAGCACTACA CGCGAAGCAC CATCACCAGG CCTTTTGATA
481 AACTCTTCGG TTCCGACTTG CTCCATCAAC GGTTCAGTGA GACTTAAACC TAACCTTTTC TTAATAGTTT CGGCATTATC
561 CACTTTTAGT GCGAGAACCT TCGTCAGTCC TGGATACGTC ACTTTGACCA CGCCTCCAGC TTTTCCAGAG AGCGGGTTTT
641 CATTATCTAC AGAGTATCCC GCAGCGTCGT ATTTATTGTC GGTACTATAA AACCTTTTCC AATCATCGTC ATAATTTCC
721 TGTGTACCAG ATTTTGGCTT TTGTATACCT TTTTGAATGG AATCTACATA ACCAGSTTTA GTCCCGTGGT ACGAAGAAAA
801 GTTTTCCATC ACAAAAGATT TAGAAGAATC AACAACATCA TCAGCGCCCA TCTTACCTTT CGGTCACACC CGGACGAAAC
881 CTAGATGTGC TGATGATCGG CTGCAACACG GACGAAACCG TAAGCAGCCT GCAGAAGATA GACGAGTTAC TCGTGTCTCG
961 TCAACGACAG TAATTAGTTA TTAATTATAC TGCGTGTAGT CACTAAGCAT GCAGCCGAGT GACAGCCACA CAGATTTTAA
1041 AGTTCGTTTA GAGAACAGAT CTACAAGAGA TCGAAAGTTG GTTGGTTTGT TACCTGGGAA GGTATAAACC TTTAATAAAA
1121 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAATGAA GAGCCGTACG GGCGCGCCTA GGCGCGATT CGCTTCTCTG CTCACTGACT
1201 CGCTGCGCTC GGTGGTTCCG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG
1281 GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTA AAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT
1361 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA
1441 GATACCAGGC GTTTCCCCTT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCGG ACCCTGCCGC TTACCCGATA CCTGTCCGCC
1521 TTTTCTCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCC GTGTAGGTCG TTCCGTTCAA
1601 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTA ACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG
1681 TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGCCGG TGCTACAGAG
1761 TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT
1841 CGGAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTTGC AAGCAGCAGA
1921 TTACCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGA CGAAA ACTCA
2001 CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC
2081 AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACTTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC
2161 TATTTGCTTC ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCGAGT
2241 GCTGCAATGA TACCGCGAGA TCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTATCAGC AATAAACAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG
2321 CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG
2401 TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCAATTCAGC
2481 TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCTCCGAT
2561 CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCA TGCCAT
2641 CCGTAAGATG CTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC GAGTTGCTCT
2721 TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAAC TTTAAA AGTGTCATC ATTGGA AAC GTTCTTCGGG
2801 GCGAAA ACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCA ACTGA TCTTCAGCAT
2881 CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG
2961 AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT
3041 ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCGG CGCACATTT CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA
3121 CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCGTC

ФИГ.15

Данные вектора

Наименование вектора	рAAV[нкРНК]-{Cov захватный дифтерийный токсин A}:WPRE
Размер вектора	6079 п.н.
Размер вирусного генома	3482 п.н.
Тип вектора	AAV вектор экспрессии гена млекопитающих
Вставленный промотор	EF1A
Вставленная некодирующая РНК	{ Cov захватный дифтерийный токсин A }
Вставленный регуляторный элемент	WPRE
Кол-во копий плазмиды	Высокое
Резистент. к антибиотику	Ампициллин
Клонирующий хозяин	VB ультрастабильный (или альтернативный штамм)

Карта вектора



Наименование	Положение	Размер (п.н.)	Тип	Описание	Примечание по применению
T7 промотор	■ 1-141	141	ITR	AAV 5' инвертированный концевой повтор (функциональный эквивалент 5' ITR дикого типа)	Позволяет репликацию вирусного генома и его упаковку в вирус
EF1A	■ 169-1347	1179	Промотор	Промотор эукариотного фактора элонгации трансляции 1 α 1 человека	Сильный промотор
{ Сов захватный дифтер. токсин A }	■ 1372-2468	1097	Некодирующая РНК	Нет	Нет
WPRE	■ 2499-3096	598	Регуляторный элемент	Посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков	Улучшает стабильность вируса в упаковывающих клетках, приводит к более высокому титру упакованного вируса; улучшает более высокую экспрессию трансгенов
BGH pA	■ 3127-3334	208	Сигнал поли-А	Сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота	Позволяет терминацию транскрипции и полиаденилирование мРНК, транскрибированную Pol II РНК полимеразы
3' ITR	■ КОМПЛЕМЕНТ (3342-3482)	141	ITR	AAV 3' инвертированный концевой повтор	Позволяет репликацию вирусного генома и его упаковку в вирус
Ампициллин	■ 4399-5259	861	ORF	Ген резистентности к ампициллину	Позволяет E. Coli быть резистентной к ампициллину
pUC ori	■ 5430-6018	589	Rep_начало	pUC точка начала репликации	Способствует репликации плазмиды в E. Coli; регулирует количество высококопийной плазмиды (500-700)

Последовательность вектора

```

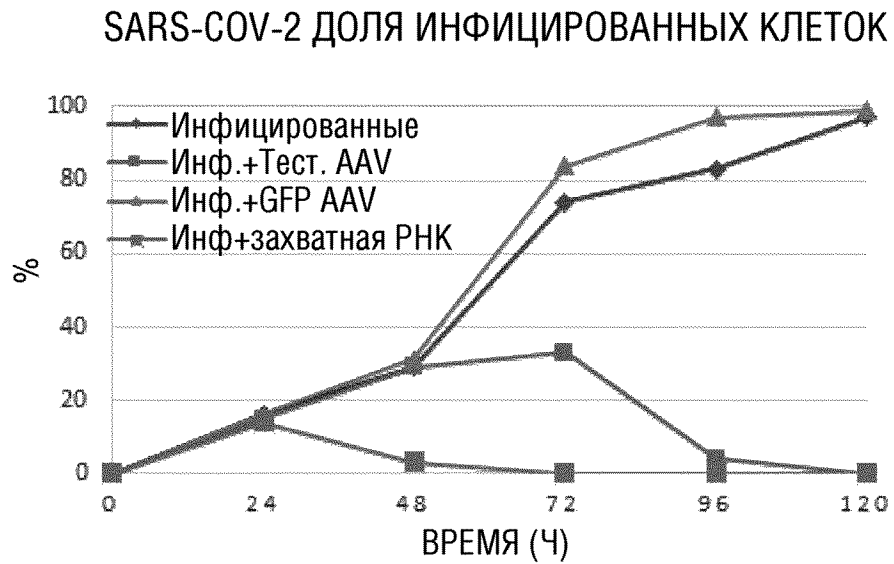
1  CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG CCCGGGCGTC GGGCGACSTT TGGTCGCCCG
81  GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCG TTCTAGACAA STTTGTATAG
161  AAAAGTTGGG CTCCGGTGCC CGTCAGTGGG CAGAGCGCAC ATCGCCACAA GTCCCGAGA AGTTGGGGGG AGGGGTCCGC
241  AATTGAACCG GTGCCTAGAG AAGGTGGCGC GGGTAAACT GGGAAAGTGA TGTCTGTAC TGGCTCCGCC TTTTCCCGA
321  GGGTGGGGGA GAACCGTATA TAAGTGCAGT AGTCGCCGTG AACGTTCTTT TTCGCAACGG GTTTGCCGCC AGAACACAGG
401  TAAGTGCCGT GTGTGGTTCC CGCGGGCCTG GCCTCTTAC GGGTTATGGC CCTGCGTGC STTGAATTAC TTCCACCTGG
481  CTGCAGTACG TGATTCTTGA TCCCGAGCTT CGGGTTGGAA GTGGGTGGGA GAGTTCGAGG CCTTGCCTTT AAGGAGCCCC

```

561 TTCGCCTCGT GCTTGAGTTG AGGCCTGGCC TGGGCGCTGG GGCCGCCCGC TGCGAATCTG GTGGCACCTT CGCGCCTGTC
641 TCGCTGCTTT CGATAAGTCT CTAGCCATTT AAAATTTTTG ATGACCTGCT GCGACGCTTT TTTTCTGGCA AGATAGTCTT
721 GTAAATGCGG GCCAAGATCT GCACACTGGT ATTTCGGTTT TTGGGGCCGC GGGCGGCGAC GGGGCCCGTG CGTCCCAGCG
801 CACATGTTTC GCGAGGCGGG GCCTGCGAGC GCGGCCACCG AGAATCGGAC GGGGTAGTTC TCAAGCTGGC CGGCCTGCTC
881 TGGTGCCTGG TCTCGGCGCG CCGTGTATCG CCCCGCCCTG GGCGGCAAGG CTGGCCCGGT CGGCACCAGT TGCGTGAGCG
961 GAAAGATGGC CGCTTCCCGG CCCTGCTGCA GGGAGCTCAA AATGGAGGAC GCGGCGCTCG GGAGAGCGGG CGGGTGAGTC
1041 ACCCACACAA AGGAAAAGGG CCTTTCCGTC CTCAGCCGTC GCTTCATGTG ACTCCACGGA GTACCGGGCG CCGTCCAGGC
1121 ACCTCGATTA GTTCTCGAGC TTTTGGAGTA CGTCGTCTTT AGGTTGGGGG GAGGGGTTTT ATGCGATGGA GTTTCCCAC
1201 ACTGAGTGGG TGGAGACTGA AGTTAGGCCA GCTTGGCACT TGATGTAATT CTCCTTGAA TTTGCCCTTT TTGAGTTTGG
1281 ATCTTGGTTC ATTCTCAAGC CTCAGACAGT GGTCAAAGT TTTTTCTTC CATTCAGGT GTCGTGACAA GTTTGACAA
1361 AAAAGCAGGC TCATGAAGAC AGTGTTTAGC AAGATTGTTT TTTTGTTCATT CTCCTAAGAA GCTATTAATA TCACATGGGG
1441 ATAGCACTAC TAAAATTAAT TTTACACATT AGGGCTCTTC CATATAGGCA GCTCTCCCTA GCATTGTTCA CTGTACACTC
1521 GATCGTACTC CGCGTGGCCT CGGTGAAAAT GTGGTGGCTC TTTCAAGTCC TCCCTAATGT TACACACTGA TTAAAGATTG
1601 TTACAATGAG CTACCTACTG ATCGCCTGAC ACGATTTCCT GCACAGGCTT GAGCCATATA CTCATACTC GCATCTGGC
1681 CACGTTTTCC ACGGGTTTCA AAATTAATCT CAAGTTCTAC GCTTAACGCT TTCGCCTGTT CCCAGTTATT AATATATTCA
1761 ACGCTAGAAC TCCCCTCAGC GAAGGGAAGG CTGAGCACTA CACGCGAAGC ACCATCACCG AACCTTTTGA TAAACTCTTC
1841 CGTTCCGACT TGCTCCATCA ACGGTTCAGT GAGACTTAAA CCTAACTCTT TCTTAATAGT TTCGGCATT TCCACTTTTA
1921 GTGCGAGAAC CTTCGTCAGT CCTGGATACG TCACTTGGAC CACGCCTCCA GCTTTTCCAG AGAGCGGGTT TTTATATCT
2001 ACAGAGTATC CCGACGCGTC GTATTTATTG TCGGTACTAT AAAACCCCTT CCAATCATCG TCATAATTTC CTTGTGTACC
2081 AGATTTTGGC TTTTGTATAC CTTTTGAAT GGAATCTACA TAACCAGGTT TAGTCCCGTG GTACGAAGAA AAGTTTCCA
2161 TCACAAAAGA TTTAGAAGAA TCAACAACAT CATCAGCGCC CATCTTACCT TTCCGGTACA CCCGGACGAA ACCTAGATGT
2241 GCTGATGATC GGCTGCAACA CGGACGAAAC CGTAAGCAGC CTGCAGAAGA TAGACGAGTT ACTCGTGTCC TGTCACCGAC
2321 AGTAATTAGT TATTAATTAT ACTGCGTGAG TGCACTAAGC ATGCAGCCGA GTGACAGCCA CACAGATTTT AAAGTTCCGT
2401 TAGAGAACAG ATCTACAAGA GATCGAAAGT TGGTTGGTTT GTTACCTGGG AAGGTATAAA CCTTTAATAC CCAGCTTTCT
2481 TGTACAAAGT GGGAATTCCG ATAATCAACC TCTGGATTAC AAAATTTGTG AAAGATTGAC TGGTATTCTT AACTATGTTG
2561 CTCCTTTTAC GCTATGTGGA TACGCTGCTT TAATGCCTTT GTATCATGCT ATTGCTTCCC GTATGGCTTT CATTTTCTCC
2641 TCCTTGTATA AATCCTGGTT GCTGTCTCTT TATGAGGAGT TGTGGCCCGT TGTCAGGCAA CGTGGCGTGG TGTGCACTGT
2721 GTTTGCTGAC GCAACCCCA CTGGTTGGGG CATTGCCACC ACCTGTCAGC TCCTTCCCG GACTTTCGCT TTCCCCTCC
2801 CTATTGCCAC GGCGGAATC ATCGCCGCTT GCCTTGCCTG CTGCTGGACA GGGGCTCGGC TGTTGGGCAC TGACAATTCC
2881 GTGGTGTGTG CGGGGAAGCT GACGTCCTTT CCATGGCTGC TCGCCTGTGT TGCCACCTGG ATTCTGCGCG GGACGTCCTT
2961 CTGCTACGTC CCTTCGGCCC TCAATCCAGC GGACCTTCTT TCCCGCGGCC TGCTGCCGGC TCTGCGGCCT CTTCCGCGTC
3041 TTCCGCTTCG CCCTCAGACG AGTCGGATCT CCCTTGGGCT CGCCTCCCGG CATCGGGAAT TCCTAGAGCT CGCTGATCAG
3121 CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCC GTGCCTTCTT TGACCCTGGA AGGTGCCACT
3201 CCCCTGCTCC TTTCTAATA AAATGAGGAA ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGTGGGGT
3281 GGGGCAGGAC AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGAGAATAGC AGGCATGCTG GGGAGGGCCG CAGGAACCCC TAGTGATGGA
3361 GTTGGCCACT CCCTCTCTGC GCGCTCGCTC GCTCACTGAG GCCGGGCGAC CAAAGGTGCG CCGACGCCCG GGCTTTGCC
3441 GGGCGGCCCT AGTGAGCGAG CGAGCGCGCA GCTGCCTGCA GGGGCGCCTG ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC
3521 GGTATTTCAC ACCGCATACG TCAAAGCAAC CATAGTACGC GCCCTGTAGC GGCGCATTAA GCGCGGCGGG GGTGGTGTTT
3601 ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCTTAGCGC CCGCTCCTTT CGCTTCTTTC CCTTCCTTTC TCGCCACGTT
3681 CGCCGGCTTT CCCCGTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTTAGTGC TTTACGGCAC CTCGACCCCA
3761 AAAAACTTGA TTTGGGTGAT GGTTCACGTA GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTTC GCCCTTTGAC GTTGGAGTCC
3841 ACGTTCTTTA ATAGTGGACT CTTGTTCCAA ACTGGAACAA CACTCAACTC TATCTCGGGC TATTCTTTTG ATTTATAAGG
3921 GATTTTGGCC ATTTCCGGTCT ATTGGTTAAA AAATGAGCTG ATTTAACAAA AAATTAACGC GAATTTTAAAC AAAATATTA
4001 CGTTTACAAT TTTATGGTGC ACTCTCAGTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCCGCAACA
4081 CCCCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT
4161 GTGTCAGAGG TTTTACCCTG CATCACCAGG ACGCGCGAGA CGAAAGGGCC TCGTGATACG CCTATTTTTA TAGGTTAATG
4241 TCATGATAAT AATGGTTTCT TAGACGTCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTG TTTATTTTTT
4321 TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT

4401 GAGTATCAA CATTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTGTCTCAC CCAGAAACGC
4481 TGGTAAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC
4561 CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG
4641 TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCC CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG
4721 AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC
4801 TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTGA
4881 TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGTAGCAATG GCAACAACGT
4961 TGCGCAAAC ATTAAGTGGC GAAGTACTTA CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TAAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT
5041 GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC GTGGAAGCCG
5121 CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA
5201 TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAA TGTCAGACCA AGTTTACTCA
5281 TATATACTTT AGATTGATTT AAAACCTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTGTATA ATCTCATGAC
5361 CAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT
5441 TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA
5521 CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAA TACTGTTCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG
5601 CCACCCTTC AAGAAGTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG
5681 ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCC
5761 TGCACACAGC CCAGCTTGGG GCGAACGACC TACACCGAAC TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT
5841 TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG CACGAGGGAG CTTCCAGGGG
5921 GAAACGCCTG GATCTTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG
6001 GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGT

ФИГ.16А



ФИГ.16В

ДЕЙСТВИЕ ЛЕЧЕНИЯ НА НЕ ИНФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

