

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202290929 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.07.25(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)  
C12N 15/861 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2020.10.16

## (54) КАССЕТА ДЛЯ ПЕРЕНОСА НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА (AAV)

(31) 62/916,749; 62/923,253

(72) Изобретатель:

(32) 2019.10.17; 2019.10.18

Дисмьюк Дэвид (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2020/056015

(87) WO 2021/076911 2021.04.22

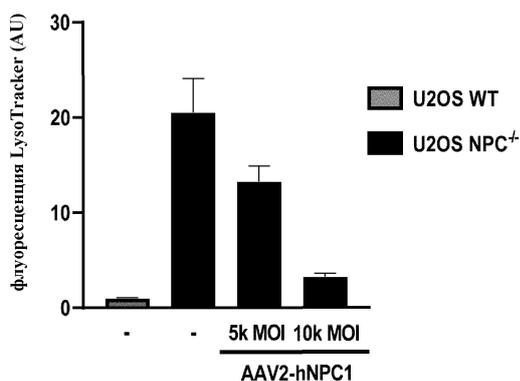
(71) Заявитель:

СТРАЙДБАЙО, ИНК. (US)

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

(57) Здесь описаны кассеты для переноса на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и плазмиды, используемые в получении рекомбинантных векторов на основе аденоассоциированных вирусов (rAAV). Раскрытые кассеты и плазмиды содержат один или более чем один трансген, имеющий терапевтическую эффективность в улучшении состояния, лечении и/или предупреждении одного или более чем одного заболевания или расстройства, такого как болезнь Ниманна-Пика типа С1 (NPC1).

лизосомальный фенотип



A1

202290929

202290929

A1

## **КАССЕТА ДЛЯ ПЕРЕНОСА НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА (AAV)**

### **ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США No. 62/923253, поданной 18 октября 2019 года, и предварительной заявки на патент США No. 62/916749, поданной 17 октября 2019 года, каждая из которых включена в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

### **ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и, таким образом, включен в данное описание посредством ссылки. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей: STRD\_015\_02WO\_SeqList\_ST25.txt. Файл размером примерно 67,6 кбит был создан 14 октября 2020 года и представлен на рассмотрение в электронном виде.

### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии и генной терапии. Более конкретно, изобретение относится к композициям и способам получения рекомбинантных вирусных векторов.

### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Болезнь Ниманна-Пика типа С1 (NPC1) представляет собой нейродегенеративное расстройство, характеризующееся накоплением холестерина в эндолизосомальных компартментах. Ее вызывают мутации в гене, кодирующем NPC1, представляющий собой эндолизосомальный белок, опосредующий внутриклеточные пути транспорта холестерина.

NPC1 может присутствовать у младенцев, детей или взрослых. У новорожденных может присутствовать асцит и тяжелое заболевание печени из-за инфильтрации печени и/или дыхательная недостаточность из-за инфильтрации легких. У других младенцев при отсутствии заболевания печени или легких присутствует гипотония и задержка развития. Классический дебют происходит в среднем-позднем детском возрасте с протекающим без явных симптомов началом атаксии,

вертикального надъядерного паралича зора (VSGP) и деменции. Часто присутствуют дистония и судороги. Дизартрия и дисфагия со временем становятся ограничивающими, делая невозможным пероральное питание; гибель обычно происходит в конце второй или в третьей декаде от аспирационной пневмонии. У взрослых более вероятно присутствие деменции или психиатрических симптомов.

Было показано, что 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин (HPBCD) уменьшает накопление холестерина и липидов и продлевает выживаемость в моделях NPC1 у животных. Однако не существует способов лечения NPC1, одобренных Управлением по контролю за продуктами и лекарственными средствами США (FDA). Соответственно, существует насущная потребность в композициях и способах лечения, устранения и/или предупреждения NPC1.

### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Здесь предложены кассеты для переноса на основе AAV, нуклеиновые кислоты и плазмиды, используемые в получении рекомбинантных векторов на основе аденоассоциированных вирусов (rAAV) для доставки нуклеиновых кислот (например нуклеиновых кислот, содержащих трансгены). Раскрытые здесь кассеты, нуклеиновые кислоты и плазмиды содержат последовательности, которые можно использовать для экспрессии одного или более чем одного трансгена, обладающего терапевтической эффективностью в улучшении состояния, лечении и/или предупреждении одного или более чем одного заболевания или расстройства, такого как NPC1.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложена кассета для переноса на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая 5'-инвертированный концевой повтор (ITR), промотор, трансген, сигнал полиаденилирования и 3'-ITR, где кассета для переноса содержит интронную последовательность. В некоторых воплощениях интронная последовательность расположена между промотором и трансгеном. В некоторых воплощениях трансген кодирует белок NPC1. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 14-19.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложен рекомбинантный AAV-вектор, содержащий белковый капсид и нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид, где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса, содержащую в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген; сигнал полиаденилирования и 3'-ITR. В некоторых

воплощениях кассета для переноса содержит интронную последовательность, такую как интронная последовательность, расположенная между промотором и трансгеном. В некоторых воплощениях трансген кодирует белок NPC1. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 14-19.

В некоторых воплощениях длина по меньшей мере одного из 5'-ITR и 3'-ITR составляет от примерно 110 до примерно 160 нуклеотидов. В некоторых воплощениях 5'-ITR имеет такую же длину как и 3'-ITR. В некоторых воплощениях 5'-ITR и 3'-ITR имеют разную длину. По меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR может быть выделен или иметь происхождение, например, из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV или бычьего AAV. В некоторых воплощениях 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых воплощениях промотор представляет собой индуцибельный промотор. В некоторых воплощениях промотор представляет собой тканеспецифичный промотор. В некоторых воплощениях промотор может быть выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379, промотора HSVTK, промотора CMV, раннего промотора SV40, позднего промотора SV40, промотора металлотioneина, промотора вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV), промотора полиэдрина, промотора  $\beta$ -актина кур (CBA), альфа-промотора EF-1, короткого промотора EF-1, промотора дигидрофолатредуктазы (DHFR) и промотора фосфоглицераткиназы (PGK). В некоторых воплощениях промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379 и промотора HSVTK. В некоторых воплощениях промотор содержит последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 5-8.

В некоторых воплощениях интронная последовательность представляет собой химерную последовательность или гибридную последовательность. В некоторых воплощениях интронная последовательность содержит последовательность, выделенную или имеющую происхождение из SV40. В некоторых воплощениях интронная последовательность содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 10-11.

Белок NPC1 может представлять собой, например, белок NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности белка NPC1 человека. В некоторых воплощениях, белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 20 или последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях белок NPC1 имеет последовательность, представленную в UniProt под номером доступа No. O15118, включенную в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых воплощениях трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования выбран из сигнала полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (SV40), бета-глобина кролика (rBG),  $\alpha$ -глобина,  $\beta$ -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) и бычьего гормона роста (bGH). В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40. В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования rBG. В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования содержит последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13. В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования содержит

последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 12 или 13.

В некоторых воплощениях кассета для переноса дополнительно содержит энхансер. Энхансер может представлять собой, например, энхансер CMV. В некоторых воплощениях энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 9.

Также здесь предложена нуклеиновая кислота, содержащая кассету для переноса на основе AAV по настоящему изобретению. Также здесь предложена плазида или бакмида, содержащая кассету для переноса на основе AAV по настоящему изобретению.

Также здесь предложен рекомбинантный AAV-вектор, содержащий белковый капсид и нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид, где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса на основе AAV по настоящему изобретению.

Также предложена клетка, содержащая кассету для переноса на основе AAV по настоящему изобретению.

Также предложен способ получения рекомбинантного AAV-вектора, включающий приведение в контакт клетки-продуцента AAV с кассетой для переноса на основе AAV или плазмидой/бакмидой по настоящему изобретению. Также предложен рекомбинантный AAV-вектор, полученный этим способом. Рекомбинантный AAV-вектор может принадлежать серотипу, выбранному из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV и бычьего AAV. Рекомбинантный AAV-вектор может содержать белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, где субъединица капсидного белка содержит одну или более чем одну мутацию по сравнению с субъединицей капсидного белка AAV дикого типа.

Также предложены композиции, содержащие кассету для переноса на основе AAV, нуклеиновую кислоту (например плазмиду или бакмиду), клетку или рекомбинантный AAV-вектор по настоящему изобретению.

Также предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества кассеты для переноса на основе AAV, нуклеиновой кислоты (например плазмиды), клетки или рекомбинантного AAV-вектора по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях субъект представляет собой субъекта-человека. В некоторых воплощениях субъект имеет NPC1.

Эти и другие воплощения описаны более подробно в изложенном ниже подробном описании изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1А** представлен график, показывающий лизосомальный фенотип, определенный путем измерения накопления LysoTracker<sup>®</sup>, в клетках U2OS дикого типа; клетках U2OS, дефицитных по NPC1 (NPC1<sup>-/-</sup>), и клетках NPC1<sup>-/-</sup>, трансдуцированных AAV2-hNPC с множественностью заражения (MOI)  $5 \times 10^3$  или  $10 \times 10^3$ . Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего ANOVA. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего (SEM).

На **Фиг. 1Б** представлен график, показывающий накопление холестерина, определенное с использованием филипинового окрашивания, в клетках U2OS дикого типа; клетках U2OS, дефицитных по NPC1 (NPC1<sup>-/-</sup>), и клетках NPC1<sup>-/-</sup>, трансдуцированных AAV2-hNPC с множественностью заражения (MOI)  $5 \times 10^3$  или  $10 \times 10^3$ . Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего ANOVA. Планки погрешностей обозначают SEM.

На **Фиг. 2** представлена кривая выживаемости Каплана-Мейера, показывающая выживаемость мышей NPC1<sup>-/-</sup> после ретроорбитальной инъекции солевым раствором или AAV9-hNPC1. Все животные, инъецированные AAV9-hNPC1, выжили на протяжении эксперимента и были умерщвлены в возрасте примерно 100 суток для гистологического анализа.

На **Фиг. 3** представлена балльная оценка поведенческого фенотипа в возрасте примерно 10 недель (70 суток) мышей дикого типа; мышей NPC1<sup>-/-</sup>, получавших солевой раствор, или мышей NPC1<sup>-/-</sup>, инъецированных AAV9-hNPC1. Статистическую значимость определяли с использованием непарного Т-критерия, и планки погрешностей обозначают SEM.

На **Фиг. 4** представлено число соскальзываний в тесте прохождения по балансиру в возрасте примерно 8 недель (56 суток) мышей дикого типа; мышей NPC1<sup>-/-</sup>,

получавших солевой раствор, или мышей NPC1<sup>-/-</sup>, получавших AAV9-hNPC1. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Здесь предложены генно-терапевтические композиции и способы лечения, предупреждения и/или устранения NPC1. Более конкретно, в настоящем изобретении предложены векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) для доставки нуклеиновых кислот, например трансгенов, и нуклеиновые кислоты (включая кассеты для переноса на основе AAV) для лечения, предупреждения и/или устранения NPC1.

AAV являются полезными в качестве агентов для доставки генов и представляют собой мощные инструменты для генной терапии человека. С помощью AAV можно добиться доставки ДНК с высокой частотой и стабильной экспрессией в разнообразных клетках, как *in vivo*, так и *in vitro*. В отличие от некоторых других вирусных векторных систем, AAV не требует активного деления клеток для стабильной интеграции в клетки-мишени.

Все статьи, публикации и патенты, цитируемые в настоящем описании, включены в данное описание посредством ссылки таким образом, как если бы каждая(ый) индивидуальная(ый) статья, публикация или патент был(а) специально и индивидуально указан(а) как включенная(ый) посредством ссылки и включен(а) в данное описание для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми эти публикации цитируют.

Если в контексте не указано иное, специально подразумевается, что различные признаки, описанные здесь, можно использовать в любой комбинации.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такие же значения, как обычно понимает специалист средней квалификации в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Терминология, используемая здесь в подробном описании, предназначена исключительно для описания определенных воплощений и не предназначена ограничивать объем настоящего изобретения.

### **Определения**

Следующие термины используют здесь в описании и прилагаемой формуле изобретения.

Формы существительных единственного числа предназначены также включать формы множественного числа, если контекст явно не указывает иное.

Кроме того, термин “примерно”, как его используют здесь в отношении измеряемой величины, такой как значение длины полинуклеотидной или полипептидной последовательности, доза, время, температура и тому подобное, предназначен охватывать разброс  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,5\%$  или даже  $\pm 0,1\%$  от указанного количества.

Также как его используют здесь, выражение “и/или” относится к любым и всем возможным комбинациям одного или более чем одного из связанных перечисленных пунктов, а также к отсутствию комбинаций, когда его интерпретируют как альтернативу (“или”), и охватывает таковые.

Термин “нуклеиновая кислота” или “полинуклеотид” представляет собой последовательность нуклеотидных оснований, например последовательности РНК, ДНК или гибридные последовательности ДНК-РНК (включающие как природные, так и не встречающиеся в природе нуклеотиды). В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут представлять собой как одноцепочечные, так и двухцепочечные последовательности ДНК. Длина нуклеиновой кислоты может составлять 1-1000, 1000-10000, 10000-100000, 100000-1 миллион или более чем 1 миллион нуклеотидов. Обычно нуклеиновая кислота содержит фосфодиэфирные связи, хотя в некоторых случаях включены аналоги нуклеиновой кислоты, которые могут иметь альтернативные каркасы, содержащие, например, фосфорамидные, фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, O-метилфосфорамидитные связи и пептидные каркасы и связи нуклеиновых кислот. Другие аналоги нуклеиновых кислот включают таковые с положительно заряженными каркасами, неионными каркасами и безрибозными каркасами. Нуклеиновые кислоты, содержащие один или более чем один карбоциклический сахар, также включены в определение нуклеиновых кислот. Эти модификации рибозо-фосфатного каркаса могут облегчать добавление меток или повышать стабильность и период полувыведения таких молекул в физиологическом окружении. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть линейными или могут быть кольцевыми (например, плаزمиды).

“Кассета для переноса на основе AAV” представляет собой нуклеиновую кислоту, которую можно использовать для получения AAV-вектора.

Как его используют здесь, термин “вектор на основе вируса” или “вирусный вектор” относится к вирусной частице, функционирующей как носитель для доставки нуклеиновой кислоты и содержащей нуклеиновую кислоту (например нуклеиновую

кислоту, содержащую трансген), упакованную в пределах вириона или вирусоподобной частицы. Примеры вирусных векторов по настоящему изобретению включают аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), лентивирусные векторы и ретровирусные векторы.

“Вектор на основе аденоассоциированного вируса” или “AAV-вектор” обычно содержит белковый капсид и нуклеиновую кислоту (например, нуклеиновую кислоту, содержащую трансген), инкапсидированную в белковый капсид. Термин “белковый капсид” означает почти сферическую белковую оболочку, содержащую отдельные “субъединицы капсидного белка” (например, примерно 60 субъединиц капсидного белка), ассоциированные и организованные с икосаэдральной симметрией T=1. Белковые капсиды AAV-векторов, описанных здесь, содержат множество субъединиц капсидного белка. Когда AAV-вектор описан здесь как содержащий AAV-субъединицу капсидного белка, следует понимать, что этот AAV-вектор содержит белковый капсид, где белковый капсид содержит одну или более чем одну субъединицу капсидного белка AAV. Как его используют здесь, термин “капсидный белок” иногда используют для ссылки на субъединицу капсидного белка. Термин “частица, подобная вирусу” или “вирусоподобная частица” относится к белковому капсиду, который не содержит какого-либо векторного генома или нуклеиновой кислоты, содержащей кассету для переноса или трансгена.

Как его используют здесь, термин “аденоассоциированный вирус” (AAV) включает AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAV типа rh32.33, AAV типа rh8, AAV типа rh10, AAV типа rh74, AAV типа hu.68, птичий AAV, бычий AAV, AAV собак, AAV коней, овечий AAV, AAV змей, AAV бородатой ящерицы, AAV2i8, AAV2g9, AAV-LK03, AAV7m8, AAV Anc80, AAV PHP.B и любой другой AAV, известный в настоящее время или который будет обнаружен позже, но не ограничиваясь ими. См., например, Таблицу 1.

ТАБЛИЦА 1

	Номер доступа в GenBank		Номер доступа в GenBank		Номер доступа в GenBank
<b>Полные геномы</b>		Клада С		Rh57	AY530569
Аденоассоциированный вирус 1	NC_002077, AF063497	Hu9	AY530629	Rh50	AY530563
Аденоассоциированный вирус 2	NC_001401	Hu10	AY530576	Rh49	AY530562
Аденоассоциированный вирус 3	NC_001729	Hu11	AY530577	Hu39	AY530601
Аденоассоциированный вирус 3В	NC_001863	Hu53	AY530615	Rh58	AY530570
Аденоассоциированный вирус 4	NC_001829	Hu55	AY530617	Rh61	AY530572
Аденоассоциированный вирус 5	Y18065, AF085716	Hu54	AY530616	Rh52	AY530565
Аденоассоциированный вирус 6	NC_001862, AAB95450.1	Hu7	AY530628	Rh53	AY530566
Птичий AAV ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828	Hu18	AY530583	Rh51	AY530564
Птичий AAV штамм DA-1	NC_006263, AY629583	Hu15	AY530580	Rh64	AY530574
Бычий AAV	NC_005889, AY388617, AAR26465	Hu16	AY530581	Rh43	AY530560
AAV11	AAT46339, AY631966	Hu25	AY530591	AAV8	AF513852
AAV12	ABI16639, DQ813647	Hu60	AY530622	Rh8	AY242997
Клада А		Ch5	AY243021	Rh1	AY530556
AAV1	NC_002077, AF063497	Hu3	AY530595	Клада F	
AAV6	NC_001862	Hu1	AY530575	Hu14	AY530579

				(AAV9)	
Hu.48	AY530611	Hu4	AY530602	Hu31	AY530596
Hu 43	AY530606	Hu2	AY530585	Hu32	AY530597
Hu 44	AY530607	Hu61	AY530623	HSC1	MI332400.1
Hu 46	AY530609	Клада D		HSC2	MI332401.1
Клада B		Rh62	AY530573	HSC3	MI332402.1
Hu. 19	AY530584	Rh48	AY530561	HSC4	MI332403.1
Hu. 20	AY530586	Rh54	AY530567	HSC5	MI332405.1
Hu 23	AY530589	Rh55	AY530568	HSC6	MI332404.1
Hu22	AY530588	Cy2	AY243020	HSC7	MI332407.1
Hu24	AY530590	AAV7	AF513851	HSC8	MI332408.1
Hu21	AY530587	Rh35	AY243000	HSC9	MI332409.1
Hu27	AY530592	Rh37	AY242998	HSC11	MI332406.1
Hu28	AY530593	Rh36	AY242999	HSC12	MI332410.1
Hu 29	AY530594	Cy6	AY243016	HSC13	MI332411.1
Hu63	AY530624	Cy4	AY243018	HSC14	MI332412.1
Hu64	AY530625	Cy3	AY243019	HSC15	MI332413.1
Hu13	AY530578	Cy5	AY243017	HSC16	MI332414.1
Hu56	AY530618	Rh13	AY243013	HSC17	MI332415.1
Hu57	AY530619	Клада E		Hu68	
Hu49	AY530612	Rh38	AY530558	Клональ- ный изолят	
Hu58	AY530620	Hu66	AY530626	AAV5	Y18065, AF085716
Hu34	AY530598	Hu42	AY530605	AAV 3	NC_001729
Hu35	AY530599	Hu67	AY530627	AAV 3B	NC_001863
AAV2	NC_001401	Hu40	AY530603	AAV4	NC_001829
Hu45	AY530608	Hu41	AY530604	Rh34	AY243001
Hu47	AY530610	Hu37	AY530600	Rh33	AY243002
Hu51	AY530613	Rh40	AY530559	Rh32	AY243003
Hu52	AY530614	Rh2	AY243007	Другие	
Hu T41	AY695378	Bb1	AY243023	Rh74	
Hu S17	AY695376	Bb2	AY243022	AAV бородатой ящерицы	

Hu T88	AY695375	Rh10	AY243015	AAV змеи	NC_006148.1
Hu T71	AY695374	Hu17	AY530582		
Hu T70	AY695373	Hu6	AY530621		
Hu T40	AY695372	Rh25	AY530557		
Hu T32	AY695371	Pi2	AY530554		
Hu T17	AY695370	Pi1	AY530553		
Hu LG15	AY695377	Pi3	AY530555		

Рекомбинантные AAV-векторы (гAAV) можно получить в культуре с помощью клеточных линий, продуцирующих вирусы. Термины “клетка, продуцирующая вирус”, “клеточная линия, продуцирующая вирус” или “клетка-продуцент вируса” относятся к клеткам, используемым для продукции вирусных векторов. Клетки HEK293 и 293T представляют собой клеточные линии, обычно используемые для продукции вирусов. В Таблице 2 ниже перечислены примеры клеточных линий, продуцирующих вирусы, для различных вирусных векторов. Для продукции гAAV обычно необходимо присутствие трех элементов в клетке: 1) трансгена, фланкированного последовательностями инвертированного концевых повтора AAV (ITR), 2) генов *her* и *cap* AAV и 3) последовательностей белков вируса-помощника. Эти три элемента могут быть предоставлены на одной или более чем одной плазмиде, и клетка может быть трансфицирована или трансдуцирована ими.

**Таблица 2: Примеры клеточных линий, продуцирующих вирусы**

<b>Вирусный вектор</b>	<b>Примеры клеточной(ых) линии(й), продуцирующей(их) вирусы</b>
Аденовирус	HEK293, 911, pTG6559, PER.C6, GH329, N52.E6, HeLa-E1, UR, VLI-293
Аденоассоциированный вирус (AAV)	HEK293, Sf9
Ретровирус	HEK293
Лентивирус	293T

Термин “HEK293” относится к клеточной линии, изначально полученной из эмбриональных клеток почки человека, выращенных в тканевой культуре. Клеточная линия HEK293 хорошо растет в культуре, и ее обычно используют для продукции вирусов. Как его используют здесь, термин “HEK293” также может относиться к

одному или более чем одному варианту клеточных линий НЕК293, то есть, клеточных линий, имеющих происхождение из исходной клеточной линии НЕК293, которые дополнительно содержат одно или более чем одно генетическое изменение. Много вариантов линий НЕК293 было разработано и оптимизировано для одного или более чем одного конкретного применения. Например, клеточная линия 293Т содержит большой Т-антиген SV40, который делает возможной эписомальную репликацию трансфицированных плазмид, содержащих ориджин репликации SV40, приводя к повышенной экспрессии желаемых генных продуктов.

Термин “Sf9” относится к клеточной линии насекомых, которая представляет собой клональный изолят, имеющий происхождение от родительской клеточной линии IPLB-Sf-21-AE *Spodoptera frugiperda*. Клетки Sf9 можно выращивать в отсутствие сыворотки и можно культивировать прикрепленными или в суспензии.

Термин “реагент для трансфекции” означает композицию, которая усиливает перенос нуклеиновой кислоты в клетки. Некоторые реагенты для трансфекции, обычно используемые в данной области техники, включают один или более чем один липид, который связывается с нуклеиновыми кислотами и с поверхностью клеток (например, Lipofectamine™).

Как его используют здесь, термин “множественность заражения” или “МОИ” относится к числу вирионов, контактирующих с клеткой. Например, культивируемые клетки могут контактировать с AAV с МОИ в диапазоне от  $1 \times 10^2$  до  $1 \times 10^5$  вирионов на клетку.

Как его используют здесь, термин “эффективное количество” означает количество AAV-вектора, нуклеиновой кислоты или другого агента, предложенного здесь, который является эффективным для лечения или предупреждения заболевания или расстройства у субъекта или для облегчения его признака или симптома. “Эффективное количество” может варьировать в зависимости, например, от заболевания и/или симптомов заболевания, тяжести заболевания и/или симптомов заболевания или расстройства, возраста, массы тела и/или состояния здоровья пациента, которого лечат, и оценки лечащего врача, делающего назначение. В каждом конкретном случае подходящее количество может быть определено специалистом в данной области техники или может допускать определение путем рутинного экспериментирования.

Способы определения сходства или идентичности последовательностей между двумя или более чем двумя аминокислотными последовательностями известны в данной области техники. Сходство или идентичность последовательностей можно определить для нуклеиновой кислоты полной длины или для указанной части нуклеиновой кислоты. Сходство или идентичность последовательностей можно определить с помощью стандартных методов, известных в данной области техники, включая алгоритм локальной идентичности последовательностей от Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2, 482 (1981), алгоритм выравнивания идентичности последовательностей от Needleman & Wunsch, *J Mol. Biol.* 48,443 (1970), метод поиска сходства от Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444 (1988), компьютеризированные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), программу анализа последовательностей “Best Fit”, описанная Devereux et al., *Nucl. Acid Res.* 12, 387-395 (1984) или визуальное сравнение, но не ограничиваясь ими.

Другой подходящий алгоритм представляет собой алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., *J Mol. Biol.* 215, 403-410, (1990) и Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873-5787 (1993). Особенно полезной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, полученная от Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>. WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, для которых возможно установить значения по умолчанию. Эти параметры являются динамическими величинами и устанавливаются самой программой в зависимости от состава определенной последовательности и состава определенной базы данных, относительно которой ведется поиск интересующей последовательности; однако, эти значения могут быть отрегулированы для повышения чувствительности.

Кроме того, дополнительный полезный алгоритм представляет собой “gapped BLAST”, опубликованный Altschul et al, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

Для задач настоящего изобретения, если не указано иное, процент идентичности рассчитывают с использованием Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), доступного онлайн на сайте [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Специалисту в данной области техники понятно, что другие алгоритмы можно подходящим образом использовать вместо него.

#### Инвертированный концевой повтор

Последовательности инвертированного концевой повтора или ITR представляют собой последовательности, которые опосредуют интеграцию провируса AAV и упаковку ДНК AAV в вирионы. ITR вовлечены в разнообразные активности в жизненном цикле AAV. Например, последовательности ITR, которые могут образовывать шпилечную структуру, участвуют в вырезании из плазмиды после трансфекции, репликации векторного генома и интеграции и высвобождения из генома клетки-хозяина.

Кассеты для переноса на основе AAV по изобретению могут содержать 5'-ITR и 3'-ITR. Длина последовательностей ITR может составлять от примерно 110 до примерно 160 нуклеотидов, например 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 или 160 нуклеотидов. В некоторых воплощениях длина последовательностей ITR может составлять примерно 141 нуклеотид. В некоторых воплощениях 5'-ITR имеет такую же длину как и 3'-ITR. В некоторых воплощениях 5'-ITR и 3'-ITR имеют разную длину. В некоторых воплощениях 5'-ITR длиннее чем 3'-ITR, а в других воплощениях 3'-ITR длиннее чем 5'-ITR.

ITR могут быть выделены или иметь происхождение из генома любого AAV, например AAV, перечисленных в Таблице 1. В некоторых воплощениях по меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR выделен или имеет происхождение из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV или бычьего AAV. В некоторых воплощениях по меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR может представлять собой ITR дикого типа или мутированный ITR, выделенный из представителя другого вида парвовируса, отличного от AAV. Например, в некоторых воплощениях ITR может представлять собой ITR дикого типа или мутатный ITR, выделенный или имеющий происхождение из бокавируса или парвовируса B19.

В некоторых воплощениях ITR содержит модификацию для активации продукции scAAV. В некоторых воплощениях модификация для активации продукции scAAV представляет собой делецию последовательности концевой разрешения (TRS) из ITR. В некоторых воплощениях 5'-ITR представляет собой ITR дикого типа, и 3'-ITR представляет собой мутированный ITR, лишенный последовательности концевой разрешения. В некоторых воплощениях 3'-ITR представляет собой ITR дикого типа, и

5'-ITR представляет собой мутированный ITR, лишенный последовательности концевой разрешения. В некоторых воплощениях последовательность концевой разрешения отсутствует как на 5'-ITR, так и на 3'-ITR. В других воплощениях модификация для активации продукции scAAV представляет собой замену ITR на другую последовательность, образующую шпильки, такую как последовательность, образующая кшРНК (короткую шпилечную РНК).

В некоторых воплощениях 5'-ITR может содержать последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность идентичную таковой по меньшей мере на 95%. В некоторых воплощениях 3'-ITR может содержать последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность идентичную таковой по меньшей мере на 95%. В некоторых воплощениях 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3, и 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV содержат один или более чем один “суррогатный” ITR, то есть, последовательность, не являющуюся ITR, которая выполняет такие же функции как ITR. См., например, Xie, J. et al., Mol. Ther., 25(6): 1363-1374 (2017). В некоторых воплощениях ITR в кассете для переноса на основе AAV заменена на суррогатный ITR. В некоторых воплощениях суррогатный ITR содержит последовательность, образующую шпильки. В некоторых воплощениях суррогатный ITR представляет собой последовательность, образующую короткую шпилечную (кш)РНК.

#### Промоторы, энхансеры, репрессоры и другие регуляторные последовательности

Экспрессию генов могут контролировать нуклеотидные последовательности, называемые промоторами и энхансерами, фланкирующие кодирующую область для определенного белка.

Как его используют здесь, термин “промотор” относится к одной или более чем одной регуляторной последовательности нуклеиновой кислоты, которая направляет транскрипцию функционально связанной нуклеиновой кислоты. Промоторы могут включать последовательности нуклеиновой кислоты около сайта начала транскрипции, такого как ТАТА-элемент. Также промоторы могут включать цис-действующие полинуклеотидные последовательности, с которыми могут связываться транскрипционные факторы.

“Конститутивный” промотор представляет собой промотор, который является активным в большинстве условий окружающей среды и во время большинства стадий

развития. “Индукцибельный” промотор представляет собой промотор, который является активным при регулировании условий окружающей среды или стадии развития. Термин “функционально связанный” относится к функциональной связи между последовательностью, контролирующей экспрессию нуклеиновой кислоты (такой как промотор или набор сайтов связывания транскрипционных факторов), и второй последовательностью нуклеиновой кислоты, где последовательность, контролирующая экспрессию, направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

Также экспрессию генов может контролировать один или более чем один дистальный “энхансерный” или “репрессорный” элемент, который может быть расположен на расстоянии нескольких тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции. Энхансерные или репрессорные элементы регулируют транскрипцию аналогично цис-действующим элементам около сайта начала транскрипции, за исключением того, что энхансерные элементы могут действовать на расстоянии от сайта начала транскрипции.

В некоторых воплощениях описанные здесь кассеты для переноса на основе AAV содержат промотор. Их промотор может представлять собой, например, конститутивный промотор или индуцибельный промотор. В некоторых воплощениях промотор представляет собой тканеспецифичный промотор.

Примеры промоторов, которые можно использовать в описанных здесь кассетах для переноса на основе AAV, включают промотор CMV, ранний промотор SV40, поздний промотор SV40, промотор металлотioneина, промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор полиэдрина, промотор  $\beta$ -актина кур (CBA), промотор дигидрофолатредуктазы (DHFR) и промотор фосфоглицераткиназы (PGK). В некоторых воплощениях промотор выбран из группы, состоящей из промотора  $\beta$ -актина кур (CBA), альфа-промотора EF-1 и короткого альфа-промотора EF-1. В некоторых воплощениях промотор содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 5-8, или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную таковой.

В некоторых воплощениях описанные здесь кассеты для переноса на основе AAV содержат энхансер. Энхансер может представлять собой, например, энхансер CMV. В некоторых воплощениях энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную таковой.

Неограничивающий перечень примеров тканеспецифичных промоторов и энхансеров, которые можно использовать в описанных здесь кассетах для на основе AAV включает: промотор редуктазы HMG-COA; стеролрегулирующий элемент 1 (SRE-1); промотор фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK); промотор С-реактивного белка (CRP) человека; промотор глюкокиназы человека; промотор холестерол-7-альфа-гидролазы (CYP-7); промотор бета-галактозидазы альфа-2,6-сиалилтрансферазы; промотор белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-1); промотор альдолазы В; промотор трансферрина человека; промотор коллагена типа I; промотор кислой фосфатазы предстательной железы (PAP); промотор секреторного белка 94 предстательной железы (PSP 94); промотор комплекса специфического антигена предстательной железы; промотор гена железистого калликреина человека (hgt-1); фактор связывания с миоцит-специфическим энхансером MEF-2; промотор мышечной креатинкиназы; промотор белка, ассоциированного с панкреатитом (PAP); энхансер транскрипции эластазы 1; промотор-энхансер амилазы и эластазы, специфичный к поджелудочной железе; промотор гена панкреатической холестеролэстеразы; промотор утероглобина; промотор расщепления боковой цепи холестерина (SCC); промотор гамма-гамма енолазы (нейрон-специфической енолазы, NSE); промотор тяжелой цепи нейрофиламентов (NF-H); промотор CGL-1/гранзима В человека; промотор концевой дезокситрансферазы (TdT), лямбда 5, VpreB и Ick (лимфоцит-специфической протеинкиназы тирозина p56lck); промотор CD2 человека и его 3'-транскрипционный энхансер; промотор специфической активации NK и Т-клеток человека (NKГ5); промотор тирозинкиназы pp60c-src; промотор орган-специфических неоантигенов (OSN), мол.масса 40 кДа (p40); промотор сецифического антигена-Р толстой кишки; промотор альфа-лактальбумина человека; промотор фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK), промотор HER2/neu, промотор казеина, промотор IgG, промотор хорионического эмбрионального антигена, промотор эластазы, промотор дезаминазы порфобилиногена, промотор инсулина, промотор фактора гормона роста, промотор тирозингидроксилазы, промотор альбумина, промотор альфа-фетопротеина, промотор рецептора ацетилхолина, промотор алкогольдегидрогеназы, промотор альфа или бета-глобина, промотор Т-клеточного рецептора, промотор остеокальцина, промотор IL-2, промотор рецептора IL-2, whey-промотор (war) и промотор MHC класса II.

### Трансген

Описанные здесь кассеты для переноса на основе AAV содержат трансген для экспрессии в клетке-мишени.

Трансген может представлять собой любую(ые) интересующую(ие) гетерологичную(ые) последовательность(и) нуклеиновой кислоты. Такие нуклеиновые кислоты могут включать нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, включая терапевтические (например, для медицинского или ветеринарного применения) или иммуногенные (например, для вакцин) полипептиды или РНК. Альтернативно, нуклеиновая кислота может кодировать антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим, РНК, которые действуют на опосредованный сплайсosomal/ram-сплайсинг, интерферирующие РНК (РНКи), включая миРНК (малые интерферирующие РНК), кшРНК (короткие шпилечные РНК) или микроРНК, которые опосредуют “молчание” генов, и другие нетранслируемые РНК. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты может направлять редактирование гена. Например, нуклеиновая кислота может кодировать молекулу редактирования гена, такую как РНК-гид или нуклеаза. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота может кодировать нуклеазу с “цинковыми пальцами”, “хоуминг”-эндонуклеазу, TALEN (нуклеаза на основе эффектора, подобного активатору транскрипции), NgAgo (“agronaute”-эндонуклеаза), SGN (направляемая структурой эндонуклеаза) или RGN (РНК-направляемая эндонуклеаза), такая как нуклеаза Cas9 или нуклеаза Cpf1. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота может иметь гомологию с локусом на хромосоме хозяина и рекомбинировать с таким локусом. Этот подход можно применять, например, для коррекции генетического дефекта клетки-хозяина.

Вирусные векторы по настоящему изобретению обеспечивают средство для доставки трансгенов в широкий диапазон клеток, включая делящиеся и не делящиеся клетки. Вирусные векторы можно использовать для доставки трансгена в клетку *in vitro*, например, для продукции полипептида *in vitro* или для генной терапии *ex vivo*. Дополнительно вирусные векторы полезны в способе доставки трансгена субъекту, нуждающемуся в этом, например, для экспрессии иммуногенного или терапевтического полипептида или функциональной РНК. Таким образом, полипептид или функциональную РНК можно продуцировать *in vivo* в субъекте. Субъект может нуждаться в таком полипептиде из-за того, что субъект имеет недостаток данного полипептида. Кроме того, реализация этого способа на практике может быть обусловлена тем, что продукция полипептида или функциональной РНК у субъекта

может оказывать некоторое полезное действие. Как его используют здесь, термин “функциональная РНК” относится к некодирующей последовательности РНК, которая имеет одну или более чем одну функцию в клетке, такую как функции, описанные в предыдущем абзаце.

Также вирусные векторы можно использовать для доставки нуклеиновых кислот для продукции интересующего полипептида или функциональной РНК в культивируемые клетки или в субъекта (например, при использовании субъекта в качестве биореактора для продукции полипептида или для наблюдения действия функциональной РНК на субъекта, например, в связи с методами скрининга).

В целом, вирусные векторы по настоящему изобретению можно применять для доставки трансгена, кодирующего полипептид или функциональную РНК, для лечения и/или предупреждения любого болезненного состояния, для которого полезна доставка терапевтического полипептида или функциональной РНК.

В некоторых воплощениях трансген является полезным для лечения NPC1. В некоторых воплощениях трансген кодирует белок NPC1. Белок NPC1 может представлять собой, например, белок NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную или по меньшей мере на 98% идентичную последовательности белка NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит одно или более чем одно изменение одной аминокислоты из перечисленных в Таблице 3 (нумерация на основе SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит одно или более чем одно изменение одной аминокислоты из перечисленных в Таблице 3 (нумерация на основе SEQ ID NO: 20). В некоторых воплощениях белок NPC1 представляет собой укороченную форму белка NPC1 человека. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 96% идентичную, по меньшей мере на 97% идентичную, по меньшей мере на 98% идентичную или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 20 или последовательность по меньшей мере 90% идентичную, по меньшей мере 95% идентичную, по меньшей мере 96% идентичную, по меньшей мере 97% идентичную, по меньшей мере 98% идентичную или по меньшей мере 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 20. В

некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 1 или 20 с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более изменениями аминокислот относительно SEQ ID NO: 1 или 20. В некоторых воплощениях белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 1 или 20 с одним или более чем одним изменением аминокислоты из перечисленных в Таблице 3. В некоторых воплощениях трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых воплощениях трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 96% идентичную, по меньшей мере на 97% идентичную, по меньшей мере на 98% идентичную или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более изменениями нуклеиновой кислоты относительно SEQ ID NO: 2.

**Таблица 3: Последовательности вариантов NPC1**

Положения пронумерованы на основе SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.

Положение	Мутация	Положение	Мутация	Положение	Мутация
63	C→R	691	P→L	1012	G→D
74	C→Y	695	L→V	1015	G→V
92	Q→R	700	D→N	1016	H→R
113	C→R	703	F→S	1023	V→G
137	T→M	724	L→P	1034	G→R
151	S→G	727	V→F	1035	A→V
166	P→S	734	S→I	1036	T→K
177	C→G	742	E→K	1036	T→M
177	C→Y	745	A→E	1049	A→V
215	H→R	754	M→K	1054	A→T
222	N→S	757	V→A	1059	R→Q
231	V→G	763	F→L	1061	I→T
237	P→S	767	A→V	1062	A→V

242	$D \rightarrow H$	775	$Q \rightarrow P$	1066	$T \rightarrow N$
242	$D \rightarrow N$	789	$R \rightarrow C$	1087	$F \rightarrow L$
247	$C \rightarrow Y$	789	$R \rightarrow G$	1088	$Y \rightarrow C$
248	$G \rightarrow V$	825	$Y \rightarrow C$	1089	$E \rightarrow K$
272	$M \rightarrow R$	849	$S \rightarrow I$	1094	$I \rightarrow T$
333	$G \rightarrow D$	858	$I \rightarrow V$	1097	$D \rightarrow N$
372	$R \rightarrow W$	862	$Q \rightarrow L$	1137	$N \rightarrow I$
378	$V \rightarrow A$	865	$S \rightarrow L$	1140	$G \rightarrow V$
380	$L \rightarrow F$	871	$Y \rightarrow C$	1142	$M \rightarrow T$
381	$W \rightarrow C$	873	$V \rightarrow A$	1150	$N \rightarrow K$
388	$A \rightarrow P$	874	$D \rightarrow V$	1156	$N \rightarrow I$
389	$R \rightarrow C$	888	$P \rightarrow S$	1156	$N \rightarrow S$
401	$P \rightarrow T$	889	$V \rightarrow M$	1165	$V \rightarrow M$
404	$R \rightarrow P$	890	$Y \rightarrow C$	1167	$F \rightarrow L$
404	$R \rightarrow Q$	899	$Y \rightarrow D$	1168	$C \rightarrow Y$
404	$R \rightarrow W$	910	$G \rightarrow S$	1174	$A \rightarrow V$
433	$P \rightarrow L$	917	$D \rightarrow Y$	1186	$R \rightarrow H$
434	$P \rightarrow L$	926	$A \rightarrow T$	1189	$E \rightarrow G$
434	$P \rightarrow S$	927	$A \rightarrow V$	1205	$T \rightarrow K$
451	$E \rightarrow K$	928	$Q \rightarrow P$	1205	$T \rightarrow R$
472	$L \rightarrow P$	929	$L \rightarrow P$	1212	$V \rightarrow L$
473	$S \rightarrow P$	934	$R \rightarrow Q$	1213	$L \rightarrow F$
474	$P \rightarrow L$	940	$S \rightarrow L$	1213	$L \rightarrow V$
479	$C \rightarrow Y$	942	$W \rightarrow C$	1216	$A \rightarrow V$
509	$Y \rightarrow S$	943	$I \rightarrow M$	1220	$I \rightarrow T$
510	$H \rightarrow P$	944	$D \rightarrow N$	1224	$F \rightarrow L$
511	$T \rightarrow M$	945	$D \rightarrow N$	1236	$G \rightarrow E$
512	$H \rightarrow R$	948	$D \rightarrow H$	1240	$G \rightarrow R$
518	$R \rightarrow Q$	948	$D \rightarrow N$	1249	$S \rightarrow G$
518	$R \rightarrow W$	948	$D \rightarrow Y$	1266	$R \rightarrow Q$
521	$A \rightarrow S$	950	$V \rightarrow M$		
537	$F \rightarrow L$	954	$S \rightarrow L$		

543	P→L	956	C→Y		
574	T→K	958	R→L		
576	K→R	958	R→Q		
605	A→V	959	V→E		
612	E→D	961-966	NITDQF→S		
615	R→C	961	N→S		
615	R→L	968	N→S		
631	M→R	971	V→G		
640	G→R	976	C→R		
642	M→I	978	R→C		
652	S→W	986	G→S		
660	G→S	992	G→A		
664	V→M	992	G→R		
666	S→N	992	G→W		
670	C→W	996	M→R		
673	G→V	1004	S→L		
684	L→F	1007	P→A		

### Сигнал полиаделирования (Поли(A))

Сигналы полиадеилирования представляют собой нуклеотидные последовательности, обнаруживаемые почти во всех генах млекопитающих и контролирующие присоединение цепочки приблизительно из 200 остатков аденозина (поли(A)-хвост) к 3'-концу генного транскрипта. Поли(A)-хвост вносит вклад в стабильность мРНК, и мРНК, лишённые поли(A)-хвоста, быстро разрушаются. Также есть доказательства того, что присутствие поли(A)-хвоста положительно влияет на трансляционную способность мРНК путем воздействия на инициацию трансляции.

В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV по изобретению содержат сигнал полиадеилирования. Сигнал полиадеилирования может быть выбран из сигнала полиадеилирования обезьяньего вируса 40 (SV40),  $\alpha$ -глобина,  $\beta$ -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) и бычьего гормона роста (bGH). В некоторых воплощениях сигнал полиадеилирования представляет собой сигнал полиадеилирования SV40. В некоторых воплощениях сигнал полиадеилирования

представляет собой сигнал полиаденилирования гBG. В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования содержит последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13. В некоторых воплощениях сигнал полиаденилирования содержит последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

#### Спейсерные последовательности

AAV-векторы обычно допускают вставки ДНК, размер которых лежит в определенном диапазоне, обычно в диапазоне от примерно 4 т.п.н. до примерно 5,2 т.п.н. или немного больше. Следовательно, для более коротких трансгенных последовательностей может быть необходимо включать дополнительные нуклеиновые кислоты для достижения требуемой длины, приемлемой для AAV-вектора. Соответственно, в некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать спейсерную последовательность. Спейсерная последовательность может представлять собой, например, последовательность длиной от 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1000, 1000-1500, 1500-2000, 2000-2500, 2500-3000, 3000-3500, 3500-4000, 4000-4500 до 4500-5000 нуклеотидов. Спейсерная последовательность может быть расположена в кассете в любом желаемом положении, так чтобы она не препятствовала функционированию или активности вектора.

#### Интронные последовательности

В некоторых воплощениях кассеты для переноса на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать интронную последовательность. Включение интронной последовательности может усиливать экспрессию по сравнению с экспрессией в отсутствие интронной последовательности. В некоторых случаях интронная последовательность может увеличивать экспрессию гена, не функционируя в качестве сайта связывания для транскрипционных факторов. Например, интронная последовательность может повышать уровни транскриптов путем воздействия на уровень транскрипции, экспорт из ядра и стабильность транскриптов. В некоторых воплощениях интронная последовательность увеличивает эффективность трансляции мРНК.

В некоторых воплощениях интронная последовательность представляет собой гибридную или химерную последовательность. В некоторых воплощениях интронная последовательность выделена или имеет происхождение из интронной последовательности одного или более чем одного из SV40,  $\beta$ -глобина, бета-актина кур, мелкого вируса мышей (MVM), фактора IX и/или IgG человека (тяжелой или легкой цепи). В некоторых воплощениях интронная последовательность выделена или имеет происхождение из SV40. В некоторых воплощениях интронная последовательность является химерной. В некоторых воплощениях интронная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 11, или последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

Интронная последовательность может быть расположена в любом месте кассеты для переноса, где она не мешает продукции AAV-вектора. Например, в некоторых воплощениях интронная последовательность может быть расположена между промотором и трансгеном.

#### Кассеты для переноса на основе AAV

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе аденоассоциированного вируса (AAV) содержит 5'-инвертированный концевой повтор (ITR), промотор, трансген, сигнал полиаденилирования и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса содержит интронную последовательность, такую как интронная последовательность между промотором и трансгеном. В некоторых воплощениях трансген кодирует белок NPC1. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит энхансер. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит интронную последовательность. В некоторых воплощениях 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3, а 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых воплощениях энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых воплощениях промотор содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 5-8. В некоторых воплощениях интронная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых воплощениях трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях, полиА-сигнал содержит последовательность SEQ ID NO: 12 или 13. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит любую

последовательность из SEQ ID NO: 14-19. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 14.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR; промотор CBA; интрон SV40; трансген, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования SV40 и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR; промотор GUSB240; химерный интрон; трансген, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования гBG и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR; промотор GUSB379; интрон SV40; трансген, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования гBG и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, промотор GUSB240; химерный интрон; трансген, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования SV40 и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR; промотор GUSB240; интрон SV40; трансген, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования SV40 и 3'-ITR. В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR; энхансер CMV; промотор HSVTK; трансген, кодирующий белок NPC1; сигнал полиаденилирования гBG и 3'-ITR.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3; промотор CBA, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5; интрон SV40, содержащий последовательность SEQ ID NO: 10; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 1); сигнал полиаденилирования SV40, содержащий SEQ ID NO: 12, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3; промотор GUSB240, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6; химерный интрон, содержащий SEQ ID NO: 11; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 1); сигнал полиаденилирования гBG, содержащий SEQ ID NO: 13, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3; промотор GUSB379, содержащий SEQ ID NO: 6; интрон SV40, содержащий последовательность SEQ ID NO: 10; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 1); сигнал полиаденилирования гBG, содержащий SEQ ID NO: 13, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3; промотор GUSB240, содержащий SEQ ID NO: 7; химерный интрон, содержащий последовательность SEQ ID NO: 11; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 1); сигнал полиаденилирования SV40, содержащий SEQ ID NO: 12, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3; промотор GUSB240, содержащий SEQ ID NO: 6; интрон SV40, содержащий последовательность SEQ ID NO: 10; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 1); сигнал полиаденилирования SV40, содержащий SEQ ID NO: 12, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях кассета для переноса на основе AAV содержит 5'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3; энхансер CMV; промотор HSVTK, содержащий SEQ ID NO: 8; трансген, кодирующий белок NPC1 (SEQ ID NO: 1); сигнал полиаденилирования gBG, содержащий SEQ ID NO: 13, и 3'-ITR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса на основе AAV. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит трансген, где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит трансген, где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген; сигнал полиаденилирования и 3'-ITR; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; интронную последовательность; трансген; сигнал полиаденилирования и 3'-ITR; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор бета-актина кур; интронную последовательность; трансген; сигнал полиаденилирования и 3'-ITR; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.

Описанные здесь кассеты для переноса на основе AAV могут быть вставлены в плазмиду или бакмиду с использованием стандартных молекулярно-биологических методов. Плазида или бакмида может дополнительно содержать один или более чем один генетический элемент, используемый во время продуцирования AAV, включая, например, гены AAV гер и сар и последовательности белков вируса-помощника.

#### Способы получения AAV

Описанные здесь кассеты для переноса на основе AAV и нуклеиновые кислоты (например, плазмиды), содержащие кассеты для переноса на основе AAV, можно использовать для получения рекомбинантных AAV-векторов.

В некоторых воплощениях способ получения рекомбинантного AAV-вектора включает приведение в контакт клетки-продуцента AAV (например, клетки НЕК293) с кассетой для переноса на основе AAV или нуклеиновой кислотой (например, плазмидой) по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает приведение в контакт клетки-продуцента AAV с одной или более чем одной дополнительной плазмидой, кодирующей, например последовательности генов AAV гер и сар и белков вируса-помощника.

В некоторых воплощениях способ получения рекомбинантного AAV-вектора включает приведение в контакт клетки-продуцента AAV (например, клетки насекомого, такой как клетка Sf9) с по меньшей мере одной совместимой с клетками насекомых нуклеиновой кислотой, содержащей кассету для переноса на основе AAV по настоящему изобретению. Термин “совместимая с клетками насекомых” нуклеиновая кислота означает любую нуклеиновую кислоту, которой можно трансформировать или трансфицировать клетку насекомого и которую может распознавать транскрипционный и/или трансляционный аппарат клетки. В некоторых воплощениях совместимая с клетками насекомых нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту бакуловируса. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает поддержание клетки насекомого в таких условиях, в которых продуцируется AAV.

Полученные рекомбинантные AAV-векторы могут принадлежать любому серотипу, например AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьему AAV и бычьему AAV. В некоторых воплощениях полученные рекомбинантные AAV-векторы могут содержать белковый капсид, содержащий субъединицу капсидного белка, где субъединица капсидного белка содержит одну или более чем одну аминокислотную

модификацию (например замену и/или делецию) по сравнению с нативной субъединицей капсидного белка AAV. Например, рекомбинантные AAV-векторы могут представлять собой модифицированные AAV-векторы, имеющие происхождение от AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV и бычьего AAV.

Рекомбинантные AAV-векторы можно использовать для трансдукции клеток-мишеней трансгеном, например, путем приведения в контакт рекомбинантного AAV-вектора с клеткой-мишенью.

#### Композиции

Также предложены композиции, содержащие кассету для переноса на основе AAV, плазмиду, клетку или рекомбинантный AAV-вектор по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

#### Способы лечения

AAV-векторы по настоящему изобретению можно использовать для лечения или предупреждения заболевания, расстройства или другого состояния у субъекта, нуждающегося в этом. Субъект может представлять собой, например, человека или животное. Человек может представлять собой ребенка, подростка, взрослого или пожилого субъекта.

Следовательно, в дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ введения субъекту вирусного вектора, вирусной частицы и/или вирусоподобной частицы по настоящему изобретению.

Также в настоящем изобретении предложен способ доставки нуклеиновой кислоты субъекту, включающий введение субъекту вирусного вектора и/или композиции по настоящему изобретению. Введение вирусных векторов и/или композиций по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, можно выполнять любым способом, известным в данной области техники. Возможно, вирусный вектор и/или композицию доставляют в эффективной дозе (например, в терапевтически эффективной дозе) в фармацевтически приемлемом носителе. В предпочтительных воплощениях доставляют эффективное количество вирусного вектора и/или композиции.

Дозировки вирусного вектора и/или вирусоподобной частицы, подлежащего(ей) введению субъекту, зависят от способа введения, заболевания или состояния, которое

лечат и/или предупреждают, индивидуального состояния субъекта, определенного(ой) вирусного вектора или частицы и доставляемой нуклеиновой кислоты и тому подобного и могут быть определены рутинным способом. В некоторых воплощениях доза рекомбинантного AAV представляет собой эффективную дозу. Примеры эффективных доз могут представлять собой, например, дозу по меньшей мере примерно  $10^5$ , примерно  $10^6$ , примерно  $10^7$ , примерно  $10^8$ , примерно  $10^9$ , примерно  $10^{10}$ , примерно  $10^{11}$ , примерно  $10^{12}$ , примерно  $10^{13}$ , примерно  $10^{14}$ , примерно  $10^{15}$  трансдуцирующих единиц, возможно от примерно  $10^8$  до примерно  $10^{13}$  трансдуцирующих единиц. В некоторых воплощениях эффективная доза рекомбинантного AAV представляет собой дозу в диапазоне от примерно  $1 \times 10^{11}$  до примерно  $1 \times 10^{15}$  векторных геномов на килограмм массы тела субъекта. Например, эффективная доза может составлять примерно  $1 \times 10^{11}$ , примерно  $5 \times 10^{11}$ , примерно  $1 \times 10^{12}$ , примерно  $5 \times 10^{12}$ , примерно  $1 \times 10^{13}$ , примерно  $5 \times 10^{13}$ , примерно  $1 \times 10^{14}$ , примерно  $5 \times 10^{14}$  или примерно  $1 \times 10^{15}$  векторных геномов на килограмм массы тела субъекта.

В определенных воплощениях можно применять более одного введения (например два, три, четыре или более чем четыре введения) для достижения желаемого уровня экспрессии гена на протяжении какого-либо периода времени с различными интервалами, например, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно и так далее.

Примеры способов введения включают пероральное, ректальное, трансмукозальное, интраназальное, путем ингаляции (например, в форме аэрозоля), буккальное (например, сублингвальное), вагинальное, интратекальное, внутриглазное, трансдермальное, в матку (или в яйцеклетку (*in ovo*)), парентеральное (например, внутривенное, подкожное, интрадермальное, внутримышечное [включая введение в скелетную мышцу, мышцу диафрагмы и/или сердечную мышцу], интрадермальное, внутривисцеральное, интрацеребральное и интраартикулярное), местное (например, в поверхность как кожи, так и слизистой, включая поверхности дыхательных путей, и трансдермальное введение), внутрилимфатическое и тому подобное, а также прямую инъекцию в ткань или орган (например, в печень, скелетную мышцу, сердечную мышцу, мышцу диафрагмы или мозг). Также можно проводить введение в опухоль (например, в опухоль или дренирующий лимфатический узел или около опухоли или дренирующего лимфатического узла). Наиболее подходящий путь в каждом конкретном случае будет зависеть от природы и тяжести состояния, которое лечат и/или предупреждают, и от природы конкретного вектора AAV, который используют.

Также доставка в ткань-мишень может быть достигнута путем доставки депо, содержащего вирусный вектор и/или вирусоподобную частицу. Как описано здесь, доставка “депо” относится к введению композиции с замедленным действием, которое обеспечивает медленное высвобождение и/или постепенное распространение вируса, так что вирус может действовать в течение более длительных периодов времени, чем это возможно при стандартных инъекциях. В репрезентативных воплощениях депо, содержащее вирусный вектор и/или вирусоподобную частицу, имплантируют в ткань скелетной, сердечной мышцы и/или мышцы диафрагмы, или ткань может быть приведена в контакт с пленкой или другим матриксом, содержащим вирусный вектор или вирусоподобную частицу.

В некоторых воплощениях способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту эффективного количества (например, терапевтически эффективного количества) кассеты для переноса на основе AAV, плазмиды, клетки или рекомбинантного AAV по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях субъект представляет собой субъекта-человека. В некоторых воплощениях субъект имеет NPC1.

### **ПРИМЕРЫ**

Следующие примеры, включенные в данное описание исключительно для иллюстративных целей, не предназначены каким-либо образом ограничивать объем настоящего изобретения.

#### **Пример 1: Получение рекомбинантного AAV-вектора в клетках млекопитающих**

Предложено три плазмиды. Первая плазида содержит кассету для переноса, содержащую трансген (SEQ ID NO: 2), кодирующий NPC1, фланкированный двумя ITR (SEQ ID NO: 3 и 4). Первая плазида содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 14-19. Вторая плазида содержит последовательности, кодирующие белки Rep и Cap. Третья плазида содержит различные “хелперные” факторы, необходимые для продукции AAV (E4, E2a и VA).

Этими тремя плазидами трансфицировали клетки-производители вируса (например, HEK293) с использованием подходящего реагента для трансфекции (например, Lipofectamine™). После инкубации при 37°C в течение заранее установленного периода времени AAV-частицы собирали из среды или клетки лизировали для высвобождения AAV-частиц. Затем AAV-частицы очищали и

титровали с использованием либо количественной ПЦР (qPCR), либо цифровой капельной ПЦР (ddPCR) в соответствии со стандартными способами. AAV-частицы можно хранить при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего использования.

### **Пример 2: Получение рекомбинантного AAV-вектора в клетках насекомых**

Предложен первый рекомбинантный бакуловирусный вектор. Первый рекомбинантный бакуловирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую кассету для переноса, содержащую трансген (SEQ ID NO: 2), кодирующий NPC1, где указанный трансген фланкирован двумя ITR (SEQ ID NO: 3 и 4). Кассета для переноса содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 14-19.

Проводили коинфицирование клеток насекомых (например, Sf9) в суспензионной культуре указанным первым рекомбинантным бакуловирусным вектором и по меньшей мере одним дополнительным рекомбинантным бакуловирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую белки AAV Rep и Cap. После инкубации при  $28^{\circ}\text{C}$  в течение заранее определенного периода времени AAV-частицы собирали из среды или клетки лизировали для высвобождения AAV-частиц. Затем AAV-частицы очищали и титровали с использованием либо количественной ПЦР (qPCR), либо цифровой капельной ПЦР (ddPCR) в соответствии со стандартными способами. AAV-частицы можно хранить при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего использования.

### **Пример 3: Исследование эффективности *in vitro***

Для определения способности описанных здесь кассет для переноса на основе AAV восстанавливать лизосомальный фенотип NPC1 в культивируемых клетках был получен рекомбинантный вектор AAV2 с упакованной кассетой для переноса hNPC1 (SEQ ID NO: 14), в клетках HEK293 с использованием протокола тройной трансфекции (см., например, Пример 1). Затем вектор AAV2-hNPC1 использовали для трансдукции клеток U2OS дикого типа (остеосаркомы) и клеток U2OS, которые не экспрессируют NPC1 (NPC<sup>-/-</sup>) *in vitro* с множественностью заражения (MOI) либо  $5 \times 10^3$  (5K), либо  $10 \times 10^3$  (10K). Затем клетки инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ .

Клетки NPC1 проявляют характерное накопление холестерина в лизосомах, за которым можно следить путем наблюдения за размером и числом лизосом в клетке. В этом исследовании лизосомальный фенотип контролировали путем измерения накопления флуоресцентного красителя органелл, LysoTracker<sup>®</sup> (ThermoFisher Scientific<sup>®</sup>), в клетках. Через 72 часа после трансдукции вектором AAV2-hNPC1 к

клеткам добавляли 50 мМ LysoTracker<sup>®</sup>. Через 2 часа клетки фиксировали и измеряли флуоресценцию LysoTracker<sup>®</sup>.

Результаты представлены на **Фиг. 1А**. Как ожидалось, клетки U2OS дикого типа не демонстрировали существенного накопления флуоресценции LysoTracker<sup>®</sup> в лизосомах, в то время клетки NPC1<sup>-/-</sup> демонстрировали такое накопление. Клетки, трансдуцированные AAV2-hNPC1 с MOI либо 5К, либо 10К, демонстрировали существенное уменьшение накопления флуоресценции LysoTracker<sup>®</sup> в лизосомах.

В отдельном исследовании клетки, трансдуцированные hNPC1, фиксировали и окрашивали филипином, гистохимическим красителем на холестерин. Краситель филипин, выделенный из *Streptomyces filipinensis*, приобретали у Polysciences и использовали в конечной концентрации 50 мкг/мл. Клетки визуализировали с помощью Pico Automated Cell Imaging System (ImageXpress<sup>®</sup>) и количественно оценивали окраску филипином. Результаты представлены на **Фиг. 1Б**. Как ожидалось, клетки U2OS дикого типа не демонстрировали существенного накопления холестерина, в то время как клетки NPC1<sup>-/-</sup> демонстрировали такое накопление. Клетки, трансдуцированные AAV2-hNPC1 с MOI либо 5К, либо 10К, демонстрировали существенное уменьшение накопления холестерина.

Взятые вместе эти данные показывают, что трансдукция клеток с использованием AAV2-hNPC1 успешно восстанавливала лизосомальный фенотип в дефицитных по NPC1 клетках U2OS.

#### **Пример 4: Исследование эффективности *in vivo***

Для определения способности описанных здесь касет для переноса на основе AAV восстанавливать фенотип NPC1 *in vivo* был получен рекомбинантный вектор AAV9 с упакованной касетой для переноса hNPC1 (SEQ ID NO: 14) в клетках HEK293 с использованием протокола тройной трансфекции (см., например, Пример 1). Мышам в возрасте примерно 24-28 суток, дефицитным по NPC1 (то есть, мышам NPC1<sup>-/-</sup>), внутривенно вводили солевой раствор или вектор AAV9-hNPC1 в дозе 3,0x10<sup>14</sup> векторных геномов на килограмм (вг/кг) путем ретро-орбитальной инъекции. Результаты представлены на **Фиг. 2**. Все мыши, получавшие солевой раствор, умерли к возрасту примерно 80 суток. Однако все животные, получавшие инъекции AAV9-hNPC1, выжили во время этого эксперимента. Мышей, инъецированных AAV9-hNPC1, умерщвляли в возрасте примерно 100 суток для анализа.

Также мышей подвергали тесту прогулки по балансиру (balance beam walking test), где измеряли число соскальзываний по мере прохождения мыши по балансиру. Этот тест проводили в возрасте примерно 8 недель (56 суток). Как показано на **Фиг. 4**, мыши дикого типа не соскальзывали с балансира. Несмотря на отсутствие статистически значимого различия в числе соскальзываний между мышами NPC1<sup>-/-</sup>, получавшими AAV9-hNPC1, и мышами NPC1<sup>-/-</sup>, получавшими солевой раствор, среднее число соскальзываний, наблюдаемых в группе AAV9-hNPC1, было меньше.

Баллы поведенческого фенотипа мышей также оценивали в возрасте примерно 10 недель (70 суток). Балл поведенческого фенотипа представляет собой суммарный балл измерения симптомов различных заболеваний, включая нарушение груминга, походки, кифоз, тест на бортике (ledge test), зажим задних конечностей и тремор (см. Alam et al, Sci Transl Med, 2016; Guyenet et al, J Vis Exp, 2010). Как показано на **Фиг. 3**, мыши NPC1<sup>-/-</sup>, получавшие AAV9-hNPC1, имели существенно более низкие баллы по сравнению с мышами NPC1<sup>-/-</sup>, получавшими солевой раствор.

Взятые вместе, эти данные показывают, что AAV9-hNPC1 может по меньшей мере частично уменьшать фенотипические проявления заболевания у мышей, дефицитных по NPC1.

Вышеприведенное описание служит исключительно для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначено ограничивать его каким-либо образом. Настоящее изобретение определено прилагаемой формулой изобретения с эквивалентами пунктов, включенными в него.

### **ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВОПЛОЩЕНИЯ**

Независимо от прилагаемой формулы изобретения следующие пронумерованные воплощения также являются частью настоящего раскрытия.

1. Кассета для переноса на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR), промотор, трансген, сигнал полиаденилирования и 3'-ITR, где трансген кодирует белок NPC1.

2. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 1, где длина по меньшей мере одного из 5'-ITR и 3'-ITR составляет от примерно 110 до примерно 160 нуклеотидов.

3. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 1 или 2, где 5'-ITR имеет такую же длину как и 3'-ITR.

4. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 1 или 2, где 5'-ITR и 3'-ITR имеют разную длину.

5. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-4, где по меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR выделен или имеет происхождение из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV или бычьего AAV.

6. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 1, где 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

7. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 1, где 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

8. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-7, где промотор представляет собой конститутивный промотор.

9. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-7, где промотор представляет собой индуцибельный промотор.

10. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-9, где промотор представляет собой тканеспецифичный промотор.

11. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-7, где промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379, промотора HSVTK, промотора CMV, раннего промотора SV40, позднего промотора SV40, промотора металлотioneина, промотора вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV), промотора полиэдрина, промотора  $\beta$ -актина кур (CBA), альфа-промотора EF-1, промотора дигидрофолатредуктазы (DHFR) и промотора фосфоглицераткиназы (PGK).

12. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 11, где промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379 и промотора HSVTK.

13. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-7, где промотор содержит последовательность по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

14. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-13, где белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека.

15. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-13, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

16. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 15, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

17. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 16, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 98% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

18. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-13, где белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

19. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-13, где трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

20. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-18, где сигнал полиаденилирования выбран из обезьяньего вируса 40 (SV40), rBG,  $\alpha$ -глобина,  $\beta$ -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) и бычьего гормона роста (bGH).

21. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 20, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40.

22. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 20, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования rBG.

23. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-19, где сигнал полиаденилирования содержит последовательность по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

24. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-23, где кассета дополнительно содержит энхансер.

25. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 24, где энхансер представляет собой энхансер CMV.

26. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 24, где энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9.

27. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-26, где кассета дополнительно содержит интронную последовательность.

28. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 27, где интронная последовательность представляет собой химерную последовательность.

29. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 27, где интронная последовательность представляет собой гибридную последовательность.

30. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 27, где интронная последовательность содержит последовательности, выделенные или имеющие происхождение из SV40.

31. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 27, где интронная последовательность содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 10-11.

32. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 1, где кассета для переноса на основе AAV содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 14-19.

33. Плазмида, содержащая кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-31.

34. Клетка, содержащая кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-32 или плазмиду согласно воплощению 33.

35. Рекомбинантный AAV-вектор, содержащий белковый капсид и нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид, где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса, содержащую в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где трансген кодирует белок NPC1.

36. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 35, где длина по меньшей мере одного из 5'-ITR и 3'-ITR составляет от примерно 110 до примерно 160 нуклеотидов.

37. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 36 или 36, где 5'-ITR имеет такую же длину как и 3'-ITR.

38. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 35 или 36, где 5'-ITR и 3'-ITR имеют разную длину.

39. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому воплощению из 35-38, где по меньшей мере один из 5'-ITR и 3'-ITR выделен или имеет происхождение из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV или бычьего AAV.

40. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 35, где 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

41. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 35, где 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

42. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-41, где промотор представляет собой конститутивный промотор.

43. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-41, где промотор представляет собой индуцибельный промотор.

44. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-41, где промотор представляет собой тканеспецифический промотор.

45. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-41, где промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379, промотора HSVTK, промотора CMV, раннего промотора SV40, позднего промотора SV40, промотора металлотioneина, промотора вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV), промотора полиэдрина, промотора  $\beta$ -актина кур (CBA), альфа-промотора EF-1, промотора дигидрофолатредуктазы (DHFR) и промотора фосфоглицераткиназы (PGK).

46. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 45, где промотор выбран из группы, состоящей из промотора CBA, промотора GUSB240, промотора GUSB379 и промотора HSVTK.

47. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-41, где промотор содержит последовательность по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

48. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-47, где белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека.

49. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-48, где белок NPC1 имеет последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

50. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 49, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

51. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 50, где белок NPC1 имеет последовательность по меньшей мере на 98% идентичную последовательности белка NPC1 человека.

52. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-48, где белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

53. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-48, где трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

54. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-53, где сигнал полиаденилирования выбран из обезьяньего вируса 40 (SV40), rBG,  $\alpha$ -глобина,  $\beta$ -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) и бычьего гормона роста (bGH).

55. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 54, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40.

56. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 54, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования rBG.

57. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-53, где сигнал полиаденилирования содержит последовательность по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

58. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-57, где кассета дополнительно содержит энхансер.

59. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 58, где энхансер представляет собой энхансер CMV.

60. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 58, где энхансер содержит последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9.

61. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-60, где кассета дополнительно содержит интронную последовательность.

62. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 61, где интронная последовательность представляет собой химерную последовательность.

63. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 61, где интронная последовательность представляет собой гибридную последовательность.

64. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 61, где интронная последовательность содержит последовательность, выделенную или имеющую происхождение из SV40.

65. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 61, где интронная последовательность содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 10-11.

66. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 35, где кассета для переноса на основе AAV содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 14-19.

67. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 35, где кассета для переноса на основе AAV содержит последовательность из SEQ ID NO: 14.

68. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-67, где белковый капсид содержит субъединицу капсидного белка из AAV любого из следующих серотипов: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичий AAV или бычий AAV.

69. Рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-67, где белковый капсид содержит субъединицу капсидного белка, имеющую одну или более чем одну аминокислотную мутацию относительно субъединицы капсидного белка любого из следующих серотипов AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичий AAV или бычий AAV.

70. Способ получения рекомбинантного AAV-вектора, включающий приведение в контакт клетки-продуцента AAV с кассетой для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-32 или плазмидой согласно воплощению 33.

71. Рекомбинантный AAV-вектор, полученный способом согласно воплощению 35.

72. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 71, где вектор принадлежит серотипу, выбранному из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичьего AAV и бычьего AAV.

73. Композиция, содержащая кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-32, плазмиду согласно воплощению 33, клетку согласно воплощению 34 или рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 35-69, 71 или 72.

74. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества кассеты для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 1-32, плазмиды согласно воплощению 33, клетки согласно воплощению 34 или рекомбинантного AAV-вектора согласно любому из воплощений 35-68, 70 или 71.

75. Способ согласно воплощению 74, где субъект имеет NPC1.

76. Способ согласно воплощению 74 или 75, где субъект представляет собой субъекта-человека.

77. Нуклеиновая кислота, содержащая для кодирования в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO:20.

78. Кассета для переноса на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор бета-актина кур; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где кассета для переноса содержит интронную последовательность; где трансген кодирует белок NPC1.

79. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 78, где интронная последовательность расположена между промотором и трансгеном.

80. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 78 или 79, где 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

81. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-80, где 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

82. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-81, где промотор содержит последовательность SEQ ID NO: 5.

83. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-82, где интронная последовательность представляет собой интрон SV40.

84. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-82, где интронная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

85. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-84, где белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека.

86. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-84, где белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

87. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-84, где трансген содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

88. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-87, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40.

89. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-87, где сигнал полиаденилирования содержит последовательность SEQ ID NO: 12.

90. Кассета для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-89, где кассета содержит энхансер.

91. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 78, где кассета для переноса на основе AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 14.

92. Кассета для переноса на основе AAV согласно воплощению 78, где кассета для переноса на основе AAV содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 15-19.

93. Плазмида, содержащая кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-92.

94. Нуклеиновая кислота, содержащая в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где нуклеиновая кислота содержит интронную последовательность; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

95. Нуклеиновая кислота согласно воплощению 94, где интронная последовательность расположена между промотором и трансгеном.

96. Клетка, содержащая кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-92, плазмиду согласно воплощению 93 или нуклеиновую кислоту согласно воплощению 94 или 95.

97. Рекомбинантный AAV-вектор, содержащий белковый капсид и нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид, где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-92.

98. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 97, где белковый капсид содержит субъединицу капсидного белка из AAV любого из следующих серотипов: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичий AAV или бычий AAV.

99. Рекомбинантный AAV-вектор согласно воплощению 97, где белковый капсид содержит субъединицу капсидного белка, имеющую одну или более чем одну аминокислотную мутацию относительно субъединицы капсидного белка любого из следующих серотипов AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичий AAV или бычий AAV.

100. Способ получения рекомбинантного AAV-вектора, включающий приведение в контакт клетки-продуцента AAV с кассетой для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-92, плазмидой согласно воплощению 93 или нуклеиновой кислотой согласно воплощению 93.

101. Рекомбинантный AAV-вектор, полученный способом согласно воплощению 100.

102. Композиция, содержащая кассету для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-92, плазмиду согласно воплощению 93, нуклеиновую кислоту согласно воплощению 94 или 95, клетку согласно воплощению 96 или рекомбинантный AAV-вектор согласно любому из воплощений 97-99 или 101.

103. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества кассеты для переноса на основе AAV согласно любому из воплощений 78-92, плазмиды согласно воплощению 93, нуклеиновой кислоты согласно воплощению 94 или 95, клетки согласно воплощению 96 или рекомбинантного AAV-вектора согласно любому из воплощений 97-99 или 101.

104. Способ согласно воплощению 103, где субъект имеет NPC1.

105. Способ согласно воплощению 103 или 104, где субъект представляет собой субъекта-человека.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Кассета для переноса на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая в направлении от 5' к 3':

5'-инвертированный концевой повтор (ITR);

промотор бета-актина кур;

транскрипционный;

сигнал полиаденилирования; и

3'-ITR;

где кассета для переноса содержит интронную последовательность; и

где транскрипционный кодирует белок NPC1.

2. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где 5'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

3. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где 3'-ITR содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

4. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где промотор содержит последовательность SEQ ID NO: 5.

5. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где интронная последовательность представляет собой интрон SV40.

6. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где интронная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

7. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где белок NPC1 представляет собой белок NPC1 человека.

8. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где белок NPC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

9. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где транскрипционный содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

10. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40.

11. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, где сигнал полиаденилирования содержит последовательность SEQ ID NO: 12.

12. Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, содержащая энхансер.

**13.** Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, содержащая последовательность SEQ ID NO: 14.

**14.** Кассета для переноса на основе AAV по п. 1, содержащая любую последовательность из SEQ ID NO: 15-19.

**15.** Плазмида, содержащая кассету для переноса на основе AAV по любому из п.п. 1-14.

**16.** Нуклеиновая кислота, содержащая в направлении от 5' к 3': 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); промотор; трансген; сигнал полиаденилирования; и 3'-ITR; где нуклеиновая кислота содержит интронную последовательность; где трансген кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

**17.** Клетка, содержащая кассету для переноса на основе AAV по любому из п.п. 1-14, плазмиду по п. 15 или нуклеиновую кислоту по п. 16.

**18.** Рекомбинантный AAV-вектор, содержащий белковый капсид и нуклеиновую кислоту, инкапсидированную в белковый капсид;

где нуклеиновая кислота содержит кассету для переноса на основе AAV по любому из п.п. 1-14.

**19.** Рекомбинантный AAV-вектор по п. 18, где белковый капсид содержит субъединицу капсидного белка, происходящую из AAV любого из следующих серотипов: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичий AAV или бычий AAV.

**20.** Рекомбинантный AAV-вектор по п. 18, где белковый капсид содержит субъединицу капсидного белка, имеющую одну или более чем одну аминокислотную мутацию относительно субъединицы капсидного белка любого из следующих серотипов: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, птичий AAV или бычий AAV.

**21.** Способ получения рекомбинантного AAV-вектора, включающий приведение в контакт клетки-продуцента AAV с кассетой для переноса на основе AAV по любому из п.п. 1-14, плазмидой по п. 15 или нуклеиновой кислотой по п. 16.

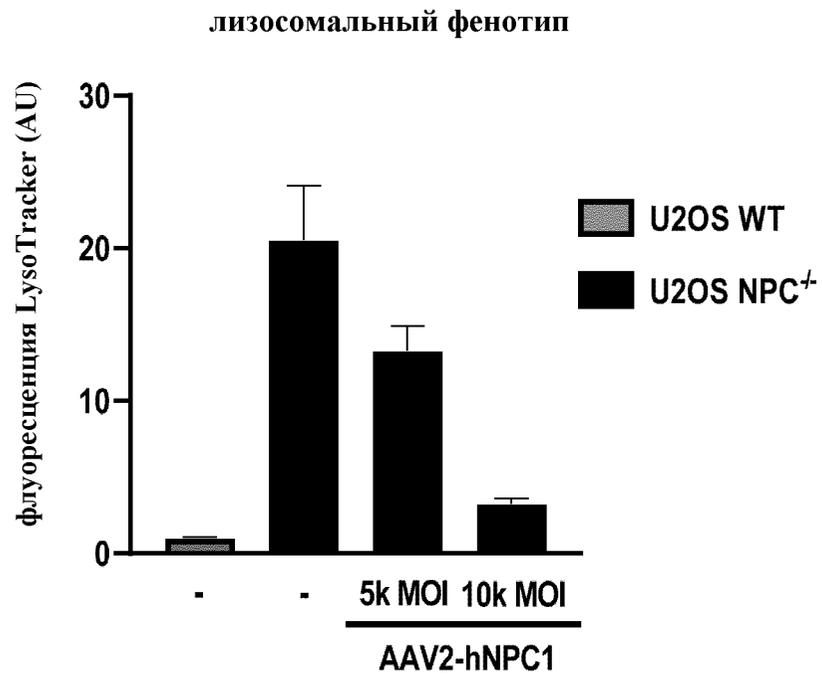
**22.** Рекомбинантный AAV-вектор, полученный способом по п. 21.

**23.** Композиция, содержащая кассету для переноса на основе AAV по любому из п.п. 1-14, плазмиду по п. 15, нуклеиновую кислоту по п. 16, клетку по п. 17 или рекомбинантный AAV-вектор по любому из п.п. 18-20 или 22.

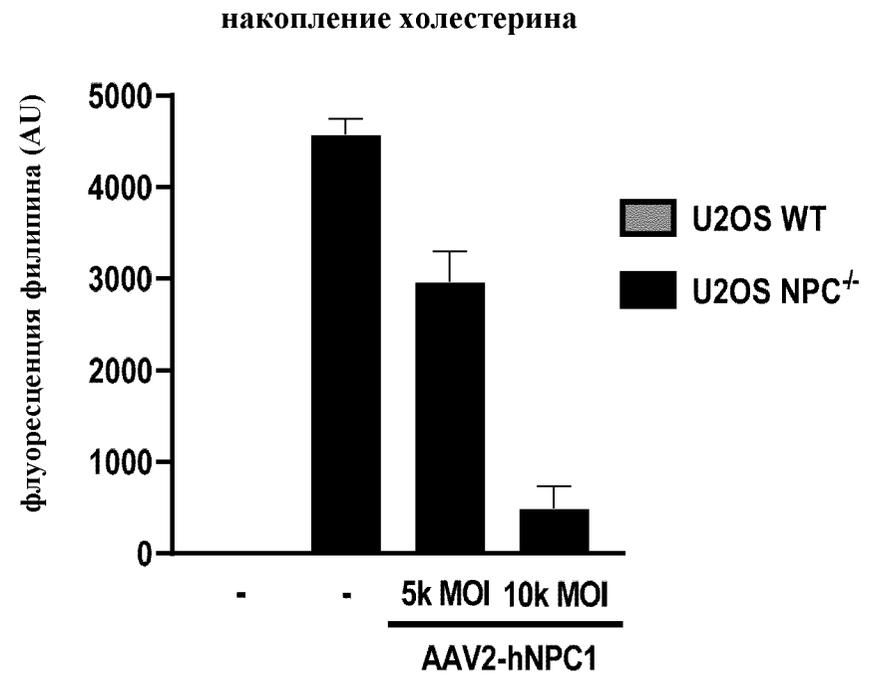
**24.** Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества кассеты для переноса на основе AAV по любому из п.п. 1-14, плазмиды по п. 15, нуклеиновой кислоты по п. 16, клетки по п. 17 или рекомбинантного AAV-вектора по любому из п.п. 18-20 или 22.

**25.** Способ по п. 24, где субъект имеет NPC1 (болезнь Ниманна-Пика типа C1).

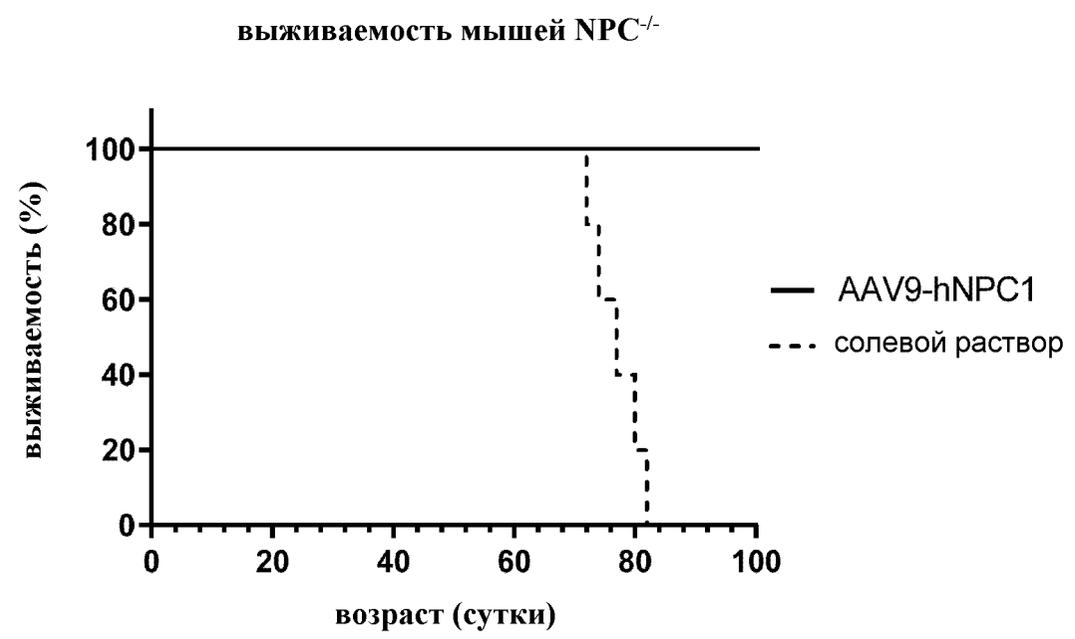
**26.** Способ по п. 24, где субъект представляет собой субъекта-человека.



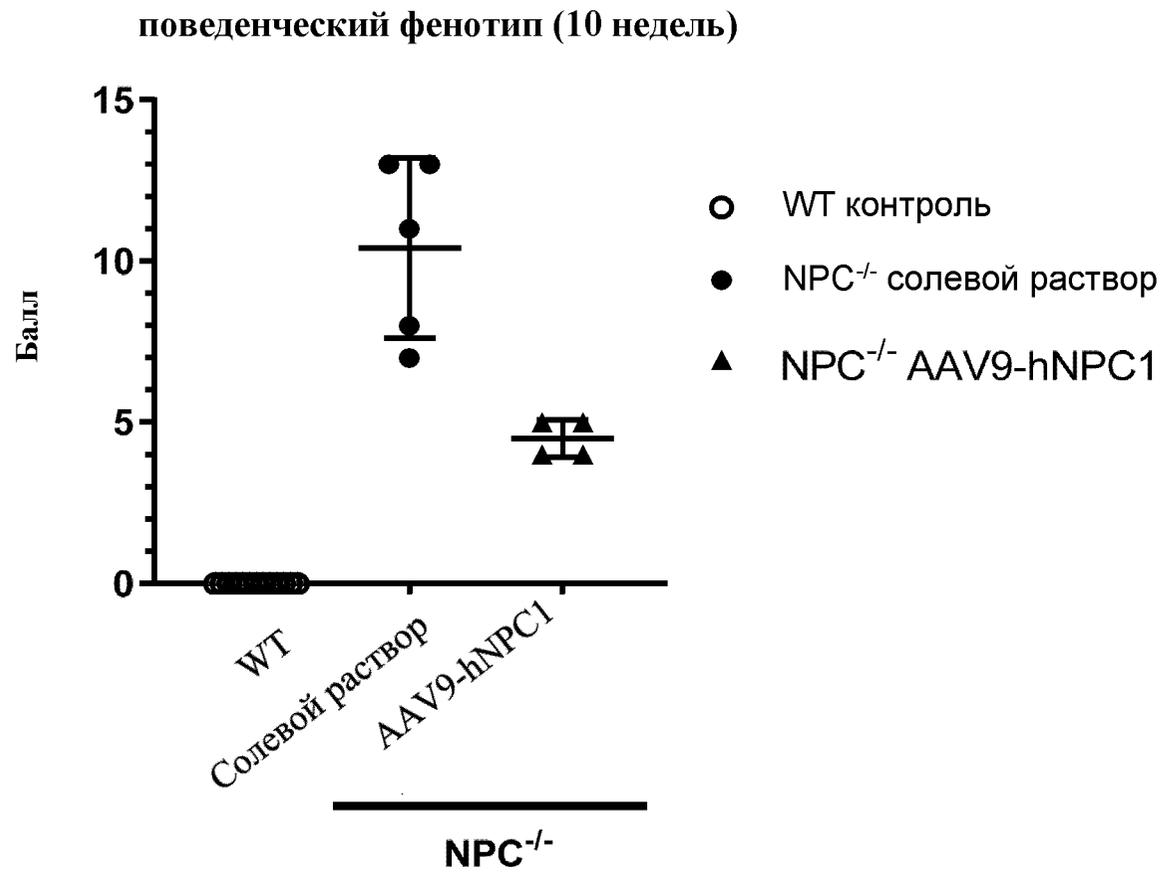
Фиг. 1А



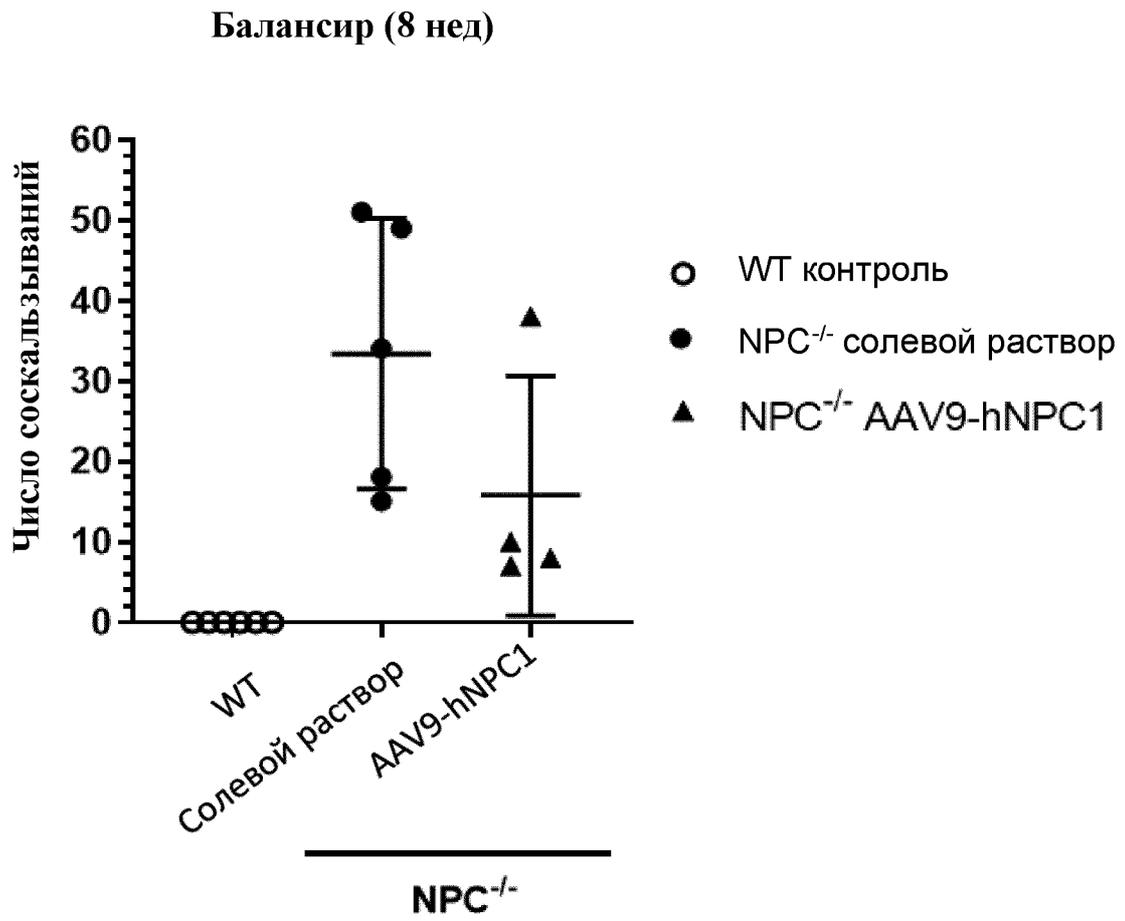
Фиг. 1Б



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4