

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045824**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента 2023.12.28	(51) Int. Cl. <i>C12N 15/861</i> (2006.01) <i>C12N 15/09</i> (2006.01) <i>C12N 7/01</i> (2006.01) <i>C07K 14/005</i> (2006.01) <i>A61K 48/00</i> (2006.01)
(21) Номер заявки 202290647	
(22) Дата подачи заявки 2020.08.21	

(54) ВЫДЕЛЕННЫЙ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ БЕЛОК VP1 КАПСИДА AAV5

(31) 2019126509	(56) US-A1-20070238684
(32) 2019.08.22	US-A1-20150023924
(33) RU	US-A1-20160201088
(43) 2022.11.07	
(86) PCT/RU2020/000445	
(87) WO 2021/034222 2021.02.25	
(71)(73) Заявитель и патентовладелец: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "АНАБИОН" (RU)	
(72) Изобретатель: Стрелкова Анна Николаевна, Карабельский Александр Владимирович, Мадера Дмитрий Александрович, Перепелкина Мария Павловна, Юрлова Елена Викторовна, Гершович Павел Михайлович, Прокофьев Александр Владимирович, Морозов Дмитрий Валентинович (RU)	

(57) Настоящее изобретение относится к области генной терапии и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенному модифицированному белку VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), который содержит одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с белком VP1 капсида AAV5 дикого типа, которые повышают эффективность трансдукции, а также к капсиду и вектору на его основе.

B1

045824

045824

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к области генной терапии и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенному модифицированному белку VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), который содержит одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с белком VP1 капсида AAV5 дикого типа, которые повышают эффективность трансдукции, а также к капсиду и вектору на его основе.

Уровень изобретения

Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой небольшой (20 нм), неспособный к самостоятельной репликации, безоболочечный вирус. У человека и приматов описано множество различных серотипов AAV. Геном аденоассоциированного вируса содержит (+ или -) одноцепочечную ДНК (ssDNA) длиной около 4,7 тысяч нуклеотидов. На концах молекулы геномной ДНК располагаются инвертированные концевые повторы (англ. inverted terminal repeats, ITRs). Геном содержит две открытые рамки считывания (англ. ORF): Rep и Cap, содержащих в себе несколько альтернативных рамок считывания, кодирующих различные белковые продукты. Продукты Rep имеют важное значение для репликации AAV, при этом ген Cap, помимо других альтернативных продуктов, кодирует 3 капсидных белка (VP1, VP2 и VP3). Белки VP1, VP2 и VP3 находятся в соотношении 1:1:10, образуя икосаэдрический капсид (Xie Q. et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:10405-10410). При образовании рекомбинантного вектора AAV (rAAV) кассета экспрессии, фланкированная ИКП, упаковывается в капсид AAV. Гены, необходимые для репликации AAV, не входят в кассету. Рекомбинантный AAV считается самым безопасным и одним из наиболее широко используемых вирусных векторов для переноса генов *in vivo*. Векторы могут инфицировать клетки из тканей множества типов, обеспечивая мощную и устойчивую трансгенную экспрессию. Они также являются непатогенными и имеют низкий профиль иммуногенности (High KA et al., "rAAV human trial experience" Methods Mol Biol. 2011; 807:429-57).

Одной из насущных целей исследований в области разработки эффективной генотерапии является оптимизация векторов для максимальной тканевой трансдукции при минимизации дозы вектора.

Известно, что различные серотипы AAV характеризуются сродством к различным рецепторам на поверхности клеток-хозяев, к которым они обладают тропизмом. Так основным известным рецептором для AAV2 является гепарансульфат-протеогликан, корецепторами выступают интегриновый гетеродимер $\alpha V\beta 5$, рецептор фактора роста фибробластов первого типа и рецептор фактора роста гепатоцитов, c-Met. AAV12 связывается с гепарансульфат-протеогликанами и сиаловой кислотой. AAV4 и AAV5 связываются с N- и O-связанными сиаловыми кислотами соответственно. AAV5 задействует рецептор фактора роста тромбоцитов. При этом установлена связь между аминокислотной последовательностью белков капсида AAV с процессом его сборки, инкапсидирования генома и сродством к различным типам рецепторов, репрезентированных на поверхности клеток-хозяев (Govindasamy L. et. al. Structural insights into adeno-associated virus serotype 5. J Virol. 2013 Oct;87(20):11187-99).

В международной заявке WO 2012145601 описаны вирионы аденоассоциированного вируса (AAV) с вариантным капсидным белком, где вирионы AAV демонстрируют большую инфекционность ретинальной клетки, когда вводятся интравитреальной инъекцией, по сравнению с AAV дикого типа.

В международной заявке WO 2013158879 описан вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей капсидный белок VP1, который содержит одну или несколько замен лизина, где одна замена лизина представляет K137R, где упомянутая замена лизина является эффективной для ингибирования убиквитинирования упомянутого капсидного белка, и тем самым увеличивается трансдукция упомянутого вектора AAV в клетке-мишени.

На данный момент существует потребность в AAV с улучшенной трансдуцирующей способностью, которые включают в своей структуре различные трансгены, в том числе клинически важные трансгены, для нуждающихся в этом пациентов. Улучшение тканевой трансдукции позволяет минимизировать дозы вводимого субъекту вектора.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких аминокислотных замен в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа, которые выбраны из группы:

S651A,
S2A и T711S или
S2A, S651A и T711S,

приводит к повышению эффективности трансдукции клеток-мишеней с помощью вектора на основе AAV серотипа 5 с данной(ыми) модификацией(ями) и существенному увеличению эффективности доставки трансгена векторами на основе rAAV с указанными выше мутациями.

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному модифицированному белку VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней, содержащему аминокислотную последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа, кодируемую геном Cap, с одной или несколькими заменами, которые выбраны из группы:

S651A,
S2A и T711S,
S2A, S651A и T711S.

В некоторых вариантах аминокислотная последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает одну замену в положении S651A.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замены S2A и T711S.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замены S2A, S651A и T711S.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей вышеуказанный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), который используется для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой S651A, представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 5 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой S651A.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A и T711S, представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 6 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A и T711S.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок капсида VP1 аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A, S651A и T711S, представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 7 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A, S651A и T711S.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному капсиду для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней, который включает вышеуказанный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В некоторых вариантах выделенный капсид включает вышеуказанный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5),

белок VP2 капсида AAV5 или его модифицированный вариант и белок VP3 капсида AAV5 или его модифицированный вариант.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает белок VP2 капсида AAV5 дикого типа.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает белок VP2 капсида AAV5 дикого типа, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T575S.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T575S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены S515A и T575S.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены S515A и T575S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает белок VP3 капсида AAV5 дикого типа.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает белок VP3 капсида AAV5 дикого типа, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ IDNO: 11.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T519S.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T519S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены S459A и T519S.

В некоторых вариантах выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены S459A и T519S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 13.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей вышеуказанный капсид, который используется для высокоэффективной трансдукции клеточных мишеней.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5) для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

- 1) вышеуказанный капсид, и
- 2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащей регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

В некоторых вариантах вектор на основе гAAV5 содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.

В некоторых вариантах вектор на основе гAAV5 содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой терапевтический полипептид, где терапевтический полипептид представляет собой фактор свертывания крови, выбираемый из группы, состоящей из фактора VIII, фактора IX или их функционального варианта.

В некоторых вариантах вектор на основе гAAV5 содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой фактор VIII или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах вектор на основе гAAV5 содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой фактор IX или его функциональный вариант.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, которая содержит:

- a) вышеуказанный вектор на основе гAAV5; и
- b) фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция используется для доставки генного продукта нуждающемуся в этом человеку.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, который включает введение субъекту вышеуказанного вектора на основе гAAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах способ доставки генного продукта используется для доставки генного продукта нуждающемуся в этом человеку.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного вектора на основе гAAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

В некоторых вариантах применение используется для лечения заболевания у нуждающегося в этом человека.

В некоторых вариантах применения заболевание выбирают из группы: заболевания крови; заболевания центральной нервной системы; заболевания метаболизма; заболевания мышц; наследственные заболевания.

В некоторых вариантах применения заболевание представляет собой заболевание крови.

В некоторых вариантах применения продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой фактор IX или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах применения продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой фактор VIII или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах применения заболевание представляет собой заболевание мышц.

В некоторых вариантах применения заболевание представляет собой наследственное заболевание.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения вышеуказанного век-

тора на основе гAAV5, который включает трансфекцию клеток-продуцентов вышеуказанной нуклеиновой кислотой, кодирующей вышеуказанный капсид.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Кольцевая схема плазмиды pAAV-linker, предназначенной для клонирования библиотек случайных вариантов гена капсида AAV пятого серотипа.

AmpR - ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину, pUC origin- pUC ориджин репликации в бактериях, ITR - инвертированные терминальные повторы, CMV-Promoter - промотор ранних генов цитомегаловируса,

Poly A - последовательность сигнала полиаденилирования, для повышения стабильности мРНК,

HBG Intron - (human beta globine intron), фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон,

GFP- ген зеленого флуоресцентного белка,

T2A - 2A расщепляющийся пептид, позволяет осуществлять коэкспрессию целевого и репортерного белков.

Фиг. 2. Кольцевая схема плазмиды pAAV-Rep, предназначенной для наработки рекомбинантных вирусных препаратов дикого типа AAV пятого серотипа из библиотеки случайных вариантов.

AmpR- ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину,

pUC origin- pUC ориджин репликации в бактериях,

Rep genes - последовательность гена Rep, кодирующая белки репликации AAV.

Фиг. 3. Кольцевая схема плазмиды pHelper, предназначенной для наработки рекомбинантных вирусных препаратов дикого типа AAV пятого серотипа из библиотеки случайных вариантов.

AmpR- ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину, Ori- ориджин репликации в бактериях,

Adeno E2A - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК,

Adeno E4 - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК,

Adeno VARNA - последовательность гена хелперного аденовируса, отвечающая за стимуляцию трансляции как ранних, так и поздних вирусных генов.

Фиг. 4. Анализ эффективности трансдукции клеток CHO-K1-S вирусными препаратами на основе AAV5-GFP, где белок VP1 капсида AAV5 дикого типа, включает одну или несколько аминокислотных замен.

Фиг. 5. Анализ концентрации белка hFIX в среде, собранной с клеток CHO-K1-S спустя 7 дней после трансдукции вирусными препаратами на основе AAV5-hFIX, где белок VP1 капсида AAV5 дикого типа, включает одну или несколько аминокислотных замен.

Фиг. 6. Положение белков капсида AAV5 в геноме. 2087-4258 п.н-VP1, 2495-4258 п.н-VP2, 2663-4258 п.н-VP3.

Описание изобретения

Определения и общие методы.

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

"Выделенный" означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, в природе присутствующие в животном, не являются "выделенными", но те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от материалов, сопутствующих им в их природном состоянии, являются "выделенными". Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать, по существу, в очищенной форме или могут существовать в неприродном окружении, таком как, например, генетически модифицированной клетке.

Определения "встречающийся в природе", "нативный" или "дикого типа" используют для описания объекта, который можно обнаружить в природе как отличающийся от получаемого искусственно. Например, белок или нуклеотидная последовательность, присутствующие в организме (включая вирус), которые можно изолировать из источника в природе, и которые не модифицированы умышленно специалистом в лаборатории, являются встречающимися в природе.

Термин "геном" относится к полному генетическому материалу организма.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова "включать" и "содержать" или их вариации, такие как "имеющий", "включает", "включающий", "содержит" или "содержащий", следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Белок (пептид).

В настоящем описании, термины "пептид", "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемо, и они относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не существует ограничений по максимальному количеству аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как применяют в настоящем описании, термин относится и к коротким цепям, также общепринято обозначаемым в этой области, например, как пептиды, олигопептиды и олигомеры, и к более длинным цепям, как правило, обозначаемым в этой области как белки, множество типов которых существует. "Полипептиды" включают, помимо прочего, например, биологически активные фрагменты, по существу, гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитные белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинацию.

Термины "трансформация", "трансфекция", "трандукция" относятся к любому способу или средствам, с помощью которых нуклеиновая кислота вводится в клетку или организм-хозяин, и могут быть использованы взаимозаменяемо для передачи аналогичного значения. Такие способы включают в себя без ограничения трансфекцию, электропорацию, микроинъекции, инфицирование, ПЭГ-сплавление и тому подобное.

Молекулы нуклеиновых кислот.

Термины "нуклеиновая кислота", "нуклеиновая последовательность" или "нуклеиновокислотная последовательность", "полинуклеотид", "олигонуклеотид", "полинуклеотидная последовательность" и "нуклеотидная последовательность", которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Специалист в этой области имеет общие знания о том, что нуклеиновые кислоты являются полинуклеотидами, которые можно гидролизовать до мономерных "нуклеотидов". Мономерные нуклеотиды можно гидролизовать в нуклеозиды. Как применяют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, в качестве неограничивающих примеров, все последовательности нуклеиновой кислоты, получаемые любыми способами, доступными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки, использование обычной технологии клонирования и ПЦР и т.п., и способами синтеза.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты нуклеазы. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, находящуюся в клетках, в которых в норме происходит экспрессия нуклеазы, например, в случае, если молекула нуклеиновой кислоты имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в клетках в естественных условиях.

Термин нуклеотидная последовательность охватывает его комплемент, если не указано иное. Таким образом, нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

Аденоассоциированный вирус (AAV).

Вирусы семейства Parvoviridae представляют собой небольшие ДНК-содержащие вирусы животных. Семейство Parvoviridae может быть разделено на два подсемейства: Parvovirinae, представители которого инфицируют позвоночных животных, и Densovirinae, представители которого инфицируют насе-

комых. К 2006 году были описаны 11 серотипов аденоассоциированного вируса (Mori, S. ET AL., 2004, "Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein", *Virology*, T. 330 (2): 375-83). Все известные серотипы могут инфицировать клетки многих видов тканей. Тканевая специфичность определяется серотипом белков капсида, поэтому векторы на основе аденоассоциированного вируса конструируют, задавая необходимый серотип. Дополнительная информация по парвовирусам и другим представителям Parvoviridae описана в литературе (Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication", Chapter 69 in *Fields Virology* (3d Ed. 1996)).

Геномная организация всех известных серотипов AAV очень сходна. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, которая содержит менее чем примерно 5000 нуклеотидов (нт) в длину. Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности репликации неструктурных белков (Rep) и структурных белков (Cap). Ген Cap кодирует белки VP (VP1, VP2 и VP3), которые образуют капсид. Концевые 145 нуклеотидов являются самокомплементарными и организованы таким образом, что может быть сформирован энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий T-образную шпильчатую структуру. Такие шпильчатые структуры функционируют как точки начала репликации ДНК вируса, являясь праймерами для клеточного ДНК-полимеразного комплекса. После инфекции клеток млекопитающих AAV дикого типа (wtAAV) гены Rep (например, Rep78 и Rep52) экспрессируются с помощью P5 промотора и P19 промотора, соответственно, и оба белка Rep выполняют определенную функцию в репликации генома вируса. Сплайсинг в открытой рамке считывания Rep (Rep ORF) приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (например, Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Однако было показано, что несплайсированная мРНК, кодирующая белки Rep78 и Rep52, является достаточной для продукции вектора AAV в клетках млекопитающих.

Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

Термин "вектор" при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена.

Фраза "рекомбинантный вектор AAV" (или "вектор rAAV") в контексте настоящего описания относится к вектору, содержащему одну или несколько интересующих полинуклеотидных последовательностей, интересующих генов или "трансгенов", которые фланкированы парвовирусными или инвертированными концевыми повторяющимися последовательностями (ITR).

Термины "инфекционная единица" (ие), "инфекционная частица" или "репликационная единица", как используется в отношении вирусного титра, относятся к числу инфекционных частиц рекомбинантного вектора AAV, которое измеряют посредством анализа инфекционных центров, также известного как анализ репликационных центров, описанный, например, в публикации McLaughlin et al., *J. Virol.* (1988) 62:1963-1973.

Термин "гетерологичный", когда он относится к последовательностям нуклеиновых кислот, таким как кодирующие последовательности и последовательности регуляции, обозначает последовательности, которые обычно не соединены вместе и/или обычно не связаны с конкретной клеткой. Таким образом, "гетерологичная" область конструкции нуклеиновой кислоты или вектора представляет собой фрагмент нуклеиновой кислоты, расположенный внутри или присоединенный к другой молекуле нуклеиновой кислоты, которая в природе не найдена совместно с другой молекулой. Например, гетерологичная область конструкции нуклеиновой кислоты может содержать кодирующую последовательность, фланкированную последовательностями, которые в природе не найдены совместно с кодирующей последовательностью. Другой пример гетерологичной кодирующей последовательности представляет собой конструкцию, где сама кодирующая последовательность не найдена в природе (например, синтетические последовательности, которые содержат кодоны, отличные от нативного гена).

В контексте настоящего описания термин "функционально связанный" относится к связи полинуклеотидных (или полипептидных) элементов в функциональную связь. Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она находится в условиях функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, регуляторная последовательность транскрипции функционально связана с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию указанной кодирующей последовательности. Термин "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК являются, как правило, непрерывными, и при необходимости соединения двух участков, кодирующих белок, являются также непрерывными и находятся в рамке считывания.

В контексте настоящего описания термин "промотор" или "регуляторная последовательность транскрипции" или "регуляторная последовательность" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который контролирует транскрипцию одной или нескольких кодирующих последовательностей, и который расположен против направления считывания информации относительно направления транскрипции от сайта инициации транскрипции кодирующей последовательности, а также который структурно идентифицируется по наличию сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и других последовательностей ДНК, включающих, без ограничения, сайты связывания фактора транскрипции, сайты связывания репрессора и активатора белка, а также любые другие последовательности нуклеотидов, известные специалистам в данной области, которые непосредственно или

опосредованно регулируют уровень транскрипции с данным промотором. "Конститутивный" промотор представляет собой такой промотор, который активен в большинстве тканей в обычных физиологических условиях и условиях развития. "Индукцибельный" промотор представляет собой промотор, который подвергается физиологической регуляции или регуляции в ходе развития, например, при воздействии химического индуктора. "Тканеспецифичный" промотор активен только в конкретных типах тканей или клеток.

Термины "энхансеры" или "энхансер", используемые в изобретении, могут относиться к последовательности ДНК, которая расположена как смежная с последовательностью ДНК, кодирующей рекомбинантный продукт. Энхансерные элементы обычно расположены в 5'-направлении от промоторного элемента или могут быть расположены ниже или в пределах кодирующей последовательности ДНК (например, последовательности ДНК, транскрибированной или транслированной в рекомбинантный продукт или продукты). Таким образом, энхансерный элемент может быть расположен на расстоянии 100 пар оснований, 200 пар оснований или 300 или больше пар оснований перед последовательностью ДНК, которая кодирует рекомбинантный продукт, или после этой последовательности. Энхансерные элементы могут увеличивать количество экспрессируемого рекомбинантного продукта от последовательности ДНК, превышая экспрессию, обусловленную одиночным промоторным элементом. Специалистам в данной области техники доступно множество энхансерных элементов.

Термин "селектируемый маркерный ген" относится к гену, который при экспрессии придает трансформированной клетке селектируемый фенотип, например, устойчивость к антибиотикам.

Как применяют в настоящем описании, термин "экспрессия" определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности, запускаемую ее промотором.

Применение для лечения.

"Генная терапия" представляет собой вставку генов в клетки и/или тканей субъекта для лечения заболевания, обычно, наследственных заболеваний, при этом дефектный мутантный аллель заменяется или дополняется функциональным аллелем.

"Лечить", "лечение" и "терапия" относятся к методу смягчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. Используемый в данном документе, термин "облегчить" болезнь, заболевание или состояние, означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, содержащиеся в данном документе ссылки на "лечение" включает ссылки на лечебную, паллиативную и профилактическую терапию.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Термин "нарушение" означает любое состояние, которое можно улучшить в результате лечения по настоящему изобретению. В определение данного термина входят хронические и острые нарушения или заболевания, включающие в себя патологические состояния, которые вызывают предрасположенность млекопитающего к возникновению данного нарушения.

"Заболевание" является состоянием здоровья животного, где животное не может поддерживать гомеостаз, и где, если заболевание не облегчают, то здоровье животного продолжает ухудшаться.

Термин "субъект", "пациент", "индивидуум" и т.п. используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к любому животному, поддающемуся воздействию способами, представленными в настоящем описании. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления субъект, пациент или индивидуум является человеком.

"Терапевтически эффективным количеством" считается количество вводимого в процессе лечения терапевтического агента, которое избавит в определенной степени от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится лечение.

Понятие "хроническое" применение относится к непрерывному (продолжительному) применению агента(ов) в противоположность острому (кратковременному) пути введения, так чтобы поддерживать первоначальное терапевтическое действие (активность) в течение длительного периода времени.

"Прерывистое" применение обозначает лечение, которое не осуществляют последовательно без перерывов, но которое скорее по своей природе является периодическим.

Подробное описание изобретения

Выделенной модифицированной белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному модифицированному белку VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней, содержащий аминокислотную последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа, кодируемую геном Cap, с одной или несколькими заменами, которые выбраны из группы:

S651A,

S2A и T711S,

S2A, S651A и T711S.

Под аминокислотной заменой S2A подразумевается замена серина (Ser, S) в положении 2 белка VP1

капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа дикого типа на аланин (Ala, A).

Под аминокислотной заменой S651A подразумевается замена серина (Ser, S) в положении 651 белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа дикого типа на аланин (Ala, A).

Под аминокислотной заменой T711S подразумевается замена треонина (Thr, T) в положении 711 белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа дикого типа на серин (Ser, S).

В некоторых вариантах аминокислотная последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, представленную

```
MSFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLAAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNG
GLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGN
LGKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAE
AGPSGSQQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTW
MGDRVVTKSTRTWVLPSPYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFH
SHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNTSTVQVFTD
DDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPS
KMLRTGNNEFTYNFEEVPHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFN
KNLAGRYANTYKNWFPMPGRTQGWNLGSVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQV
PPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRV
AYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLGPIWAKIPETGA
HFHPSPAMGGFGLKHPPPMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTMEMEWE
LKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID
NO: 1).
```

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает одну замену в положении S651A.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

```
MSFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLAAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNG
GLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGN
LGKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAE
AGPSGSQQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTW
MGDRVVTKSTRTWVLPSPYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFH
SHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNTSTVQVFTD
DDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPS
KMLRTGNNEFTYNFEEVPHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFN
KNLAGRYANTYKNWFPMPGRTQGWNLGSVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQV
PPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRV
AYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLGPIWAKIPETGA
HFHPSPAMGGFGLKHPPPMLIKNTPVPGNITSFADVPVSSFITQYSTGQVTMEMEWE
ELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID
NO: 2).
```

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замены S2A и T711S.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

```
MAFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLAAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNG
NGLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGG
```

NLGKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDA
 EAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDST
 WMGDRVVTKSTRTWLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRF
 HSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANLNTSTVQVFT
 DDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSFFCLEYFP
 SKMLRTGNNFEFTYNFEEVPHSSFAFSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQF
 NKNLAGRYANTYKNWFPMPGRTQGWNLGSGVNRASVSFAATTNRMELEGASYQ
 VPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNR
 VAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETG
 AHFHSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEME
 WELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ
 ID NO: 3).

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает заме-
 ны S2A, S651A и T711S.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет амино-
 кислотную последовательность, представленную

MAFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLAEGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGGP
 NGLDRGEPVNRADDEVAREHDSYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSGG
 NLGKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDA
 EAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDST
 WMGDRVVTKSTRTWLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRF
 HSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANLNTSTVQVFT
 DDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSFFCLEYFP
 SKMLRTGNNFEFTYNFEEVPHSSFAFSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQF
 NKNLAGRYANTYKNWFPMPGRTQGWNLGSGVNRASVSFAATTNRMELEGASYQ
 VPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNR
 VAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETG
 AHFHSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFADVPVSSFITQYSTGQVTVEME
 WELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ
 ID NO: 4).

Выделенные модифицированные белки VP2 и VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серо-
 типа (AAV5).

"Правая часть" (+)-цепи геномной ДНК аденоассоциированного вируса содержит перекрывающиеся
 последовательности, кодирующие три белка капсида - VP1, VP2 и VP3.

Транскрипция этих генов начинается с одного промотора, p40. Молекулярная масса соответствующих
 белков составляет 87, 72 и 62 кДа, соответственно. Все три белка транслируются с одной мРНК. После
 транскрипции пре-мРНК может подвергаться сплайсингу двумя разными способами, при этом вырезается
 более длинный или более короткий интрон и образуются мРНК длиной 2300 или 2600 нуклеотидов.

Таким образом, введение мутаций в ген Cas будет влиять не только на белок VP1 капсида AAV5, но
 и на VP2 и VP3 капсида AAV5.

На фиг. 6 приведено схематичное изображение положения белков капсида AAV5 в геноме AAV:
 2087-4258 п.н.-VP1,
 2495-4258 п.н.-VP2,
 2663-4258 п.н.-VP3.

Из вышеизложенного следует, что мутация аналогичная мутации S2A в VP1 будет отсутствовать в
 VP2 и VP3, а, в свою очередь, мутации аналогичные мутациям S651A и/или T711S в VP1 будет присут-
 ствовать и в VP2, и в VP3.

С учетом перекрывающейся последовательности, кодирующей три белка капсида -VP1, VP2 и VP3,
 аминокислотная замена S651A в VP1 будет соответствовать:

аминокислотной замене в положении S515A в VP2;
 аминокислотной замене в положении S459A в VP3.

С учетом перекрывающейся последовательности, кодирующей три белка капсида -VP1, VP2 и VP3, аминокислотная замена T711S будет соответствовать:

аминокислотной замене в положении T575S в VP2;

аминокислотной замене в положении T519S в VP3.

Заявитель также считает целесообразным указать окружение найденных мутаций путем указания краткой аминокислотной последовательности, включающей данные мутации в VP1/VP2/VP3:

для S2A в VP1 (отсутствует в VP2 и VP3) - MSFVDHP; для S651A в VP1 (S515A в VP2/ S459A в VP3) - TSFSDVP; для T711S в VP1 (T575S в VP2/ T519S в VP3) - EYRTTRP.

В некоторых вариантах аминокислотная последовательность белка VP2 капсида AAV5 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, представленную

TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGA
DTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSYN
NHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYDFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFR
PRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAF
PPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFH
SSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPM
GRTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALE
NTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
ATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPM
LIKNTVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYN
DPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 8)

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP2 капсида AAV5 включает замену T575S.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP2 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGA
DTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSYN
NHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYDFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFR
PRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAF
PPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFH
SSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPM
GRTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALE
NTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
ATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPM
LIKNTVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYN
DPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 9)

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP2 капсида AAV5 включает замены S515A и T575S.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP2 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGA
DTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSYN
NHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYDFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFR
PRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAF

PPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFH
 SSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPM
 GRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALE
 NTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
 ATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPM
 LIKNTVPGNITSFADVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNY
 NDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 10)

В некоторых вариантах аминокислотная последовательность белка VP3 капсида AAV5 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, представленную

MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP
 SYNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGF
 PRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCL
 PAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEV
 PFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPM
 GRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENT
 MIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPAT
 GTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPMMLIK
 NTPVGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYN
 NDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 11)

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP3 капсида AAV5 включает замену T519S.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP3 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP
 SYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYW
 GFPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCL
 PAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEV
 PFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGP
 MGRRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYAL
 ENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
 ATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPM
 LIKNTVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYN
 NDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 12)

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP3 капсида AAV5 включает замены S459A и T519S.

В некоторых вариантах выделенный модифицированный белок VP3 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP
 YNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWG
 FRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLP
 AFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVP
 FHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGP
 MGRTQGWNLGSGVNRASVSASFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYAL
 ENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
 ATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPM
 LIKNTVPGNITSFADVVPSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTN
 NDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 13)

Капсид.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному капсиду для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней, который включает вышеуказанный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В одном из вариантов выделенный капсид включает вышеуказанный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), белок VP2 капсида AAV5 или его модифицированный вариант и белок VP3 капсида AAV5 или его модифицированный вариант.

Особенно предпочтительные варианты включают замены, которые являются консервативными по природе, т.е. те замены, которые имеют место в семействе аминокислот, которые объединены по их боковым цепям. В частности, аминокислоты обычно делят на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Например, достаточно обосновано предсказание о том, что выделенная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или схожая консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не окажет важного влияния на биологическую активность. Например, полипептид, представляющий интерес, может включать вплоть до приблизительно 5-10 консервативных или неконсервативных аминокислотных замен, или даже вплоть до приблизительно 15-25 или 50 консервативных или неконсервативных аминокислотных замен, или любое число от 5 до 50 при условии, что желаемая функция молекулы остается незатронутой.

В одном из вариантов выделенный капсид включает белок VP2 капсида AAV5 дикого типа.

В одном из вариантов выделенный капсид включает белок VP2 капсида AAV5 дикого типа, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 8.

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T575S.

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T575S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9.

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены S515A и T575S.

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены S515A и T575S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10.

В одном из вариантов выделенный капсид включает белок VP3 капсида AAV5 дикого типа.

В одном из вариантов выделенный капсид включает белок VP3 капсида AAV5 дикого типа, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 11.

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T519S.

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T519S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12.

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены S459A и T519S.

В одном из вариантов выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены S459A и T519S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 13.

Выделенная нуклеиновая кислота.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей вышеуказанный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), который используется для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой S651A, представлена нуклеиновой последовательностью

```

ATGTCTTTTGTGATCACCCCTCCAGATTGGTTGGAAGAAGTTGGTGAAGGTCTTC
GCGAGTTTTTGGGCCTTGAAGCGGGCCACCGAAACCAAAACCCAATCAGCAGC
ATCAAGATCAAGCCCGTGGTCTTGTGCTGCCTGGTTATAACTATCTCGGACCCGG
AAACGGTCTCGATCGAGGAGAGCCTGTCAACAGGGCAGACGAGGTTCGCGGAGA
GCACGACATCTCGTACAACGAGCAGCTTGAGGCGGGAGACAACCCCTACCTCAA
GTACAACCACGCGGACGCCGAGTTTCAGGAGAAGCTCGCCGACGACACATCCTT
CGGGGAAACCTCGGAAAGGCAGTCTTTCAGGCCAAGAAAAGGGTTCTCGAACC
TTTTGGCCTGTTGAAGAGGGTGCTAAGACGGCCCCTACCGGAAAGCGGATAGA
CGACCACTTTCCAAAAAGAAAGAAGGCTCGGACCGAAGAGGACTCCAAGCCTTC
CACCTCGTCAGACGCCGAAGCTGGACCCAGCGGATCCCAGCAGCTGCAAATCCC
AGCCCAACCAGCCTCAAGTTTGGGAGCTGATACAATGTCTGCGGGAGGTGGCGG
CCCATTGGGCGACAATAACCAAGGTGCCGATGGAGTGGGCAATGCCTCGGGAGA
TTGGCATTGCGATTCCACGTGGATGGGGGACAGAGTCGTCACCAAGTCCACCCG
AACCTGGGTGCTGCCCAGCTACAACAACCACCAGTACCGAGAGATCAAAAGCGG
CTCCGTCGACGGAAGCAACGCCAACGCCTACTTTGGATACAGCACCCCTGGGG
GTACTTTGACTTTAACCGCTTCCACAGCCACTGGAGCCCCCGAGACTGGCAAAGA
CTCATCAACAACACTACTGGGGCTTCAGACCCCGGTCCCTCAGAGTCAAAATCTTCA

```

ACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGGTGCAGGACTCCACCACCACCATCGCCAACA
 ACCTCACCTCCACCGTCCAAGTGTTTACGGACGACGACTACCAGCTGCCCTACGT
 CGTCGGCAACGGGACCGAGGGATGCCTGCCGGCCTTCCCTCCGCAGGTCTTTACG
 CTGCCGCAGTACGGTTACGCGACGCTGAACCGCGACAACACAGAAAATCCCACC
 GAGAGGAGCAGCTTCTTCTGCCTAGAGTACTTTCCCAGCAAGATGCTGAGAACG
 GGCAACAACCTTTGAGTTTACCTACAACCTTTGAGGAGGTGCCCTTCCACTCCAGCT
 TCGCTCCAGTCAGAACCTGTTCAAGCTGGCCAACCCGCTGGTGGACCAGTACTT
 GTACCGCTTCGTGAGCACAAATAACACTGGCGGAGTCCAGTTCAACAAGAACCT
 GGCCGGGAGATACGCAACACCTACAAAACTGGTTCCCGGGGGCCATGGGCCG
 AACCCAGGGCTGGAACCTGGGCTCCGGGGTCAACCGCGCCAGTGTACGCGCCTT
 CGCCACGACCAATAGGATGGAGCTCGAGGGCGCGAGTTACCAGGTGCCCCCGCA
 GCCGAACGGCATGACCAACAACCTCCAGGGCAGCAACACCTATGCCCTGGAGAA
 CACTATGATCTTCAACAGCCAGCCGGCGAACCCGGGCACCACCGCCACGTACCT
 CGAGGGCAACATGCTCATCACCAGCGAGAGCGAGACGCAGCCGGTGAACCGCGT
 GGCGTACAACGTCGGCGGGCAGATGGCCACCAACAACCAGAGCTCCACCACTGC
 CCCC GCGACCGGCACGTACAACCTCCAGGAAATCGTGCCCGGCAGCGTGTGGAT
 GGAGAGGGACGTGTACCTCCAAGGACCCATCTGGGCCAAGATCCCAGAGACGGG
 GGCGCACTTTCACCCCTCTCCGGCCATGGGCGGATTCGGACTCAAACACCCACCG
 CCCATGATGCTCATCAAGAACACGCCTGTGCCCGGAAATATCACCAGCTTCgCGG
 ACGTGCCCGTCAGCAGCTTCATCACCCAGTACAGCACCGGGCAGGTCACCGTGG
 AGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAAAACCTCCAAGAGGTGGAACCCAGAGATC
 CAGTACACAAACAACCTACAACGACCCCCAGTTTGTGGACTTTGCCCGGACAGC
 ACCGGGAATACAGAACCACCAGACCTATCGGAACCCGATACCTTACCCGACCC
 CTTTAA (SEQ ID NO: 5)

или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой S651A.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой S651A" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 5, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 2. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A и T711S, которая представлена нуклеиновой последовательностью

ATGGCTTTTGTGATCACCTCCAGATTGGTTGGAAGAAGTTGGTGAAGGTCTTC
GCGAGTTTTTGGGCCTTGAAGCGGGCCACCGAAACCAAAACCCAATCAGCAGC
ATCAAGATCAAGCCCGTGGTCTTGTGCTGCCTGGTTATAACTATCTCGGACCCGG
AAACGGTCTCGATCGAGGAGAGCTGTCAACAGGGCAGACGAGGTGCGCGGAGA
GCACGACATCTCGTACAACGAGCAGCTTGAGGCGGGAGACAACCCCTACCTCAA
GTACAACCACGCGGACGCCGAGTTTCAGGAGAAGCTCGCCGACGACACATCCTT
CGGGGGAAACCTCGGAAAGGCAGTCTTTCAGGCCAAGAAAAGGGTTCTCGAACC
TTTTGGCCTGGTTGAAGAGGGTGCTAAGACGGCCCCTACCGGAAAGCGGATAGA
CGACCACTTTCCAAAAGAAAGAAGGCTCGGACCGAAGAGGACTCCAAGCCTTC
CACCTCGTCAGACGCCGAAGCTGGACCCAGCGGATCCCAGCAGCTGCAAATCCC
AGCCCAACCAGCCTCAAGTTTGGGAGCTGATACAATGTCTGCGGGAGGTGGCGG
CCCATTGGGCGACAATAACCAAGGTGCCGATGGAGTGGGCAATGCCTCGGGAGA
TTGGCATTGCGATTCCACGTGGATGGGGGACAGAGTCGTCACCAAGTCCACCCG
AACCTGGGTGCTGCCAGCTACAACAACCACCAGTACCGAGAGATCAAAAGCGG
CTCCGTCGACGGAAGCAACGCCAACGCCTACTTTGGATACAGCACCCCTGGGG
GTACTTTGACTTTAACCGCTTCCACAGCCACTGGAGCCCCGAGACTGGCAAAGA
CTCATCAACAACACTACTGGGGCTTCAGACCCCGGTCCCTCAGAGTCAAAATCTTCA
ACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGGTGCAGGACTCCACCACCACCATCGCCAACA
ACCTCACCTCCACCGTCCAAGTGTTTACGGACGACGACTACCAGCTGCCCTACGT
CGTCGGCAACGGGACCGAGGGATGCCTGCCGGCCTTCCCTCCGCAGGTCTTTACG
CTGCCGAGTACGGTTACGCGACGCTGAACCGCGACAACACAGAAAATCCCACC
GAGAGGAGCAGCTTCTTCTGCCTAGAGTACTTTCCAGCAAGATGCTGAGAACG
GGCAACAACCTTGAGTTTACCTACAACCTTGAGGAGGTGCCCTTCCACTCCAGCT
TCGCTCCAGTCAGAACCTCTTCAAGCTGGCCAACCCGCTGGTGGACCAGTACTT
GTACCGCTTCGTGAGCACAATAAACAACACTGGCGGAGTCCAGTTCAACAAGAACCT
GGCCGGGAGATACGCCAACACCTACAAAACTGGTTCCCGGGGCCCATGGGCCG
AACCAGGGCTGGAACCTGGGCTCCGGGGTCAACCGCGCCAGTGTACGCGCCTT
CGCCACGACCAATAGGATGGAGCTCGAGGGCGCGAGTTACCAGGTGCCCCGCA
GCCGAACGGCATGACCAACAACCTCCAGGGCAGCAACACCTATGCCCTGGAGAA
CACTATGATCTTCAACAGCCAGCCGGCGAACCCGGGCACCACCGCCACGTACCT
CGAGGGCAACATGCTCATCACCAGCGAGAGCGAGACGCAGCCGGTGAACCGCGT
GGCGTACAACGTCGGCGGGCAGATGGCCACCAACAACCAGAGCTCCACCACTGC
CCCCGCGACCGGCACGTACAACCTCCAGGAAATCGTGCCCGGCAGCGTGTGGAT
GGAGAGGGACGTGTACCTCCAAGGACCCATCTGGGCCAAGATCCCAGAGACGGG
GGCGCACTTTCACCCCTCTCCGGCCATGGGCGGATTCGGACTCAAACACCCACCG
CCCATGATGCTCATCAAGAACACGCCTGTGCCCGGAAATATCACCAGCTTCTCGG
ACGTGCCCGTCAGCAGCTTCATCACCCAGTACAGCACCGGGCAGGTACCCGTGG
AGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAAAACCTCCAAGAGGTGGAACCCAGAGATC
CAGTACACAACAACACTACAACGACCCCCAGTTTGTGGACTTTGCCCGGACAGC
ACCGGGGAATACAGAAGCACCCAGACCTATCGGAACCCGATACCTTACCCGACCC
CTTAA (SEQ ID NO: 6)

или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A и T711S.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A и T711S" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 6, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 3. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A, S651A и T711S, которая представлена нуклеиновой последовательностью

```
ATGGCTTTTGGTTGATCACCTCCAGATTGGTTGGAAGAAGTTGGTGAAGGTCTTC
GCGAGTTTTTGGGCCTTGAAGCGGGCCACCGAAACCAAAACCCAATCAGCAGC
ATCAAGATCAAGCCCCTGGTCTTGTGCTGCCTGGTTATAACTATCTCGGACCCGG
AAACGGTCTCGATCGAGGAGAGCCTGTCAACAGGGCAGACGAGGTCGCGCGAGA
GCACGACATCTCGTACAACGAGCAGCTTGAGGCGGGAGACAACCCCTACCTCAA
GTACAACCACGCGGACGCCGAGTTTCAGGAGAAGCTCGCCGACGACACATCCTT
CGGGGGAACCTCGGAAAGGCAGTCTTTCAGGCCAAGAAAAGGGTTCTCGAACC
TTTTGGCCTGGTTGAAGAGGGTGCTAAGACGGCCCCTACCGGAAAGCGGATAGA
CGACCACTTCCAAAAAGAAAGAAGGCTCGGACCGAAGAGGACTCCAAGCCTTC
CACCTCGTCAGACGCCGAAGCTGGACCCAGCGGATCCCAGCAGCTGCAAATCCC
AGCCCAACCAGCCTCAAGTTTGGGAGCTGATAACAATGTCTGCGGGAGGTGGCGG
CCCATTGGGCGACAATAACCAAGGTGCCGATGGAGTGGGCAATGCCTCGGGAGA
TTGGCATTGCGATTCCACGTGGATGGGGGACAGAGTCGTCACCAAGTCCACCCG
AACCTGGGTGCTGCCAGCTACAACAACCACCAGTACCGAGAGATCAAAGCGG
CTCCGTCGACGGAAGCAACGCCAACGCCTACTTTGGATACAGCACCCCTGGGG
GTACTTTGACTTTAACCGCTTCCACAGCCACTGGAGCCCCCGAGACTGGCAAAGA
CTCATCAACAATACTACTGGGGCTTCAGACCCCGTCCCTCAGAGTCAAAATCTTCA
ACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGGTGCAGGACTCCACCACCACCATCGCCAACA
ACCTCACCTCCACCGTCCAAGTGTTCACGGACGACGACTACCAGCTGCCCTACGT
CGTCGGCAACGGGACCGAGGGATGCCTGCCGGCCTTCCCTCCGCAGGTCTTTACG
CTGCCGCAGTACGGTTACGCGACGCTGAACCGCGACAACACAGAAAATCCCACC
GAGAGGAGCAGCTTCTTCTGCCTAGAGTACTTTCCAGCAAGATGCTGAGAACG
GGCAACAACCTTTGAGTTTACCTACAACCTTTGAGGAGGTGCCCTTCCACTCCAGCT
TCGCTCCAGTCAGAACCTCTTCAAGCTGGCCAACCCGCTGGTGGACCAGTACTT
GTACCGCTTCGTGAGCACAATAAACAACCTGGCGGAGTCCAGTTCAACAAGAACCT
GGCCGGGAGATACGCCAACACCTACAAAACTGGTTCCCGGGGCCCATGGGCCG
AACCCAGGGCTGGAACCTGGGCTCCGGGGTCAACCGCGCCAGTGTGAGCCCTT
CGCCACGACCAATAGGATGGAGCTCGAGGGCGCGAGTTACCAGGTGCCCCGCA
GCCGAACGGCATGACCAACAACCTCCAGGGCAGCAACACCTATGCCCTGGAGAA
CACTATGATCTTCAACAGCCAGCCGGCGAACCCGGGCACCACCGCCACGTACCT
CGAGGGCAACATGCTCATCACAGCGAGAGCGAGACGCAGCCGGTGAACCGCGT
GGCGTACAACGTCGGCGGGCAGATGGCCACCAACAACCAGAGCTCCACCACTGC
CCCCGCGACCGGCACGTACAACCTCCAGGAAATCGTGCCCGGCAGCGTGTGGAT
GGAGAGGGACGTGTACCTCCAAGGACCCATCTGGGCCAAGATCCCAGAGACGGG
GGCGCACTTTCACCCCTCTCCGGCCATGGGCGGATTCGGACTCAAACACCCACCG
CCCATGATGCTCATCAAGAACACGCTGTGCCCGGAAATATCACAGCTTCgCGG
ACGTGCCCGTCAGCAGCTTCATCACCCAGTACAGCACCGGGCAGGTACCGTGG
AGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAAAACCTCAAGAGGTGGAACCCAGAGATC
CAGTACACAAACAACCTACAACGACCCCCAGTTTGTGGACTTTGCCCCGGACAGC
ACCGGGGAATACAGAAGCACCAGACCTATCGGAACCCGATACCTTACCCGACCC
CTTTAA (SEQ ID NO: 7)
```

или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A, S651A и T711S.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A, S651A и T711S" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 7, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 4. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вышеуказанный VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) дикого типа, представлена нуклеиновой последовательностью

```
ATGTCTTTTGTGATCACCCCTCAGATTGGTTGGAAGAAGTTGGTGAAGGTCTTC
GCGAGTTTTTGGGCCTTGAAGCGGGCCCACCGAAACCAAAACCCAATCAGCAGC
ATCAAGATCAAGCCCGTGGTCTTGTGCTGCCTGGTTATAACTATCTCGGACCCGG
AAACGGTCTCGATCGAGGAGAGCCTGTCAACAGGGCAGACGAGGTCGCGCGAGA
GCACGACATCTCGTACAACGAGCAGCTTGAGGCGGGAGACAACCCCTACCTCAA
GTACAACCACGCGGACGCCGAGTTTCAGGAGAAGCTCGCCGACGACACATCCTT
CGGGGGAAACCTCGGAAAGGCAGTCTTTCAGGCCAAGAAAAGGGTTCTCGAACC
TTTTGGCCTGGTTGAAGAGGGTGCTAAGACGGCCCCTACCGGAAAGCGGATAGA
CGACCACTTCCAAAAAGAAAGAAGGCTCGGACCGAAGAGGACTCCAAGCCTTC
CACCTCGTCAGACGCCGAAGCTGGACCCAGCGGATCCCAGCAGCTGCAAATCCC
AGCCCAACCAGCCTCAAGTTTGGGAGCTGATACAATGTCTGCGGGAGGTGGCGG
CCCATTGGGCGACAATAACCAAGGTGCCGATGGAGTGGGCAATGCCTCGGGAGA
```

TTGGCATTGCGATTCCACGTGGATGGGGGACAGAGTCGTCACCAAGTCCACCCG
 AACCTGGGTGCTGCCCAGCTACAACAACCACCAGTACCGAGAGATCAAAGCGG
 CTCCGTCGACGGAAGCAACGCCAACGCCTACTTTGGATACAGCACCCCTGGGG
 GTACTTTGACTTTAACCGCTTCCACAGCCACTGGAGCCCCCGAGACTGGCAAAGA
 CTCATCAACAACACTACTGGGGCTTCAGACCCCGGTCCTCAGAGTCAAAATCTTCA
 ACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGGTGCAGGACTCCACCACCACCATCGCCAACA
 ACCTCACCTCCACCGTCCAAGTGTACGGACGACGACTACCAGCTGCCCTACGT
 CGTCGGCAACGGGACCGAGGGATGCCTGCCGGCCTTCCCTCCGCAGGTCTTTACG
 CTGCCGAGTACGGTTACGCGACGCTGAACCGCGACAACACAGAAAATCCCACC
 GAGAGGAGCAGCTTCTTCTGCCTAGAGTACTTTCCAGCAAGATGCTGAGAACG
 GGCAACAACCTTTGAGTTTACCTACAACCTTTGAGGAGGTGCCCTTCCACTCCAGCT
 TCGCTCCAGTCAGAACCTCTTCAAGCTGGCCAACCCGCTGGTGGACCAGTACTT
 GTACCGCTTCGTGAGCACAATAAACAACACTGGCGGAGTCCAGTTCAACAAGAACCT
 GGCCGGGAGATACGCCAACACCTACAAAACCTGGTTCCCGGGGCCCATGGGCCG
 AACCCAGGGCTGGAACCTGGGCTCCGGGGTCAACCGCGCCAGTGTACGCGCCTT
 CGCCACGACCAATAGGATGGAGCTCGAGGGCGCGAGTTACCAGGTGCCCCCGCA
 GCCGAACGGCATGACCAACAACCTCCAGGGCAGCAACACCTATGCCCTGGAGAA
 CACTATGATCTTCAACAGCCAGCCGGCGAACCCGGGCACCACCGCCACGTACCT
 CGAGGGCAACATGCTCATCACAGCGAGAGCGAGACGCAGCCGGTGAACCGCGT
 GGCGTACAACGTCGGCGGGCAGATGGCCACCAACAACCAGAGCTCCACCCTGC
 CCCC GCGACCGGCACGTACAACCTCCAGGAAATCGTGCCCGGCAGCGTGTGGAT
 GGAGAGGGACGTGTACCTCCAAGGACCCATCTGGGCCAAGATCCCAGAGACGGG
 GGCGCACTTTACCCCTCTCCGGCCATGGGCGGATTTCGGACTCAAACACCCACCG
 CCCATGATGCTCATCAAGAACACGCCTGTGCCCGGAAATATCACAGCTTCTCGG
 ACGTGCCCGTCAGCAGCTTCATCACCCAGTACAGCACCGGGCAGGTCACCGTGG
 AGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAAAACCTCCAAGAGGTGGAACCCAGAGATC
 CAGTACACAACAACACTACAACGACCCCCAGTTTGTGGACTTTGCCCCGGACAGC
 ACCGGGGAATACAGAACCACCAGACCTATCGGAACCCGATACCTTACCCGACCC
 CTTTAA (SEQ ID NO: 14)

или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) дикого типа.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) дикого типа" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 14, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 1. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей вышеуказанный модифицированный белок VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой T575S, представлена нуклеиновой последовательностью

ACGGCCCCTACCGGAAAGCGGATAGACGACCACTTTCCAAAAAGAAAGAAGGCT
 CGGACCGAAGAGGACTCCAAGCCTTCCACCTCGTCAGACGCCGAAGCTGGACCC
 AGCGGATCCCAGCAGCTGCAAATCCCAGCCCAACCAGCCTCAAGTTTGGGAGCT
 GATACAATGTCTGCGGGAGGTGGCGGCCATTGGGCGACAATAACCAAGGTGCC
 GATGGAGTGGGCAATGCCTCGGGAGATTGGCATTGCGATTCCACGTGGATGGGG
 GACAGAGTCGTCACCAAGTCCACCCGAACCTGGGTGCTGCCCAGCTACAACAAC
 CACCAGTACCGAGAGATCAAAAGCGGCTCCGTCGACGGAAGCAACGCCAACGCC
 TACTTTGGATACAGCACCCCTGGGGGTACTTTGACTTTAACCGCTTCCACAGCC
 ACTGGAGCCCCCGAGACTGGCAAAGACTCATCAACAACACTACTGGGGCTTCAGAC
 CCCGGTCCCTCAGAGTCAAAATCTTCAACATTCAAGTCAAAGAGGTACGGGTGC
 AGGACTCCACCACCACCATCGCCAACAACCTCACCTCCACCGTCCAAGTGTTTAC
 GGACGACGACTACCAGCTGCCCTACGTCGTCGGCAACGGGACCGAGGGATGCCT
 GCCGGCCTTCCCTCCGCAGGTCTTTACGCTGCCGCAGTACGGTTACGCGACGCTG
 AACCGCGACAACACAGAAAATCCCACCGAGAGGAGCAGCTTCTTCTGCCTAGAG
 TACTTTCCAGCAAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTTTACCTACAAC
 TTGAGGAGGTGCCCTTCCACTCCAGCTTCGCTCCCAGTCAGAACCTTCAAGCT
 GGCCAACCCGCTGGTGGACCAGTACTTGTACCGCTTCGTGAGCACAAATAACACT
 GGCGGAGTCCAGTTCAACAAGAACCTGGCCGGGAGATACGCCAACACCTACAAA
 AACTGGTTCCCGGGGCCATGGGCCGAACCCAGGGCTGGAACCTGGGCTCCGGG
 GTCAACCGCGCCAGTGTACGCGCCTTCGCCACGACCAATAGGATGGAGCTCGAG
 GGCGCGAGTTACCAGGTGCCCCGCAGCCGAACGGCATGACCAACAACCTCCAG
 GGCAGCAACACCTATGCCCTGGAGAACAATATGATCTTCAACAGCCAGCCGGCG
 AACCCGGGCACCACCGCCACGTACCTCGAGGGCAACATGCTCATCACAGCGAG
 AGCGAGACGCAGCCGGTGAACCGCGTGGCGTACAACGTCGGCGGGCAGATGGCC
 ACCAACAACCAGAGCTCCACCCTGCCCCGCGACCGGCACGTACAACCTCCAG
 GAAATCGTGCCCGGCAGCGTGTGGATGGAGAGGGACGTGTACCTCCAAGGACCC
 ATCTGGGCCAAGATCCCAGAGACGGGGGCGCACTTTCACCCCTCTCCGGCCATG
 GGCGGATTCGGACTCAAACACCCACCGCCCATGATGCTCATCAAGAACACGCCT
 GTGCCCGGAAATATCACAGCTTCTCGGACGTGCCCGTCAGCAGCTTCATCACCC
 AGTACAGCACCGGGCAGGTCACCGTGGAGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAA
 AACTCCAAGAGGTGGAACCCAGAGATCCAGTACACAAACAACACTACAACGACCCC
 CAGTTTGTGGACTTTGCCCCGGACAGCACCGGGGAATACAGAAGCACCCAGACCT
 ATCGGAACCCGATACCTTACCCGACCCCTTTAA (SEQ ID NO: 15)

или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой T575S.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой T575S" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 15, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 9. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S515A и

T575S имеет любую нуклеиновую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 10. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вышеуказанный VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) дикого типа, представлена нуклеиновой последовательностью

```
ACGGCCCCTACCGGAAAGCGGATAGACGACCACTTTCCAAAAAGAAAGAAGGCT
CGGACCGAAGAGGACTCCAAGCCTTCCACCTCGTCAGACGCCGAAGCTGGACCC
AGCGGATCCCAGCAGCTGCAAATCCCAGCCCAACCAGCCTCAAGTTTGGGAGCT
GATACAATGTCTGCGGGAGGTGGCGGCCATTGGGCGACAATAACCAAGGTGCC
GATGGAGTGGGCAATGCCTCGGGAGATTGGCATTGCGATTCCACGTGGATGGGG
GACAGAGTCGTCACCAAGTCCACCCGAACCTGGGTGCTGCCCAGCTACAACAAC
CACCAGTACCGAGAGATCAAAAGCGGCTCCGTCGACGGAAGCAACGCCAACGCC
TACTTTGGATACAGCACCCCTGGGGTACTTTGACTTTAACCGCTTCCACAGCC
ACTGGAGCCCCGAGACTGGCAAAGACTCATCAACAACACTGGGGCTTCAGAC
CCCGGTCCCTCAGAGTCAAAATCTTCAACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGGTGC
AGGACTCCACCACCACCATCGCCAACAACCTCACCTCCACCGTCCAAGTGTTTAC
GGACGACGACTACCAGCTGCCCTACGTCGTGGCAACGGGACCGGAGGGATGCCT
GCCGGCTTCCCTCCGCAGGTCTTTACGCTGCCGCAGTACGGTTACGCGACGCTG
AACCGCGACAACACAGAAAATCCCACCGAGAGGAGCAGCTTCTTCTGCCTAGAG
TACTTTCCAGCAAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTTTACCTACAAC
TTGAGGAGGTGCCCTTCCACTCCAGCTTCGCTCCCAGTCAGAACCTTCTCAAGCT
GGCCAACCCGCTGGTGGACCAGTACTTGTACCGCTTCGTGAGCACAAATAACACT
GGCGGAGTCCAGTTCAACAAGAACCTGGCCGGGAGATACGCCAACACCTACAAA
AACTGGTTCCCGGGGCCATGGGCCGAACCCAGGGCTGGAACCTGGGCTCCGGG
GTCAACCGCGCCAGTGTACGCGCTTCGCCACGACCAATAGGATGGAGCTCGAG
GGCGCGAGTTACCAGGTGCCCCCGCAGCCGAACGGCATGACCAACAACCTCCAG
GGCAGCAACACCTATGCCCTGGAGAACAACCTATGATCTTCAACAGCCAGCCGGCG
AACCCGGGCACCACCGCCACGTACCTCGAGGGCAACATGCTCATCACCAGCGAG
AGCGAGACGCAGCCGGTGAACCGCGTGGCGTACAACGTCGGCGGGCAGATGGCC
ACCAACAACCAGAGCTCCACCACTGCCCCGCGACCGGCACGTACAACCTCCAG
GAAATCGTGCCCGGCAGCGTGTGGATGGAGAGGGACGTGTACCTCCAAGGACCC
ATCTGGGCCAAGATCCCAGAGACGGGGGCGCACTTTCACCCCTCTCCGGCCATG
GGCGGATTCGGACTCAAACACCCACCGCCCATGATGCTCATCAAGAACACGCCT
GTGCCCGGAAATATCACCAGCTTCTCGGACGTGCCCGTCAGCAGCTTCATCACCC
AGTACAGCACCGGGCAGGTCACCGTGGAGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAA
AACTCCAAGAGGTGGAACCCAGAGATCCAGTACACAACAACCTACAACGACCCC
CAGTTTGTGGACTTTGCCCGGACAGCACCGGGGAATACAGAACCACCAGACCT
ATCGGAACCCGATACCTTACCCGACCCCTTTAA (SEQ ID NO: 16)
```

или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность белка VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) дикого типа.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность белка VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) дикого типа" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 16, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 8. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтерна-

тивных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей вышеуказанный модифицированный белок VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой T519S, представлена нуклеиновой последовательностью

```

ATGTCTGCGGGAGGTGGCGGCCCATTTGGGCGACAATAACCAAGGTGCCGATGGA
GTGGGCAATGCCTCGGGAGATTGGCATTGCGATTCCACGTGGATGGGGGACAGA
GTCGTCACCAAGTCCACCCGAACCTGGGTGCTGCCAGCTACAACAACCACCAG
TACCGAGAGATCAAAAGCGGCTCCGTTCGACGGAAGCAACGCCAACGCTACTTT
GGATACAGCACCCCCTGGGGTACTTTGACTTTAACCGCTTCCACAGCCACTGGA
GCCCCGAGACTGGCAAAGACTCATCAACAACACTACTGGGGCTTCAGACCCCGGT
CCCTCAGAGTCAAAATCTTCAACATTCAGTCAAAAGAGGTCACGGTGCAGGACT
CCACCACCACCATCGCCAACAACCTCACCTCCACCGTCCAAGTGTTCACGGACGA
CGACTACCAGCTGCCCTACGTCGTCGGCAACGGGACCGAGGGATGCCTGCCGGC
CTTCCCTCCGCAGGTCTTTACGCTGCCGCAGTACGGTTACGCGACGCTGAACCGC
GACAACACAGAAAATCCCACCGAGAGGAGCAGCTTCTTCTGCCTAGAGTACTTT
CCCAGCAAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTTTACCTACAACCTTTGAG
GAGGTGCCCTTCCACTCCAGCTTCGCTCCCAGTCAGAACCTCTTCAAGCTGGCCA
ACCCGCTGGTGGACCAGTACTTGTACCGCTTCGTGAGCACAAATAACACTGGCG
GAGTCCAGTTCAACAAGAACCTGGCCGGGAGATACGCCAACACCTACAAAAACT
GGTTCCCGGGGCCCATGGGCCGAACCCAGGGCTGGAACCTGGGCTCCGGGGTCA
ACCGCGCCAGTGTACGCGCCTTCGCCACGACCAATAGGATGGAGCTCGAGGGCG
CGAGTTACCAGGTGCCCCCGCAGCCGAACGGCATGACCAACAACCTCCAGGGCA
GCAACACCTATGCCCTGGAGAACAATATGATCTTCAACAGCCAGCCGGCGAACC
CGGGCACCACCGCCACGTACCTCGAGGGCAACATGCTCATCACCAGCGAGAGCG
AGACGCAGCCGGTGAACCGCGTGGCGTACAACGTCGGCGGGCAGATGGCCACCA
ACAACCAGAGCTCCACCCTGCCCCGCGACCGGCACGTACAACCTCCAGGAAA
TCGTGCCCGGCAGCGTGTGGATGGAGAGGGACGTGTACCTCCAAGGACCCATCT
GGGCCAAGATCCCAGAGACGGGGGCGCACTTTCAACCCTCTCCGGCCATGGGCG
GATTCGGACTCAAACACCCACCGCCCATGATGCTCATCAAGAACACGCCTGTGCC
CGGAAATATCACCAGCTTCTCGGACGTGCCCGTCAGCAGCTTCATCACCCAGTAC
AGCACCGGGCAGGTACCGTGGAGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAAAACCTC
CAAGAGGTGGAACCCAGAGATCCAGTACACAAACAACACTACAACGACCCCCAGTT
TGTGGACTTTGCCCCGGACAGCACCGGGGAATACAGAAGCACCCAGACCTATCGG
AACCCGATACCTTACCCGACCCCTTTAA (SEQ ID NO: 17)

```

или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой T519S.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой T519S" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 17, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 12. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме на-

стоящего изобретения.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S459A и T519S имеет любую нуклеиновую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 13. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вышеуказанный VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) дикого типа, представлена нуклеиновой последовательностью

```

ATGTCTGCGGGAGGTGGCGGCCATTGGGCGACAATAACCAAGGTGCCGATGGA
GTGGGCAATGCCTCGGGAGATTGGCATTGCGATTCCACGTGGATGGGGGACAGA
GTCGTCACCAAGTCCACCCGAACCTGGGTGCTGCCAGCTACAACAACCACCAG
TACCGAGAGATCAAAAGCGGCTCCGTCGACGGAAGCAACGCCAACGCCTACTTT
GGATACAGCACCCCCTGGGGGTACTTTGACTTTAACCCTTCCACAGCCACTGGA
GCCCCGAGACTGGCAAAGACTCATCAACAATACTGGGGCTTCAGACCCCGGT
CCCTCAGAGTCAAAATCTTCAACATTCAGTCAAAGAGGTACCGGTGCAGGACT
CCACCACCACCATCGCCAACAACCTCACCTCCACCGTCCAAGTGTTCACGGACGA
CGACTACCAGCTGCCCTACGTCGTCGGCAACGGGACCGAGGGATGCCTGCCGGC
CTTCCCTCCGCAGGTCTTTACGCTGCCGCAGTACGGTTACGCGACGCTGAACCGC
GACAACACAGAAAATCCCACCGAGAGGAGCAGCTTCTTCTGCCTAGAGTACTTT
CCCAGCAAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTTTACCTACAACCTTTGAG
GAGGTGCCCTTCCACTCCAGCTTCGCTCCCAGTCAGAACCTCTTCAAGCTGGCCA
ACCCGCTGGTGGACCAGTACTTGTACCGCTTCGTGAGCACAATAACACTGGCG
GAGTCCAGTTCAACAAGAACCTGGCCGGGAGATACGCCAACACCTACAAAACT
GGTTCCCGGGGCCCATGGGCCGAACCCAGGGCTGGAACCTGGGCTCCGGGGTCA
ACCGCGCCAGTGTGACGCGCTTCGCCACGACCAATAGGATGGAGCTCGAGGGCG
CGAGTTACCAGGTGCCCCCGCAGCCGAACGGCATGACCAACAACCTCCAGGGCA
GCAACACCTATGCCCTGGAGAACAATAATGATCTTCAACAGCCAGCCGGCGAACC
CGGGCACCAACCGCCACGTACCTCGAGGGCAACATGCTCATCACAGCGAGAGCG
AGACGCAGCCGGTGAACCGCGTGGCGTACAACGTCGGCGGGCAGATGGCCACCA
ACAACCAGAGCTCCACCACTGCCCCCGCAGCCGGCACGTACAACCTCCAGGAAA
TCGTGCCCGGCAGCGTGTGGATGGAGAGGGACGTGTACCTCCAAGGACCCATCT
GGGCCAAGATCCCAGAGACGGGGGCGCACTTTCACCCCTCTCCGGCCATGGGCG
GATTCGGACTCAAACACCCACCGCCCATGATGCTCATCAAGAACACGCCTGTGCC
CGGAAATATCACAGCTTCTCGGACGTGCCCGTCAGCAGCTTCATCACCCAGTAC
AGCACCGGGCAGGTACCGTGGAGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAAAACCTC
CAAGAGGTGGAACCCAGAGATCCAGTACACAACAACCTACAACGACCCCCAGTT
TGTGGACTTTGCCCGGACAGCACCGGGGAATACAGAACCACCAGACCTATCGG
AACCCGATACCTTACCCGACCCCTTTAA (SEQ ID NO: 18)

```

или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность белка VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) дикого типа.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность белка VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) дикого типа" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 18, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 11. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности.

Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей вышеуказанный капсид, который используется для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вышеуказанный капсид, включает любую из вышеуказанных последовательностей нуклеиновых кислот.

Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5) для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

- 1) вышеуказанный капсид, и
- 2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию целевого продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

Вектор rAAV по изобретению не содержит нуклеотидные последовательности генов, кодирующих неструктурные белки (Rep) и структурные белки (Cap).

Характеристика капсида подробно описана в вышеуказанном разделе описания.

В некоторых вариантах вектор на основе rAAV5 имеет продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.

В некоторых вариантах вектор на основе rAAV5 содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой терапевтический полипептид, где терапевтический полипептид представляет собой фактор свертывания крови, выбираемый из группы, состоящей из фактора VIII, фактора IX или их функционального варианта.

В некоторых вариантах вектор на основе rAAV5 содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой фактор VIII или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах вектор на основе rAAV5 содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой фактор IX или его функциональный вариант.

Фармацевтическая композиция.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, которая содержит:

- a) вышеуказанный вектор на основе rAAV5; и
- b) фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция используется для доставки генного продукта нуждающемуся в этом человеку.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу на основе rAAV5 по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе или в других лекарственных соединениях, фармацевтические агенты, носители, адьюванты, разбавители и т.д. Носитель для инъекций обычно является жидким. Носитель для других способов введения может быть или твердым, или жидким, таким как стерильная апиrogenная вода или стерильный апиrogenный фосфатно-солевой буферный раствор. Для введения путем ингаляции носитель является вдыхаемым и предпочтительно находится в твердой или жидкой дисперсной форме. В качестве инъекционной среды предпочтительно использовать воду, содержащую добавки, общепринятые для инъекционных растворов, такие как стабилизирующие агенты, соли или солевые растворы и/или буферы.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку, в которой вектор на основе rAAV5 интегрирован в геном, в фармацевтически приемлемом носителе или других лекарственных соединениях, фармацевтических агентах, носителях, адьювантах, разбавителях и т.д.

"Фармацевтическая композиция" обозначает композицию, включающую в себя вышеуказанный вектор на основе rAAV5, согласно изобретению и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых эксципиентов, таких как наполнители, растворители, разбавители, носители, вспомогательные, распределяющие, средства доставки, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их изготовления будут бесспорно очевидными для специалистов в этой области. Производство фармацевтических композиций предпочтительно должно соответствовать требованиям GMP (надлежащей производственной практики). Композиция может включать буферную композицию, тонические агенты, стабилизаторы и солюбилизаторы.

"Фармацевтически приемлемым" считается материал, который не имеет биологических или других

противопоказаний, например, материал можно вводить субъекту без каких-либо нежелательных биологических эффектов. Таким образом, такие фармацевтические композиции можно использовать, например, для трансфекции клетки *ex vivo* или для введения *in vivo* вирусной частицы или клетки непосредственно субъекту.

Термин "эксципиент" или "вспомогательное вещество" используется в данном документе для описания любого компонента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению. Это вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Под "стабилизатором" понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного агента.

Под термином "буфер", "буферная композиция", "буферный агент" понимается раствор, способный сохранять значение pH, благодаря взаимодействию кислотных и щелочных компонентов, входящих в его состав, который дает возможность препарату вектора на основе gAAV5, проявлять устойчивость к изменениям pH. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0. В качестве буферных агентов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и т.п. буферные растворы, но, не ограничиваясь ими.

Фармацевтическая композиция является "стабильной", если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2-8°C. Предпочтительно, чтобы активный агент сохранял и физическую, и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может изготавливаться, упаковываться или широко продаваться в виде единичной стандартной дозы или множества единичных стандартных доз в виде готовой лекарственной формы. Используемый в данном документе термин "единичная стандартная доза" означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, который будет вводиться субъекту, или удобной части такой дозировки, например, половине или трети такой дозировки.

Способ доставки генного продукта.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, который включает введение субъекту вышеуказанного вектора на основе gAAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах способ доставки генного продукта используется для доставки генного продукта нуждающемуся в этом человеку.

Любой способ введения вектора на основе gAAV5, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для вышеуказанного вектора на основе gAAV5, по данному изобретению.

Рекомбинантные вирусные векторы на основе gAAV5 предпочтительно вводят в клетку в биологически эффективном количестве. "Биологически эффективное" количество вирусного вектора представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать инфекцию (или трансдукцию) и экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке. Если вирус вводят в клетку *in vivo* (например, вирус вводят субъекту, как описано ниже), "биологически эффективное" количество вирусного вектора представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать трансдукцию и экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-мишени.

Клетка для введения вирусного вектора на основе gAAV5 по изобретению может быть клеткой любого типа, включая в себя без ограничения нервные клетки (включающие в себя клетки периферической и центральной нервной системы, в частности, клетки головного мозга), легочные клетки, эпителиальные клетки (например, эпителиальные клетки кишечника и дыхательных путей), мышечные клетки, клетки поджелудочной железы (в том числе островковые клетки), печеночные клетки, клетки миокарда, костные клетки (например, стволовые клетки костного мозга), гемопоэтические стволовые клетки, клетки селезенки, кератиноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки, клетки предстательной железы, половые клетки и тому подобное. Альтернативно, клетка для введения вирусного вектора на основе gAAV5 может быть любой клеткой-предшественником. В качестве дополнительной альтернативы, клетки могут представлять собой стволовые клетки (например, нервные стволовые клетки, стволовые клетки печени). Кроме того, клетки могут происходить от любых видов, как указано выше.

Применение

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного вектора на основе gAAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

В некоторых вариантах применение используется для лечения заболевания у нуждающегося в этом человека.

Введение вектора на основе гAAV5 по настоящему изобретению субъекту-человеку или животному, нуждающемуся в этом, можно проводить любым известным в данной области способом для введения вирусных векторов.

Примеры способов введения включают в себя местное применение, пероральное, ректальное, чрез-слизистое, трансдермальное, ингаляционное, парентеральное введение (например, внутривенное, подкожное, внутрикожное, внутримышечное и внутрисуставное) и т.п., а также инъекции непосредственно в ткань или в орган и, альтернативно, интратекальные, непосредственно внутримышечные, внутрижелудочковые, внутривенные, внутривентрикулярные, интраназальные или внутриглазные инъекции. Инъекционные препараты могут быть приготовлены в общепринятых лекарственных формах: в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для приготовления растворов или суспензий в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Альтернативно, можно вводить вектор на основе гAAV5 локально, а не системно, например, в виде депо или в композиции с замедленным высвобождением.

В некоторых вариантах применения заболевание выбирают из группы: заболевания крови; заболевания центральной нервной системы; заболевания метаболизма; заболевания мышц; наследственные заболевания.

В некоторых вариантах применения заболевание представляет собой заболевание крови.

В некоторых вариантах применения заболевание представляет собой заболевание мышц.

В некоторых вариантах применения заболевание представляет собой наследственное заболевание.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения рассматриваемая нуклеотидная последовательность, которая доставляется вектором на основе гAAV5 в печень субъекта. Введение в печень можно осуществлять любым способом, известным в данной области и включающим в себя без ограничения внутривенное введение, внутрипортальное введение, интрабилиарное введение, внутриартериальное введение и непосредственную инъекцию в паренхиму печени.

Предпочтительно клетки (например, клетки печени) инфицируются вектором на основе гAAV5, кодирующим пептид или белок, эти клетки экспрессируют кодированный пептид или белок и выделяют его в кровеносную систему в терапевтически эффективном количестве (как описано ниже). Альтернативно, доставка и экспрессия вектора происходит в другой клетке или ткани, включающей в себя без ограничения головной мозг, поджелудочную железу, селезенку или мышцы.

Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевается количество, которое достаточно для облегчения (например, для смягчения, уменьшения, снижения) по меньшей мере одного из симптомов, связанных с патологическим состоянием. Другими словами, "терапевтически эффективное" количество представляет собой количество, которое достаточно для обеспечения некоторого улучшения состояния субъекта.

В некоторых вариантах применения продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой фактор IX или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах применения продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой фактор VIII или его функциональный вариант.

В других предпочтительных вариантах осуществления вектор на основе гAAV5 по изобретению вводят внутримышечно, более предпочтительно, путем внутримышечной инъекции или путем местного применения (как описано выше). В других предпочтительных вариантах осуществления парвовирусные частицы по настоящему изобретению вводят в легкие.

Вектор на основе гAAV5, раскрытый в изобретении, можно вводить в легкие субъекта с помощью любых подходящих способов, но предпочтительным является введение в форме аэрозольной суспензии вдыхаемых частиц, состоящих из парвовирусного вектора на основе гAAV5 по изобретению, который вдыхается субъектом. Вдыхаемые частицы могут быть жидкими или твердыми. Аэрозоли из жидких частиц, содержащих парвовирусные векторы на основе гAAV5 по изобретению, можно делать любыми подходящими способами, например, в виде аэрозольного ингалятора под давлением или ультразвукового распылителя, которые известны специалистам в данной области техники. Также можно делать аэрозоли твердых частиц, содержащие вирусные векторы на основе гAAV5 по изобретению, с любым генератором твердых лекарственных аэрозольных частиц с помощью известных в фармацевтической области технологий.

Дозировки парвовирусных частиц на основе гAAV5 по изобретению будут зависеть от способа введения, заболевания или состояния, подлежащего лечению, от состояния субъекта, конкретного вирусного вектора и доставляемого гена, и их можно определять рутинными способами. Примерными дозами для достижения терапевтического эффекта являются вирусные титры, составляющие по меньшей мере примерно 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} трансдуцирующих единиц или больше, предпочтительно приблизительно от 10^8 до 10^{13} трансдуцирующих единиц, еще более предпочтительно 10^{12} трансдуцирующих единиц.

Таким образом, парвовирусные векторы на основе гAAV5, реагенты и способы по настоящему изобретению можно использовать для направления нуклеиновой кислоты в делящиеся или неделящиеся клетки и для стабильной экспрессии в этих клетках гетерологичной нуклеиновой кислоты. С использованием этой векторной системы стало возможно вводить в клетки в условиях *in vivo* гены, которые кодируют белки, влияющие на физиологию клеток. Таким образом, векторы по настоящему изобретению мо-

гут быть полезными в генной терапии при патологических состояниях.

Настоящее изобретение можно использовать для доставки любой чужеродной нуклеиновой кислоты с биологическим эффектом для лечения или ослабления симптомов, связанных с каким-либо расстройством, обусловленным генной экспрессией. Примеры патологических состояний включают в себя без ограничения кистозный фиброз (и другие заболевания легких), гемофилию А, гемофилию В, талассемию, анемию и другие нарушения свертываемости крови, СПИД, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, эпилепсию и другие неврологические расстройства, сахарный диабет, мышечные дистрофии (например, Дюшенна, Беккера), болезнь Гоше, болезнь Херлера, дефицит аденозиндеаминазы, болезни накопления гликогена и другие метаболические дефекты, заболевания солидных органов (например, мозга, печени, почек, сердца) и тому подобное.

Перенос генов обладает значительным потенциалом применения для понимания и создания способов лечения патологических состояний. Существует ряд наследственных заболеваний, для которых были изучены и клонированы дефектные гены. В некоторых случаях известна функция этих клонированных генов. В целом, упомянутые выше патологические состояния делятся на два класса: дефицитные состояния, как правило, дефицит ферментов, которые обычно наследуются рецессивным образом, и состояния нарушения баланса, иногда с вовлечением по меньшей мере регуляторных или структурных белков, которые наследуются доминантным образом. При дефицитных заболеваниях можно использовать перенос генов, чтобы внести нормальный ген в пораженные ткани для заместительной терапии. При патологических состояниях нарушения баланса перенос генов можно использовать для создания патологического состояния в смоделированной системе, которую затем можно использовать для разработки мер против этого патологического состояния. Таким образом, способы по настоящему изобретению позволяют лечить генетические заболевания. Согласно изобретению, патологическое состояние лечится путем частичного или полного устранения дефекта или дисбаланса, который вызывает заболевание или усугубляет степень его тяжести. Также возможно использование сайт-специфичной интеграции нуклеиновых последовательностей для запуска мутаций или исправления дефектов.

Способ получения вектора на основе гAAV5.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения вышеуказанного вектора на основе гAAV5, который включает трансфекцию клеток-продуцентов вышеуказанной нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, кодирующую капсид, включающий модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В некоторых вариантах способа получения вектора на основе гAAV5 используется вышеуказанная нуклеиновая кислота, которая содержит последовательность, кодирующую вышеуказанный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), белок VP2 капсида AAV5 или его модифицированный вариант и белок VP3 капсида AAV5 или его модифицированный вариант.

Под модифицированными вариантами белка VP2 капсида AAV5 дикого типа и белка VP3 капсида AAV5 подразумеваются варианты белка VP2 капсида AAV5 дикого типа и белка VP3 капсида AAV5, которые включают одну или несколько аминокислотных замен.

Особенно предпочтительные варианты включают замены, которые являются консервативными по природе, т.е. те замены, которые имеют место в семействе аминокислот, которые объединены по их боковым цепям. В частности, аминокислоты обычно делят на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Например, достаточно обосновано предсказание о том, что выделенная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или схожая консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не окажет важного влияния на биологическую активность. Например, полипептид, представляющий интерес, может включать вплоть до приблизительно 5-10 консервативных или неконсервативных аминокислотных замен, или даже вплоть до приблизительно 15-25 или 50 консервативных или неконсервативных аминокислотных замен, или любое число от 5 до 50 при условии, что желаемая функция молекулы остается незатронутой.

В некоторых вариантах способа получения вектора на основе гAAV5 используется вышеуказанная нуклеиновая кислота, которая содержит последовательность, кодирующую вышеуказанный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), белок VP2 капсида AAV5 дикого типа и белок VP3 капсида AAV5 дикого типа.

Модифицированные варианты белков VP2 и VP3 капсида AAV5, а также нуклеиновые кислоты их кодирующие, подробно описаны в соответствующих разделах описания.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем

иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы.

Методы рекомбинантной ДНК.

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов.

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 4000 п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК.

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сенгеру.

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях. Применяли пакет программ Infomax's Vector NTI Advance suite, версия 8.0 и SnapGene Viewer для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Пример 1. Получение библиотек вариантов капсидов AAV5.

Получение библиотек вариантов капсидов AAV5 производили методом случайного мутагенеза последовательности гена Cap (Davidsson M. et al., 2016). Вкратце, последовательность дикого типа гена Cap пятого серотипа (GenBank ID AF085716.1) была собрана *de novo*, после чего синтезированный геном капсида AAV5 дикого типа фрагментировали с использованием урацил-ДНК-гликозилазы, полученные фрагменты собирали в полноразмерный ген Cap с помощью ДНК-полимеразы, не обладающей корректирующей активностью (в результате в последовательности возникали случайные мутации). Полноразмерные мутантные варианты клонировали в плазмиду-носитель pAAV-linker (фиг. 1.) по сайтам рестрикции AscI/EcoRI в общую рамку считывания с зеленым флуоресцентным белком (GFP), продуцируя многообразную случайную библиотеку капсидов AAV5, которую затем использовали для отбора вариантов капсидов с повышенной трансдуцирующей активностью.

Положительный отбор вирусных частиц с повышенной трансдуцирующей активностью проводили *in vitro* на клетках линии CHO-K1-S. При этом для трансдукции использовали частицы, очищенные с помощью УЦФ в градиенте йодиксанола. Спустя 48 ч клетки собирали и выделяли геномную ДНК для последующей амплификации последовательностей геномов вирусов, способных к эффективной трансдукции. Полученные последовательности затем переклонировали и повторно нарабатывали для последующих итераций отбора с целью обогащения библиотеки вариантами с наибольшей эффективностью трансдукции. После 5 раундов отбора капсидные гены 30 клонов просеквенировали для определения наиболее успешных мутаций и их сочетаний. По результатам секвенирования преобладающими сочетаниями мутаций оказались S2A, T711S в VP1 AAV5 и варианты капсидов содержащие S2A, T711S, S651A в VP1 AAV5 - порядка 20% клонов. Также были отобраны варианты капсидов, содержащие мутацию S651A в VP1 AAV5. Данные варианты капсидов клонировали в вектора для наработки вирусных частиц и в дальнейшем использовали для визуализации и сравнения профилей трансдукции относительно AAV5 дикого типа.

Пример 2. Нарботки и последующий отбор рекомбинантных вирусных частиц из полученной библиотеки последовательностей.

Для наработки и последующего отбора рекомбинантных вирусных частиц из полученной библиотеки последовательностей была разработана серия плазмид: плазида-носитель, плазида, содержащая последовательность гена Rep, а также конструкция, содержащая аденовирусные гены, необходимые для репликации вирусных частиц.

Плазида-носитель pAAV-linker (фиг. 1.), предназначенная для клонирования библиотек случайных вариантов гена капсида AAV пятого серотипа в одну рамку считывания с репортерным белком, была получена путем замены последовательности модифицированного зеленого флуоресцентного белка в исходной конструкции pAAV-GFP Control plasmid (VPK-402) от CellBiolab (США), с помощью рестриктазно-лигазного метода клонирования по сайтам HindIII/EcoRI, на последовательность T2A-GFP, синтезированной *de novo* с добавлением сайтов рестрикции EcoRI с 5'-конца и HindIII с 3'-конца.

Плазида pAAV-Rep, содержащая последовательность гена Rep (фиг. 2.), была получена путем клонирования *de novo* синтезированной последовательности гена Rep AAV второго серотипа (GenBank ID AF043303.1) по сайтам рестрикции PciI/PsiI (New England Biolabs, США) с последующей обработкой T4 DNA Polymerase (New England Biolabs, США) для получения "тупых" концов, в плазмиду pGem-T Easy (Promega, США) так же обработанную рестриктазами PciI/PsiI (New England Biolabs, США)

В качестве источника аденовирусных генов для наработки рекомбинантных вирусных частиц была

использована конструкция рHelper (фиг. 3) из коммерческого набора AAV-2 Packaging System (VPK-402) от CellBiolab (США), содержащая AmpR - ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину, Ori- ориджин репликации в бактериях, Adeno E2A - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК, Adeno E4 - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК, Adeno VARNA - последовательность гена хелперного аденовируса отвечающая за стимуляцию трансляции как ранних, так и поздних вирусных генов

Пример 3. Способ получения векторов на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (gAAV).

Для получения частиц gAAV с модифицированным капсидом 5 серотипа, клетки-продуценты трансфицировали одновременно 3 плазмидами:

1) плазмидой, содержащей нуклеотидные последовательности аденовируса, кодирующие белки и РНК, необходимые для сборки частиц gAAV (хелперная плазида);

2) плазмидой, содержащей нуклеотидную природную последовательность гена Rep аденоассоциированного вируса 2 серотипа, а также последовательность модифицированного гена Cap, которую выбирают из группы: нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 5, 6 или 7 или любая другая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок VP1 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 2, 3 или 4 и белки VP2 и VP3 с альтернативных рамок считывания используемой нуклеотидной последовательности, где

VP2 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 8, 9 или 10;

а VP3 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11, 12 или 13;

3) плазмидой, содержащей гетерологичный геном частицы gAAV, кодирующий целевой ген, предназначенный для доставки в клетки пациента.

Данный набор генов обеспечивает сборку вирусных частиц gAAV и инкапсидирование в них целевого генома в течение 72 ч. Через 72 ч после трансфекции клетки-продуценты подвергают лизису с высвобождением частиц gAAV и очищают последовательными стадиями фильтрации и хроматографии. Титр очищенных частиц gAAV проверяют с помощью иммуноферментного анализа и количественной ПЦР.

Пример 4. Увеличение эффективности трансдукции клеток препаратами на основе gAAV5 при наличии мутаций S2A, S651A, T711S в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа.

Дизайн эксперимента.

В лунки 12-луночных планшетов были посеяны клетки линии CHO-K1-S. Посев проводили в ростовую среду: DMEM/F12 с глутамином, содержание глюкозы 4,5 г/л, 5% сыворотки крупного рогатого скота. Плотность посадки клеток составила 10 000 клеток/см². При постановке трансдукции подготовленные заранее клетки были трансдуцированы при MOI 100 000 вг/клетка. Все образцы были поставлены в трипликатах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

Анализ эффективности трансдукции проводили с помощью проточного цитометра Guava EasyCyte и программного обеспечения GuavaSoft.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, которые выбраны из группы S2A, S651A или T711S в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа, приводило к существенному увеличению эффективности доставки трансгена векторами на основе gAAV с указанными выше мутациями. К примеру, при помощи метода проточной цитометрии удалось выявить изменение количества GFP позитивных клеток спустя 48 ч после трансдукции линии CHO-K1-S препаратами на основе gAAV с белком VP1 капсида AAV5 дикого типа или белком VP1 капсида AAV5 дикого типа, несущим одну или несколько мутаций, которые выбраны из группы: S2A, S651A, T711S (фиг. 4).

При наличии мутации S651A (AAV5-01Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,2 раза с 22,54% до 49,45% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A и T711S (AAV5-02Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,6 раза с 22,54% до 58,51% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S651A и T711S (AAV5-03Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,7 раз с 22,54% до 38,27% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

Пример 5. Увеличение продукции целевого белка, кодируемого трансгеном, после трансдукции клеток препаратами на основе gAAV5 при наличии мутаций S2A, S651A, T711S в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа.

Дизайн эксперимента.

В лунки 12-луночных планшетов были посеяны клетки линии CHO-K1-S. Посев проводили в ростовую среду: DMEM/F12 с глутамином, содержание глюкозы 4,5 г/л, 5% сыворотки крупного рогатого скота. Плотность посадки клеток составила 10 000 клеток/см². При постановке трансдукции подготовленные заранее клетки были трансдуцированы при MOI 100 000 вг/клетка. Все образцы были поставлены в трипликатах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

Анализ количества белка FIX в культуральной жидкости 7 дней спустя после трансдукции оцени-

вался при помощи набора ИФА Human Factor IX ELISA Kit. Использованное разведение образцов - 1:25. Процедура была проведена согласно инструкции производителя.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, которые выбраны из группы: S2A, S651A, T711S в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа, приводило к существенному увеличению продукции белка hFIX после трансдукции клеток линии CHO-K1-S векторами на основе gAAV с указанными выше мутациями. К примеру, метод иммуоферментного анализа (ИФА) позволил выявить повышение количества белка hFIX в среде культивирования спустя 7 дней после трансдукции клеток линии CHO-K1-S препаратами на основе gAAV с белком VP1 капсида AAV5 дикого типа или белком VP1 капсида AAV5 дикого типа, несущим одну или несколько мутаций, которые выбраны из группы: S2A, S651A, T711S (фиг. 5.).

При наличии мутации S651A (AAV5-01Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 4,6 раза с 0,17 нг/мл до 0,74 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A и T711S (AAV5-02Mut-GFP) количество продуцируемого белка увеличивалось в 7,1 раза с 0,17 нг/мл до 1,24 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S651A и T711S (AAV5-03Mut-GFP) количество продуцируемого белка увеличивалось в 3,3 раза с 0,17 нг/мл до 0,57 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней, содержащий аминокислотную последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа, кодируемую геном Cap, с одной или несколькими заменами, которые выбраны из группы:

S651A,
S2A и T711S,
S2A, S651A и T711S,

где аминокислотная последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1.

2. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.1, который включает одну замену в положении S651A.

3. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.2, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2.

4. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.1, который включает замены S2A и T711S.

5. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.4, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3.

6. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.1, который включает замены S2A, S651A и T711S.

7. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.6, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4.

8. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) по любому из пп.1-7, который используется для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней.

9. Выделенная нуклеиновая кислота по п.8, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой S651A, которая представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 5 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

10. Выделенная нуклеиновая кислота по п.8, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A и T711S, которая представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 6 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

11. Выделенная нуклеиновая кислота по п.8, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A, S651A и T711S, которая представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 7 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

12. Выделенный капсид для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней, который включает модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) по любому из пп.1-7.

13. Выделенный капсид по п.12, который включает модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) по любому из пп.1-7, белок VP2 капсида AAV5 или его

модифицированный вариант и белок VP3 капсида AAV5 или его модифицированный вариант.

14. Выделенный капсид по п.13, который включает белок VP2 капсида AAV5 дикого типа.

15. Выделенный капсид по п.14, который включает белок VP2 капсида AAV5 дикого типа, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 8.

16. Выделенный капсид по п.13, который включает модифицированный белок VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

17. Выделенный капсид по п.16, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T575S.

18. Выделенный капсид по п.17, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T575S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9.

19. Выделенный капсид по п.16, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены S515A и T575S.

20. Выделенный капсид по п.19, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены S515A и T575S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10.

21. Выделенный капсид по п.13, который включает белок VP3 капсида AAV5 дикого типа.

22. Выделенный капсид по п.21, который включает белок VP3 капсида AAV5 дикого типа, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 11.

23. Выделенный капсид по п.13, который включает модифицированный белок VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

24. Выделенный капсид по п.23, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T519S.

25. Выделенный капсид по п.24, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T519S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12.

26. Выделенный капсид по п.23, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены S459A и T519S.

27. Выделенный капсид по п.26, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены S459A и T519S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 13.

28. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая капсид по любому из пп.12-27, который используется для высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней.

29. Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5) для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

1) капсид по любому из пп.12-27, и

2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

30. Вектор на основе rAAV5 по п.29, где продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.

31. Вектор на основе rAAV5 по п.30, где терапевтический полипептид представляет собой фактор свертывания крови, выбираемый из группы, состоящей из фактора VIII, фактора IX или их функционального варианта.

32. Вектор на основе rAAV5 по п.31, где терапевтический пептид представляет собой фактор VIII или его функциональный вариант.

33. Вектор на основе rAAV5 по п.31, где терапевтический пептид представляет собой фактор IX или его функциональный вариант.

34. Фармацевтическая композиция для доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, содержащая:

а) вектор на основе rAAV5 по любому из пп.29-33; и

б) фармацевтически приемлемый эксципиент.

35. Фармацевтическая композиция по п.34, где субъект представляет собой человека.

36. Способ доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, который включает введение субъекту вектора на основе rAAV5 по любому из пп.29-33 или фармацевтической композиции по п.34.

37. Способ доставки генного продукта по п.36, где субъект представляет собой человека.

38. Применение вектора на основе rAAV5 по любому из пп.29-33 или фармацевтической композиции по п.34 для лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

39. Применение по п.38, где субъект представляет собой человека.

40. Применение по п.38, где заболевание выбирают из группы: заболевания крови; заболевания центральной нервной системы; заболевания метаболизма; заболевания мышц; наследственные заболевания.

41. Применение по п.40, где заболевание представляет собой заболевание крови.

42. Применение по п.41, где продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой

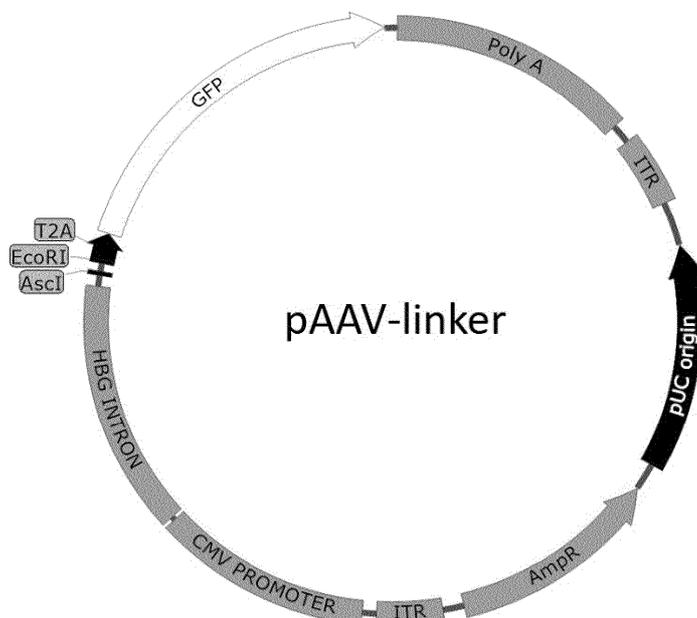
кислоты представляет собой фактор IX или его функциональный вариант.

43. Применение по п.41, где продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой фактор VIII или его функциональный вариант.

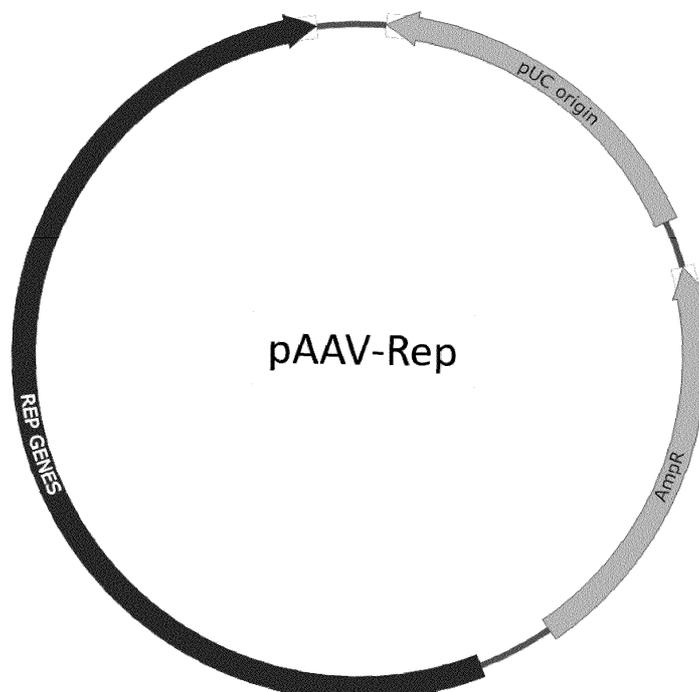
44. Применение по п.40, где заболевание представляет собой заболевание мышц.

45. Применение по п.40, где заболевание представляет собой наследственное заболевание.

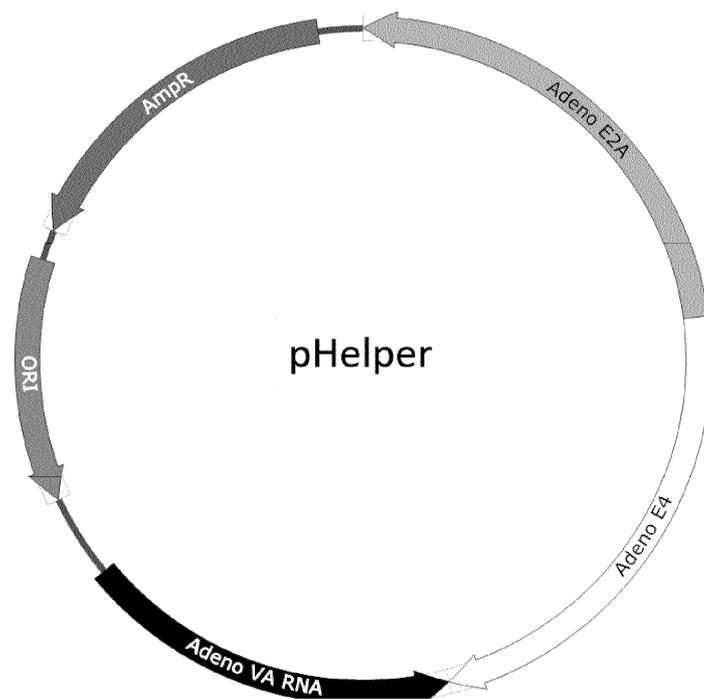
46. Способ получения вектора на основе rAAV5 по любому из пп.29-33, который включает трансфекцию клеток-продуцентов нуклеиновой кислотой по п.28.



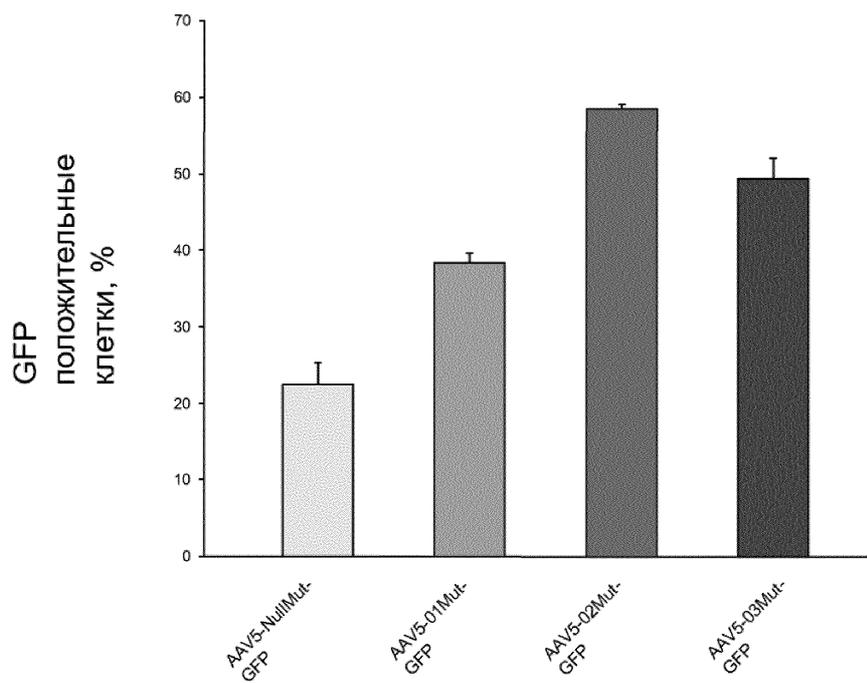
Фиг. 1



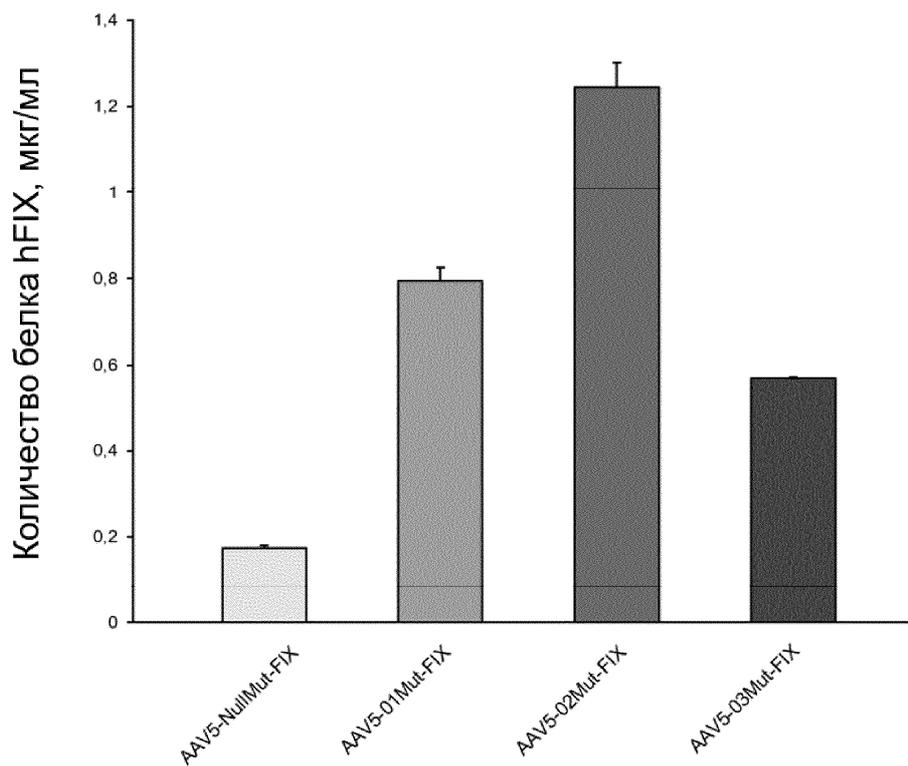
Фиг. 2



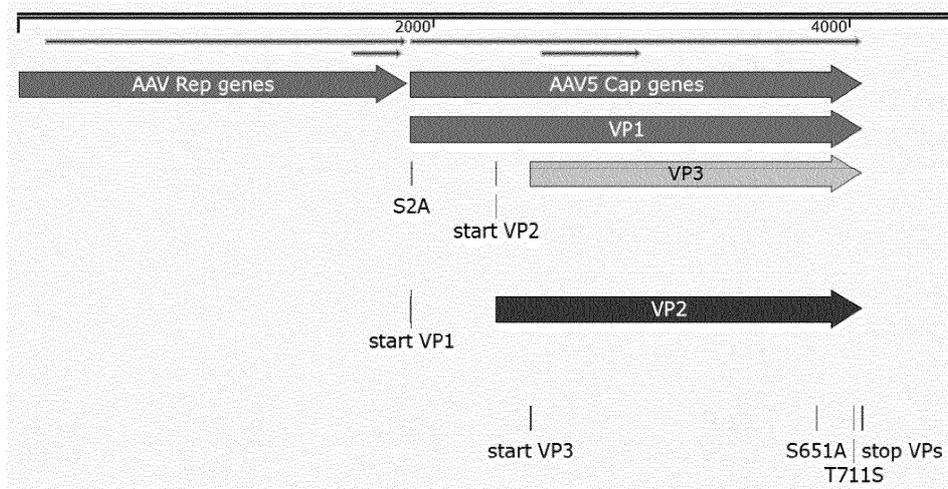
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

