

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293467** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.08.24

(51) Int. Cl. **C12N 15/90** (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
C12N 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.27

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФУНКЦИИ ГЕНА РАН И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/030,341; 63/117,252**

(32) **2020.05.27; 2020.11.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/070615**

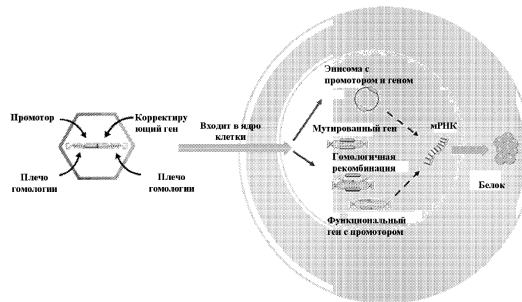
(87) **WO 2021/243364 2021.12.02**

(71) Заявитель:
**ХОМОЛОДЖИ МЕДИСИНС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Райт Джейсон Боук, Сукиасян
Даниелль Лорен, Ст. Мартин Тиа
Бэбовал, Фрэнкоун Омар, Сеймур
Альберт Барнс (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе предусмотрены композиции на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), которые способны обеспечивать восстановление функции гена фенилаланингидроксилазы (PAH) в клетках, и способы их применения для лечения заболеваний, ассоциированных со снижением функции гена PAH (например, PKU). Также предусмотрены нуклеиновые кислоты, векторы, системы упаковки и способы получения композиций на основе аденоассоциированного вируса.



202293467
A1

202293467

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576668EA/019

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФУНКЦИИ ГЕНА РАН И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/030341, поданной 27 мая 2020 года, и 63/117252, поданной 23 ноября 2020 года, полные раскрытия которых настоящим включены в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте (указанная копия в формате ASCII, созданная 24 мая 2021 года, называется «404217-NMW-040WO-183161_SL.txt» и имеет размер 213352 байта).

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Фенилкетонурия (PKU) представляет собой аутосомно-рецессивное генетическое нарушение, где большинство случаев вызвано мутациями в гене фенилаланингидроксилазы (PAH). Ген PAH кодирует печеночный фермент, который катализирует гидроксилирование L-фенилаланина (Phe) до L-тирозина (Tyr) при мультимеризации. Снижение или утрата активности PAH приводит к накоплению фенилаланина и его превращению в фенилпируват (также известный как фенилкетон). Данная аномалия в метаболизме фенилаланина нарушает созревание нейронов и синтез миелина, что приводит к задержке умственного развития, судорожным припадкам и другим серьезным медицинским проблемам.

[0004] В настоящее время лечения PKU не существует. Стандартное лечение представляет собой соблюдение диеты с минимизацией потребления продуктов, которые содержат большие количества фенилаланина. Соблюдение диеты с момента рождения с использованием смеси для детского питания с низким содержанием фенилаланина в значительной степени предупреждает развитие неврологических последствий нарушения. Однако даже при соблюдении диеты с низким содержанием белка дети все еще страдают от задержки роста, и у взрослых часто имеется остеопороз и дефицит витаминов. Более того, сложно соблюдать пожизненное диетическое лечение, в частности после школьного возраста.

[0005] В последнее время появились новые стратегии лечения, в том числе дополнение рациона крупными нейтральными аминокислотами (LNAA), терапия с применением кофактора тетрагидробиоптерина, ферментозаместительная терапия и терапия с применением генетически модифицированных пробиотиков. Однако данные стратегии страдают от недостатков. Дополнение рациона LNAA подходит только для взрослых, не придерживающихся диеты с низким содержанием Phe. Кофактор тетрагидробиоптерин можно применять только при некоторых легких формах PKU.

Замещение ферментов путем введения заместителя для РАН, например, фенилаланинаммиаклиазы (PAL), может приводить к иммунным ответам, которые снижают эффективность и/или вызывают побочные эффекты. Что касается терапии с применением генетически модифицированных пробиотиков, опасение вызывает патогенность *E. coli*, экспрессирующей PAL.

[0006] Генная терапия обеспечивает уникальную возможность вылечить PKU. Векторы на основе ретровирусов, в том числе векторы на основе лентивирусов, способны интегрировать нуклеиновые кислоты в геномы клеток-хозяев. Однако данные векторы могут вызывать опасения относительно безопасности вследствие их нецелевого встраивания в геном. Например, существует риск того, что вектор нарушит работу гена-супрессора опухоли или активирует онкоген, вызвав таким образом возникновение злокачественного новообразования. Действительно, в клиническом испытании лечения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID) путем трансдукции CD34⁺ предшественников в костном мозге с помощью вектора на основе гаммаретровируса у четырех из десяти пациентов развился лейкоз (Hacein-Bey-Abina et al. *J Clin Invest.* (2008) 118(9):3132-42).

[0007] Также было высказано предположение, что технологии редактирования генов на основе нуклеаз, таких как мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и технология с использованием регулярно расположенных группами коротких палиндромных повторов (CRISPR), могут применяться для коррекции дефектов в гене РАН у пациентов с PKU. Однако каждая из данных технологий вызывает опасения относительно безопасности ввиду наличия потенциала для нецелевой мутации сайтов в геноме человека, сходных по последовательности с предполагаемым целевым сайтом.

[0008] Соответственно, в данной области техники существует потребность в улучшенных композициях и способах генной терапии, которые могут эффективно и безопасно восстанавливать функцию гена РАН у пациентов с PKU.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] В данном документе предусмотрены композиции на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), которые способны обеспечивать восстановление функции гена РАН в клетках, и способы их применения для лечения заболеваний, ассоциированных со снижением функции гена РАН (например, PKU). Также предусмотрены нуклеиновые кислоты, векторы, системы упаковки и способы получения композиций на основе аденоассоциированного вируса. Особое преимущество композиций на основе rAAV, предусмотренных в данном документе, состоит в том, что они могут эффективно редактировать геном клеток (например, клеток печени) у субъекта таким образом, чтобы они экспрессировали РАН под контролем промотора, специфического в отношении печени, и таким образом обеспечивается потенциальное лечение для пациентов с PKU.

[0010] Соответственно, в одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен

рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий

(a) капсид AAV, содержащий капсидный белок AAV, и

(b) геном rAAV, содержащий (i) редактирующий элемент для редактирования целевого локуса в гене РАН, содержащий по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН, функционально связанную с элементом регуляции транскрипции; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную в направлении 5' относительно редактирующего элемента, характеризующуюся гомологией с первой геномной областью в направлении 5' относительно целевого локуса, и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную в направлении 3' относительно редактирующего элемента, характеризующуюся гомологией со второй геномной областью в направлении 3' относительно целевого локуса.

[0011] В определенных вариантах осуществления редактирующий элемент содержит кодирующую последовательность РАН. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН кодирует аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 33. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 53. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН изменена посредством молчащей мутации. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 28, 63 или 83. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 63. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 83.

[0012] В определенных вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции обладает способностью опосредовать транскрипцию в гепатоците, клетке почки или клетке в головном мозге, гипофизе, надпочечнике, поджелудочной железе, мочевом пузыре, желчном пузыре, толстой кишке, тонком кишечнике или молочной железе. В определенных вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции является эндогенным по отношению к гену РАН. В определенных вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции является экзогенным по отношению к гену РАН. В определенных вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции является специфическим в отношении печени, где необязательно элемент регуляции транскрипции предусматривает один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из промотора гена альбумина человека, промотора гена транстретина (TTR) человека, печеночной контрольной области (HCR) ApoE/C-I 1 или 2 человека, промотора гена ApoH

человека, промотора гена SERPINA1 (hAAT) человека и их регуляторного модуля, специфического в отношении печени. В определенных вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27 или 69. В определенных вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 27. В определенных вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27. В определенных вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 27.

[0013] В определенных вариантах осуществления редактирующий элемент дополнительно содержит интронный элемент, расположенный в направлении 5' относительно кодирующей последовательности РАН и в направлении 3' относительно элемента регуляции транскрипции. В определенных вариантах осуществления интронный элемент представляет собой экзогенный интронный элемент, где необязательно экзогенный интронный элемент представляет собой интронный элемент SV40. В определенных вариантах осуществления интронный элемент SV40 содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 29. В определенных вариантах осуществления интронный элемент SV40 содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29. В определенных вариантах осуществления интронный элемент SV40 состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 29.

[0014] В определенных вариантах осуществления редактирующий элемент дополнительно содержит последовательность полиаденилирования, расположенную в направлении 3' относительно кодирующей последовательности РАН. В определенных вариантах осуществления последовательность полиаденилирования представляет собой экзогенную последовательность полиаденилирования, где необязательно экзогенная последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования SV40. В определенных вариантах осуществления последовательность полиаденилирования SV40 содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 31. В определенных вариантах осуществления последовательность полиаденилирования SV40 содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31. В определенных вариантах осуществления последовательность полиаденилирования SV40 состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 31.

[0015] В определенных вариантах осуществления нуклеотид, расположенный в направлении 5' относительно целевого локуса, находится в интроне гена РАН. В

определенных вариантах осуществления нуклеотид, расположенный в направлении 5' относительно целевого локуса, находится в интроне 1 гена РАН. В определенных вариантах осуществления нуклеотид, расположенный в направлении 3' относительно целевого локуса, находится в интроне гена РАН. В определенных вариантах осуществления нуклеотид, расположенный в направлении 3' относительно целевого локуса, находится в интроне 1 гена РАН.

[0016] В определенных вариантах осуществления ген РАН представляет собой ген РАН человека. В определенных вариантах осуществления ген РАН человека представляет собой ген РАН человека дикого типа. В определенных вариантах осуществления ген РАН человека представляет собой вариантный ген РАН.

[0017] В определенных вариантах осуществления редактирующий элемент содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 31, 50, 51, 52, 69 или 70.

[0018] В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 5'-плеча гомологии является на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной первой геномной области. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 3'-плеча гомологии является на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной второй геномной области. В определенных вариантах осуществления первая геномная область расположена в первом участке редактирования, и вторая геномная область расположена во втором участке редактирования. В определенных вариантах осуществления первый участок редактирования состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления второй участок редактирования состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления первая геномная область состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления вторая геномная область состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления длина каждой из нуклеотидных последовательностей 5'- и 3'-плеча гомологии независимо составляет от приблизительно 100 до приблизительно 2000 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 23. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 5'-плеча гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 23. В определенных

вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 3'-плеча гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 24.

[0019] В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 43. В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 43.

[0020] В определенных вариантах осуществления геном rAAV дополнительно содержит нуклеотидную последовательность 5'-концевого инвертированного повтора (5'-ITR) в направлении 5' от нуклеотидной последовательности 5'-плеча гомологии и нуклеотидную последовательность 3'-концевого инвертированного повтора (3'-ITR) в направлении 3' от нуклеотидной последовательности 3'-плеча гомологии. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 5'-ITR является на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и нуклеотидная последовательность 3'-ITR является на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 18.

[0021] В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 73 и/или 74. В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 75 и/или 76.

[0022] В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 45. В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 45. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность генома rAAV состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 45.

[0023] В определенных вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В определенных вариантах осуществления

[0024] В определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[0025] В определенных вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В определенных вариантах осуществления аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 из SEQ ID NO: 16, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 из SEQ ID NO: 16, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 16, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 из SEQ ID NO: 16, представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C, или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G. В определенных вариантах осуществления:

(a) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M;

(с) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, или

(e) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C.

[0026] В определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[0027] В определенных вариантах осуществления капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В определенных вариантах осуществления аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 из SEQ ID NO: 16, представляет собой T; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 68 из SEQ ID NO: 16, представляет собой V; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 из SEQ ID NO: 16, представляет собой L; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 из SEQ ID NO: 16, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 из SEQ ID NO: 16, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 16, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[0029] В определенных вариантах осуществления эффективность интеграции редактирующего элемента в целевой локус составляет по меньшей мере 1%, если AAV вводят мышам с имплантированными гепатоцитами человека в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV. В определенных вариантах осуществления аллельная частота интеграции редактирующего элемента в целевой локус составляет по меньшей мере 0,5%, если AAV вводят мышам с имплантированными гепатоцитами человека в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

[0030] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую gAAV, раскрытый в данном документе.

[0031] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 43, 45, 51 или 52.

[0032] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения субъекта, у которого имеется фенилкетонурия (PKU), при этом способ включает введение субъекту эффективного количества gAAV или фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе. В определенных вариантах осуществления gAAV или фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления PKU ассоциирована с мутацией гена PAH. В определенных вариантах осуществления субъект является субъектом-человеком.

[0033] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает систему упаковки для получения gAAV, где система упаковки содержит: (a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более белков Rep AAV; (b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный белок, раскрытый в данном документе, и (c) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность генома gAAV из gAAV, раскрытого в данном документе. В определенных вариантах осуществления система упаковки содержит первый вектор, содержащий первую нуклеотидную последовательность и вторую нуклеотидную последовательность, и второй вектор, содержащий третью нуклеотидную последовательность. В определенных вариантах осуществления система упаковки дополнительно содержит четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую один или более генов вируса-помощника. В определенных вариантах осуществления четвертая нуклеотидная последовательность содержится в третьем векторе. В определенных вариантах осуществления четвертая нуклеотидная последовательность содержит один или более генов вируса, выбранного из группы, состоящей из аденовируса, вируса герпеса, вируса осповакцины и цитомегаловируса (CMV). В определенных вариантах осуществления первый вектор, второй вектор и/или третий вектор представляет собой плазмиду.

[0034] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ

рекомбинантного получения гAAV, при этом способ включает введение системы упаковки, раскрытой в данном документе, в клетку в условиях, при которых продуцируется гAAV.

[0035] гAAV, фармацевтическая композиция или полинуклеотид, раскрытые в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата. гAAV, фармацевтическая композиция или полинуклеотид, раскрытые в данном документе, для применения в лечении РКУ. гAAV, фармацевтическая композиция или полинуклеотид, раскрытые в данном документе, для применения в способе лечения субъекта, у которого имеется РКУ, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества гAAV, фармацевтической композиции или полинуклеотида.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0036] На **фиг. 1** представлено схематическое изображение, демонстрирующее механизм переноса гена и редактирования гена для гAAV, раскрытого в данном документе.

[0037] На **фиг. 2A-2D** представлены схематические изображения, демонстрирующие карты плазмид РАН-006m (**фиг. 2A**), РАН-006m-LP-1 (**фиг. 2B**), РАН-032h (**фиг. 2C**) и hРАН-hI1C-032-LP1-SD3 (**фиг. 2D**).

[0038] На **фиг. 3** представлен график, демонстрирующий влияние РАН-006m на уровни Phe в крови у мышей РАН^{enu2}.

[0039] На **фиг. 4** представлен график, демонстрирующий целевую вставку в локус РАН мыши после введения РАН-006m.

[0040] На **фиг. 5** представлен график, демонстрирующий влияние РАН-006m на экспрессию мРНК по сравнению с GAPDH мыши.

[0041] На **фиг. 6** представлен график, демонстрирующий целевую вставку у мышей FRG® после введения РАН-032h, как измерено посредством видоспецифических анализов редактирования с применением ddPCR.

[0042] На **фиг. 7** представлен график, демонстрирующий редактирование гепатоцитов человека у мышей FRG, как измерено посредством количественных анализов с применением секвенирования нового поколения.

[0043] На **фиг. 8A-8C** представлены графики, демонстрирующие влияние РАН-006m-LP-1 на концентрацию Phe в крови у мышей РАН^{enu2} с течением времени. На **фиг. 8A** показан полный набор данных, тогда как на **фиг. 8B** показаны данные за определенный временной диапазон при уменьшенном масштабе оси y с целью демонстрации различий между уровнями доз. На **фиг. 8C** показана целевая интеграция РАН-006m-LP-1 у мышей РАН^{enu2}, как измерено посредством секвенирования нового поколения.

[0044] На **фиг. 9A-9L** представлены графики, демонстрирующие эффективность вектора для переноса гена/редактирования гена РАН-006m-LP-1 и вектора для эписомальной экспрессии трансгена. На **фиг. 9A и 9B** представлены графики, демонстрирующие влияние вектора для эписомальной экспрессии трансгена и РАН-006m-

LP-1 соответственно, упакованных в капсид AAVHSC15, на уровни Phe в сыворотке крови у мышей PАН^{enu2} вплоть до 12 недель после введения в указанных дозах. На **фиг. 9С и 9D** представлены графики, демонстрирующие влияние вектора для эписомальной экспрессии трансгена и PАН-006m-LP-1 соответственно, упакованных в капсид AAVHSC15, на уровни Tug в сыворотке крови у мышей PАН^{enu2} вплоть до 12 недель после введения в указанных дозах. На **фиг. 9Е и 9F** представлены графики, демонстрирующие влияние вектора для эписомальной экспрессии трансгена и PАН-006m-LP-1 соответственно, упакованных в капсид AAVHSC15, на уровень геномов вектора, выявленный на мкг геномной ДНК у мышей PАН^{enu2} при указанных дозах. На **фиг. 9G и 9H** представлены графики, демонстрирующие влияние вектора для эписомальной экспрессии трансгена и PАН-006m-LP-1 соответственно, упакованных в капсид AAVHSC15, на уровень экспрессии мРНК на 10 нг общей РНК, выявленный у мышей PАН^{enu2} при указанных дозах. На **фиг. 9I** представлен график, демонстрирующий уровень целевой интеграции, представленный в виде количества вирусных геномов на каждый аллель, выявленный посредством ddPCR, для различных указанных доз через 12 недель после введения дозы вектора, упакованного в AAVHSC15, как указано. На **фиг. 9J** представлен график, демонстрирующий частоту целевой вставки, выявленную для различных указанных доз, через 12 недель после введения дозы вектора, упакованного в AAVHSC15, как указано. На **фиг. 9K и 9L** представлены графики, демонстрирующие результаты для влияния частичной гепатэктомии (РНх) на уровни Phe в сыворотке крови на протяжении 42 недель (**фиг. 9K**) или 40 недель (**фиг. 9L**) после введения мышам PАН^{enu2} указанного вектора в указанной дозе. РНх или хирургическую операцию-плацебо выполняли через примерно 2 недели после введения дозы.

[0045] На **фиг. 10А-10Р** представлены графики, демонстрирующие различия диапазонов доз между специфическим в отношении мыши вектором на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (PАН-006m-LP-1; «схема для мыши») и специфическим в отношении человека вектором на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (hPАН-hIIC-032-LP1-SD3; «схема для человека») у 4-недельных (**фиг. 10А-10H**) или 10-недельных (**фиг. 10I-10P**) мышей PАН^{enu2}, которым вводили вектор, упакованный в капсид AAVHSC15, как указано, в указанной дозе.

[0046] На **фиг. 11А-11К** представлены графики, демонстрирующие влияние возраста мышей PАН^{enu2} на ответ на однократную дозу специфического в отношении мыши вектора на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (PАН-006m-LP-1; «схема для мыши») или специфического в отношении человека вектора на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (hPАН-hIIC-032-LP1-SD3; «схема для человека»). Уровни Phe и Tug в сыворотке крови (**фиг. 11А-11D**) и уровни генома вектора и мРНК (**фиг. 11Е-11К**) изучали с течением времени для различных групп дозирования, изложенных в таблице 2.

[0047] На **фиг. 12А-12С** представлены графики, демонстрирующие кинетику и устойчивость интеграции с течением времени для мышей PАН^{enu2}, которым вводили

специфический в отношении мыши вектор на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (РАН-006m-LP-1), упакованный в капсид AAVHSC15, в дозе $1E14$ г. в./кг. На **фиг. 12А и 12В** представлены графики, демонстрирующие влияние РАН-006m-LP-1, упакованного в капсид AAVHSC15, на уровень геномов вектора, выявленный на мкг геномной ДНК, и уровень экспрессии мРНК, выявленный на 10 нг общей РНК у мышей РАН^{enu2}, соответственно с течением времени. На **фиг. 12С** представлен график, демонстрирующий частоту целевой вставки, выявленную в различных временных точках после введения дозы РАН-006m-LP-1, упакованного в капсид AAVHSC15. На **фиг. 12D и 12Е** представлены диаграммы, демонстрирующие влияние на уровень Phe (**фиг. 12D**) и Туг (**фиг. 12Е**) в сыворотке крови у мышей РАН^{enu2}, которым вводили РАН-006m-LP-1, упакованный в капсид AAVHSC15, в дозе $1E14$ г. в./кг вплоть до 42 недель после инъекции.

[0048] На **фиг. 13А и 13В** представлены графики, демонстрирующие влияние hРАН-h11C-032-LP1-SD3, упакованного в AAVHSC15, на уровень геномов вектора, выявленный на мкг геномной ДНК, и уровень экспрессии мРНК, выявленный на 10 нг общей РНК в гепатоцитах человека, выделенных от мышей NuLiv, соответственно при указанных дозах и в указанные временные точки. На **фиг. 13С** представлен график, демонстрирующий частоту целевой вставки, выявленную в гепатоцитах человека, выделенных от мышей NuLiv, в различных временных точках после введения дозы hРАН-h11C-032-LP1-SD3, упакованного в AAVHSC15, при указанных дозах.

[0049] На **фиг. 14А-14D** представлены графики, демонстрирующие уровень интеграции в прогнозируемых сайтах нецелевой интеграции, выявленный в геномной ДНК, выделенной от мышей NuLiv, которым вводили специфический в отношении человека вектор для переноса гена/редактирования гена, hРАН-h11C-032-LP1-SD3, упакованный в капсид AAVHSC15.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0050] В данном документе предусмотрены композиции на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), которые способны обеспечивать восстановление функции гена РАН в клетках, и способы их применения для лечения заболеваний, ассоциированных со снижением функции гена РАН (например, PKU). Также предусмотрены нуклеиновые кислоты, векторы, системы упаковки и способы получения композиций на основе аденоассоциированного вируса.

I. Определения

[0051] Используемые в данном документе термины «рекомбинантный аденоассоциированный вирус» или «rAAV» относятся к AAV, содержащему геном, в котором отсутствуют функциональные гены гер и сар.

[0052] Используемый в данном документе термин «ген РАН» относится к гену фенилаланингидроксилазы (РАН), включая без ограничения кодирующие области, экзоны, интроны, 5'-UTR, 3'-UTR и области регуляции транскрипции из гена РАН. Ген РАН человека идентифицирован в базе данных Entrez как ген под ID 5053.

Иллюстративная нуклеотидная последовательность мРНК РАН представлена под SEQ ID NO: 53. Иллюстративная аминокислотная последовательность полипептида РАН представлена под SEQ ID NO: 33. В определенных вариантах осуществления ген РАН представляет собой вариантный ген РАН. Вариантные гены РАН известны специалистам в данной области техники и могут предусматривать одно или более нуклеотидных различий по сравнению с эталонным геномом человека. В определенных вариантах осуществления вариантный ген РАН представляет собой вариант, часто встречающийся у населения. Например, вариант rs1522296 предусматривает различие по одному нуклеотиду по сравнению с эталонным геномом человека в геномной локализации в сборке Hg38 генома человека на chr12: 103310787. Данный вариант наблюдается у >30% мировой популяции и не имеет известной ассоциации ни с изменениями экспрессии РАН, ни с риском развития заболевания.

[0053] Используемый в данном документе термин «геном гAAV» относится к геному рекомбинантного AAV, который обладает способностью интегрировать редактирующий элемент (например, один или более нуклеотидов или межнуклеотидную связь) путем гомологичной рекомбинации в целевой локус для коррекции генетического дефекта в гене РАН. В определенных вариантах осуществления целевой локус находится в гене РАН человека. Специалисту в данной области техники будет понятно, что часть генома гAAV, содержащая 5'-плечо гомологии, редактирующий элемент и 3'-плечо гомологии, может находиться в смысловой или антисмысловой ориентации относительно целевого локуса (например, гена РАН человека).

[0054] Используемый в данном документе термин «редактирующий элемент» относится к части генома гAAV, которая при интеграции в целевой локус модифицирует целевой локус. Редактирующий элемент может опосредовать вставку, делецию или замену одного или более нуклеотидов в целевом локусе.

[0055] Используемый в данном документе термин «целевой локус» относится к области хромосомы или к межнуклеотидной связи (например, области или межнуклеотидной связи гена РАН человека), которые модифицируются редактирующим элементом.

[0056] Используемый в данном документе термин «плечо гомологии» относится к части генома гAAV, расположенной в направлении 5' или 3' относительно редактирующего элемента, которая является по сути идентичной геному, фланкирующему целевой локус. В определенных вариантах осуществления целевой локус находится в гене РАН человека, и плечо гомологии содержит последовательность, по сути идентичную геному, фланкирующему целевой локус.

[0057] Используемый в данном документе термин «капсидный белок AAV» относится к капсидному белку VP1, VP2 или VP3 AAV. Используемый в данном документе термин «капсидный белок клады F» относится к капсидному белку VP1, VP2 или VP3 AAV, который содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотными

последовательностями VP1, VP2 или VP3, изложенными в аминокислотах 1-736, 138-736 и 203-736 соответственно из SEQ ID NO:1 в данном документе.

[0058] Используемый в данном документе «процент идентичности» между двумя нуклеотидными последовательностями или между двумя аминокислотными последовательностями рассчитывается путем умножения количества совпадений между парой выровненных последовательностей на 100 и деления на длину выровненной области, включая внутренние гэпы. При оценке идентичности учитываются только точные совпадения, и не учитывается степень сходства аминокислот друг с другом. Следует отметить, что в длину включаются только внутренние гэпы, но не гэпы на концах последовательности.

[0059] Используемый в данном документе термин «заболевание или нарушение, ассоциированное с мутацией гена РАН» относится к любому заболеванию или нарушению, вызываемому, усугубляемому или генетически связанному с вариацией гена РАН. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированное с мутацией гена РАН, представляет собой фенилкетонурию (PKU).

[0060] Используемый в данном документе термин «измененный посредством молчащей мутации» относится к изменению кодирующей последовательности или кодирующей последовательности со вставкой спейсера гена (например, путем нуклеотидной замены) без изменения аминокислотной последовательности полипептида, кодируемой кодирующей последовательностью или кодирующей последовательностью со вставкой спейсера. Изменение кодонов можно проводить посредством любого способа, известного из уровня техники (например, как описано в Mauro & Chappell (2014) Trends Mol Med. 20(11):604-13, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Преимущество такого изменения посредством молчащей мутации состоит в том, что оно снижает вероятность интеграции генома гAAV в локусы других генов или псевдогенов, паралоогичных целевому гену. Такое изменение посредством молчащей мутации также снижает гомологию между редактирующим элементом и целевым геном, таким образом снижая уровень нежелательной интеграции, опосредованной скорее редактирующим элементом, чем плечом гомологии.

[0061] Используемый в данном документе термин «кодирующая последовательность» относится к части комплементарной ДНК (кДНК), которая кодирует полипептид, начинающийся со стартового кодона и заканчивающийся стоп-кодом. Ген может содержать одну или более кодирующих последовательностей вследствие альтернативного сплайсинга и/или альтернативной инициации трансляции. Кодированная последовательность может быть либо дикого типа, либо измененной посредством молчащей мутации. Иллюстративная кодирующая последовательность РАН дикого типа изложена под SEQ ID NO: 53.

[0062] Используемый в данном документе термин «последовательность полиаденилирования» относится к последовательности ДНК, которая при транскрипции в РНК образует сигнальную последовательность полиаденилирования. Последовательность

полиаденилирования может быть нативной (например, из гена РАН) или экзогенной. Экзогенная последовательность полиаденилирования может представлять собой последовательность полиаденилирования млекопитающего или вируса (например, последовательность полиаденилирования SV40).

[0063] Используемый в данном документе термин «интронный элемент» относится к цис-действующей нуклеотидной последовательности, например, последовательности ДНК, которая регулирует (например, контролирует, повышает или снижает) экспрессию трансгена. В определенных вариантах осуществления интронный элемент представляет собой модифицированный интрон, например, синтетическую интронную последовательность. В определенных вариантах осуществления интронный элемент является экзогенным интронным элементом и получен из интрона, экзогенного по отношению к трансгену, который он может регулировать. В определенных вариантах осуществления интронный элемент содержит модифицированный акцептор сплайсинга и/или донор сплайсинга, что приводит к более стабильной активности сплайсинга. Без ограничения теорией предполагается, что интроны могут повышать экспрессию трансгена, например, путем снижения транскрипционного сайленсинга и повышения экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Специалисту в данной области техники будет понятно, что синтетические интронные последовательности могут быть разработаны для опосредования сплайсинга РНК путем введения любых консенсусных мотивов сплайсинга, известных из уровня техники (например, в Sibley et al., (2016) *Nature Reviews Genetics*, 17, 407-21, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Иллюстративные интронные последовательности представлены в Lu et al. (2013) *Molecular Therapy* 21(5): 954-63 и Lu et al. (2017) *Hum. Gene Ther.* 28(1): 125-34, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0064] Используемый в данном документе термин «элемент регуляции транскрипции» или «TRE» относится к цис-действующей нуклеотидной последовательности, например, последовательности ДНК, которая регулирует (например, контролирует, повышает или снижает) транскрипцию функционально связанной нуклеотидной последовательности с помощью РНК-полимеразы с образованием молекулы РНК. TRE зависит от одной или более транс-действующих молекул, таких как факторы транскрипции, для регулирования транскрипции. Таким образом, один TRE может по-разному регулировать транскрипцию, когда он находится в контакте с разными транс-действующими молекулами, например, когда он находится в разных типах клеток. TRE может содержать один или более промоторных элементов и/или энхансерных элементов. Квалифицированному специалисту будет понятно, что промоторный и энхансерный элементы в гене могут быть близкими по местоположению, и термин «промотор» может относиться к последовательности, содержащей промоторный элемент и энхансерный элемент. Таким образом, термин «промотор» не исключает энхансерный элемент в последовательности. Промоторный и энхансерный элементы не обязательно должны быть получены из одного и того же гена или вида, и последовательность каждого

промоторного или энхансерного элемента может быть либо идентичной, либо по существу идентичной соответствующей эндогенной последовательности в геноме.

[0065] Используемый в данном документе термин «функционально связанный» используется для описания связи между TRE и кодирующей последовательностью, которая подлежит транскрибированию. Обычно экспрессия гена находится под контролем TRE, содержащего один или более промоторных и/или энхансерных элементов. Кодирующая последовательность «функционально связана» с TRE, если транскрипция кодирующей последовательности контролируется или находится под влиянием TRE. Промоторные и энхансерные элементы TRE могут находиться в любой ориентации и/или на любом расстоянии от кодирующей последовательности, при условии обеспечения необходимого уровня транскрипционной активности. В определенных вариантах осуществления TRE располагается выше кодирующей последовательности.

[0066] В настоящем изобретении положения нуклеотидов в гене РАН указаны относительно первого нуклеотида стартового кодона. Первый нуклеотид стартового кодона находится в положении 1; нуклеотиды, расположенные в направлении 5' от первого нуклеотида стартового кодона, имеют отрицательные номера; нуклеотиды, расположенные в направлении 3' от первого нуклеотида стартового кодона, имеют положительные номера. Как используется в данном документе, нуклеотид 1 гена РАН человека представляет собой нуклеотид 5473 эталонной последовательности из NCBI под номером доступа NG_008690.1, и нуклеотид -1 гена РАН человека представляет собой нуклеотид 5472 эталонной последовательности из NCBI под номером доступа NG_008690.1.

[0067] В настоящем изобретении экзоны и интроны в гене РАН указаны относительно экзона, охватывающего первый нуклеотид стартового кодона, которым является нуклеотид 5473 эталонной последовательности из NCBI под номером доступа NG_008690.1. Экзон, охватывающий первый нуклеотид стартового кодона, представляет собой экзон 1. Экзоны, расположенные в направлении 3'-конца от экзона 1, представляют собой в направлении от 5'- к 3'-концу: экзон 2, экзон 3 и т. д. Интроны, расположенные в направлении 3'-конца от экзона 1, представляют собой в направлении от 5'- к 3'-концу: интрон 1, интрон 2 и т. д. Соответственно, ген РАН содержит в направлении от 5'- к 3'-концу: экзон 1, интрон 1, экзон 2, интрон 2, экзон 3 и т. д. Как используется в данном документе, экзон 1 гена РАН человека представляет собой нуклеотиды 5001-5532 эталонной последовательности из NCBI под номером доступа NG_008690.1, и интрон 1 гена РАН человека представляет собой нуклеотиды 5533-9704 эталонной последовательности из NCBI под номером доступа NG_008690.1.

[0068] Используемый в данном документе термин «интеграция» относится к введению редактирующего элемента в целевой локус (например, ген РАН) посредством гомологичной рекомбинации между геномом гAAV и целевым локусом. Интеграция редактирующего элемента может приводить к замене, вставке и/или делеции одного или более нуклеотидов в целевом локусе (например, гене РАН).

[0069] Используемый в данном документе термин «эффективность интеграции редактирующего элемента в целевой локус» относится к процентной доле клеток в трансдуцированной популяции, в которых произошла интеграция редактирующего элемента в целевой локус.

[0070] Используемый в данном документе термин «аллельная частота интеграции редактирующего элемента в целевой локус» относится к процентной доле аллелей в популяции трансдуцированных клеток, в которых произошла интеграция редактирующего элемента в целевой локус.

[0071] Используемый в данном документе термин «стандартные условия введения AAV» относится к трансдукции гепатоцитов человека, имплантированных мышце после абляции гепатоцитов, где AAV вводят внутривенно в дозе 1×10^{13} геномов вектора на килограмм веса тела.

[0072] Используемый в данном документе термин «эффективное количество» в контексте введения AAV субъекту относится к количеству AAV, которое обеспечивает необходимый профилактический или терапевтический эффект.

[0073] Используемый в данном документе термин «приблизительно» или «примерно», если он относится к измеримому значению, такому как уровень экспрессии белка IDS, охватывает вариации $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$ заданного значения или диапазона, подходящих для выполнения способов, раскрытых в данном документе.

II. Композиции на основе аденоассоциированного вируса

[0074] В одном аспекте в данном документе предусмотрены новые композиции на основе гAAV, применимые для восстановления экспрессии РАН в клетках со сниженной или иным образом дефектной функцией гена РАН. Такие композиции на основе гAAV являются высокоэффективными в отношении редактирования генома клеток (например, клеток печени) у субъекта с экспрессией РАН под контролем промотора, специфического в отношении печени, и не требуют расщепления генома в целевом локусе путем действия экзогенной нуклеазы (например, мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами, нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), или РНК-направляемой нуклеазы, такой как Cas9) для облегчения такого редактирования. Соответственно, в определенных вариантах осуществления композиции на основе гAAV, раскрытые в данном документе, не содержат или не требуют наличия экзогенной нуклеазы или нуклеотидной последовательности, которая кодирует экзогенную нуклеазу.

[0075] В определенных вариантах осуществления гAAV, раскрытый в данном документе, содержит: (a) капсид AAV, содержащий капсидный белок AAV (например, капсидный белок AAV клады F), и (b) геном гAAV, содержащий (i) редактирующий элемент для редактирования целевого локуса в гене РАН, содержащий по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН, функционально связанную с элементом регуляции транскрипции; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную в направлении 5' относительно редактирующего элемента,

характеризующуюся гомологией с первой геномной областью в направлении 5' относительно целевого локуса, и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную в направлении 3' относительно редактирующего элемента, характеризующуюся гомологией со второй геномной областью в направлении 3' относительно целевого локуса. В определенных вариантах осуществления гAAV, раскрытый в данном документе, характеризуется потенциалом экспрессии трансгена РАН как путем эписомальной экспрессии, так и посредством вставки редактирующего элемента в геном в целевом локусе в гене РАН (см. фиг. 1). В определенных вариантах осуществления гAAV, раскрытый в данном документе, обеспечивает возможность поддержания экспрессии РАН во время периода роста печени, в ходе которого может быть утрачена эписомальная экспрессия. Соответственно, композиции на основе гAAV являются особенно применимыми для лечения ювенильной PKU.

[0076] Капсидный белок из любого капсида, известного из уровня техники, можно применять в композициях на основе гAAV, раскрытых в данном документе, включая без ограничения капсидный белок из серотипа AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9. Например, в определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17, где аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 из SEQ ID NO: 16, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 16, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M;

аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 из SEQ ID NO: 16, представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C, или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G. В определенных вариантах осуществления аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G. В определенных вариантах осуществления аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M. В определенных вариантах осуществления аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R. В определенных вариантах осуществления аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R. В определенных вариантах осуществления аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C. В определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[0077] Например, в определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17, где аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном

соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой С. В определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[0078] Например, в определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В определенных вариантах осуществления капсидный белок содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17, где аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 из SEQ ID NO: 16, представляет собой Т; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 68 из SEQ ID NO: 16, представляет собой V; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 из SEQ ID NO: 16, представляет собой L; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 из SEQ ID NO: 16, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 из SEQ ID NO: 16, представляет собой С, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 из SEQ ID NO: 16, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 16, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте

более из (а) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17; (b) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17, и (c) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит: (а) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17; (b) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17, и (c) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

[0080] В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит один или более из (а) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 8; (b) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 8, и (c) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит один или более из (а) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 8; (b) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 8, и (c) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит два или более из (а) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 8; (b) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 8, и (c) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит: (а) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 8; (b) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 8, и (c) капсидный белок, содержащий

характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит один или более из (a) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 13; (b) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 13, и (c) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит два или более из (a) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 13; (b) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 13, и (c) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит: (a) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 13; (b) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 13, и (c) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 13.

[0083] В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит один или более из (a) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 16; (b) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 16, и (c) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 16. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит один или более из (a) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 16; (b) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 16, и (c) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 16. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит два или более из (a) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 16; (b) капсидного белка, содержащего аминокислотную

последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 16, и (с) капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 16. В определенных вариантах осуществления капсид AAV содержит: (а) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 16; (b) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 16, и (с) капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 16.

[0084] Геномы гAAV, применимые в композициях на основе AAV, раскрытых в данном документе, обычно содержат: (i) редактирующий элемент для редактирования целевого локуса в гене РАН, содержащий по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН, функционально связанную с элементом регуляции транскрипции; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную в направлении 5' относительно редактирующего элемента, характеризующуюся гомологией с первой геномной областью в направлении 5' относительно целевого локуса, и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную в направлении 3' относительно редактирующего элемента, характеризующуюся гомологией со второй геномной областью в направлении 3' относительно целевого локуса. В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит нуклеотидную последовательность 5'-концевого инвертированного повтора (5'-ITR) в направлении 5' от нуклеотидной последовательности 5'-плеча гомологии и нуклеотидную последовательность 3'-концевого инвертированного повтора (3'-ITR) в направлении 3' от нуклеотидной последовательности 3'-плеча гомологии.

[0085] Редактирующие элементы, используемые в геномах гAAV, раскрытых в данном документе, могут опосредовать вставку, делецию или замену одного или более нуклеотидов в целевом локусе.

[0086] В определенных вариантах осуществления при корректной интеграции в целевой локус путем гомологичной рекомбинации редактирующий элемент обеспечивает вставку нуклеотидной последовательности, содержащей по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН, в ген РАН. В определенных вариантах осуществления редактирующий элемент содержит кодирующую последовательность РАН (например, полную кодирующую последовательность РАН).

[0087] В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН кодирует полипептид РАН дикого типа (например, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 33). В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН представляет собой кодирующую последовательность РАН дикого типа (например, содержащую нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 53). В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность РАН изменена посредством молчащей мутации таким образом, что она является на менее чем 100% (например, на менее чем

95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% или 50%) идентичной соответствующим экзонам гена PАН дикого типа. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность PАН содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 28, 63 или 83, или состоит из нее. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность PАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность PАН состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 28. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность PАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 63. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность PАН состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 63. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность PАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 83. В определенных вариантах осуществления кодирующая последовательность PАН состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 83.

[0088] В определенных вариантах осуществления геномы rAAV, применимые в композициях на основе AAV, раскрытых в данном документе, содержат элемент регуляции транскрипции (TRE), функционально связанный с по меньшей мере частью кодирующей последовательности PАН. В определенных вариантах осуществления геномы rAAV, применимые в композициях на основе AAV, раскрытых в данном документе, содержат в направлении от 5'- к 3'-концу: TRE и по меньшей мере часть кодирующей последовательности PАН.

[0089] Геном rAAV можно применять для экспрессии PАН в любых клетках млекопитающих (например, клетках человека). Таким образом, TRE может быть активен в любых клетках млекопитающих (например, клетках человека). В определенных вариантах осуществления TRE активен в широком диапазоне клеток человека. Такие TRE могут содержать конститутивные промоторные и/или энхансерные элементы, включая промотор/энхансер цитомегаловируса (CMV) (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 54, 55 или 56), промотор SV40, промотор гена АСТВ курицы (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 47 или 57), промотор JeT (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 58), промотор smCBA (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на

по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 59), промотор гена фактора элонгации 1 альфа (EF1 α) человека (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 39), интрон минутного вируса мыши (MVM), который содержит сайты связывания факторов транскрипции (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 61), промотор гена фосфоглицераткиназы (PGK1) человека, промотор гена убиквитина С (Ubc) человека, промотор гена бета-актина человека, промотор гена нейронспецифической енолазы (ENO2) человека, промотор гена бета-глюкуронидазы (GUSB) человека, бета-глобиновый элемент кролика (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 41 или 62), промотор гена кальмодулина 1 (CALM1) человека (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 44) и/или промотор метил-CpG-связывающего белка 2 (MeCP2) человека. Любой из этих TRE можно комбинировать в любом порядке для обеспечения эффективной транскрипции. Например, геном гAAV может содержать энхансер CMV, промотор CBA и акцептор сплайсинга из экзона 3 гена бета-глобина кролика, вместе называемые промотором CAG (например, содержащим нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 42 или 64). Например, геном гAAV может содержать гибрид энхансера CMV и промотора CBA, за которым следует донор сплайсинга и акцептор сплайсинга, вместе называемые промоторной областью CASI (например, содержащей нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 48 или 65).

[0090] В качестве альтернативы, TRE может представлять собой тканеспецифический TRE, т. е. он активен в конкретной(конкретных) ткани(тканях) и/или органе(органах). Тканеспецифический TRE содержит один или более тканеспецифических промоторных и/или энхансерных элементов и необязательно один или более конститутивных промоторных и/или энхансерных элементов. Квалифицированному специалисту будет понятно, что тканеспецифические промоторные и/или энхансерные элементы могут быть выделены из генов, специфически экспрессируемых в ткани, посредством способов, хорошо известных из уровня техники.

[0091] В определенных вариантах осуществления TRE является специфическим в отношении печени (например, специфическим в отношении гепатоцитов).

Иллюстративные TRE, специфические в отношении печени, могут содержать один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из промотора гена альбумина человека, промотора гена транстретина (TTR) человека (например, содержащего нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 66), печеночной контрольной области (HCR) ApoE/C-I 1 или 2 человека (например, содержащей нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 25 или 68), промотора гена APOH человека и промотора гена SERPINA1 (hAAT) человека (например, содержащего нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 26, 69 или 70) или их регуляторного модуля, специфического в отношении печени (например, содержащего нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 71). В определенных вариантах осуществления промоторная область hAAT содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 72. Больше специфических в отношении печени промоторных элементов раскрыто в WO 2009/130208 и Kramer et al. *Molecular Therapy* (2003) 7, 375-385, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0092] В определенных вариантах осуществления TRE является специфическим в отношении почек (например, специфическим в отношении эпителиальных клеток почек). Иллюстративные TRE, специфические в отношении почек, могут содержать один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из промотора гена нефрина человека, промотора гена рецептора паратиреоидного гормона человека, промотора гена уромодулина человека и промотора гена SLC12A1 человека. В определенных вариантах осуществления TRE является специфическим в отношении головного мозга (например, специфическим в отношении нейронов, специфическим в отношении глиальных клеток, специфическим в отношении астроцитов, специфическим в отношении олигодендроцитов, специфическим в отношении микроглии и/или специфическим в отношении центральной нервной системы). Иллюстративные TRE, специфические в отношении головного мозга, могут содержать один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из промотора гена глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) человека и промотора гена синапсина 1 (SYN1) человека. Более специфические в отношении головного мозга промоторные элементы раскрыты в WO 2016/100575A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0093] В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит два или более TRE, необязательно содержащих по меньшей мере один из TRE, раскрытых выше.

Квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятно, что любой из этих TRE можно комбинировать в любом порядке, и комбинации конститутивного TRE и тканеспецифического TRE могут управлять эффективной и тканеспецифической транскрипцией. Например, в определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит промотор гена HCR1 человека (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 25 или 68) и промотор EF-1 α человека (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 39), где необязательно промотор гена HCR1 человека располагается в направлении 5' от промотора гена EF-1 α человека. В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности нуклеотидов, изложенной под SEQ ID NO: 60.

[0094] Сходным образом, комбинации из двух или более тканеспецифических TRE могут управлять эффективной и тканеспецифической транскрипцией. Например, в определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит промотор гена HCR1 человека (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 25) и промотор гена hAAT (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 26), где необязательно промотор гена HCR1 человека располагается в направлении 5' от промотора гена hAAT. В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 27. В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит промотор гена HCR1 человека (например, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 25) и промотор гена hAAT (например, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 26), где необязательно промотор гена HCR1 человека располагается в направлении 5' от промотора гена hAAT. В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27.

[0095] В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит специфический в отношении печени регуляторный модуль промотора гена hAAT (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 71) и промотор гена TTR человека (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 66), где необязательно специфический в отношении печени регуляторный модуль располагается в направлении 5' от промотора гена TTR человека. В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 67. В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит специфический в отношении печени регуляторный модуль промотора hAAT (например, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 71) и промотор TTR человека (например, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 66), где необязательно специфический в отношении печени регуляторный модуль располагается в направлении 5' от промотора гена TTR человека. В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 67.

[0096] В определенных вариантах осуществления геном rAAV дополнительно содержит интронный элемент, расположенный в направлении 5' от по меньшей мере части кодирующей последовательности РАН. Такие интронные элементы могут повышать уровень экспрессии трансгена, например, путем снижения транскрипционного сайленсинга и повышения экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит в направлении от 5'- к 3'-концу: TRE, интронный элемент и по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН.

[0097] Интронный элемент может содержать по меньшей мере часть нативной интронной последовательности гена РАН, или интронный элемент может представлять собой экзогенный интронный элемент (например, содержащий по меньшей мере интронную последовательность от другого вида или из другого гена от того же вида и/или синтетическую интронную последовательность). В определенных вариантах осуществления интронный элемент представляет собой экзогенный интронный элемент, содержащий по меньшей мере часть интронной последовательности от другого вида. В определенных вариантах осуществления интронный элемент представляет собой экзогенный интронный элемент, содержащий по меньшей мере часть интронной последовательности из другого гена от того же вида. В определенных вариантах осуществления интронный элемент представляет собой экзогенный интронный элемент, содержащий синтетическую интронную последовательность. В определенных вариантах осуществления интронный элемент представляет собой экзогенный интронный элемент, содержащий комбинацию по меньшей мере интронной последовательности от другого вида или из другого гена от того же вида и/или синтетической интронной последовательности.

[0098] Специалисту в данной области техники будет понятно, что интронные элементы могут быть разработаны для опосредования сплайсинга РНК путем введения любых консенсусных мотивов сплайсинга, известных из уровня техники (например, в Sibley et al., (2016) *Nature Reviews Genetics*, 17, 407-21, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Иллюстративные интронные последовательности представлены в Lu et al. (2013) *Molecular Therapy* 21(5): 954-63 и Lu et al. (2017) *Hum. Gene Ther.* 28(1): 125-34, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0099] В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит экзогенный интронный элемент. В определенных вариантах осуществления гAAV содержит интронный элемент SV40 (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 29) или интрон минутного вируса мыши (MVM) (например, содержащий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 61). В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит интронный элемент SV40 (например, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29) или интронный элемент минутного вируса мыши (MVM) (например, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 61).

[00100] В определенных вариантах осуществления геном гAAV, раскрытый в данном документе, дополнительно содержит терминатор транскрипции (например, последовательность полиаденилирования). В определенных вариантах осуществления терминатор транскрипции расположен в направлении 3' от по меньшей мере части кодирующей последовательности РАН. Терминатор транскрипции может представлять собой любую последовательность, которая эффективно терминирует транскрипцию, и специалисту в данной области техники будет понятно, что такие последовательности могут быть выделены из любых генов, которые экспрессируются в клетке, в которой необходима транскрипция по меньшей мере части кодирующей последовательности РАН. В определенных вариантах осуществления терминатор транскрипции содержит последовательность полиаденилирования. В определенных вариантах осуществления последовательность полиаденилирования является идентичной или по сути идентичной эндогенной последовательности полиаденилирования гена РАН человека. В определенных вариантах осуществления последовательность полиаденилирования представляет собой экзогенную последовательность полиаденилирования. В определенных вариантах осуществления последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования SV40 (например, содержащую нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 31, 34 или 35, или нуклеотидную последовательность, комплементарную им). В определенных вариантах осуществления последовательность полиаденилирования содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31. В определенных вариантах осуществления последовательность полиаденилирования состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 31.

[00101] В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит в направлении от 5'- к 3'-концу: TRE, интронный элемент, по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН и последовательность полиаденилирования. В определенных вариантах осуществления TRE характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 25-27, 30, 36, 39, 40-42, 44, 46-49, 54-60 или 62-72; интронный элемент характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 29 или 61; по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 28, и/или последовательность полиаденилирования характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 31, 34 или 35. В определенных вариантах осуществления TRE содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-27, 30, 36, 39, 40-42, 44, 46-49, 54-60 и 62-72; интронный элемент содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29 и 61; по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28, и/или последовательность полиаденилирования содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, 34 и 35.

[00102] В определенных вариантах осуществления TRE содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 25, 26 или 27, или состоит из нее; интронный элемент содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29, или состоит из нее; по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28, или состоит из нее, и/или последовательность полиаденилирования содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31, или состоит из нее. В определенных вариантах осуществления TRE содержит в направлении от 5'- к 3'-концу нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 25, и нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 26 (например, TRE содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27); интронный элемент

содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29; по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28, и/или последовательность полиаденилирования содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31.

[00103] Плечи гомологии, применяемые в геномах гAAV, раскрытых в данном документе, могут быть направлены на любую область гена РАН или соседнего гена в геноме. Точную идентичность и расположение плеч гомологии определяют по идентичности редактирующего элемента и/или целевого локуса.

[00104] Плечи гомологии, применяемые в геномах гAAV, раскрытых в данном документе, являются по сути идентичными геному, фланкирующему целевой локус (например, целевой локус в гене РАН). В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 90% (например, по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичностью нуклеотидной последовательности с первой геномной областью в направлении 5' относительно целевого локуса. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии характеризуется 100% идентичностью нуклеотидной последовательности с первой геномной областью. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 90% (например, по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичностью нуклеотидной последовательности со второй геномной областью в направлении 3' относительно целевого локуса. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии характеризуется 100% идентичностью нуклеотидной последовательности со второй геномной областью. В определенных вариантах осуществления каждое из 5'- и 3'-плеч гомологии является на по меньшей мере приблизительно 90% (например, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичным первой и второй геномным областям, фланкирующим целевой локус (например, целевой локус в гене РАН), соответственно. В определенных вариантах осуществления каждое из 5'- и 3'-плеч гомологии является на 100% идентичным первой и второй геномным областям, фланкирующим целевой локус (например, целевой локус в гене РАН), соответственно. В определенных вариантах осуществления различия в нуклеотидных последовательностях 5'-плеча гомологии и/или 3'-плеча гомологии и соответствующих областях генома, фланкирующих целевой локус, содержат некодирующие различия в нуклеотидных последовательностях, по сути состоят или состоят из них.

[00105] Специалисту в данной области техники будет понятно, что плечи гомологии не должны быть на 100% идентичными геномной последовательности, фланкирующей целевой локус, чтобы обладать способностью опосредовать интеграцию редактирующего элемента в данный целевой локус путем гомологичной рекомбинации. Например, плечи гомологии могут предусматривать одну или более генетических

вариаций в человеческой популяции и/или одну или более модификаций (например, нуклеотидных замен, вставок или делеций), сконструированных для улучшения уровня экспрессии или специфичности. Человеческие генетические вариации включают как наследуемые вариации, так и вариации *de novo*, которые являются специфичными для целевого генома, и охватывают простые нуклеотидные полиморфизмы, вставки, делеции, перестройки, инверсии, дубликации, микроповторы и их комбинации. Такие вариации известны из уровня техники и могут быть найдены, например, в базах данных dnSNP (см. Sherry et al. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(1):308-11), Базе данных геномных вариантов (см. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Database issue): D986-92), ClinVar (см. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Database issue): D980-D985), Genbank (см. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(Database issue): D67-D72), ENCODE (genome.ucsc.edu/encode/terms.html), JASPAR (см. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D260-D266) и PROMO (см. Messeguer et al. *Bioinformatics* 2002; 18(2):333-334; *Farré et al. Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13):3651-3653), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что в ситуациях, где плечо гомологии не является на 100% идентичным геномной последовательности, фланкирующей целевой локус, гомологичная рекомбинация между плечом гомологии и геномом может обеспечивать изменение геномной последовательности, фланкирующей целевой локус, таким образом, что она становится идентичной последовательности применяемого плеча гомологии.

[00106] В определенных вариантах осуществления первая геномная область в направлении 5' относительно целевого локуса расположена в первом участке редактирования, где первый участок редактирования состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления вторая геномная область в направлении 3' относительно целевого локуса расположена во втором участке редактирования, где второй участок редактирования состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления первая геномная область в направлении 5' относительно целевого локуса расположена в первом участке редактирования, где первый участок редактирования состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 37, и вторая геномная область в направлении 3' относительно целевого локуса расположена во втором участке редактирования, где второй участок редактирования состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 38.

[00107] В определенных вариантах осуществления первый и второй участки редактирования являются разными. В определенных вариантах осуществления первый участок редактирования расположен в направлении 5' относительно второго участка редактирования. В определенных вариантах осуществления первая геномная область состоит из последовательности, более короткой, чем последовательность первого участка редактирования, в котором расположена первая геномная область. В определенных

вариантах осуществления первая геномная область состоит из последовательности первого участка редактирования, в котором расположена первая геномная область. В определенных вариантах осуществления вторая геномная область состоит из последовательности, более короткой, чем последовательность второго участка редактирования, в котором расположена вторая геномная область. В определенных вариантах осуществления вторая геномная область состоит из последовательности второго участка редактирования, в котором расположена вторая геномная область.

[00108] В определенных вариантах осуществления первый и второй участки редактирования являются одинаковыми. В определенных вариантах осуществления целевой локус представляет собой межнуклеотидную связь или нуклеотидную последовательность в участке редактирования, где первая геномная область состоит из первой части участка редактирования в направлении 5' относительно целевого локуса, и вторая геномная область состоит из второй части участка редактирования в направлении 3' относительно целевого локуса. В определенных вариантах осуществления первая часть участка редактирования состоит из последовательности от 5'-конца участка редактирования до нуклеотида, примыкающего со стороны 5'-конца к целевому локусу. В определенных вариантах осуществления вторая часть участка редактирования состоит из последовательности от нуклеотида, примыкающего со стороны 3' к целевому локусу, до 3'-конца участка редактирования. В определенных вариантах осуществления первая часть участка редактирования состоит из последовательности от 5'-конца участка редактирования до нуклеотида, примыкающего со стороны 5'-конца к целевому локусу, и вторая часть участка редактирования состоит из последовательности от нуклеотида, примыкающего со стороны 3'-конца к целевому локусу, до 3'-конца участка редактирования. В определенных вариантах осуществления участок редактирования состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 37 или 38. В определенных вариантах осуществления первая и вторая части участков редактирования характеризуются по сути эквивалентными значениями длины (например, отношение длины более короткой части к длине более длинной части составляет более чем 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98 или 0,99).

[00109] В определенных вариантах осуществления длина 5'-плеча гомологии составляет от приблизительно 50 до приблизительно 4000 нуклеотидов (например, от приблизительно 100 до приблизительно 3000, от приблизительно 200 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000 нуклеотидов). В определенных вариантах осуществления длина 5'-плеча гомологии составляет приблизительно 800 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина 5'-плеча гомологии составляет приблизительно 100 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина 3'-плеча гомологии составляет от приблизительно 50 до приблизительно 4000 нуклеотидов (например, от приблизительно 100 до приблизительно 3000, от приблизительно 200 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно

1000 нуклеотидов). В определенных вариантах осуществления длина 3'-плеча гомологии составляет приблизительно 800 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина 3'-плеча гомологии составляет приблизительно 100 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина каждого из 5'- и 3'-плеч гомологии независимо составляет от приблизительно 50 до приблизительно 4000 нуклеотидов (например, от приблизительно 100 до приблизительно 3000, от приблизительно 200 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000 нуклеотидов). В определенных вариантах осуществления длина каждого из 5'- и 3'-плеч гомологии независимо составляет приблизительно 800 нуклеотидов.

[00110] В определенных вариантах осуществления 5'- и 3'-плечи гомологии характеризуются по сути эквивалентными значениями длины нуклеотидной последовательности. В определенных вариантах осуществления 5'- и 3'-плечи гомологии характеризуются асимметричными значениями длины нуклеотидной последовательности. В определенных вариантах осуществления асимметрия длины нуклеотидной последовательности определяется разницей между 5'- и 3'-плечами гомологии, составляющей не более 90% в длине, например, составляющей не более чем 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10% разницу в длине.

[00111] В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 90% (например, по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичностью нуклеотидной последовательности с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии дополнительно предусматривает одну или более генетических вариаций в человеческой популяции. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 23.

[00112] В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 90% (например, по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичностью нуклеотидной последовательности с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии дополнительно предусматривает одну или более генетических вариаций в человеческой популяции. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 24.

[00113] В определенных вариантах осуществления каждое из 5'-плеча гомологии и 3'-плеча гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 90% (например, по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

99,5%) идентичностью нуклеотидной последовательности с нуклеотидными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 37 и 38 соответственно. В определенных вариантах осуществления каждое из 5'-плеча гомологии и 3'-плеча гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 90% (например, по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичностью нуклеотидной последовательности с нуклеотидными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 23 и 24 соответственно. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии содержат нуклеотидные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 37 и 38, 23 и 24, 37 и 24 или 23 и 38 соответственно. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии состоят из нуклеотидных последовательностей, изложенных под SEQ ID NO: 37 и 38, 23 и 24, 37 и 24 или 23 и 38 соответственно.

[00114] В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичную SEQ ID NO: 43. В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 43. В определенных вариантах осуществления геном гAAV состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 43.

[00115] В определенных вариантах осуществления геномы гAAV, раскрытые в данном документе, дополнительно содержат нуклеотидную последовательность 5'-концевого инвертированного повтора (5'-ITR) в направлении 5' от TRE, и нуклеотидную последовательность 3'-концевого инвертированного повтора (3'-ITR) в направлении 3' от кодирующей последовательности РАН. Последовательности ITR из любого серотипа AAV или его варианта могут использоваться в геномах гAAV, раскрытых в данном документе. 5'- и 3'-ITR могут происходить из AAV одного и того же серотипа или из AAV разных серотипов. Иллюстративные ITR для применения в геномах гAAV, раскрытых в данном документе, изложены под SEQ ID NO: 14, 18, 19, 20, 21 и 32 в данном документе.

[00116] В определенных вариантах осуществления 5'-ITR или 3'-ITR происходит из AAV2. В определенных вариантах осуществления как 5'-ITR, так и 3'-ITR происходят из AAV2. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 5'-ITR характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 14, или нуклеотидная последовательность 3'-ITR характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 5'-ITR характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 14, и нуклеотидная

последовательность 3'-ITR характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18. В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 43, нуклеотидную последовательность 5'-ITR, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 14, и нуклеотидную последовательность 3'-ITR, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 18.

[00117] В определенных вариантах осуществления 5'-ITR или 3'-ITR происходят из AAV5. В определенных вариантах осуществления как 5'-ITR, так и 3'-ITR происходят из AAV5. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 5'-ITR характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 20, или нуклеотидная последовательность 3'-ITR характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 21. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 5'-ITR характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 20, и нуклеотидная последовательность 3'-ITR характеризуется по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 21. В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 43, нуклеотидную последовательность 5'-ITR, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 20, и нуклеотидную последовательность 3'-ITR, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 21.

[00118] В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность 5'-ITR и нуклеотидная последовательность 3'-ITR по существу комплементарны друг другу (например, комплементарны друг другу, за исключением несоответствия в положениях 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов в 5'- или 3'-ITR).

[00119] В определенных вариантах осуществления 5'-ITR или 3'-ITR модифицируют для обеспечения снижения или устранения разделения Rep-белком («неразделяемый ITR»). В определенных вариантах осуществления неразделяемый ITR предусматривает вставку, делецию или замену в нуклеотидной последовательности конечного сайта разделения. Такая модификация позволяет формировать самокомплементарный двухцепочечный ДНК-геном AAV после того, как геном rAAV реплицируется в инфицированной клетке. Иллюстративные неразделяемые последовательности ITR известны из уровня техники (см., например, последовательности, представленные в патентах США №№ 7790154 и 9783824, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах

осуществления 5'-ITR содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 19. В определенных вариантах осуществления 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO: 19. В определенных вариантах осуществления 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 19. В определенных вариантах осуществления 3'-ITR содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 32. В определенных вариантах осуществления 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной SEQ ID NO: 32. В определенных вариантах осуществления 3'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 32. В определенных вариантах осуществления 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 19, и 3'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 32. В определенных вариантах осуществления 5'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 19, и 3'-ITR состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 32.

[00120] В определенных вариантах осуществления 5'-ITR фланкирован дополнительной нуклеотидной последовательностью, полученной из геномной последовательности AAV2 дикого типа. В определенных вариантах осуществления 5'-ITR фланкирован дополнительной последовательностью размером 46 п. о., полученной из последовательности AAV2 дикого типа, которая примыкает к ITR AAV2 дикого типа в геноме AAV2. В определенных вариантах осуществления дополнительная последовательность размером 46 п. о. расположена в направлении 3'-конца относительно 5'-ITR в геноме rAAV. В определенных вариантах осуществления последовательность размером 46 п. о. состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 74.

[00121] В определенных вариантах осуществления 3'-ITR фланкирован дополнительной нуклеотидной последовательностью, полученной из геномной последовательности AAV2 дикого типа. В определенных вариантах осуществления 3'-ITR фланкирован дополнительной последовательностью размером 37 п. о., полученной из последовательности AAV2 дикого типа, которая примыкает к ITR AAV2 дикого типа в геноме AAV2. См., например, Savy et al. *Human Gene Therapy Methods* (2017) 28(5): 277-289 (которая настоящим включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах осуществления дополнительная последовательность размером 37 п. о. расположена в направлении 5'-конца относительно 3'-ITR в геноме rAAV. В определенных вариантах осуществления последовательность размером 37 п. о.

состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 73.

[00122] В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью нуклеотидной последовательности с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии дополнительно предусматривает одну или более генетических вариаций в человеческой популяции. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 23.

[00123] В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью нуклеотидной последовательности с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии дополнительно предусматривает одну или более генетических вариаций в человеческой популяции. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления 3'-плечо гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 24.

[00124] В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит в направлении от 5'- к 3'-концу: 5'-плечо гомологии, 5'-ITR, TRE, интронный элемент, по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН, последовательность полиаденилирования, 3'-ITR и/или 3'-плечо гомологии. В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 37 или 23; 5'-ITR характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 14, 19 или 20; TRE характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 30, 36, 39, 40, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72 или 72; интронный элемент характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 29 или 61; по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 28, последовательность полиаденилирования характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 31, 34 или 35; 3'-ITR характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18, 21 или 32; и/или 3'-плечо гомологии характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 38 или 24.

[00125] В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37 и 23; 5'-ITR содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 19 или 20; TRE содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-27, 30, 36, 39, 40-42, 44, 46-49, 54-60 и 62-72; интрон содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29 и 61; по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28, последовательность полиаденилирования содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, 34 и 35; 3'-ITR содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 21 и 32; и/или 3'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38 и 24.

[00126] В определенных вариантах осуществления 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23, или состоит из нее; 5' ITR содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, или состоит из нее; TRE содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 25, 26 или 27, или состоит из нее; интронный элемент содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29, или состоит из нее; по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28, или состоит из нее, последовательность полиаденилирования содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31, или состоит из нее; 3' ITR содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18, или состоит из нее; и/или 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24, или состоит из нее.

[00127] В определенных вариантах осуществления геном rAAV содержит в направлении от 5'- к 3'-концу: 5'-плечо гомологии, содержащее нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23; 5'-ITR, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14; TRE, содержащий в направлении от

5'- к 3'-концу нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 25, и нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 26 (например, TRE содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27); интронный элемент, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29; по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН, содержащую нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28; последовательность полиаденилирования, содержащую нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31; 3'-ITR, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18, и 5'-плечо гомологии, содержащее нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24.

[00128] В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную SEQ ID NO: 45. В определенных вариантах осуществления геном гAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 45. В определенных вариантах осуществления геном гAAV состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 45.

[00129] В другом аспекте в данном документе предусмотрен полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности нуклеиновой кислоты, изложенной под SEQ ID NO: 28, 43, 45, 51 или 52. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 43, 45, 51 или 52, или состоит из нее.

[00130] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, содержащие AAV, как раскрыто в данном документе, вместе с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, адьювантом, разбавителем, средой-носителем или носителем или их комбинацией. «Фармацевтически приемлемый носитель» включает любой материал, который при объединении с активным ингредиентом композиции позволяет ингредиенту сохранять биологическую активность и не вызывает разрушительных физиологических реакций, таких как непредусмотренная иммунная реакция. Фармацевтически приемлемые носители включают воду, фосфатно-солевой буферный раствор, эмульсии, такие как эмульсия масло/вода, и смачивающие средства. Композиции, содержащие такие носители, составляют общеизвестными общепринятыми способами, такими, как представленные в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, current Ed., Mack Publishing Co., Easton Pa. 18042, USA; A. Gennaro (2000) «*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*» 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (1999) H. C. Ansel et al, 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins, и *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2000) A. H. Kibbe et al, 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

[00131] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает полинуклеотид, содержащий кодирующую последовательность, кодирующую белок РАН человека или его фрагмент, где кодирующая последовательность была изменена посредством молчащей мутации таким образом, что она характеризуется менее чем 100% (например, менее чем 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% или 50%) идентичностью с геном РАН человека дикого типа. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28. Полинуклеотид может содержать ДНК, РНК, модифицированную ДНК, модифицированную РНК или их комбинацию. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой вектор экспрессии.

[00132] Особенное преимущество композиций на основе AAV, раскрытых в данном документе, состоит в том, что они обладают способностью редактировать ген РАН в клетке с высокой эффективностью как *in vivo*, так и *in vitro*. В определенных вариантах осуществления эффективность интеграции редактирующего элемента в целевой локус составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%), если AAV вводят мыши, которой имплантированы гепатоциты человека, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV. В определенных вариантах осуществления аллельная частота интеграции редактирующего элемента в целевой локус составляет по меньшей мере 0,5% (например, по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%), если AAV вводят мыши, которой имплантированы гепатоциты человека, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

[00133] Можно использовать любые способы определения эффективности редактирования гена РАН. В определенных вариантах осуществления отдельные клетки отделяют от популяции трансдуцированных клеток и подвергают ПЦР с одиночными клетками с применением праймеров для ПЦР, с помощью которых можно идентифицировать наличие редактирующего элемента, корректно интегрированного в целевой локус гена РАН. Такой способ может дополнительно включать осуществление ПЦР с одиночными клетками для тех же клеток с применением праймеров для ПЦР, которые позволяют селективно амплифицировать немодифицированный целевой локус. Таким образом можно определить генотип клеток. Например, если результат ПЦР с одиночными клетками продемонстрировал, что клетка содержит как отредактированный целевой локус, так и немодифицированный целевой локус, то клетка будет считаться гетерозиготной по отредактированному гену РАН.

[00134] Дополнительно или в качестве альтернативы в определенных вариантах осуществления можно осуществлять ПЦР, опосредованную линейной амплификацией (ЛАМ-ПЦР), количественную ПЦР (qPCR) или цифровую капельную ПЦР (ddPCR) с использованием ДНК, экстрагированной из популяции трансдуцированных клеток, с

применением праймеров и зондов, которые обеспечивают только выявление отредактированных аллелей РАН. Такие способы могут дополнительно включать осуществление дополнительной qPCR или ddPCR (либо в ходе той же реакции, либо в виде отдельной реакции) с определением количества общих геномов в образце и количества неотредактированных аллелей РАН. Данные показатели можно применять для определения аллельной частоты интеграции редактирующего элемента в целевой локус.

[00135] Дополнительно или в качестве альтернативы в определенных вариантах осуществления локус РАН можно амплифицировать из ДНК, экстрагированной из популяции трансдуцированных клеток, либо посредством ПЦР с применением праймеров, которые связываются с областями гена РАН, фланкирующими целевой локус, либо посредством LAM-PCR с применением праймера, который связывает область в пределах генома гAAV (например, область, содержащую экзогенную последовательность, не являющуюся нативной для локуса). Ампликоны, полученные посредством ПЦР, можно секвенировать по отдельности с применением методик одномолекулярного секвенирования нового поколения (NGS) с определением относительного количества отредактированных и неотредактированных аллелей РАН, присутствующих в популяции трансдуцированных клеток. Данные показатели можно применять для определения аллельной частоты интеграции редактирующего элемента в целевой локус.

[00136] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, содержащие AAV, как раскрыто в данном документе, вместе с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, адъювантом, разбавителем, средой-носителем или носителем или их комбинацией. «Фармацевтически приемлемый носитель» включает любой материал, который при объединении с активным ингредиентом композиции позволяет ингредиенту сохранять биологическую активность и не вызывает разрушительных физиологических реакций, таких как непредусмотренная иммунная реакция. Фармацевтически приемлемые носители включают воду, фосфатно-солевой буферный раствор, эмульсии, такие как эмульсия масло/вода, и смачивающие средства. Композиции, содержащие такие носители, составляют общеизвестными общепринятыми способами, такими, как представленные в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, current Ed., Mack Publishing Co., Easton Pa. 18042, USA; A. Gennaro (2000) «*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*» 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (1999) H. C. Ansel et al, 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins, и *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2000) A. H. Kibbe et al, 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

III. Способы применения

[00137] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы восстановления функции гена РАН в клетке. Способы обычно включают трансдукцию клетки с помощью гAAV, раскрытого в данном документе. Такие способы являются высокоэффективными в отношении редактирования функции гена РАН в клетке и не требуют расщепления генома в целевом локусе путем действия экзогенной нуклеазы

(например, мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами, нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), или РНК-направляемой нуклеазы, такой как Cas9) для облегчения такой коррекции. Соответственно, в определенных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают трансдукцию клетки с помощью rAAV, раскрытого в данном документе, без совместной трансдукции или совместного введения экзогенной нуклеазы или нуклеотидной последовательности, которая кодирует экзогенную нуклеазу.

[00138] Способы, раскрытые в данном документе, можно применять в отношении любой клетки, несущей мутацию в гене РАН. Специалисту в данной области техники будет понятно, что клетки, которые активно экспрессируют РАН, представляют особенный интерес. Соответственно, в определенных вариантах осуществления способ применяют в отношении клеток в печени, почке, головном мозге, гипофизе, надпочечнике, поджелудочной железе, мочевом пузыре, желчном пузыре, толстой кишке, тонком кишечнике или молочной железе. В определенных вариантах осуществления способ применяют в отношении гепатоцитов и/или клеток почки.

[00139] Раскрытые в данном документе способы можно осуществлять *in vitro* для исследовательских целей или можно осуществлять *ex vivo* или *in vivo* для терапевтических целей.

[00140] В определенных вариантах осуществления трансдуцируемая клетка находится в организме субъекта-млекопитающего, и AAV вводят субъекту в количестве, эффективном для обеспечения трансдукции клетки в организме субъекта. Соответственно, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание или нарушение, ассоциированное с мутацией гена РАН, при этом способ обычно включает введение субъекту эффективного количества rAAV, раскрытого в данном документе. Субъект может представлять собой субъекта-человека или субъекта-грызуна (например, мышь), содержащего клетки печени человека. Подходящие субъекты-мыши включают без ограничения мышей, которым были пересажены клетки печени человека (например, гепатоциты человека). Любое заболевание или нарушение, ассоциированное с мутацией гена РАН, можно лечить с применением способов, раскрытых в данном документе. Подходящие заболевания или нарушения включают без ограничения фенилкетонурию. В определенных вариантах осуществления клетку трансдуцируют без совместной трансдукции или совместного введения экзогенной нуклеазы или нуклеотидной последовательности, которая кодирует экзогенную нуклеазу.

[00141] Особенное преимущество способов, раскрытых в данном документе, состоит в том, что с их помощью можно редактировать ген РАН в клетке с высокой эффективностью как *in vivo*, так и *in vitro*. В определенных вариантах осуществления эффективность интеграции редактирующего элемента в целевой локус составляет по меньшей мере 1% (например, по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или

95%), если AAV вводят мышам, которым имплантированы гепатоциты человека, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV. В определенных вариантах осуществления аллельная частота интеграции редактирующего элемента в целевой локус составляет по меньшей мере 0,5% (например, по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%), если AAV вводят мышам, которым имплантированы гепатоциты человека, в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

[00142] Раскрытые в данном документе способы можно осуществлять *in vitro* для исследовательских целей или можно осуществлять *ex vivo* или *in vivo* для терапевтических целей.

[00143] В определенных вариантах осуществления трансдуцируемая клетка находится в организме субъекта-млекопитающего, и AAV вводят субъекту в количестве, эффективном для обеспечения трансдукции клетки в организме субъекта. Соответственно, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание или нарушение, ассоциированное с мутацией гена PАН, при этом способ обычно включает введение субъекту эффективного количества rAAV, раскрытого в данном документе. Субъект может представлять собой субъекта-человека, субъекта-примата, отличного от человека (например, яванского макака), или субъекта-грызуна (например, мыш) с мутацией гена PАН. Любое заболевание или нарушение, ассоциированное с мутацией гена PАН, можно лечить с применением способов, раскрытых в данном документе. Подходящие заболевания или нарушения включают без ограничения фенилкетонурию (PKU).

[00144] В определенных вариантах осуществления в вышеупомянутых способах применяют rAAV, содержащий: (а) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 16, и геном rAAV, содержащий в направлении от 5'- к 3'-концу следующие генетические элементы: 5'-плечо гомологии (например, 5'-плечо гомологии, содержащее нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23), 5'-ITR (например, 5'-ITR, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14), элемент регуляции транскрипции (например, TRE, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27), интронный элемент (например, интронный элемент, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29), по меньшей мере часть кодирующей последовательности PАН (например, кодирующей последовательности PАН, содержащей нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28), последовательность полиаденилирования (например, последовательность полиаденилирования SV40 под SEQ ID NO: 31), 3'-ITR (например, 3'-ITR, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18) и 3'-плечо гомологии (например, 3'-плечо гомологии, содержащее нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24); (b)

капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 16, и геном rAAV, содержащий в направлении от 5'-к 3'-концу следующие генетические элементы: 5'-плечо гомологии (например, 5'-плечо гомологии, содержащее нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23), 5'-ITR (например, 5'-ITR, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14), элемент регуляции транскрипции (например, TRE, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27), интронный элемент (например, интронный элемент, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29), по меньшей мере часть кодирующей последовательности PАН (например, кодирующей последовательности PАН, содержащей нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28), последовательность полиаденилирования (например, последовательность полиаденилирования SV40 под SEQ ID NO: 31), 3'-ITR (например, 3'-ITR, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18) и 3'-плечо гомологии (например, 3'-плечо гомологии, содержащее нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24), и/или (с) капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, и геном rAAV, содержащий в направлении от 5'-к 3'-концу следующие генетические элементы: 5'-плечо гомологии (например, 5'-плечо гомологии, содержащее нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23), 5'-ITR (например, 5'-ITR, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14), элемент регуляции транскрипции (например, TRE, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27), интронный элемент (например, интронный элемент, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29), по меньшей мере часть кодирующей последовательности PАН (например, кодирующей последовательности PАН, содержащей нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28), последовательность полиаденилирования (например, последовательность полиаденилирования SV40 под SEQ ID NO: 31), 3'-ITR (например, 3'-ITR, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18) и 3'-плечо гомологии (например, 3'-плечо гомологии, содержащее нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24).

[00145] В определенных вариантах осуществления трансдукция клетки раскрытой в данном документе композицией на основе AAV может быть осуществлена, как предусмотрено в данном документе, или любым способом трансдукции, известным специалисту средней квалификации в данной области техники. В определенных вариантах осуществления клетка может быть приведена в контакт с AAV при множественности инфекции (MOI), составляющей 50000; 100000; 150000; 200000; 250000; 300000; 350000; 400000; 450000 или 500000 или при любой MOI, которая обеспечивает оптимальную трансдукцию клетки.

[00146] Композицию на основе AAV, раскрытую в данном документе, можно

вводить субъекту любым подходящим путем, включая без ограничения внутривенный, интраперитонеальный, подкожный, внутримышечный, интраназальный, местный или внутрикожный пути. В определенных вариантах осуществления композиция составлена для введения посредством внутривенной инъекции или подкожной инъекции.

IV. Системы упаковки на основе AAV

[00147] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает системы упаковки для рекомбинантного получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), раскрытого в данном документе. Такие системы упаковки обычно содержат первый нуклеотид, кодирующий один или более белков Rep AAV; второй нуклеотид, кодирующий капсидный белок любого из AAV, раскрытых в данном документе, и третью нуклеотидную последовательность, содержащую любой из геномов rAAV, раскрытых в данном документе, где система упаковки функционирует в клетке, обеспечивая включение генома rAAV в капсид с образованием AAV.

[00148] В определенных вариантах осуществления система упаковки содержит первый вектор, содержащий первую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более белков Rep AAV, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный белок AAV, и второй вектор, содержащий третью нуклеотидную последовательность, содержащую геном rAAV. Как используется в контексте описанной в данном документе системы упаковки, «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая является средой-носителем для введения нуклеиновых кислот в клетку (например, плазида, вирус, космида, искусственная хромосома и т. п.).

[00149] Любой белок Rep AAV можно использовать в раскрытых в данном документе системах упаковки. В определенных вариантах осуществления системы упаковки нуклеотидная последовательность Rep кодирует белок Rep AAV2. Подходящие белки Rep AAV2 включают без ограничения Rep 78/68 или Rep 68/52. В определенных вариантах осуществления системы упаковки нуклеотидная последовательность, кодирующая белок Rep AAV2, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, характеризующийся минимальным процентом идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью Rep AAV2 под SEQ ID NO: 22, где минимальный процент идентичности последовательности составляет по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) по длине аминокислотной последовательности белка Rep AAV2. В определенных вариантах осуществления системы упаковки белок Rep AAV2 имеет аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

[00150] В определенных вариантах осуществления системы упаковки система упаковки дополнительно содержит четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую один или более генов вируса-помощника. В определенных вариантах осуществления системы упаковки система упаковки дополнительно содержит третий вектор, например, вектор на основе вируса-помощника, содержащий четвертую

нуклеотидную последовательность, содержащую один или более генов вируса-помощника. Третий вектор может представлять собой независимый третий вектор, может быть встроенным в первый вектор или встроенным во второй вектор.

[00151] В определенных вариантах осуществления системы упаковки вирус-помощник выбран из группы, состоящей из аденовируса, вируса герпеса (включая вирус простого герпеса (HSV)), поксвируса (такого как вирус осповакцины), цитомегаловируса (CMV) и бакуловируса. В определенных вариантах осуществления системы упаковки, где вирус-помощник представляет собой аденовирус, геном аденовируса содержит один или более генов РНК аденовируса, выбранных из группы, состоящей из E1, E2, E4 и VA. В определенных вариантах осуществления системы упаковки, где вирус-помощник представляет собой HSV, геном HSV содержит один или более генов HSV, выбранных из группы, состоящей из UL5/8/52, ICPO, ICP4, ICP22 и UL30/UL42.

[00152] В определенных вариантах осуществления системы упаковки первый, второй и/или третий вектор содержатся в одной или более плаزمиде. В определенных вариантах осуществления первый вектор и третий вектор содержатся в первой плазмиде. В определенных вариантах осуществления второй вектор и третий вектор содержатся во второй плазмиде.

[00153] В определенных вариантах осуществления системы упаковки первый, второй и/или третий вектор содержатся в одном или более рекомбинантных вирусах-помощниках. В определенных вариантах осуществления первый вектор и третий вектор содержатся в рекомбинантном вирусе-помощнике. В определенных вариантах осуществления второй вектор и третий вектор содержатся в рекомбинантном вирусе-помощнике.

[00154] В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ рекомбинантного получения AAV, как описано в данном документе, где способ включает осуществление трансфекции или трансдукции клетки с помощью системы упаковки, как описано в данном документе, в условиях, применяющихся для включения генома гAAV в капсид с образованием гAAV, как описано в данном документе. Иллюстративные способы рекомбинантного получения гAAV включают временную трансфекцию (например, одной или более плазмидами для трансфекции, содержащими первый, второй и необязательно третий вектор, как описано в данном документе), вирусную инфекцию (например, одним или более рекомбинантными вирусами-помощниками, такими как аденовирус, поксвирус (такой как вирус осповакцины), вирус герпеса (включая HSV, цитомегаловирус или бакуловирус), содержащими первый, второй и необязательно третий вектор, как описано в данном документе), и трансфекцию или инфекцию стабильной линией клеток-продуцентов (например, с использованием стабильной клетки-продуцента, такой как клетка млекопитающего или насекомого, содержащей нуклеотидную последовательность Rep, кодирующую один или более белков Rep AAV, и/или нуклеотидную последовательность Cap, кодирующую один или более капсидных белков AAV, как описано в данном документе, и генома AAV, как описано в данном документе,

доставляемого в форме плазмиды или рекомбинантного вируса-помощника).

[00155] Соответственно, настоящее изобретение предусматривает систему упаковки для получения рекомбинантного AAV (rAAV), где система упаковки содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более белков Rep AAV; вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный белок любого из AAV, описанных в данном документе; третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность генома rAAV из любого из AAV, описанных в данном документе, и необязательно четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую один или более генов вируса-помощника.

V. Примеры

[00156] Эти примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Пример 1: Схемы вектора для коррекции hPАН

Специфический в отношении мыши вектор PАН-006m для редактирования гена PАН

[00157] Специфический в отношении мыши вектор на основе AAV для редактирования гена, PАН-006m, показан на фиг. 2А. Данный вектор был разработан для интеграции кодирующей последовательности PАН человека в локус гена PАН мыши с применением левого и правого плеч гомологии, которые являются специфическими в отношении последовательности мыши. PАН-006m содержит следующие генетические элементы в направлении от 5'- к 3'-концу: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; кодирующую последовательность PАН человека, измененную посредством молчащей мутации; последовательность полиаденилирования SV40; 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности данных элементов изложены в таблице 1. PАН-006m не содержит гетерологичный промотор.

Специфический в отношении мыши вектор PАН-006m-LP-1 для переноса гена PАН/редактирования гена PАН

[00158] Специфический в отношении мыши вектор на основе AAV для переноса гена/редактирования гена, PАН-006m-LP-1, показан на фиг. 2В. Данный вектор был разработан для интеграции кодирующей последовательности PАН человека в локус гена PАН мыши с применением левого и правого плеч гомологии мыши, а также для обеспечения возможности экспрессии PАН человека под контролем гетерологичного промотора, специфического в отношении печени, в клетке в отсутствие геномной интеграции. PАН-006m-LP-1 содержит следующие генетические элементы в направлении от 5'- к 3'-концу: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; элемент регуляции транскрипции, содержащий элемент, представляющий собой печеночную контрольную область (HCR) аполипопротеина человека, промоторный элемент гена альфа-1-антитрипсина человека (hAAT) и экзон 1 hAAT; элемент SV40; кодирующую последовательность PАН человека, измененную посредством молчащей мутации; последовательность полиаденилирования SV40; 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности данных элементов

изложены в таблице 1.

Специфический в отношении человека вектор РАН-032h для редактирования гена РАН

[00159] Специфический в отношении человека вектор на основе AAV для редактирования гена, РАН-032h, показан на фиг. 2С. Данный вектор был разработан для интеграции кодирующей последовательности РАН человека в локус гена РАН человека с применением левого и правого плеч гомологии, которые являются специфическими в отношении последовательности человека. РАН-032h содержит следующие генетические элементы в направлении от 5'- к 3'-концу: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; акцептор сплайсинга; элемент 2А; кодирующую последовательность РАН человека, измененную посредством молчащей мутации; последовательность полиаденилирования SV40; 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности данных элементов изложены в таблице 1. РАН-032h не содержит гетерологичный промотор.

Специфический в отношении человека вектор hРАН-hIIC-032-LP1-SD3 для переноса гена РАН/редактирования гена РАН

[00160] Специфический в отношении человека вектор на основе AAV для переноса гена/редактирования гена, hРАН-hIIC-032-LP1-SD3, показан на фиг. 2D. Данный вектор был разработан для интеграции кодирующей последовательности РАН человека в локус гена РАН человека с применением левого и правого плеч гомологии человека, а также для обеспечения возможности экспрессии РАН человека под контролем гетерологичного промотора, специфического в отношении печени, в клетке в отсутствие геномной интеграции. hРАН-hIIC-032-LP1-SD3 содержит следующие генетические элементы в направлении от 5'- к 3'-концу: элемент 5'-ITR; 5'-плечо гомологии; элемент регуляции транскрипции, содержащий элемент, представляющий собой печеночную контрольную область (HCR) аполипопротеина человека, промоторный элемент гена альфа-1-антитрипсина человека (hААТ) и экзон 1 hААТ; элемент SV40; кодирующую последовательность РАН человека, измененную посредством молчащей мутации; последовательность полиаденилирования SV40; 3'-плечо гомологии и элемент 3'-ITR. Последовательности данных элементов изложены в таблице 1.

Таблица 1. Выбранные генетические элементы в векторах РАН-006m, РАН-006m-LP-1, РАН-032h и hРАН-hIIC-032-LP1-SD3 для коррекции РАН

	РАН-006m	РАН-006m-LP-1	РАН-032h	hРАН-hIIC-032-LP1-SD3
Генетический элемент	SEQ ID NO:			
Элемент 5'-ITR	14	14	14	14
5'-плечо гомологии	84	85	23	23
Акцептор сплайсинга	-	-	30	-
Элемент 2А	-	-	40	-

Элемент регуляции транскрипции	-	27	-	27
Интронный элемент SV40	-	29	-	29
Кодирующая последовательность РАН человека, измененная посредством молчащей мутации	83	28	83	28
Последовательность полиаденилирования SV40	31	31	31	31
3'-плечо гомологии	86	86	24	24
Элемент 3'-ITR	18	18	18	18
Геном AAV от 5'-плеча гомологии до 3'-плеча гомологии	77	79	81	43
Геном AAV от 5'-ITR до 3'-ITR	78	80	82	45

«-» обозначает отсутствие данного элемента

Пример 2: Анализ векторов для коррекции hPAH в мышинных моделях

Материалы и способы

Мышиная модель РАН^{enu2}.

[00161] Мышиную модель РАН^{enu2} использовали для установления дозозависимого ответа для векторов для коррекции РАН, упакованных в капсид AAVHSC15, посредством измерения количества геномов вектора, процентной доли вставки в целевой ген, экспрессии мРНК hPAH и концентрации Phe/Тур.

[00162] Линию мышей РАН^{enu2} получали посредством мутагенеза зародышевой линии с использованием этилнитрозомочевины с последующим скринингом клиренса Phe для отделения мутантной линии мышей, дефектной по активности РАН (см. McDonald JD, et al. PNAS 1990;87:1965-1967, которая настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте). Она содержит гомозиготную миссенс-мутацию (F263S в экзоне 7) в области, кодирующей активный сайт РАН, что приводит к устранению активности РАН. Мутации в пределах экзона 7 часто встречаются у людей с дефицитом РАН, хотя дефицит РАН у людей, как правило, выражается в компаунд-гетерозиготном фоне. Мыши РАН^{enu2} демонстрируют настоящее явление при уровнях Phe в крови, постоянно превышающих 1200 мкмоль/л.

Мышиная модель ксенотрансплантата печени человека FRG®.

[00163] Мышей Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-} (FRG) (Azuma et al. (2007) Nat. Biotechnol.

25(8): 903-910), содержащих ткань печени человека, использовали для измерения трансдукции геномов вектора *in vivo*, вставки в целевой ген ДНК человека и экспрессии мРНК hPAH в ткани печени человека после введения векторов для коррекции, упакованных в капсид AAVHSC15, по всему диапазону доз.

[00164] Модель ксенотрансплантата печени человека FRG® представляет собой линию мышей с ослабленной иммунной системой, несущих нокауты трех генов: *Fah*^{-/-}, *IL2rg*^{-/-} и *Rag2*^{-/-}. По причине нокаутов *IL2rg*^{-/-} и *Rag2*^{-/-} у данных мышей отсутствуют В-клетки, Т-клетки и NK-клетки, что приводит к принятию пересадки клеток человека. Генотип *Fah*^{-/-} делает данных мышей зависимыми от лекарственного средства для защиты печени, 2-(2-нитро-4-трифторметилбензоил)-1,3-циклогександиона (NTBC), таким образом, что его отмена приводит к утрате гепатоцитов и смерти животного в течение 4-8 недель.

[00165] Для получения гуманизированной печени у мышей FRG первичные гепатоциты человека имплантировали при одновременной отмене NTBC. Поскольку гепатоциты человека содержат интактный ген FАH, воздействию подвергаются только мышинные гепатоциты, что приводит к постепенной репопуляции компартмента печени мыши гепатоцитами человека. Печень, подвергнутая репопуляции гепатоцитами человека, демонстрирует > 90% гепатоцитов человека и восстановленную функцию печени (Azuma et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25(8): 903-910).

Целевая вставка - анализ сцепления посредством ddPCR.

[00166] Для определения уровня целевой вставки на каждый аллель в локусе гена PAH применяли анализ, в котором используется цифровая капельная ПЦР (ddPCR). В ходе данного анализа наличие целевой вставки определяли посредством измерения генетического сцепления между трансгеном hPAH и геномной мишенью. Сцепление представляет собой меру того, как часто две последовательности находятся на одной и той же цепи ДНК. Определение количества сцепленных и несцепленных последовательностей вектора и генома можно применять для измерения эффективности вставки, которую регистрируют в виде процентной доли вставки на каждый аллель.

[00167] Для измерения доли целевой вставки посредством сцепления применяли два набора праймеров и зондов, где один нацеливается на полезную нагрузку, представляющую собой hPAH, измененный посредством молчащей мутации, и второй нацеливается на геномную последовательность *PaH* за пределами плеч гомологии. Каждый зонд состоял из флуорофора в канале либо FAM, либо HEX таким образом, чтобы если ДНК анализировали в виде разделенных капель, каждую каплю можно было оценивать по ее профилю излучения как продуцирующую один из трех возможных сигналов: FAM-положительный (только полезная нагрузка, представляющая собой hPAH, измененный посредством молчащей мутации); HEX-положительный (только геномный) и HEX+FAM-положительный (содержит полезную нагрузку, представляющую собой hPAH, измененный посредством молчащей мутации, и геномную последовательность). Долю целевой вставки измеряли посредством определения доли капель, содержащих как

полезную нагрузку, так и геномную последовательность на уровне, превышающем ожидаемый, обусловленном вероятностью, разделенной на общее количество протестированных аллелей P_{ah}.

[00168] Поскольку относительная концентрация вектора по отношению к геному может варьироваться среди доз и моделей, важно удостовериться, что каждое измерение находится в пределах линейного диапазона выявления как для вектора, так и для целевой геномной последовательности. Таким образом, перед измерением доли целевой вставки измеряли относительное содержание вектора и целевого генома среди диапазона концентраций входной выборки от 1 нг, 5 нг, 10 нг, 100 нг. Соотношение вектора и генома применяли для определения концентраций во входной выборке, где как вектор, так и геномы попадают в пределы выявления посредством ddPCR, которые составляют 0,25-5000 молекул на мкл.

Целевая вставка - анализ посредством секвенирования нового поколения (NGS).

[00169] Данный подход применяли для расчета доли целевой вставки с применением анализов, охватывающих как левый, так и правый сайт интеграции для конструкции, редактирующей P_{ah} человека. Для каждого из двух ампликонов имелся общий соответствующий наружный праймер, расположенный на геномной ДНК, фланкирующей каждое плечо гомологии, в то время как внутренние праймеры были уникальными для неотредактированных аллелей или для отредактированных аллелей соответственно. Каждое количество последовательностей дикого типа (WT) и отредактированных последовательностей подсчитывали путем определения количества последовательностей, покрывающих соединение между плечом гомологии и либо последовательностью вставленного гена, либо неотредактированной последовательностью дикого типа. Наличие отдельных анализов, покрывающих как левую, так и правую сторону сайта вставки, обеспечивает избыточное количественное определение вставки. Посредством применения данного подхода с использованием NGS процентную долю целевых вставок можно определять из расчета на общее количество аллелей и, более того, можно собирать последовательности целого сайта вставки, что обеспечивает возможность выявления мутаций de novo (например, некорректных событий вставки и делеции и интеграции ITR).

[00170] Различия эффективности амплификации при отсутствии и наличии вставки учитывали с применением 11-этапного стандарта как для левого, так и для правого сайта интеграции. Каждая контрольная панель состоит из очищенного ампликона без вставки и отредактированного ампликона в следующих соотношениях: 0% отредактированной, 1%, 2%, 5%, 10%, 50%, 60%, 90%, 95%, 98%, 99% и 100% отредактированной контрольной последовательности. Расчеты эффективности целевой вставки осуществляли следующим образом: подсчитывали количество ридов, полученное посредством секвенирования, специфических в отношении геномных локусов с наличием и отсутствием вставки, и рассчитывали показатель целевой вставки (количество ридов со вставкой/общее количество ридов * 100%), и аппроксимировали по стандартной кривой. Поскольку

количественный показатель редактирования на каждый образец измеряли посредством двух независимых анализов, каждый из которых охватывал противоположные плечи гомологии в нативном геноме, определяли согласованность между измерениями.

Точность целевой вставки - анализ посредством секвенирования нового поколения (NGS).

[00171] Для определения того, сопровождалась ли вставка в целевой ген мутацией *de novo* в сайтах интеграции, секвенировали ампликоны, полученные посредством ПЦР, охватывающие геномные последовательности за пределами как левого, так и правого плеча гомологии, а также целевой сайт вставки. В общей сложности секвенировали четыре ампликона на каждый образец. Оценивали ампликоны, специфические в отношении вставки, охватывающие каждое плечо гомологии (hРАН-зависимая ПЦР), или аллели WT/без вставки, охватывающие каждое плечо гомологии (без вставки hРАН).

[00172] Для идентификации предела выявления для анализа собирали контрольную панель на основе ампликона посредством смешивания двух ампликонов правых плеч гомологии, варьирующихся по одному основанию (вариация с заменой Т на G), при 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 50 и 100%. Панель на основе ампликона подвергали тем же этапам обработки. На основании количественного определения вариантов с помощью стандартной кривой ложноположительные варианты наблюдали при частоте 0,1-0,25% в неслучайных положениях. Покрытие секвенирования для почти всех положений превышало 10000. Вариант считался истинно положительным при следующих критериях: (1) при частоте варианта, составляющей $> 0,5\%$, и при прохождении фильтров; (2) появляется в обоих технических дубликатах секвенирования и (3) не наблюдается в аллелях WT при условии сопоставимой глубины и качества последовательности.

Результаты

[00173] Исследование выполняли с использованием мышей РАН^{enu2} с применением специфического в отношении мышцы вектора для коррекции, РАН-006m, который содержит плечи гомологии, нацеливающиеся на locus РАН мышши. РАН-006m не содержит промотор, специфический в отношении печени и, таким образом, экспрессией управляют эндогенные промоторные элементы. Трех самцам мышши на каждую группу вводили либо $1E+14$ г. в./кг РАН-006m, упакованного в капсид AAVHSC15, либо буфер для составления, и уровень Phe в крови измеряли один раз в неделю в течение 12 недель. Во временной точке 12 недель мышши умерщвляли с измерением доли целевой вставки в локусе РАН и уровней экспрессии мРНК.

[00174] Уровни Phe в крови снижались до нормальных уровней в течение 2 недель после введения РАН-006m, упакованного в капсид AAVHSC15, как показано на фиг. 3. Снижение уровня Phe в крови поддерживалось на уровнях < 360 мкМ на протяжении 12-недельного исследования.

[00175] Уровень целевой вставки в локусе РАН измеряли с применением анализа сцепления посредством ddPCR, как описано в разделе «Материалы и способы» выше. Диапазон 3-7% целевой вставки на каждый аллель выявляли в печени во временной точке

12 недель, как показано на фиг. 4. Также измеряли уровень мРНК hPAN, измененного посредством молчащей мутации (относительно GAPDH мыши), и он показан на фиг. 5. Выявляли экспрессию мРНК hPAN, измененного посредством молчащей мутации (соотношение мРНК PAN/GAPDH составляло $0,38 \pm 0,06$). Следует отметить, что было обнаружено, что уровень целевой вставки на каждый аллель непосредственно коррелировал с уровнем экспрессии мРНК (коэффициент детерминации R-квадрат 0,82; $P < 0,02$).

[00176] Для определения того, могут ли быть достигнуты сходные уровни целевой вставки и экспрессии мРНК в печени человека, проводили эксперименты с использованием мыши FRG®, содержащей ксенотрансплантат печени человека. Мышей обрабатывали посредством однократной IV дозы, составляющей 1E+14 г. в./кг PAN-032h, упакованного в капсид AAVHSC15. PAN-032h не содержит промотор, специфический в отношении печени и, таким образом, экспрессией управляют эндогенные промоторные элементы человека, сходные с таковыми для конструкции PAN-006m.

[00177] Экспрессию мРНК hPAN, полученной из hPAN, измененного посредством молчащей мутации, оценивали в клетках печени, полученных от мыши FRG®. Экспрессию измеряли посредством RT-ddPCR и выражали в виде соотношения с GAPDH для обеспечения возможности сравнения для гепатоцитов человека и мыши. В гепатоцитах человека, выделенных из мышинной модели FRG® через 6 недель после введения PAN-032h, упакованного в капсид AAVHSC15, экспрессировалась мРНК hPAN, полученная из hPAN, измененного посредством молчащей мутации (соотношение мРНК hPAN/GAPDH= $0,57 \pm 0,11$). Уровни мРНК hPAN, измененного посредством молчащей мутации, в гепатоцитах мыши были значительно более низкими (соотношение мРНК hPAN/GAPDH= $0,13 \pm 0,08$, $p < 0,003$ по сравнению с таковым для человека) и могли полностью объясняться присутствием примеси гепатоцитов человека в используемых препаратах (примерно 15-20% гепатоцитов человека). Долю клеток мыши в образцах от человека и клеток человека в образцах от мыши рассчитывали посредством измерения относительного содержания гена GAPDH человека и мыши в каждом образце.

[00178] Подтверждение специфической в отношении человека целевой вставки в локус PAN человека осуществляли в ходе отдельного исследования с использованием мышей FRG®, где уровни целевой вставки (~6% с применением способа анализа сцепления посредством ddPCR; фиг. 6) и уровни мРНК hPAN, полученной из hPAN, измененного посредством молчащей мутации (соотношение мРНК hPAN/GAPDH= $0,45 \pm 0,26$), достигались в клетках человека при обработке с помощью PAN-032h, упакованного в капсид AAVHSC15. Эффективность вставки в целевой ген характеризовали с применением анализа посредством NGS, где количественное определение интеграции основано на двух отдельных измерениях, которые покрывают как левое, так и правое плечо гомологии соответственно, при этом покрытие распространяется на геномные сайты для целенаправленной интеграции и за пределы каждого плеча гомологии, как описано в разделе «Материалы и способы» выше. Необработанную геномную ДНК дикого

типа применяли для выявления частоты ложноположительных результатов для данного эксперимента. Интеграцию hРАН в локус РАН подтверждали посредством ортогональных анализов (анализ сцепления посредством ddPCR и NGS), в ходе которых регистрировали значения эффективности интеграции, составляющие 6%. Данные результаты показаны на фиг. 7.

[00179] На фиг. 6 и фиг. 7 показана частота целенаправленной вставки в гепатоцитах, выделенных от обработанных мышей FRG. На фиг. 6 показана вставка нацеливающегося на клетки человека вектора для коррекции РАН-032h, упакованного в капсид AAVHSC15, в локусы РАН мыши и человека, как измерено посредством видоспецифических анализов редактирования посредством ddPCR, описанных в данном документе. В качестве положительного контроля использовали сцепление между специфическим в отношении мыши зондом для локуса РАН и зондом для гомологичного сайта вставки. На фиг. 6 An.1 HS относится к клеткам животного 1 Homo sapiens, An.1 MM относится к клеткам животного 1 Mus musculus, An.1 MM Pos. относится к положительному контролю для животного 1 Mus musculus, An.2 HS относится к клеткам животного 2 Homo sapiens, An.2 MM относится к клеткам животного 2 Mus musculus, и An.2 MM Pos. относится к положительному контролю для животного 2 Mus musculus. На фиг. 7 показано редактирование гепатоцитов человека, как измерено с применением количественных анализов посредством NGS, охватывающих как левое, так и правое плечо гомологии. Эффективность редактирования измеряли по количествам ридов для последовательностей, специфических для редактирования, по сравнению с последовательностями, специфическими для дикого типа. Необработанная ДНК человека, смешанная с вектором РАН-032h, служила в качестве отрицательного контроля.

[00180] На основании данных исследований можно сделать вывод, что (1) концентрация Phe в крови снижается до терапевтически значимого порога (≤ 360 мкМ) после введения мышью конструкции РАН-006m, упакованной в капсид AAVHSC15, мышам РАН^{enu2}; (2) сходные уровни экспрессии мРНК наблюдались среди видов между специфической в отношении мыши конструкцией РАН-006m у мышей РАН^{enu2} и специфической в отношении человека конструкцией РАН-032h в ткани печени человека у мышей FRG®, обе из которых были упакованы в капсид AAVHSC15; (3) отсутствие значительной доли целевой вставки наблюдалось в гепатоцитах мыши (с применением анализов, специфических в отношении мыши) после введения специфической в отношении человека конструкции РАН-032h, упакованной в капсид AAVHSC15, мышам FRG®, что демонстрирует специфичность в отношении последовательности/вида для плеч гомологии человека, и (4) сходные уровни целевой интеграции на каждый аллель достигались среди видов между специфической в отношении мыши конструкцией РАН-006m у мыши РАН^{enu2} (4-7%) и специфической в отношении человека конструкцией РАН-032h у мыши FRG (~6%).

Пример 3. Эффективность РАН-006m-LP-1 у мышей РАН^{enu2} in vivo

[00181] Оценивали способность вектора РАН-006m-LP-1 снижать уровни Phe в

крови у мышей и проводили корреляцию с экспрессией мРНК hPAH и целевой вставкой в локусе PAH мыши. В частности, четырех мышей PAH^{enu2} подвергали однократному внутривенному введению специфического в отношении мыши вектора PAH-006m-LP-1, упакованного в капсид AAVHSC15, покрывающему диапазон доз ~ 2 -log, при уровнях доз, составляющих 5E+12, 1E+13, 1E+14 и 2E+14 г. в./кг («GE 5E12», «GE 1E13», «GE 1E14» и «GE 2E14» соответственно). Кроме того, контрольное средство, содержащее конструкцию на основе AAV для переноса гена, экспрессирующую hPAH, но не содержащую плечи гомологии, вводили в дозе 1E+13 г. в./кг («GT (+) контроль 1E13»). Четырем мышам PAH^{enu2} также вводили буфер для составления в качестве отрицательного контроля («FB»). Концентрацию Phe в крови измеряли на протяжении всего эксперимента.

[00182] Подгруппу животных, которым вводили дозу 1E+14 г. в./кг, умерщвляли во временной точке 2 недели с измерением уровня вставки в целевой ген в печени. Выявляли уровень вставки в целевой ген на каждый аллель, составляющий $5 \pm 2\%$. Значения концентрации Phe в крови у мышей до недели 41 показаны на фиг. 8А. На фиг. 8А показан полный набор данных, тогда как на фиг. 8В показаны данные для 12 недель с уменьшенным масштабом оси у для обеспечения возможности более ясного отображения различий между уровнями доз. Концентрация Phe в крови снижалась до нормальных уровней через одну неделю после введения всех уровней доз, при этом дозы 1E+14 и 2E+14 приводили к получению наиболее низких уровней.

[00183] Анализ целевой интеграции осуществляли у животных, которым вводили дозы 5E12 г. в./кг («5E+12»), 1E13 г. в./кг («1E+13») и 1E14 г. в./кг («1E+14»), как указано (фиг. 8С). Целевую интеграцию измеряли посредством секвенирования нового поколения, как описано в примере 2. Показатели частоты интеграции рассчитывали на основании количества последовательностей с интеграцией, разделенного на общее количество последовательностей (с событием интеграции или без него). На фиг. 8С все данные были собраны через 43 недели после введения дозы, за исключением «1E+14 г. в./кг - 3 недели», где данные были собраны через 3 недели после введения дозы. Как показано, целевую интеграцию выявляли у животных, которым вводили дозу 1E14 г. в./кг вектора PAH-006m-LP-1, упакованного в капсид AAVHSC15, как через 3, так и через 43 недели после введения дозы.

Пример 4. Специфичность редактирования для PAH-032h в гепатоцитах примата, отличного от человека, и человека *in vitro*

[00184] Яванские макаки демонстрируют 94,2% идентичность последовательности в локусе PAH относительно последовательностей плеч гомологии человека из PAH-032h. Для определения специфичности PAH-032h в отношении локуса PAH человека оценивали способность PAH-032h редактировать локус PAH в смеси первичных гепатоцитов яванского макака и первичных гепатоцитов человека. В общей сложности 5E+5 гепатоцитов от одного яванского макака и одного донора-человека обрабатывали с помощью 1,5E+5 г. в./клетка вектора PAH-032h, упакованного в капсид AAVHSC15. Редактирование локуса PAH оценивали посредством ПЦР с применением праймеров,

специфических в отношении отредактированного аллеля человека, и праймеров, специфических в отношении отредактированного аллеля примата, отличного от человека. Данные праймеры для ПЦР были разработаны для демонстрации наличия либо отсутствия интеграции и не были предназначены для количественного анализа. Соответственно, показатели эффективности ПЦР определяли в ДНК для положительного контроля по стандартной кривой разбавлений. Данный ПЦР-анализ характеризовался более низкой границей выявления, составляющей 15 копий отредактированного аллеля ($2,618E-5$ amol).

[00185] Наблюдалась целенаправленная интеграция полезной нагрузки в локус РАН гепатоцитов человека. Напротив, интеграция полезной нагрузки в гомологичные локусы яванского макака не выявлялась. Данные результаты указывают на то, что плечи гомологии человека были специфическими в отношении локуса РАН человека в ходе данных анализов.

Пример 5. Сравнение вектора для переноса гена/редактирования гена и вектора для эписомальной экспрессии трансгена

[00186] Для изучения дозозависимого ответа в виде экспрессии интегрированного трансгена и эписомальной экспрессии трансгена проводили прямое сравнение с применением специфического в отношении мыши вектора на основе AAV для переноса гена/редактирования гена, РАН-006m-LP-1, и вектора на основе AAV для эписомальной экспрессии трансгена (содержащего такой же элемент регуляции транскрипции, как и РАН-006m-LP-1, но не содержащего плечи гомологии), упакованного в капсид AAVHSC15. Единственным различием между полезными нагрузками двух векторов было наличие двух нуклеотидных изменений посредством молчащей мутации в кодирующей последовательности РАН из РАН-006m-LP-1. Пяти самцам мышей РАН^{enu2} в возрасте 4 недель внутривенно вводили дозы, составляющие $1E12$ г. в./кг (« $1E+12$ »), $5E12$ г. в./кг (« $5E+12$ »), $1E13$ г. в./кг (« $1E+13$ »), $5E13$ г. в./кг (« $5E+13$ ») или $1E14$ г. в./кг (« $1E+14$ »), либо специфического в отношении мыши вектора для переноса гена/редактирования гена, либо вектора для эписомальной экспрессии трансгена, в каждом случае упакованных в AAVHSC15, либо контроля в виде буфера для составления (FB). В случае вектора для эписомальной экспрессии трансгена, упакованного в AAVHSC15, после принятой в фармакопее процедуры титрования титр используемой партии соответственно доводили до $7,8E11$ г. в./кг (« $7,8E+11$ »), $3,9E12$ г. в./кг (« $3,9E+12$ г. в./кг»), $7,8E12$ г. в./кг (« $7,8E+12$ »), $3,9E13$ г. в./кг (« $3,9E+13$ ») и $7,8E13$ г. в./кг (« $7,8E+13$ »). Было обнаружено, что целенаправленная интеграция у мышей, которым вводили дозу РАН-006m-LP-1, была выявляемой и стабильной. Был также обнаружен дозозависимый ответ между коррекцией фенотипа и уровнями интеграции.

[00187] На фиг. 9А и 9В показаны уровни Phe в сыворотке крови на протяжении 12-недельных промежутков времени у мышей, которым вводили дозу, как описано выше. Как показано, снижение уровня Phe в сыворотке крови наблюдалось у мышей, которые получали вектор для эписомальной экспрессии трансгена, упакованный в капсид AAVHSC15 (фиг. 9А), или вектор для переноса гена/редактирования гена, упакованный в

капсид AAVHSC15 (фиг. 9B). Соответствующие повышения концентрации Tug в крови, последующего метаболита Phe, также наблюдались у мышей, которые получали вектор для эписомальной экспрессии трансгена, упакованный в капсид AAVHSC15 (фиг. 9C), или вектор для переноса гена/редактирования гена, упакованный в капсид AAVHSC15 (фиг. 9D).

[00188] На фиг. 9E и 9F показаны уровни геномов вектора у мышей PАН^{enu2}, которым вводили дозу вектора для эписомальной экспрессии трансгена (фиг. 9E) или PАН-006m-LP1 (фиг. 9F), в каждом случае запакованных в капсид AAVHSC15, в указанных дозах. Количество геномов вектора на мкг ДНК измеряли посредством количественной ПЦР с применением праймера и зондов, специфических в отношении кодирующей последовательности, по сравнению с исходной геномной ДНК-мишенью. Дозозависимый ответ как в виде количества копий генома вектора, так и в виде мРНК наблюдался как для PАН-006m-LP-1, так и для вектора для эписомальной экспрессии трансгена. Количество копий вектора для PАН-006m-LP-1 (фиг. 9F) было более высоким при всех дозах по сравнению с вектором для эписомальной экспрессии трансгена (фиг. 9E). Наблюдаются различия в г. в./мкг между трансгенным вектором и вектором для интеграции, и они могут отражать различия в стабильности между самокомплементарными и одноцепочечными векторами.

[00189] На фиг. 9G и 9H показаны уровни экспрессии мРНК трансгена PАН у мышей PАН^{enu2}, которым вводили дозу вектора для эписомальной экспрессии трансгена (фиг. 9G) или PАН-006m-LP1 (фиг. 9H), в каждом случае запакованных в капсид AAVHSC15, в указанных дозах. Уровни мРНК измеряли посредством количественной RT-PCR с применением праймеров и зондов, специфических в отношении кодирующей последовательности, по сравнению с общей РНК. Как показано, было обнаружено, что экспрессия мРНК была дозозависимой, и уровень экспрессии был незначительно более высоким у мышей, которые получали PАН-006m-LP-1, упакованный в капсид AAVHSC15, по сравнению с мышами, которые получали вектор для эписомальной экспрессии трансгена, упакованный в капсид AAVHSC15.

[00190] Для оценки количественного показателя и достоверности интеграции в целевой локус у мышей PАН^{enu2} выполняли два способа для выявления событий интеграции: ddPCR и секвенирование нового поколения.

[00191] Уровень целевой интеграции в локусе PАН измеряли с применением анализа сцепления посредством ddPCR, как описано в примере 2. На фиг. 9I показан количественный показатель целевой интеграции (измеренный в виде вирусных геномов на аллель PАН, выявленных посредством ddPCR) через 12 недель после введения дозы для различных доз PАН-006m-LP1 и вектора для эписомальной экспрессии трансгена с указанием контроля. Как показано, дозозависимый ответ в виде целенаправленной интеграции, выявленной посредством ddPCR, наблюдался у мышей, которые получали PАН-006m-LP1, упакованный в капсид AAVHSC15 (фиг. 9I; группы 2, 3, 4, 5 и 6). В качестве сравнения, целенаправленная интеграция не была выявлена посредством ddPCR

у мышей, которые получали вектор для эписомальной экспрессии трансгена, упакованный в капсид AAVHSC15 (фиг. 9I; группа 11).

[00192] На фиг. 9J показана частота целевой вставки вектора, выявленная (с применением подхода NGS, описанного в примере 2) через 12 недель после введения дозы при указанных дозах РАН-006m-LP1, упакованного в AAVHSC15. Как показано, дозозависимый ответ в виде целенаправленной интеграции, выявленной посредством NGS, наблюдался у мышей, которые получали РАН-006m-LP1, упакованный в капсид AAVHSC15. В качестве сравнения, целенаправленная интеграция не была выявлена посредством NGS у мышей, которые получали вектор для эписомальной экспрессии трансгена, упакованный в капсид AAVHSC15. Было обнаружено, что уровень интеграции был дозозависимым и превышал 2% при дозах, превышающих $5E13$ г. в./кг.

[00193] Для оценки эффекта в виде экспрессии интегрированного трансгена и эписомальной экспрессии трансгена в популяциях пролиферирующих клеток мышам РАН^{enu2} в возрасте 10 недель внутривенно вводили дозы, составляющие $5E12$ г. в./кг, $2E13$ г. в./кг, $6E13$ г. в./кг или $1E15$ г. в./кг, либо специфического в отношении мышцы вектора для переноса гена/редактирования гена, либо вектора для эписомальной экспрессии трансгена, в каждом случае упакованных в AAVHSC15, либо контроля в виде буфера для составления (FB). В случае вектора для эписомальной экспрессии трансгена, упакованного в AAVHSC15, после принятой в фармакопее процедуры титрования титр используемой партии соответственно доводили до $3,92E12$ г. в./кг (« $3,92E+12$ »), $1,57E13$ г. в./кг (« $1,57E+13$ г. в./кг»), $4,71E13$ г. в./кг (« $4,71E+13$ ») и $7,84E13$ г. в./кг (« $7,84E+13$ »). Через приблизительно 2 недели после введения дозы мышей подвергали либо 70% частичной гепатэктомии (РНх) для индуцирования быстрого цикла гепатоцитов, либо хирургической операции-плацебо (плацебо). На фиг. 9K и 9L показаны уровни Phe в сыворотке крови у данных мышей на протяжении 42 недель (фиг. 9K) или 40 недель (фиг. 9L). Как показано, у мышей, обработанных вектором для эписомальной экспрессии трансгена (фиг. 9K), уровни Phe в сыворотке крови снижались через 1 и 2 недели. После гепатэктомии во временной точке 2 недели уровни Phe при уровнях доз $5E12$ г. в./кг и $2E13$ г. в./кг повышались во время периода ускоренной регенерации печени. Животные, подвергавшиеся хирургической операции-плацебо, обработанные с помощью $2E13$ г. в./кг вектора для эписомальной экспрессии трансгена, не демонстрировали утрату данного ответа, что указывало на то, что повышение уровней Phe в сыворотке крови у мышей, подвергнутых гепатэктомии и обработанных вектором для эписомальной экспрессии трансгена, может быть обусловлено разбавлением вектора в условиях ускоренного роста печени, который имел место после гепатэктомии. Мыши, обработанные вектором для переноса гена/редактирования гена (фиг. 9L), демонстрировали стабильное снижение уровней Phe в течение периода ускоренного роста печени у мышей, подвергнутых частичной гепатэктомии. Данный результат может указывать на благоприятный эффект от интеграции в целевой локус Pdh1 мышши.

Пример 6: Сравнение вектора, специфического в отношении мышцы, и

вектора, специфического в отношении человека

[00194] Для изучения различий диапазона доз для прямого сравнительного исследования применяли специфический в отношении мыши вектор на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (РАН-006m-LP-1; «схема для мыши») и специфический в отношении человека вектор на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (hРАН-h11C-032-LP1-SD3; «схема для человека»). От четырех до пяти самцов мышей РАН^{enu2} в возрасте 4 недель (фиг. 10A-10H) или 10 недель (фиг. 10I-10P) подвергали внутривенному введению 1E12 г. в./кг, 5E12 г. в./кг, 1E13 г. в./кг или 5E13 г. в./кг либо вектора из схемы для мыши (фиг. 10A, 10C, 10E, 10G, 10I, 10K, 10M и 10O), либо вектора из схемы для человека (фиг. 10B, 10D, 10F, 10H, 10J, 10L, 10N и 10P), в каждом случае упакованного в AAVHSC15, либо контроля в виде буфера для составления (FB).

[00195] Вектор из схемы для человека содержит последовательности плеча гомологии человека и предположительно не будет интегрироваться в геном мыши путем гомологичной рекомбинации вследствие различий в последовательности, соответственно, вектор из схемы для человека служил в качестве исключительно эписомального контроля в данных экспериментах. Как показано, мыши в возрасте 4 недель, которым вводили дозы вектора из схемы для человека, упакованного в капсид AAVHSC15 (фиг. 10B), демонстрировали улучшение в отношении снижения уровня Phe в сыворотке крови, сходное с таковым для мышей, которым вводили вектор из схемы для мыши (фиг. 10A). Соответствующее повышение концентрации Tug в крови также наблюдалось у 4-недельных мышей, которым вводили дозу вектора из схемы для человека, упакованного в капсид AAVHSC15 (фиг. 10D), и у мышей, которым вводили дозу вектора из схемы для мыши (фиг. 10C). Как показано на фиг. 10E и 10F, дозозависимый ответ наблюдался для уровней генома вектора, выявленных в печени 4-недельных мышей, которым вводили дозу вектора из схемы для человека (фиг. 10F) или вектора из схемы для мыши (фиг. 10E), упакованных в капсид AAVHSC15. Дозозависимый ответ также наблюдался для уровней мРНК, выявленных в печени 4-недельных мышей, которым вводили дозу вектора из схемы для человека (фиг. 10H) или вектора из схемы для мыши (фиг. 10G), упакованных в капсид AAVHSC15.

[00196] В возрасте 10 недель у мышей, которым вводили дозу вектора из схемы для человека, упакованного в капсид AAVHSC15 (фиг. 10I), обнаруживалось сходное снижение уровней Phe в сыворотке крови по сравнению с мышами, которым вводили дозу вектора из схемы для мыши (фиг. 10H). Соответствующее повышение концентрации Tug в крови также наблюдалось у 10-недельных мышей, которым вводили дозу вектора из схемы для человека, упакованного в капсид AAVHSC15 (фиг. 10K), и у мышей, которым вводили дозу вектора из схемы для мыши (фиг. 10J). Как показано на фиг. 10M и 10N, дозозависимый ответ наблюдался для уровней генома вектора, выявленных в печени 10-недельных мышей, которым вводили дозу вектора из схемы для человека (фиг. 10N) или вектора из схемы для мыши (фиг. 10M), упакованных в капсид AAVHSC15.

Дозозависимый ответ также наблюдался для уровней мРНК, выявленных в печени 10-недельных мышей, которым вводили дозу вектора из схемы для человека (фиг. 10P) или вектора из схемы для мыши (фиг. 10O), упакованных в капсид AAVHSC15.

Пример 7. Эффект однократной дозы вектора, специфического в отношении мыши, или вектора, специфического в отношении человека

[00197] Для оценки влияния возраста мышей RAHenu2 на ответ на однократную дозу специфического в отношении мыши вектора на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (RAH-006m-LP-1; «схема для мыши») или специфического в отношении человека вектора на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (hRAH-hI1C-032-LP1-SD3; «схема для человека») отбирали мышей в возрасте 2, 4 и 10 недель. Это обеспечивало возможность сравнения эффекта роста печени детенышей (2- и 4-недельные мыши) и печени взрослого животного (10-недельные мыши). Однократную дозу $1E14$ г. в./кг вектора из схемы для мыши, упакованного в AAVHSC15, или вектора из схемы для человека, упакованного в AAVHSC15, внутривенно вводили мышам RAHenu2 в возрасте 2, 4 или 10 недель. В общей сложности четверем - пяти самцам мышей в каждой возрастной группе вводили соответствующие запакованные векторы. Буфер для составления вводили в качестве контроля. Поскольку вектор из схемы для человека не интегрируется в локус *Rah* мыши, он обеспечивает контроль для демонстрации влияния эписомальной экспрессии на мышей разных возрастов. В данном примере после принятой в фармакопее процедуры титрования титр используемой партии соответственно доводили до $9,07E13$ г. в./кг в случае схемы для мыши и $1,06E14$ г. в./кг в случае схемы для человека. Информация о различных исследуемых когортах дозирования изложена в таблице 2.

Таблица 2. Когорты дозирования

Группа	Исследуемое изделие	Уровень дозы (г. в./кг)	Число мышей, которым вводили дозу/пол (возраст на момент введения дозы)	Аутопсия (количество недель после введения)
1	Буфер для составления	NA	5/М (2 недели)	43 недели
2	Вектор из схемы для мыши, упакованный в AAVHSC15	$1E+14$ ($9,07E13$)	5/М (2 недели)	
3			4/М (4 недели)	
4			4/М (10 недель)	
5			4/М (2 недели)	2 недели
6			4/М (2 недели)	4 недели
7			4/М (2 недели)	8 недель

8	Буфер для составления	NA	4/М (2 недели)	42 недели
9	Вектор из схемы для человека, упакованный в AAVHSC15	1E+14 (1,06E14)	4/М (2 недели)	
10			4/М (4 недели)	
11			4/М (10 недель)	
12			4/М (2 недели)	2 недели
13			4/М (2 недели)	4 недели
14			4/М (2 недели)	8 недель
15	Вектор из схемы для мыши, упакованный в AAVHSC15		4/М (4 недели)	42 недели

[00198] Как изложено в таблице 2, группы 1-4 умерщвляли через 43 недели после введения, и группы 8-11 и 15 умерщвляли через 42 недели после введения. Уровни Phe и Туг в сыворотке крови изучали с течением времени для групп 1-4, 8-11 и 15 (фиг. 11А-11D). На фиг. 11Е-11К показаны уровни геномов вектора и уровни мРНК, выявленные в печени мышей во временных точках проведения аутопсии, указанных в таблице 2. Уровни мРНК в образцах печени мышей из групп 5-7 не измеряли.

[00199] У мышей, обработанных вектором из схемы для мыши, уровни Phe в сыворотке крови снижались до нормальных уровней в течение одной недели после введения вектора (фиг. 11А). В случае обработанных мышей в возрасте 4 и 10 недель (группы 3 и 4) снижение уровней Phe поддерживалось в течение 43 недель, что демонстрировало долговременную устойчивость ответа на лечение. В случае мышей в возрасте 2 недель результаты варьировались. Соответствующее повышение концентрации Туг в сыворотке крови наблюдали у мышей в возрасте 4 и 10 недель в течение 43 недель (фиг. 11С). На фиг. 11Е показаны уровни геномов вектора, выявленные в печени мышей в возрасте 2, 4 и 10 недель, обработанных вектором из схемы для мыши. На фиг. 11И показаны уровни мРНК, выявленные в печени мышей в возрасте 2, 4 и 10 недель, обработанных вектором из схемы для мыши.

[00200] У мышей, обработанных вектором из схемы для человека, уровни Phe в сыворотке крови снижались при достижении временной точки одна неделя после введения вектора (фиг. 11В). В случае обработанных мышей в возрасте 4 и 10 недель (группы 10 и 11) снижение уровней Phe поддерживалось в течение 43 недель, что указывало на долговременную устойчивость ответа на лечение. У обработанных мышей в возрасте 2 недель (группа 9) уровни Phe поддерживались на клинически значимых уровнях, составляющих ≤ 360 мкМ, в течение 30 недель. Соответствующее повышение

концентрации Туг в сыворотке крови наблюдали в группах 9 (в течение 30 недель), 10 (в течение 42 недель) и 11 (в течение 42 недель) (фиг. 11D). Эти данные указывают на то, что доза, составляющая $1E14$ г. в./кг, вектора из схемы для человека, упакованного в AAVHSC15, является достаточной для обеспечения устойчивой эффективности в течение периода роста печени у молодых мышей, и что эффект поддерживается в течение по меньшей мере 30 недель после введения. На фиг. 11F показаны уровни геномов вектора, выявленные в печени мышей в возрасте 2, 4 и 10 недель, обработанных вектором из схемы для человека. На фиг. 11J показаны уровни мРНК, выявленные в печени мышей в возрасте 2, 4 и 10 недель, обработанных вектором из схемы для человека.

[00201] На фиг. 11G и 11H показано, что у мышей в возрасте 2 недель, обработанных вектором из схемы для мыши (фиг. 11G; группы 5-7), и мышей в возрасте 2 недель, обработанных вектором из схемы для человека (фиг. 11H; группы 12-14), уровни геномов вектора поддерживались вплоть до 8 недель после введения. На фиг. 11K показано, что уровни мРНК мышей в возрасте 2 недель, обработанных вектором из схемы для человека, поддерживались вплоть до 8 недель после введения.

Пример 8. Кинетика и устойчивость интеграции у взрослых мышей РАН^{enu2}

[00202] Для определения кинетики и устойчивости интеграции вектора с течением времени самцам мышей РАН^{enu2} в возрасте 10 недель вводили специфический в отношении мыши вектор на основе AAV для переноса гена/редактирования гена (РАН-006m-LP-1), упакованный в капсид AAVHSC15, в дозе $1E14$ г. в./кг. Шесть когорт умерщвляли через 1, 2, 4, 8 и 16 недель после введения дозы (пять мышей на когорту). Кинетику интеграции изучали посредством мониторинга уровней Phe в сыворотке крови с течением времени, уровней геномов вектора с течением времени, уровней экспрессии мРНК трансгена РАН с течением времени и уровней целенаправленной интеграции с течением времени в различных временных точках. Было обнаружено, что уровни геномов вектора, уровни экспрессии мРНК трансгена РАН и значения частоты интеграции были стабильными с течением времени (фиг. 12A-12C).

[00203] На фиг. 12A и 12B показана динамика уровней геномов вектора (фиг. 12A) и уровней экспрессии мРНК трансгена РАН (фиг. 12B) у мышей РАН^{enu2}, которым вводили РАН-006m-LP-1, упакованный в капсид AAVHSC15, в дозе $1E14$ г. в./кг. Было обнаружено, что уровни геномов вектора и мРНК с течением времени были стабильными вплоть до 42 недель. Количество геномов вектора измеряли посредством количественной ПЦР с применением праймера и зондов, специфических в отношении кодирующей последовательности, по сравнению с исходной геномной ДНК-мишенью. Измерение экспрессии выполняли посредством количественной RT-PCR с применением праймеров и зондов, специфических в отношении кодирующей последовательности, по сравнению с общей РНК.

[00204] Способ секвенирования нового поколения (NGS) с высоким значением длины рида был разработан для количественного анализа аллелей с интеграцией по сравнению с аллелями без интеграции. Секвенирование с высоким значением длины рида

было выбрано вследствие длины плеч гомологии, требующей считывания по ходу интегрированной последовательности и с захватом геномной ДНК. Способ обеспечивал возможность определения различий между аллелями с интеграцией, аллелями дикого типа и геномами вектора, которые присутствуют в определенном образце. ПЦР выполняют с применением трех праймеров, специфических в отношении i) геномной области; ii) области, специфической в отношении аллеля с интеграцией, и iii) области, специфической в отношении аллеля дикого типа. Частоту интеграции целевого вектора определяли посредством конкурентной амплификации как аллелей дикого типа, так и аллелей с интеграцией в области РАН с применением ДНК, полученной из образцов печени обработанных животных. Секвенирование с высоким значением длины ряда амплифицированных продуктов покрывало плечо гомологии, которое было идентичным среди геномных последовательностей, последовательностей с интеграцией и последовательностей генома вектора. Смежные последовательности, которые также покрывались секвенированием с высоким значением длины ряда, определяют происхождение источника ряда из геномов дикого типа, геномов с интеграцией или геномов вектора. Непрерывные последовательности, которые содержали как геномную ДНК, так и трансген hРАН, измененный посредством молчащей мутации, учитывали как аллели с интеграцией, в то время как последовательности, которые содержали только геномную ДНК без трансгена hРАН, измененного посредством молчащей мутации, в сайте целевой интеграции, учитывали как аллели дикого типа. Процентную долю последовательностей с интеграцией рассчитывали в виде количества ридов, картированных относительно эталонной последовательности с интеграцией, разделенного на общее количество ридов, картированных относительно эталонной последовательности с интеграцией, ридов, картированных относительно эталонной последовательности дикого типа, и ридов, картированных относительно конкатемеров геномов вектора. На фиг. 12С показана динамика частоты целенаправленной интеграции у мышей РАН^{enu2}, которым вводили РАН-006m-LP-1, упакованный в капсид AAVHSC15, в дозе 1E14 г. в./кг. Целевая интеграция выявлялась через одну неделю после введения дозы, достигала пиковых уровней к приблизительно 2 неделям и оставалась постоянной в течение 42 недель.

[00205] На фиг. 12D и 12E представлены диаграммы, демонстрирующие влияние на уровень Phe (фиг. 12D) и Tug (фиг. 12E) в сыворотке крови у мышей РАН^{enu2}, которым вводили РАН-006m-LP-1, упакованный в капсид AAVHSC15, в дозе 1E14 г. в./кг вплоть до 42 недель после инъекции.

Пример 9. Эффективность hРАН-hIIC-032-LP1-SD3 in vivo

[00206] Для определения кинетики и устойчивости интеграции специфического в отношении человека вектора для переноса гена/редактирования гена с течением времени самцам мышей FRG с гуманизированной печенью (мышам «HuLiv»; см. пример 2) вводили специфический в отношении человека вектор для переноса гена/редактирования гена, hРАН-hIIC-032-LP1-SD3, упакованный в капсид AAVHSC15, в дозе 7E13 г. в./кг (группы 1 и 3) или 2E14 г. в./кг (группы 2 и 4), и их умерщвляли через 4 (группы 1 и 2)

или 12 недель (группы 3 и 4) после введения дозы (шесть самцов мышей на когорту). Контрольным мышам FRG вводили буфер для составления, и их умерщвляли через 4 (группа 5) или 12 недель (группа 6) после введения.

[00207] На фиг. 13А и 13В показаны уровни геномов вектора и уровни мРНК, выявленные в гепатоцитах человека, выделенных от мышей HuLiv, через 4 и 12 недель после введения hPAN-h11C-032-LP1-SD3, упакованного в AAVHSC15, в указанных дозах. Как показано, было обнаружено, что уровень геномов вектора (фиг. 13А) и экспрессии мРНК (фиг. 13В) в гепатоцитах человека был дозозависимым и стабильным с течением времени вплоть до 12 недель. Количество геномов вектора измеряли посредством количественной ПЦР с применением праймера и зондов, специфических в отношении кодирующей последовательности, по сравнению с исходной геномной ДНК-мишенью. Измерение экспрессии выполняли посредством количественной RT-PCR с применением праймеров и зондов, специфических в отношении кодирующей последовательности, по сравнению с общей РНК. На фиг. 13С показана частота целевой интеграции, выявленная в гепатоцитах человека, выделенных от мышей HuLiv, через 4 и 12 недель после введения hPAN-h11C-032-LP1-SD3, упакованного в AAVHSC15, в указанных дозах. Как показано, было обнаружено, что уровень целевой интеграции в гепатоцитах человека был дозозависимым и стабильным с течением времени вплоть до 12 недель. Измерение целенаправленной интеграции выполняли с применением способа NGS с высоким значением длины рида, описанного в примере 8.

[00208] С учетом того, что гомологичная рекомбинация может управляться короткими отрезками со сходством последовательностей между плечами гомологии из вектора и нецелевым положением в геноме, анализ на основе ПЦР был разработан для конкретного тестирования наличия интеграции в геномные области, которые содержат последовательность, сходную с плечами гомологии. В способе посредством биоинформатических подходов прогнозировали области, с наибольшей вероятностью подлежащие нецелевой гомологичной рекомбинации в клетках человека, трансдуцированных с помощью вектора, содержащего плечи гомологии, специфические в отношении локуса PAN человека. Данные прогнозируемые области выбирали на основании наиболее высокого сходства последовательности с плечами гомологии. Способ на основе ПЦР был разработан для конкретного тестирования трансдуцированных образцов на наличие любого случая нецелевой интеграции в прогнозируемых областях. С применением данного способа на основе ПЦР обеспечивалась возможность выявления интеграции вплоть до уровня, составляющего 1:10000 молекул ДНК.

[00209] Прогнозируемые сайты нецелевой интеграции выбирали на основании двух критериев: минимальной длины последовательности, составляющей 35 п. о., и минимальной идентичности последовательностей, составляющей 60%, относительно плеч гомологии. Были идентифицированы шесть областей генома, которые соответствовали данным критериям, путем биоинформатического выравнивания с геномом человека сборки 38 согласно Консорциуму эталонного генома. Были разработаны праймеры для

ПЦР, которые обеспечивают возможность специфической амплификации для нецелевой интеграции в 5 из данных 6 областей. Было обнаружено, что область 3 является областью с большим количеством повторов, и ее исключали из дальнейшего анализа, поскольку специфические праймеры не могли быть получены. В качестве положительных контролей («Pos») конкретные контрольные ДНК, добавленные в геномную ДНК, анализировали в отношении каждой конкретной области до разбавления 1:10000, представляющего собой 0,01% и предел выявления для способа на основе ПЦР. Что касается каждой прогнозируемой области, пары праймеров, специфические в отношении интеграции, нацеливающиеся на гомологичную рекомбинацию в любом направлении (внутри («In») или наружу («Out») от области гомологии), тестировали независимо друг от друга для определения наличия нецелевой интеграции. Нецелевую интеграцию определяли как положительную, если в образце после ПЦР идентифицировали отдельную полосу корректного размера.

[00210] На фиг. 14A-14D показаны результаты для прогнозируемой нецелевой интеграции, определенной посредством способа на основе ПЦР, описанного выше, который осуществляли с использованием образцов геномной ДНК, выделенных от самцов мышей FRG с гуманизированной печенью в возрасте 10 недель, которым вводили специфический в отношении человека вектор для переноса гена/редактирования гена, hPAH-h11C-032-LP1-SD3, упакованный в капсид AAVHSC15, в дозе 7E13 г. в./кг (фиг. 14A и 14C) или 2E14 г. в./кг (фиг. 14B и 14D), и которых умерщвляли через 4 (фиг. 14A и 14B) или 12 недель (фиг. 14C и 14D) после введения дозы (шесть самцов мышей на когортку). Как показано, интеграция в прогнозируемых сайтах нецелевой интеграции не выявлялась.

* * *

[00211] Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным в данном документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00212] Все ссылки (например, публикации, или патенты, или заявки на патент), процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация, или патент, или заявка на патент) была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. Другие варианты осуществления находятся в пределах следующих пунктов формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий:
 - (a) капсид AAV, содержащий капсидный белок AAV, и
 - (b) геном rAAV, содержащий (i) редактирующий элемент для редактирования целевого локуса в гене РАН, содержащий по меньшей мере часть кодирующей последовательности РАН, функционально связанную с элементом регуляции транскрипции; (ii) нуклеотидную последовательность 5'-плеча гомологии, расположенную в направлении 5' относительно редактирующего элемента, характеризующуюся гомологией с первой геномной областью в направлении 5' относительно целевого локуса, и (iii) нуклеотидную последовательность 3'-плеча гомологии, расположенную в направлении 3' относительно редактирующего элемента, характеризующуюся гомологией со второй геномной областью в направлении 3' относительно целевого локуса.
2. rAAV по п. 1, где редактирующий элемент содержит кодирующую последовательность РАН.
3. rAAV по п. 2, где кодирующая последовательность РАН кодирует аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 33.
4. rAAV по п. 1 или п. 2, где кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 53.
5. rAAV по п. 2, где кодирующая последовательность РАН изменена посредством молчащей мутации.
6. rAAV по п. 5, где кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 28.
7. rAAV по п. 5 или п. 6, где кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28.
8. rAAV по п. 5 или п. 6, где кодирующая последовательность РАН содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 83.
9. rAAV по любому из пп. 1-8, где элемент регуляции транскрипции обладает способностью опосредовать транскрипцию в гепатоците, клетке почки или клетке в головном мозге, гипофизе, надпочечнике, поджелудочной железе, мочевом пузыре, желчном пузыре, толстой кишке, тонком кишечнике или молочной железе.
10. rAAV по любому из пп. 1-9, где элемент регуляции транскрипции является эндогенным по отношению к гену РАН.
11. rAAV по любому из пп. 1-9, где элемент регуляции транскрипции является экзогенным по отношению к гену РАН.
12. rAAV по п. 11, где элемент регуляции транскрипции является специфическим в отношении печени, где необязательно элемент регуляции транскрипции предусматривает один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из промотора гена альбумина человека, промотора гена транстиретина (TTR) человека, печеночной

контрольной области (HCR) AроE/C-I 1 или 2 человека, промотора гена AроH человека, промотора гена SERPINA1 (hAAT) человека и их регуляторного модуля, специфического в отношении печени.

13. rAAV по п. 11 или п. 12, где элемент регуляции транскрипции содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27 и 69.

14. rAAV по любому из пп. 11-13, где элемент регуляции транскрипции содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 27.

15. rAAV по любому из пп. 11-14, где элемент регуляции транскрипции содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27.

16. rAAV по любому из пп. 11-15, где нуклеотидная последовательность элемента регуляции транскрипции состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 27.

17. rAAV по любому из пп. 1-16, где редактирующий элемент дополнительно содержит интронный элемент, расположенный в направлении 5' относительно кодирующей последовательности PАН и в направлении 3' относительно элемента регуляции транскрипции.

18. rAAV по п. 17, где интронный элемент представляет собой экзогенный интронный элемент, где необязательно экзогенный интронный элемент представляет собой интронный элемент SV40.

19. rAAV по п. 18, где интронный элемент SV40 содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 29.

20. rAAV по п. 18 или п. 19, где интронный элемент SV40 содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29.

21. rAAV по любому из пп. 18-20, где нуклеотидная последовательность интронного элемента SV40 состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 29.

22. rAAV по любому из пп. 1-21, где редактирующий элемент дополнительно содержит последовательность полиаденилирования, расположенную в направлении 3' относительно кодирующей последовательности PАН.

23. rAAV по п. 22, где последовательность полиаденилирования представляет собой экзогенную последовательность полиаденилирования, где необязательно экзогенная последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования SV40.

24. rAAV по п. 23, где последовательность полиаденилирования SV40 содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 31.

25. rAAV по п. 23 или п. 24, где последовательность полиаденилирования SV40

содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31.

26. rAAV по любому из пп. 23-25, где нуклеотидная последовательность последовательности полиаденилирования SV40 состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 31.

27. rAAV по любому из пп. 1-26, где нуклеотид, расположенный в направлении 5' относительно целевого локуса, находится в интроне гена PАН.

28. rAAV по любому из пп. 1-27, где нуклеотид, расположенный в направлении 5' относительно целевого локуса, находится в интроне 1 гена PАН.

29. rAAV по любому из пп. 1-28, где нуклеотид, расположенный в направлении 3' относительно целевого локуса, находится в интроне гена PАН.

30. rAAV по любому из пп. 1-29, где нуклеотид, расположенный в направлении 3' относительно целевого локуса, находится в интроне 1 гена PАН.

31. rAAV по любому из пп. 1-30, где ген PАН представляет собой ген PАН человека.

32. rAAV по п. 31, где ген PАН человека представляет собой ген PАН человека дикого типа.

33. rAAV по п. 31 или п. 32, где ген PАН человека представляет собой вариантный ген PАН.

34. rAAV по любому из пп. 1-33, где редактирующий элемент содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 31, 50, 51, 52, 69 или 70.

35. rAAV по любому из пп. 1-34, где нуклеотидная последовательность 5'-плеча гомологии является на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной первой геномной области.

36. rAAV по любому из пп. 1-35, где нуклеотидная последовательность 3'-плеча гомологии является на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной второй геномной области.

37. rAAV по любому из пп. 1-36, где первая геномная область расположена в первом участке редактирования, и вторая геномная область расположена во втором участке редактирования.

38. rAAV по п. 37, где первый участок редактирования состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 37.

39. rAAV по п. 37 или п. 38, где второй участок редактирования состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 38.

40. rAAV по любому из пп. 1-39, где первая геномная область состоит из области генома человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 37.

41. rAAV по любому из пп. 1-40, где вторая геномная область состоит из области

гена человека, соответствующей нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 38.

42. rAAV по любому из пп. 1-41, где длина каждой из нуклеотидных последовательностей 5'- и 3'-плеча гомологии независимо составляет от приблизительно 100 до приблизительно 2000 нуклеотидов.

43. rAAV по любому из пп. 1-42, где 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 23.

44. rAAV по любому из пп. 1-43, где 5'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23.

45. rAAV по любому из пп. 1-44, где нуклеотидная последовательность 5'-плеча гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 23.

46. rAAV по любому из пп. 1-45, где 3'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 24.

47. rAAV по любому из пп. 1-46, где 3'-плечо гомологии содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24.

48. rAAV по любому из пп. 1-47, где нуклеотидная последовательность 3'-плеча гомологии состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 24.

49. rAAV по любому из пп. 1-48, где геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 43.

50. rAAV по любому из пп. 1-49, где геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 43.

51. rAAV по любому из пп. 1-50, где геном rAAV дополнительно содержит нуклеотидную последовательность 5'-концевого инвертированного повтора (5'-ITR) в направлении 5' от нуклеотидной последовательности 5'-плеча гомологии и нуклеотидную последовательность 3'-концевого инвертированного повтора (3'-ITR) в направлении 3' от нуклеотидной последовательности 3'-плеча гомологии.

52. rAAV по п. 51, где нуклеотидная последовательность 5'-ITR является на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 14, и/или нуклеотидная последовательность 3'-ITR является на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 18.

53. rAAV по любому из пп. 1-52, где геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 73 и/или 74.

54. rAAV по любому из пп. 1-53, где геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 75 и/или 76.

55. rAAV по любому из пп. 1-54, где геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 45.

56. rAAV по любому из пп. 1-55, где геном rAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 45.

57. rAAV по любому из пп. 1-56, где капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

58. rAAV по п. 57, где аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 из SEQ ID NO: 16, представляет собой С; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой Н; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 из SEQ ID NO: 16, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой А; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 16, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 из SEQ ID NO: 16, представляет собой K; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C, или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G.

59. rAAV по п. 58, где:

(а) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N, аминокислота в капсидном

белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M;

(с) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, или

(е) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C.

60. rAAV по п. 58, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

61. rAAV по любому из пп. 1-60, где капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

62. rAAV по п. 61, где аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 из SEQ ID NO: 16, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 206 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 312 из SEQ ID NO: 16, представляет собой Q; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 468 из SEQ ID NO: 16, представляет собой S; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 590 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G или Y; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 690 из SEQ ID NO: 16,

представляет собой К; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой С, или аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G.

63. rAAV по п. 62, где:

(а) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 626 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 718 из SEQ ID NO: 16, представляет собой G;

(b) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 296 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 464 из SEQ ID NO: 16, представляет собой N, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M;

(с) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R;

(d) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, или

(е) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой С.

64. rAAV по п. 62, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

65. rAAV по любому из пп. 1-64, где капсидный белок AAV содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

66. rAAV по п. 65, где аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 2 из SEQ ID NO: 16, представляет собой T; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 65 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 68 из SEQ ID NO: 16, представляет собой V; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 77 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 119 из SEQ ID NO: 16, представляет собой L; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 151 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R; аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 160 из SEQ ID NO: 16, представляет собой D; аминокислота в капсидном белке,

аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 681 из SEQ ID NO: 16, представляет собой M;

(g) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 687 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R;

(h) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 346 из SEQ ID NO: 16, представляет собой A, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, или

(i) аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 501 из SEQ ID NO: 16, представляет собой I, аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 505 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, и аминокислота в капсидном белке, соответствующая аминокислоте 706 из SEQ ID NO: 16, представляет собой C.

68. rAAV по п. 66, где капсидный белок содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 1-736 из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 или 17.

69. rAAV по любому из пп. 1-68, где эффективность интеграции редактирующего элемента в целевой locus составляет по меньшей мере 1%, если AAV вводится мышам с имплантированными гепатоцитами человека в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

70. rAAV по любому из пп. 1-69, где аллельная частота интеграции редактирующего элемента в целевой locus составляет по меньшей мере 0,5%, если AAV вводится мышам с имплантированными гепатоцитами человека в отсутствие экзогенной нуклеазы в стандартных условиях введения AAV.

71. Фармацевтическая композиция, содержащая rAAV по любому из пп. 1-70.

72. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 43, 45, 51 или 52.

73. Способ лечения субъекта, у которого имеется фенилкетонурия (PKU), при этом способ включает введение субъекту эффективного количества rAAV по любому из пп. 1-70, фармацевтической композиции по п. 71 или полинуклеотида по п. 72.

74. Способ по п. 73, где rAAV, фармацевтическую композицию или нуклеиновую кислоту вводят внутривенно.

75. Способ по п. 73 или п. 74, где PKU ассоциирована с мутацией гена PAH.

76. Способ по любому из пп. 73-75, где субъект является субъектом-человеком.

77. Система упаковки для получения rAAV, где система упаковки содержит:

(a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более белков Rep AAV;

(b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный белок rAAV по любому из пп. 1-70, и

(c) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность генома rAAV из rAAV по любому из пп. 1-70.

78. Система упаковки по п. 77, где система упаковки содержит первый вектор, содержащий первую нуклеотидную последовательность и вторую нуклеотидную последовательность, и второй вектор, содержащий третью нуклеотидную последовательность.

79. Система упаковки по п. 77 или п. 78, дополнительно содержащая четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую один или более генов вируса-помощника.

80. Система упаковки по п. 79, где четвертая нуклеотидная последовательность содержится в третьем векторе.

81. Система упаковки по любому из пп. 77-80, где четвертая нуклеотидная последовательность содержит один или более генов вируса, выбранного из группы, состоящей из аденовируса, вируса герпеса, вируса осповакцины и цитомегаловируса (CMV).

82. Система упаковки по любому из пп. 77-81, где первый вектор, второй вектор и/или третий вектор представляют собой плазмиду.

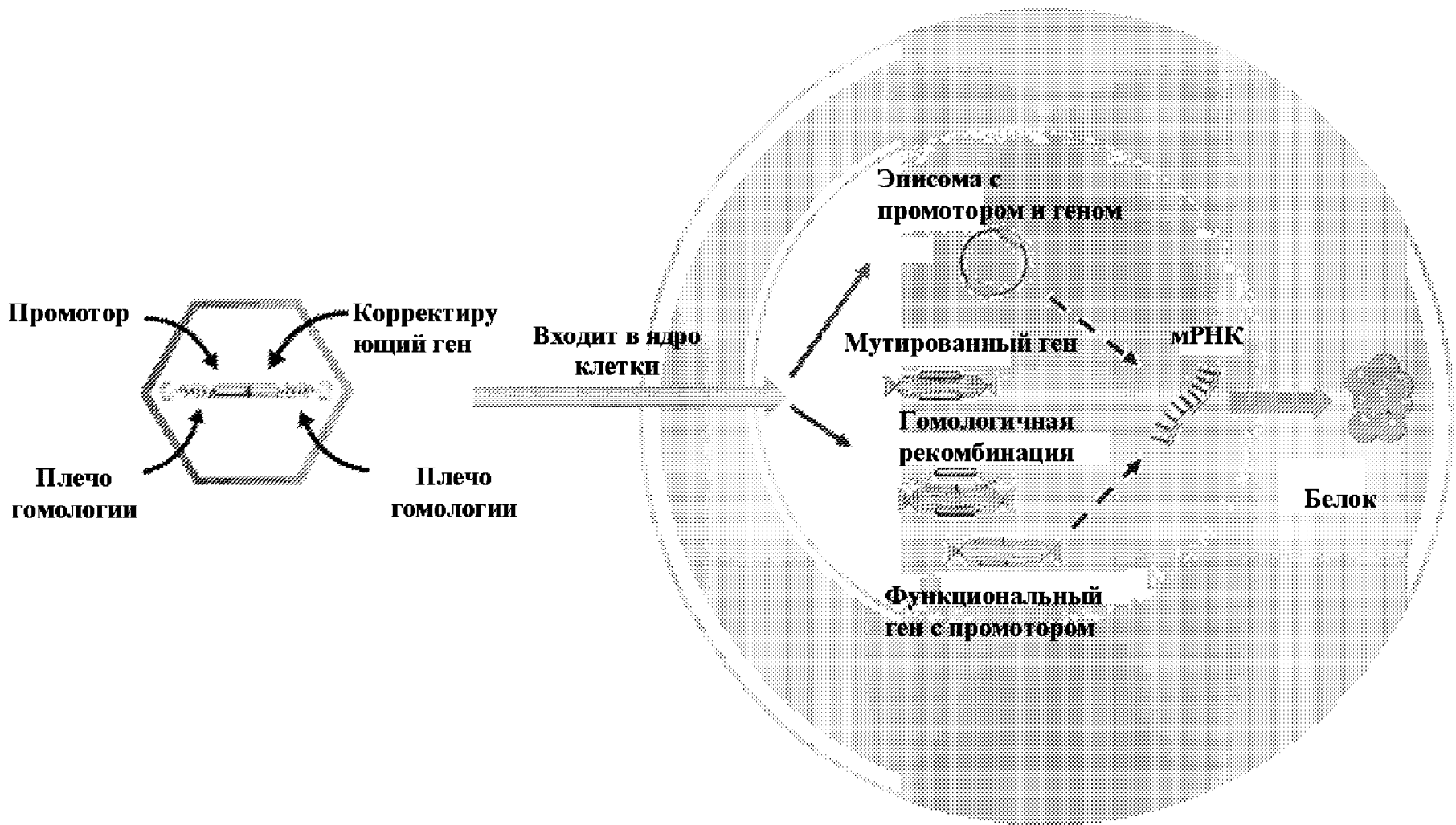
83. Способ рекомбинантного получения гAAV, при этом способ включает введение системы упаковки по любому из пп. 77-82 в клетку в условиях, при которых продуцируется гAAV.

84. гAAV по любому из пп. 1-70, фармацевтическая композиция по п. 71 или полинуклеотид по п. 72 для применения в качестве лекарственного препарата.

85. гAAV по любому из пп. 1-70, фармацевтическая композиция по п. 71 или полинуклеотид по п. 72 для применения в лечении РКУ.

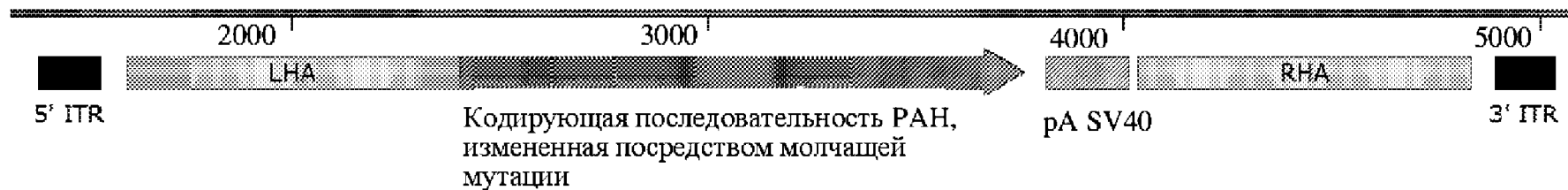
86. гAAV по любому из пп. 1-70, фармацевтическая композиция по п. 71 или полинуклеотид по п. 72 для применения в способе лечения субъекта, у которого имеется РКУ, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества гAAV, фармацевтической композиции или полинуклеотида.

По доверенности

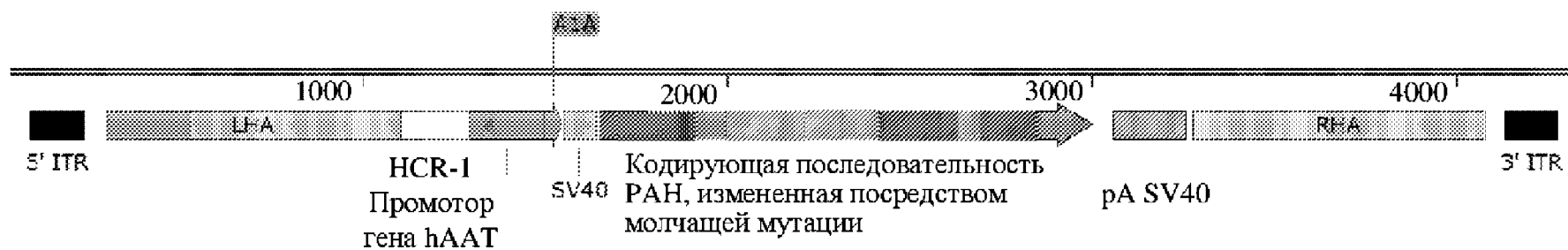


Фиг. 1

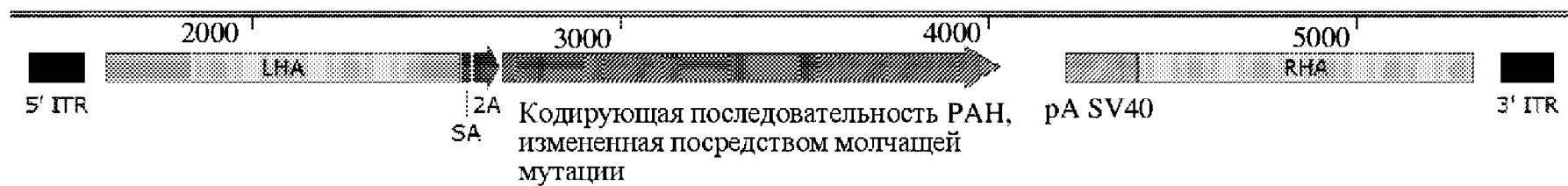
Фиг. 2А



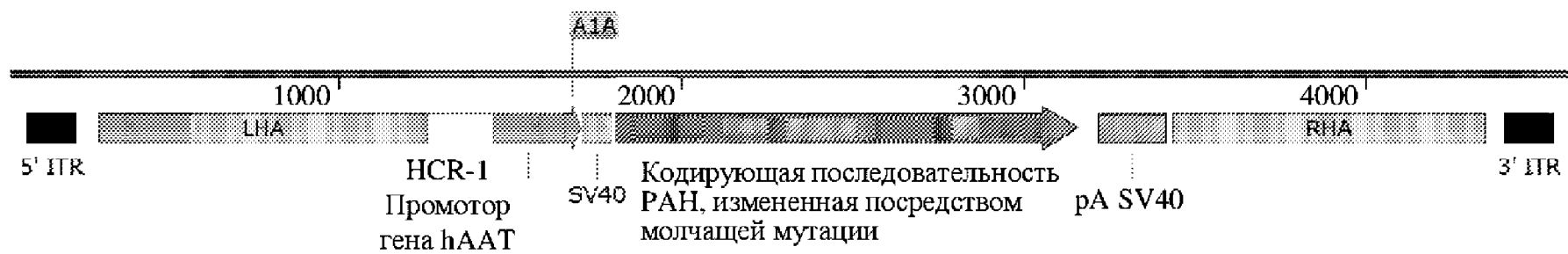
Фиг. 2В



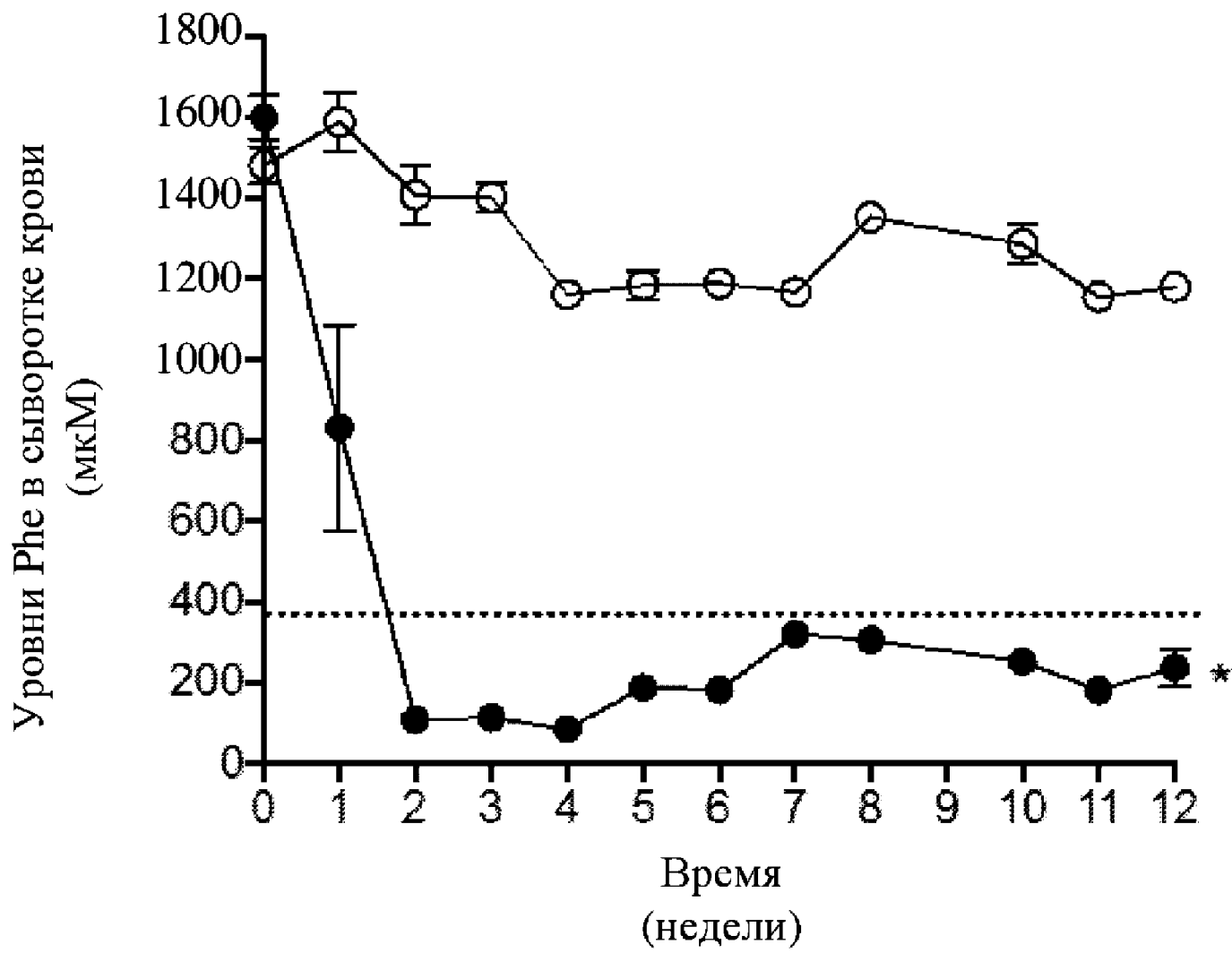
Фиг. 2С



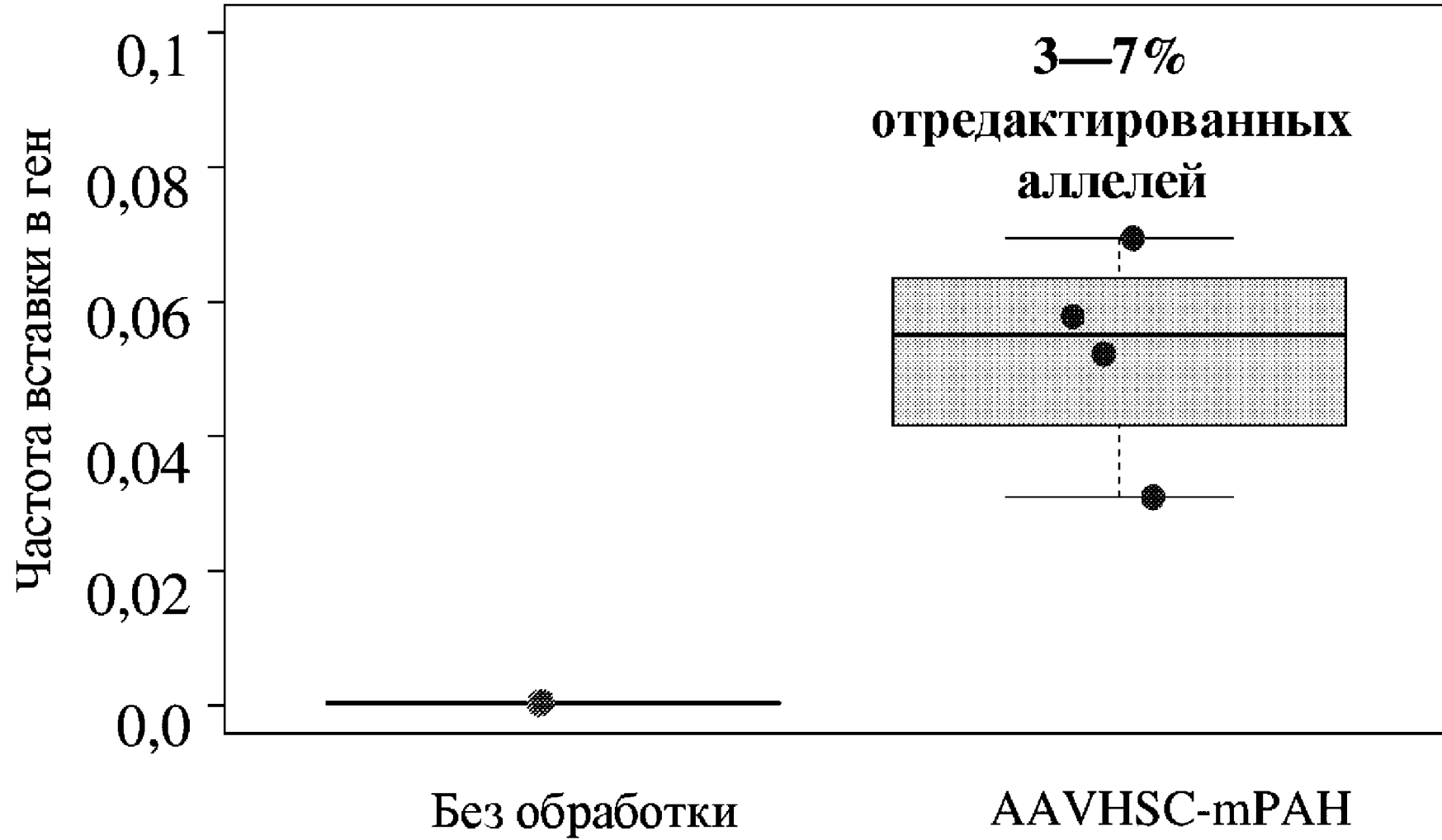
Фиг. 2D



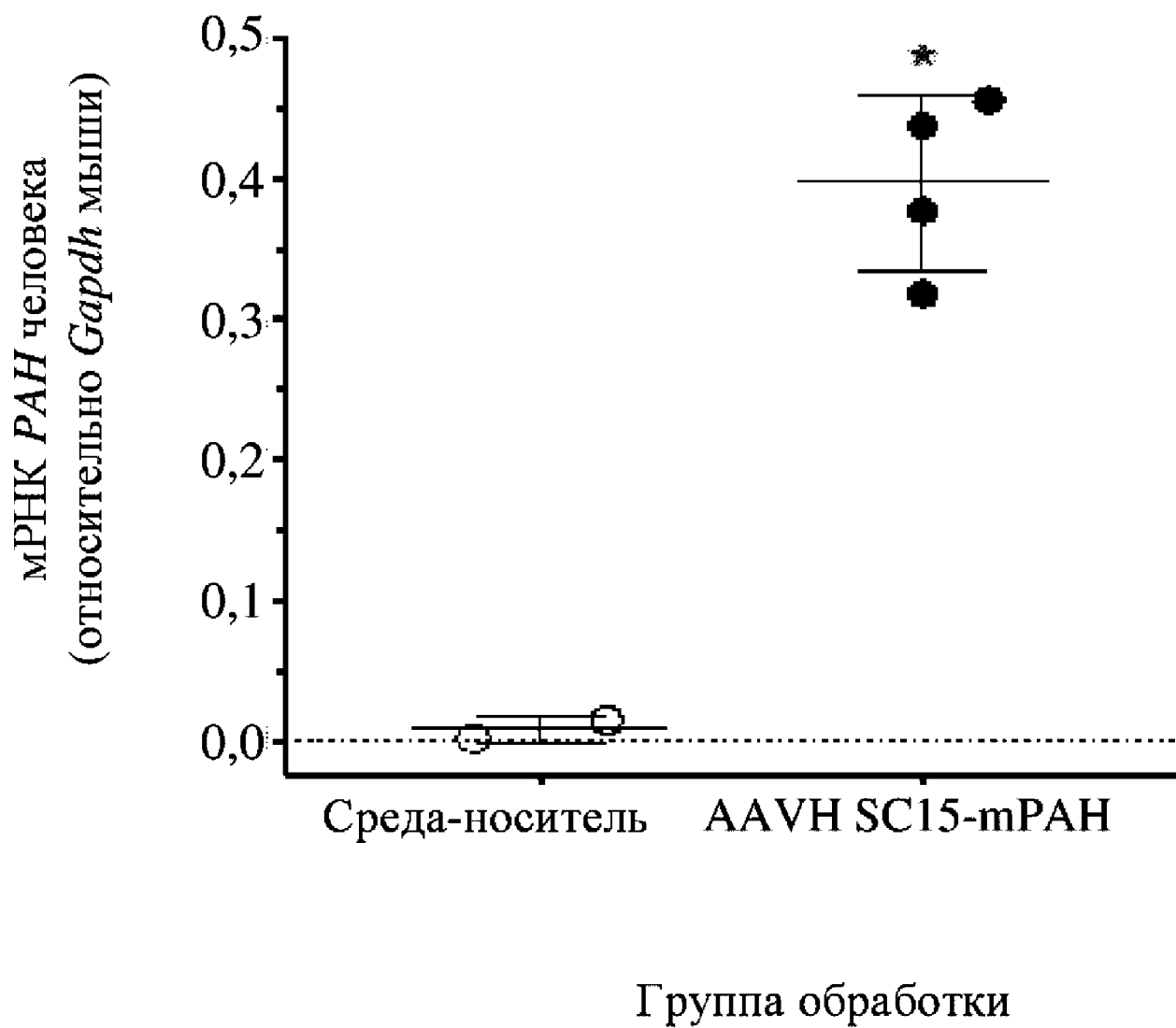
Фиг. 3



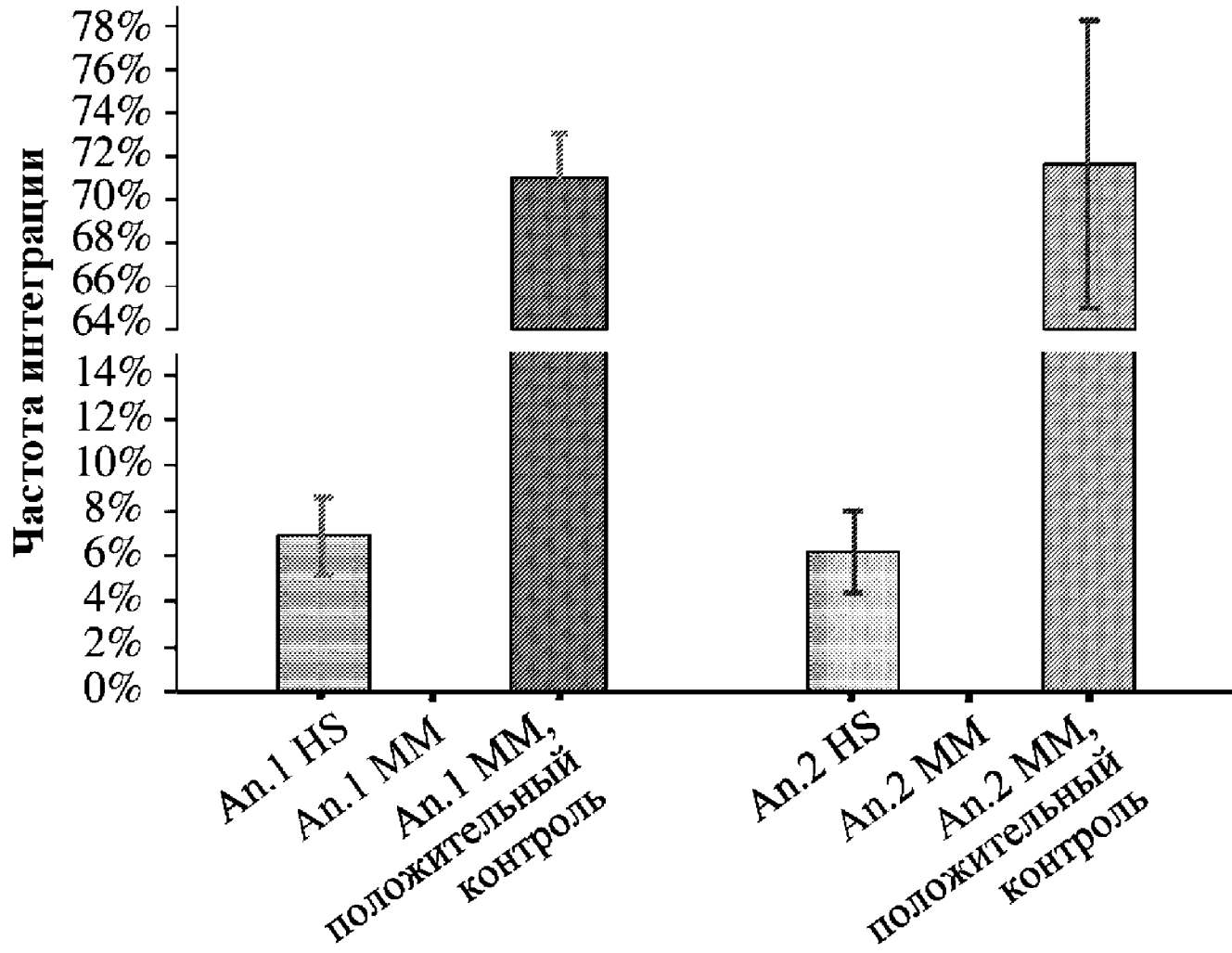
Фиг. 4



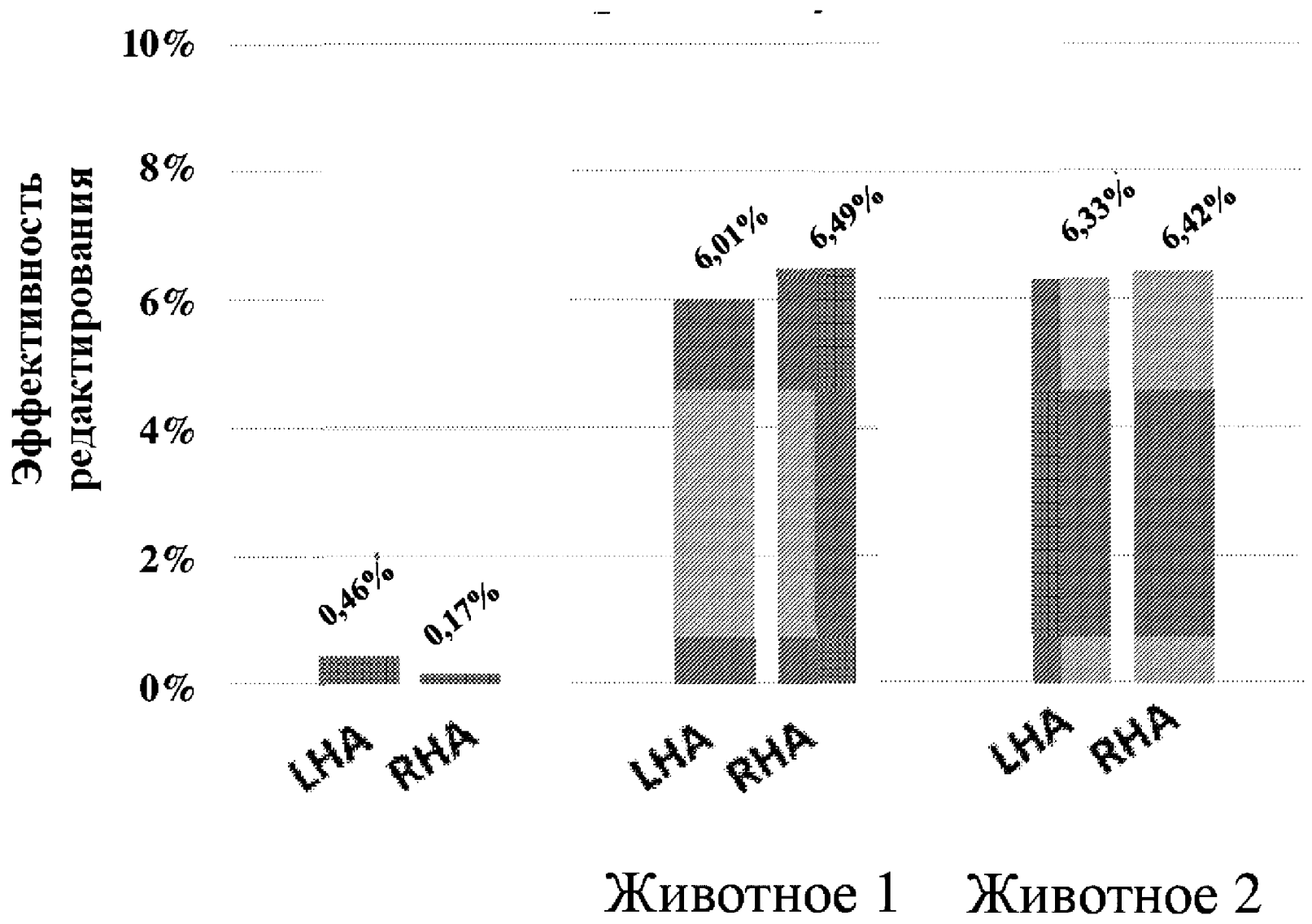
Фиг. 5



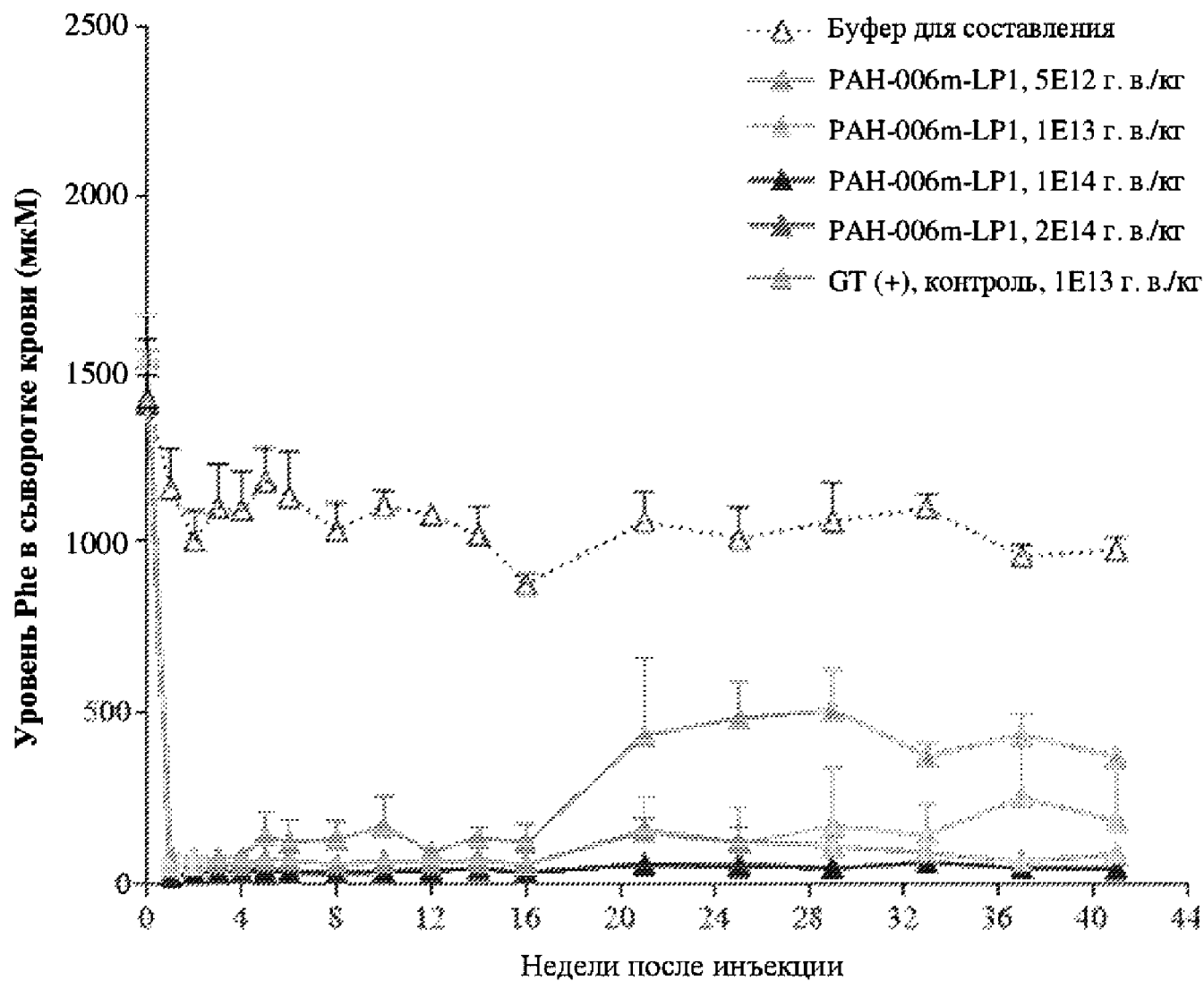
Фиг. 6



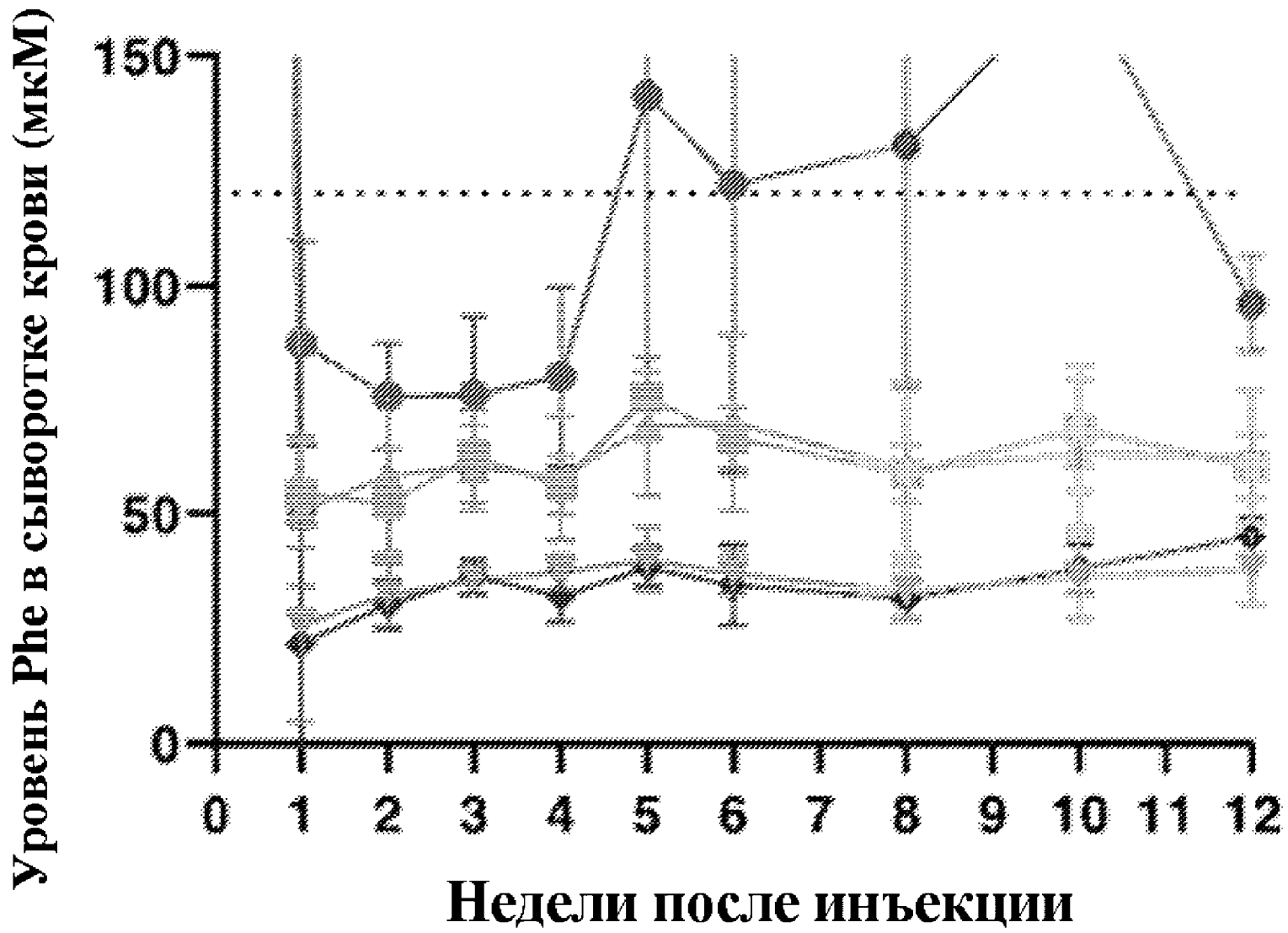
Фиг. 7



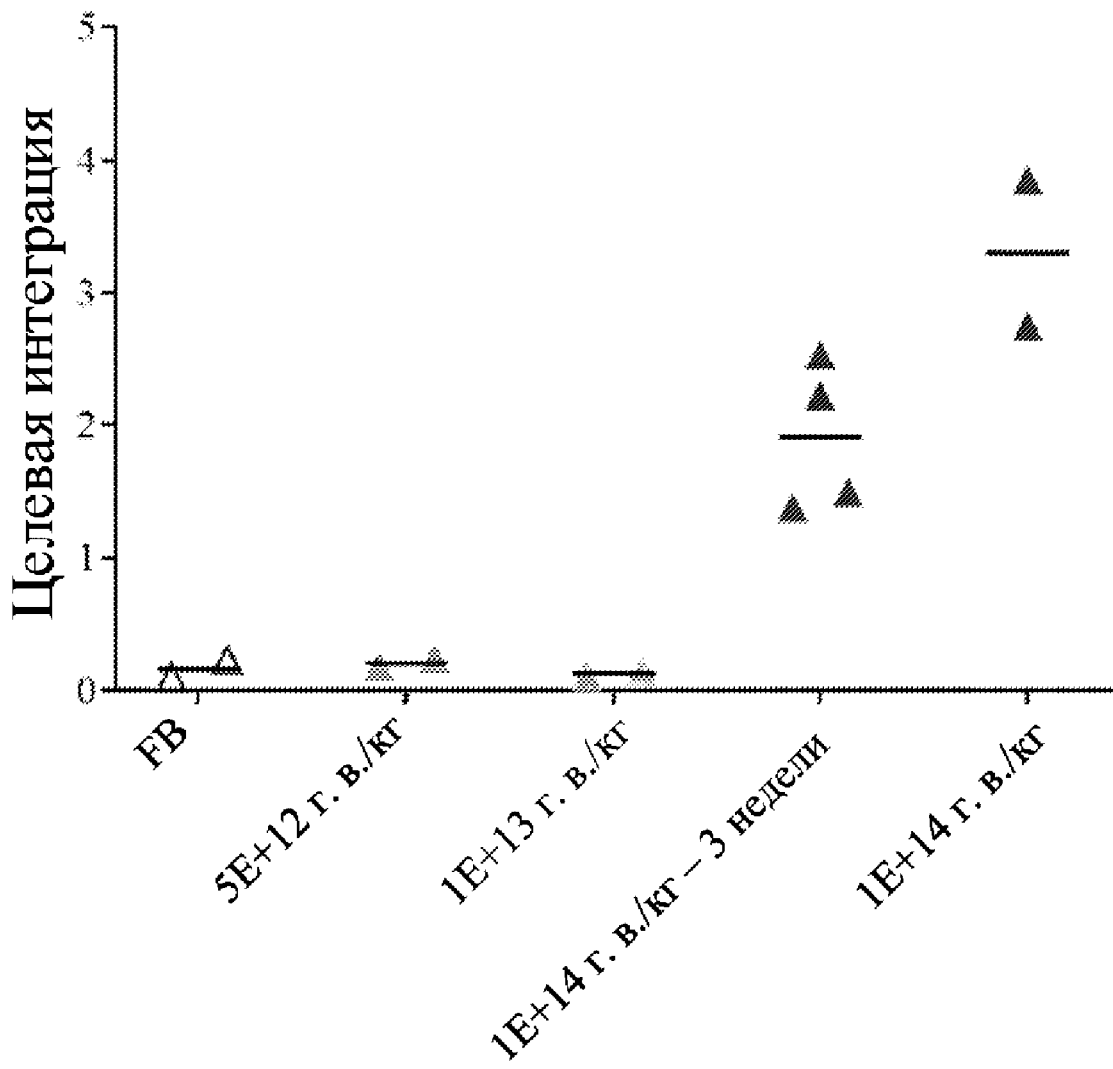
Фиг. 8А

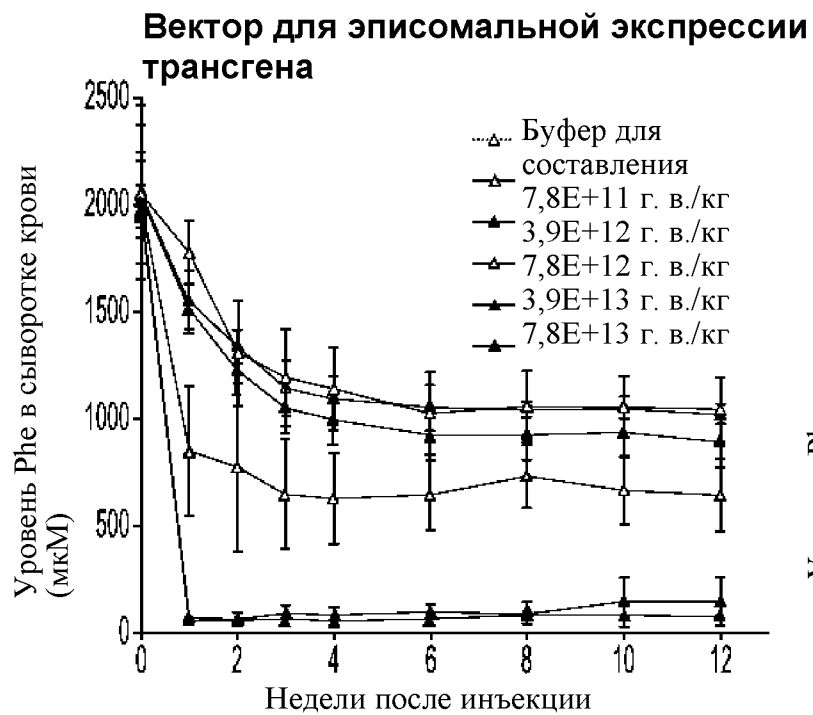


Фиг. 8В

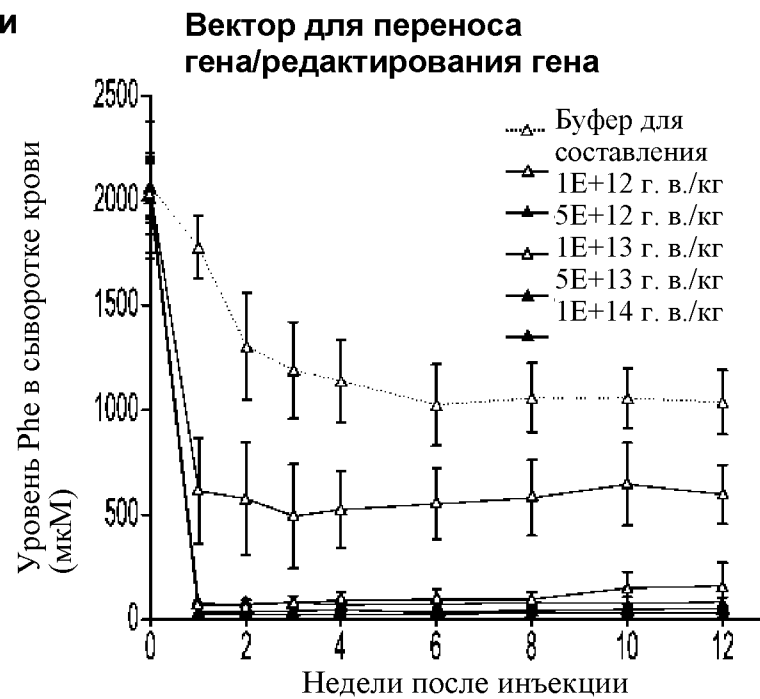


Фиг. 8С

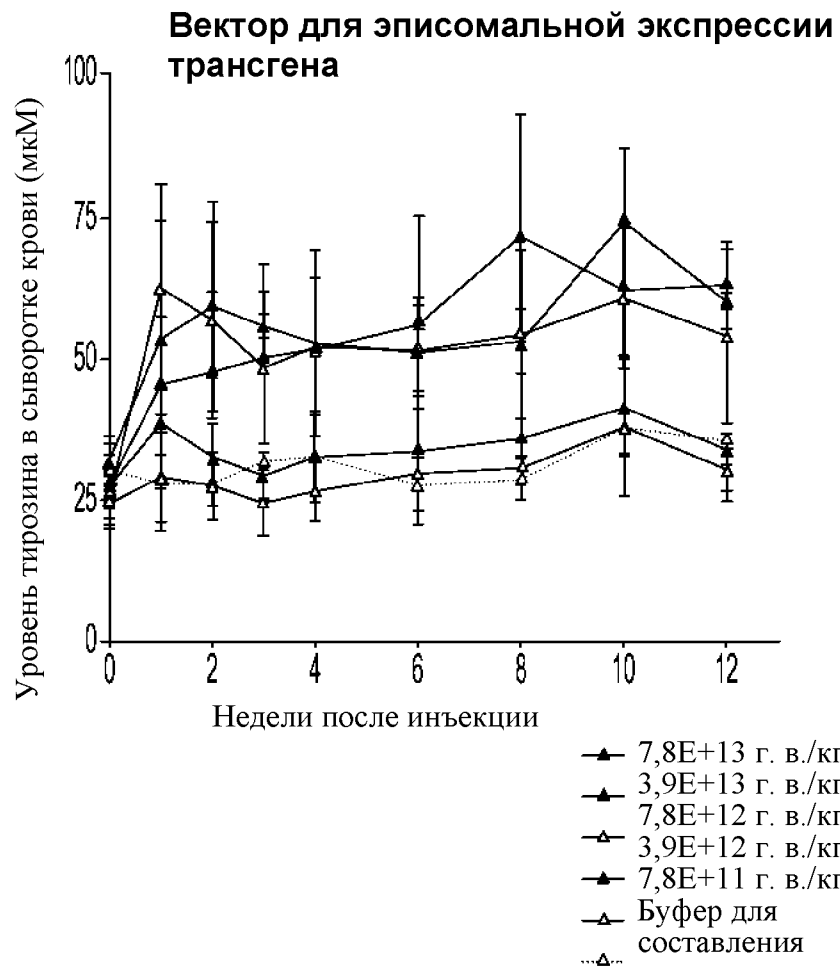




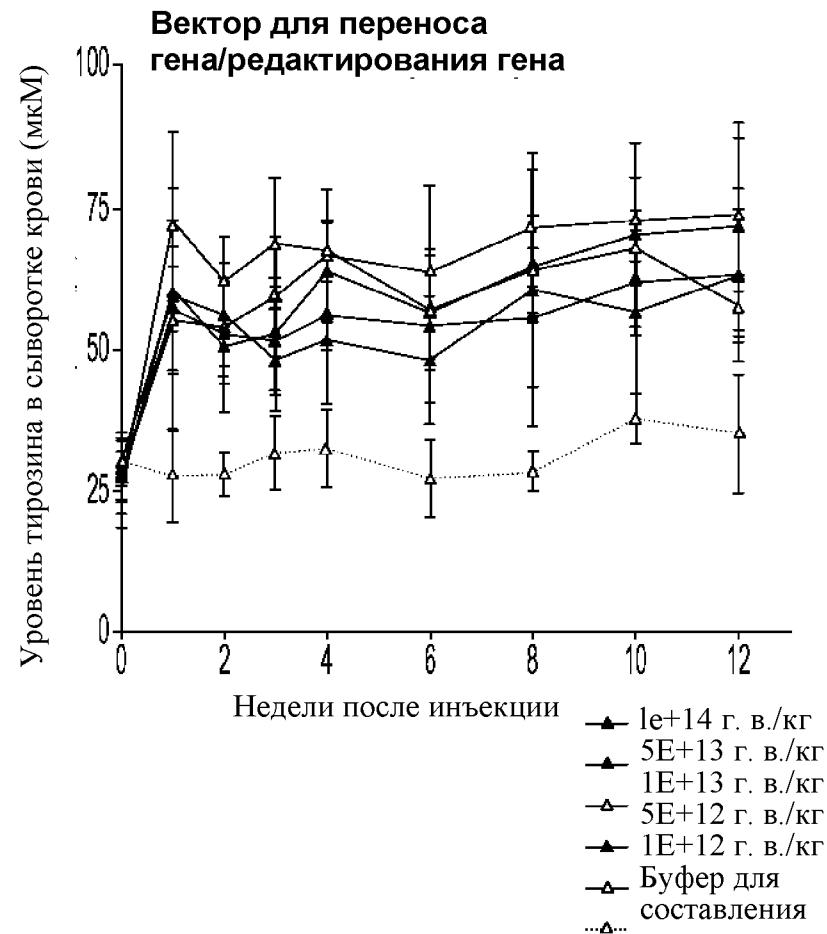
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9С



Фиг. 9D

Фиг. 9Е



Фиг. 9F



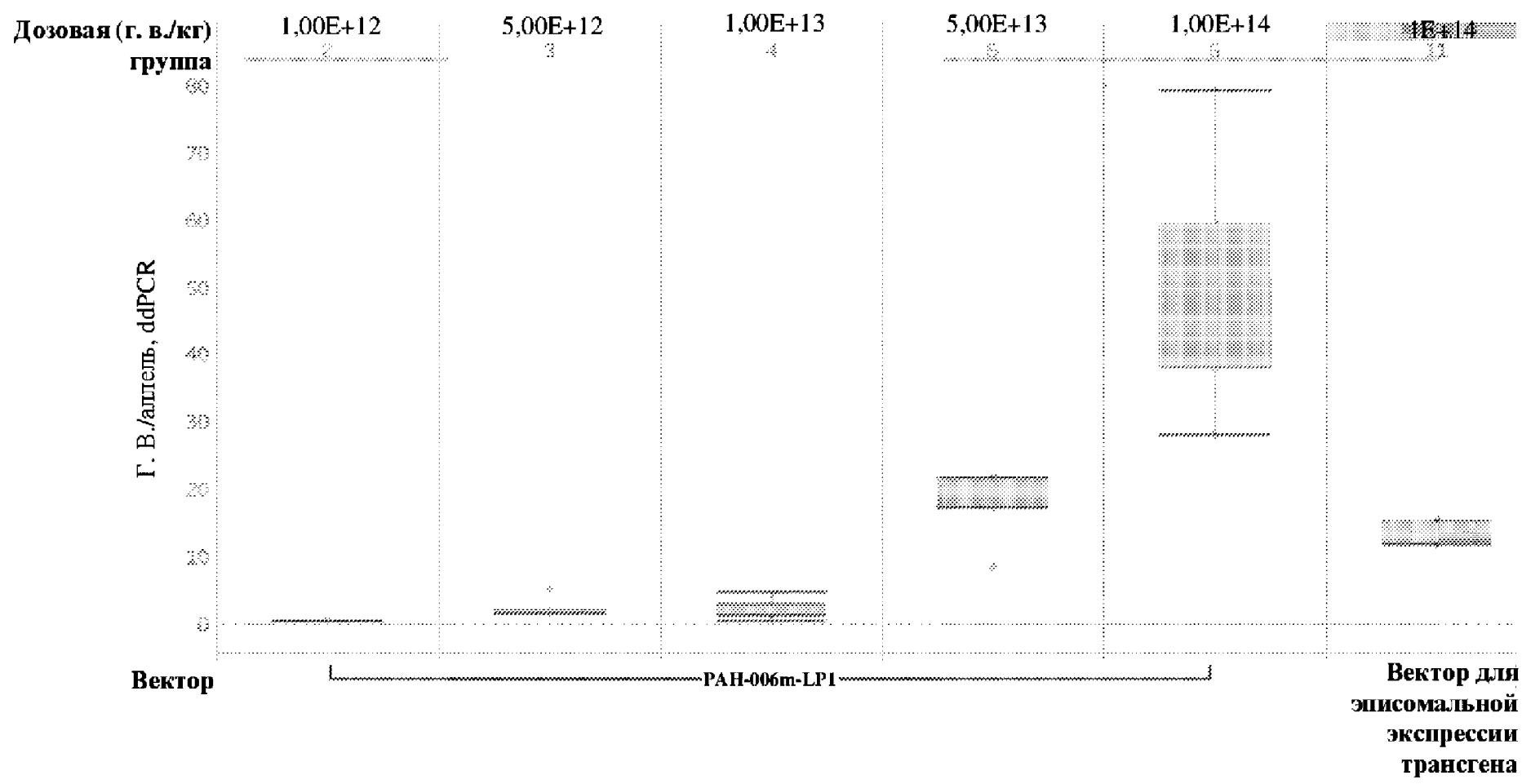
Фиг. 9G



Фиг. 9H

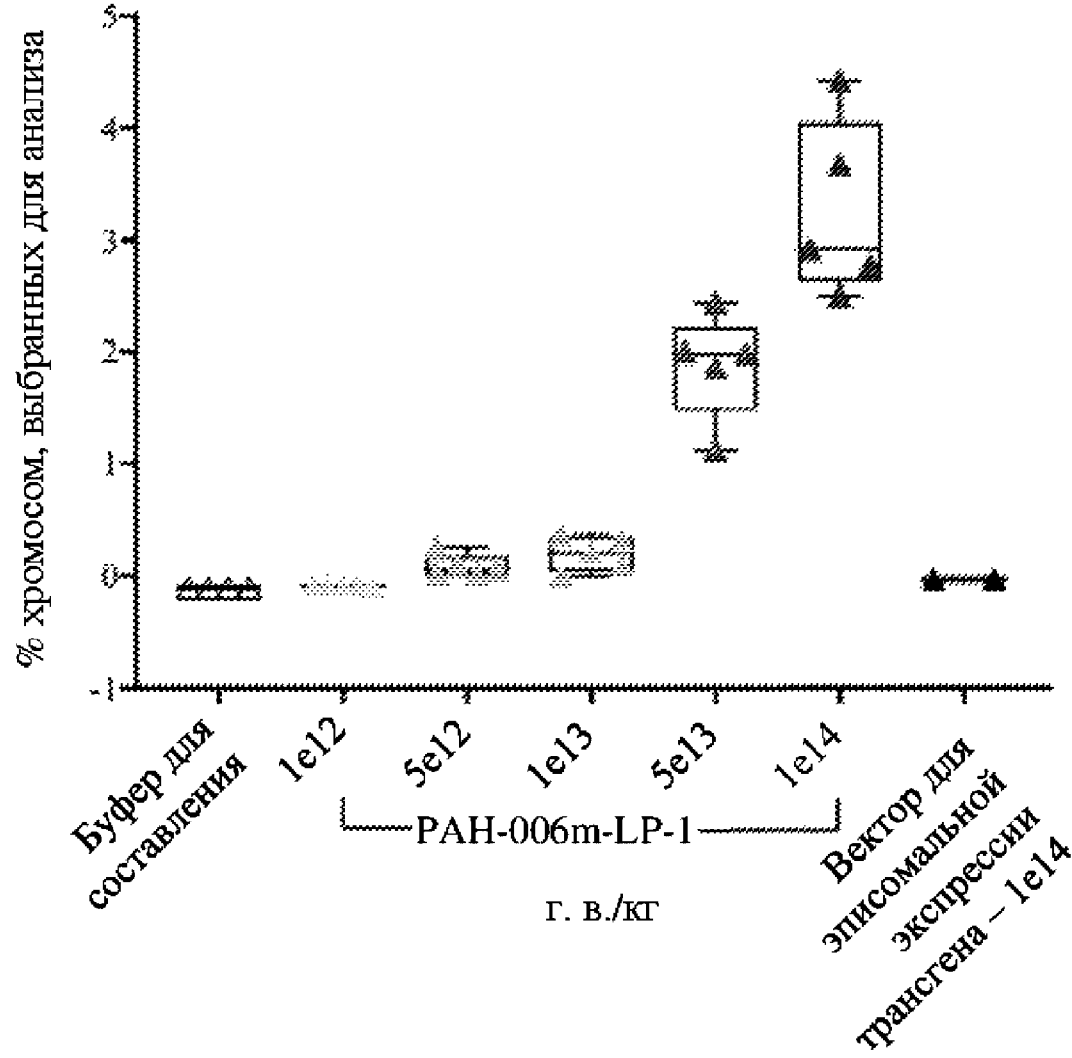


Фиг. 9I

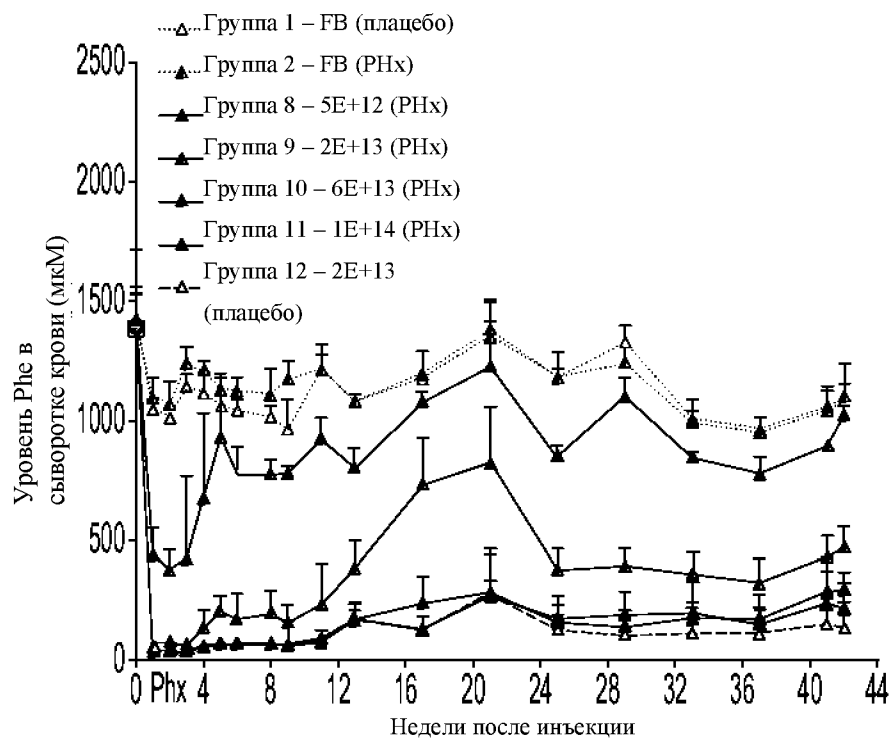


Фиг. 9J

Целевая интеграция

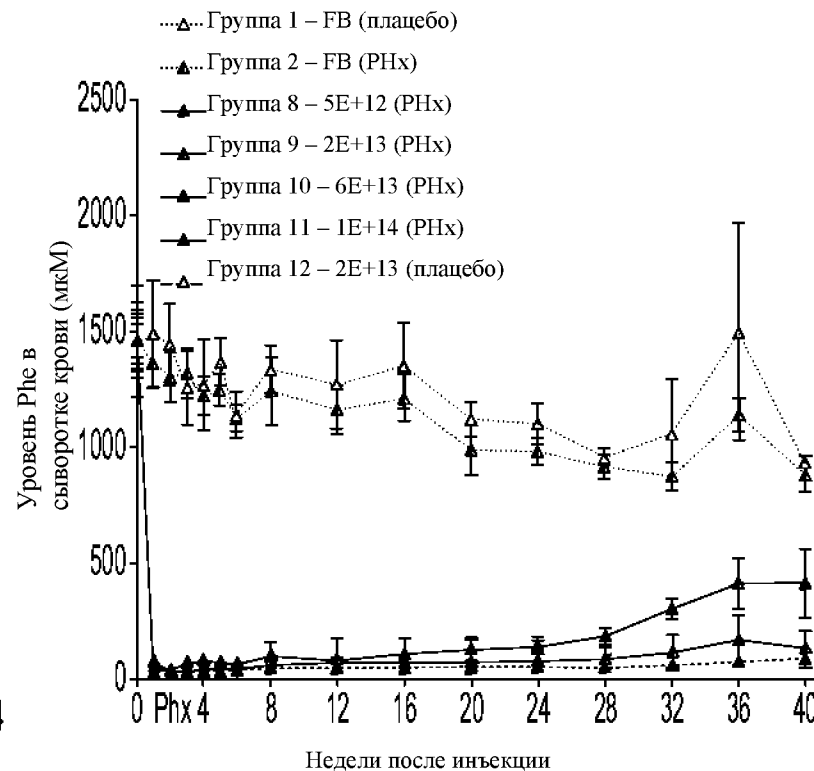


Вектор для эписомальной экспрессии трансгена

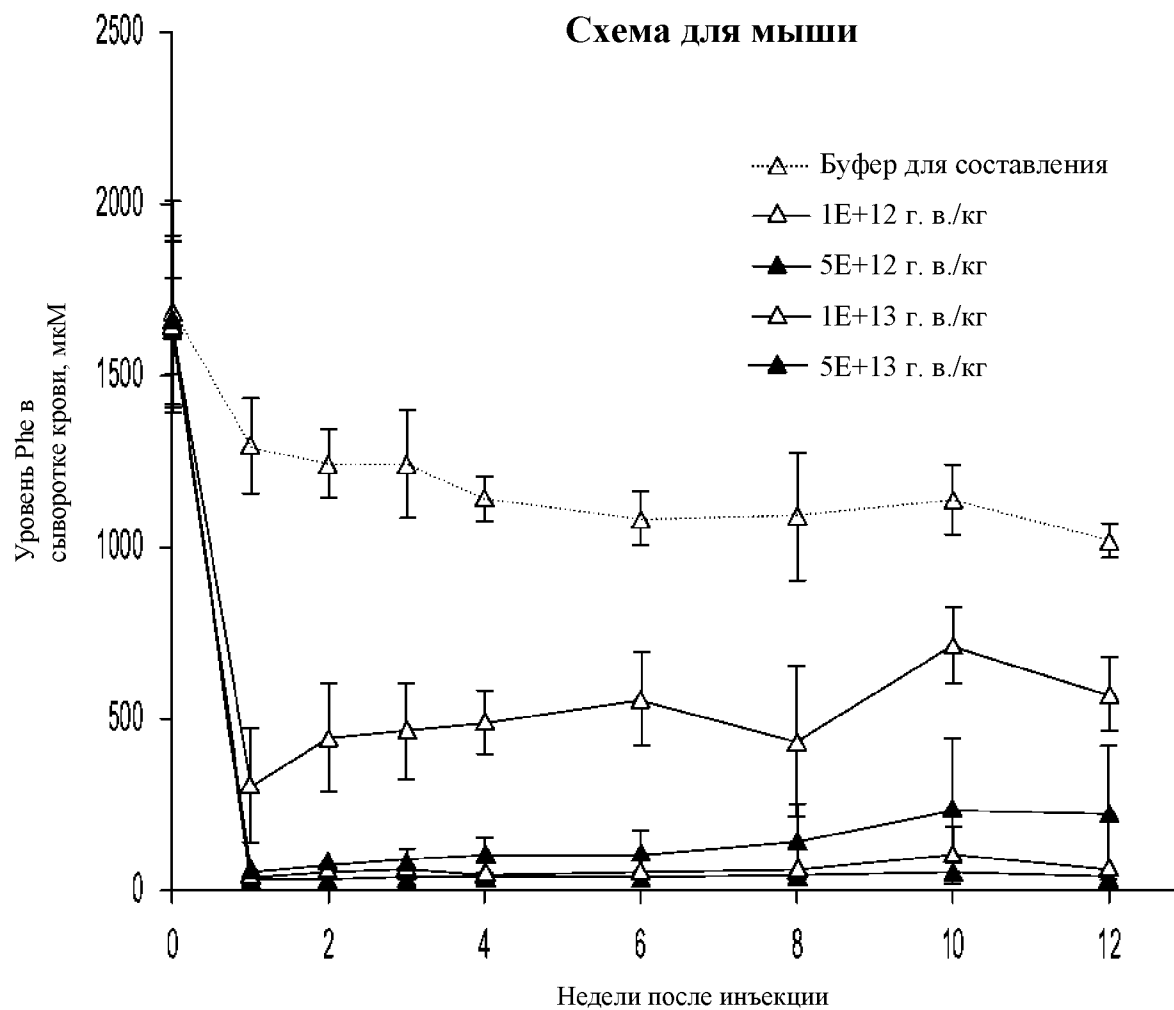


Фиг. 9K

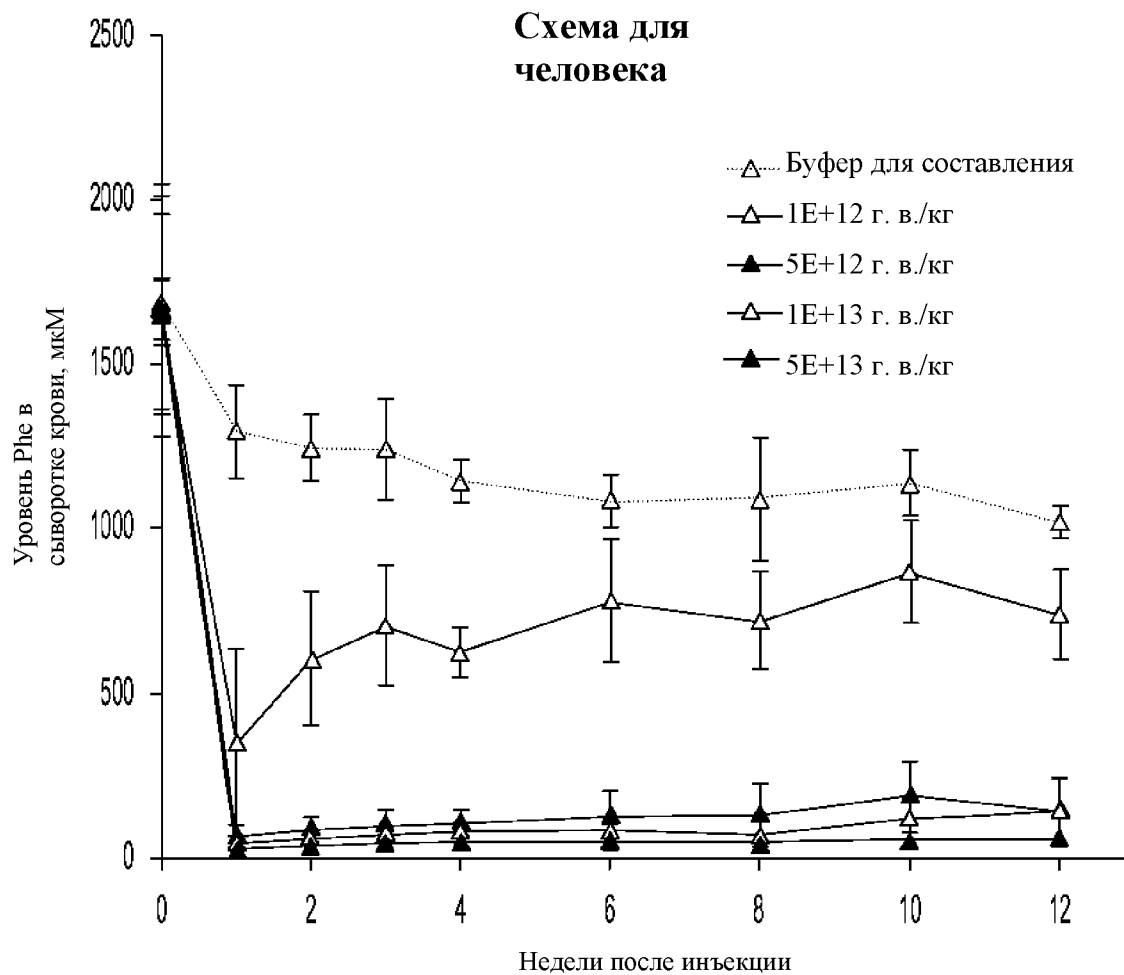
Вектор для переноса гена/редактирования гена



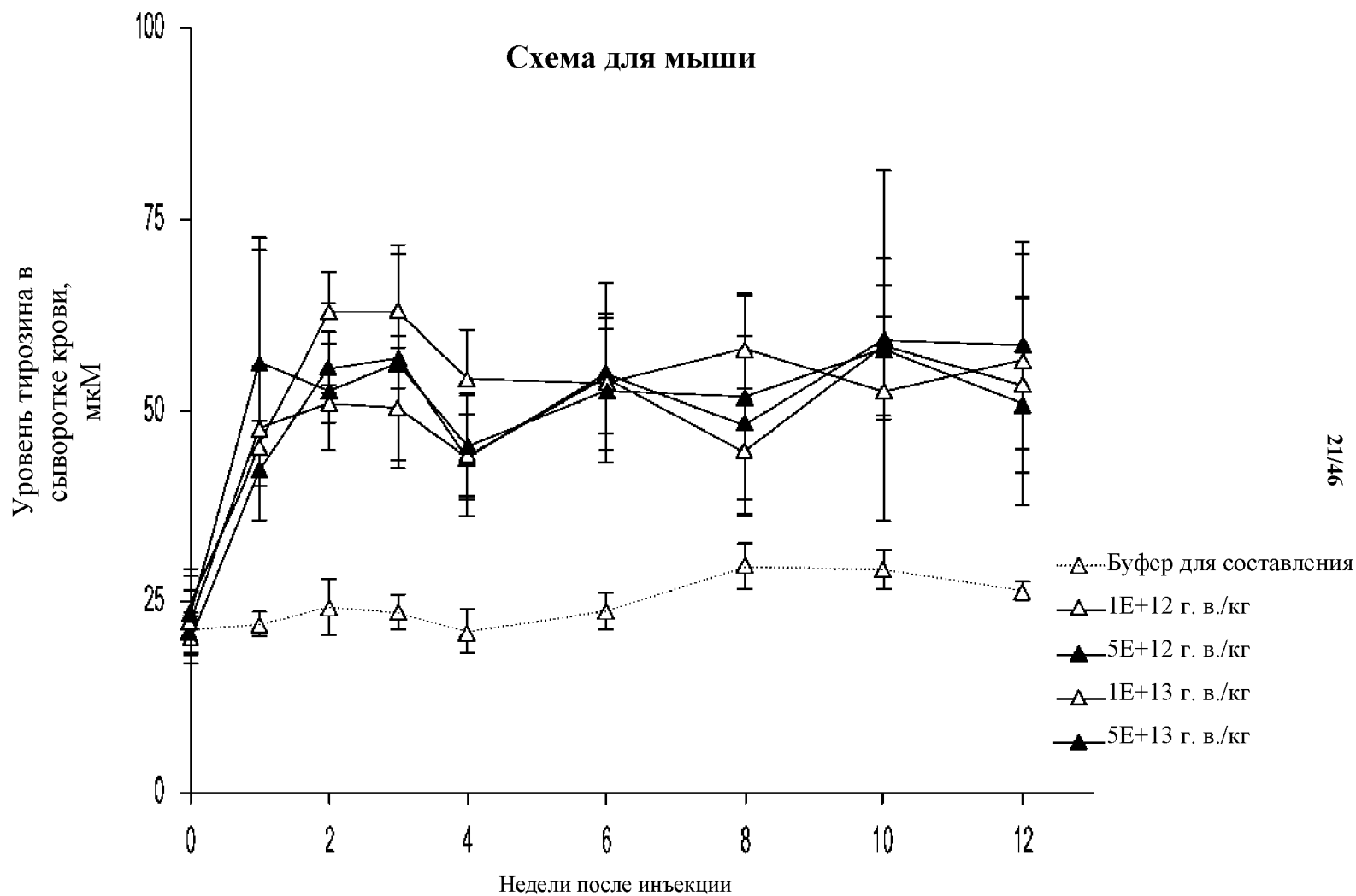
Фиг. 9L



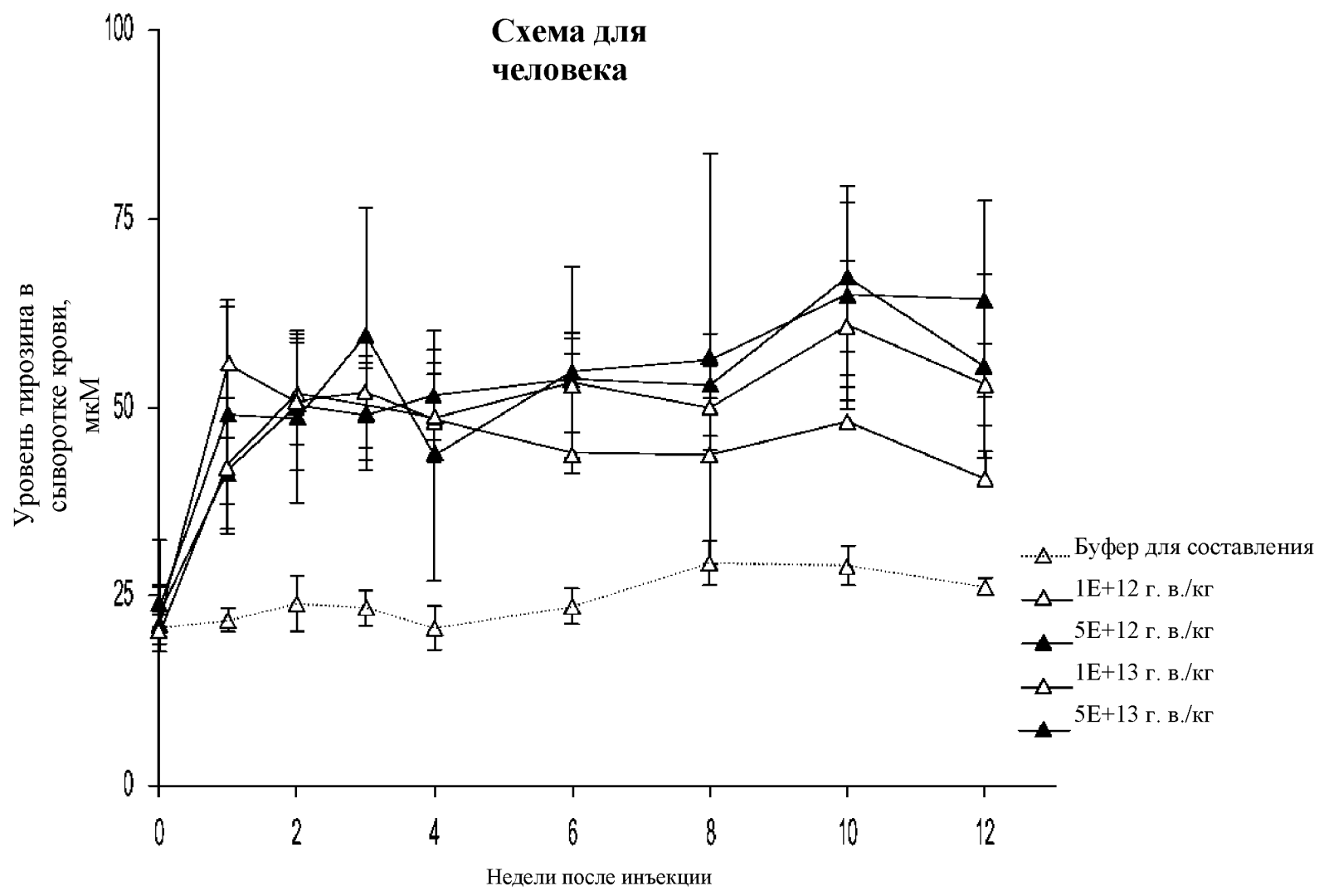
Фиг. 10А



Фиг.10В

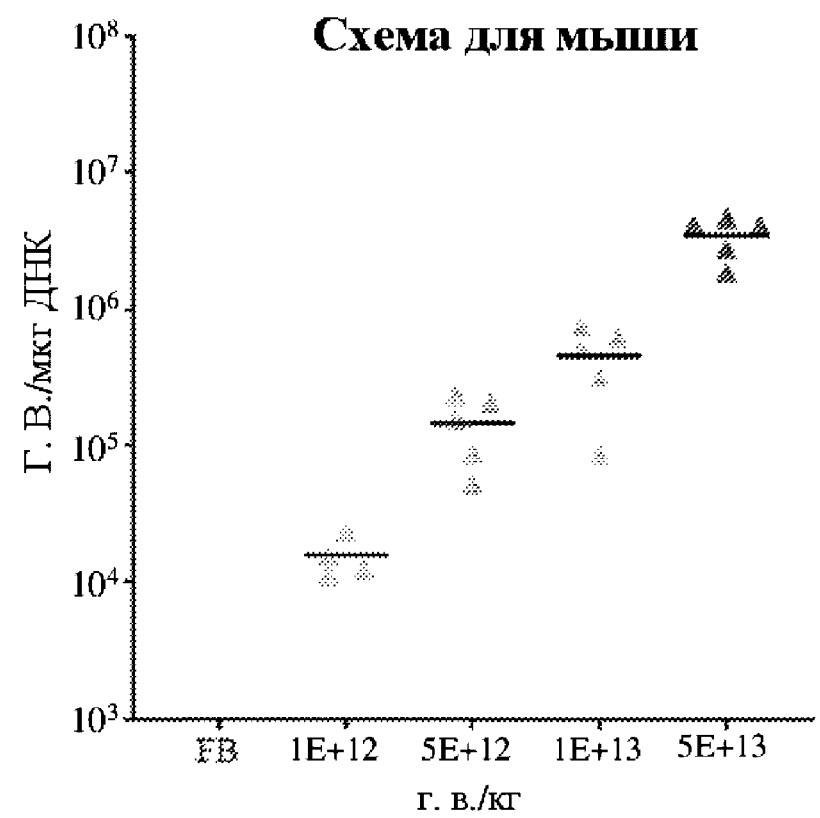


Фиг. 10С

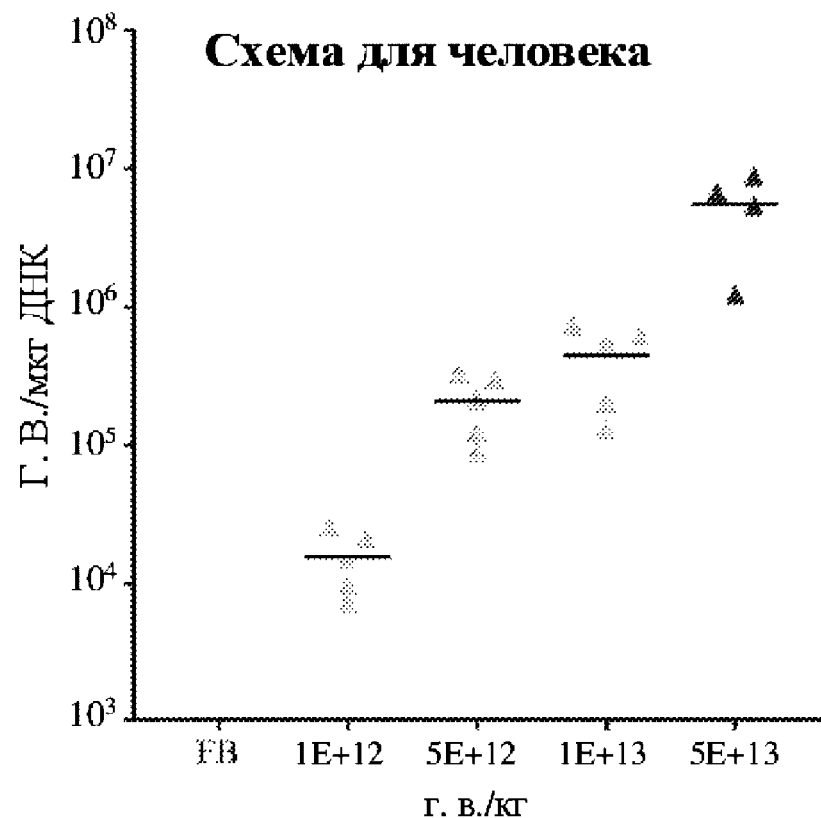


Фиг. 10D

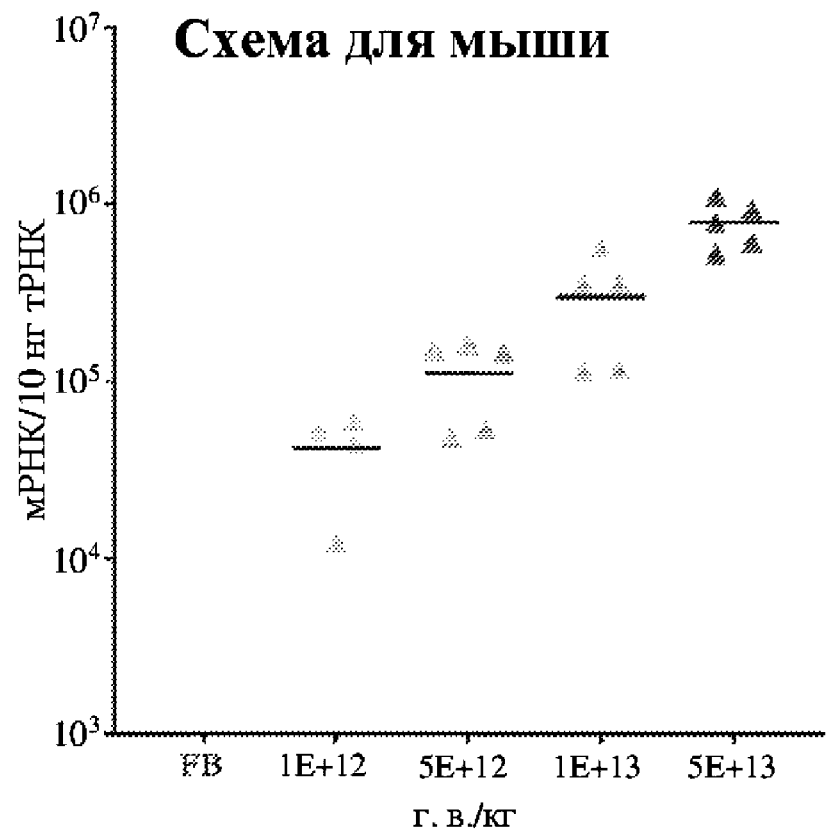
Фиг. 10Е



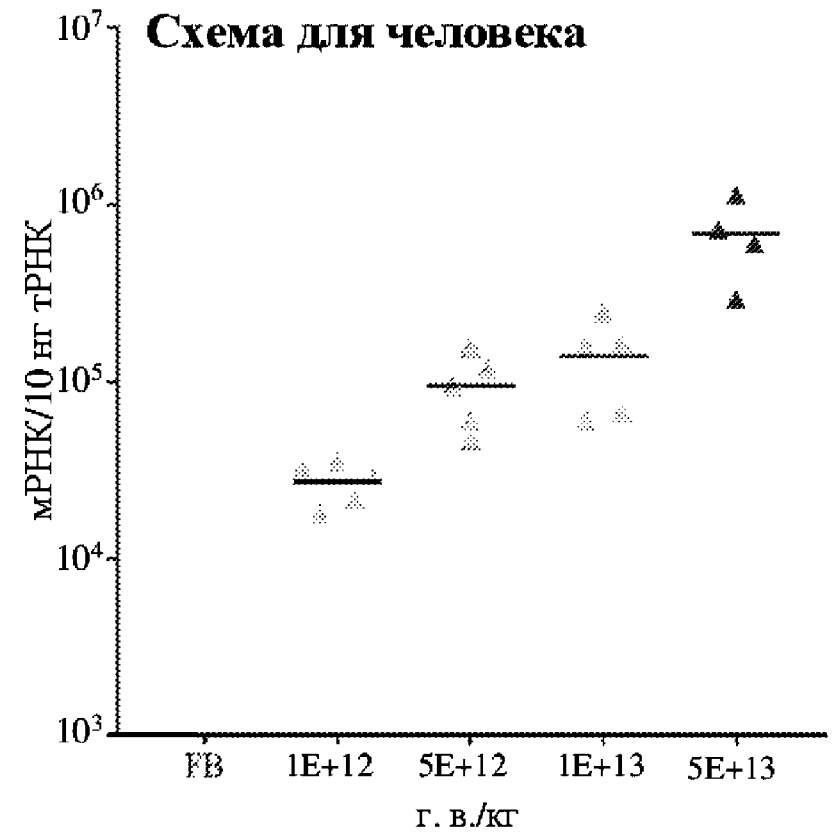
Фиг. 10F

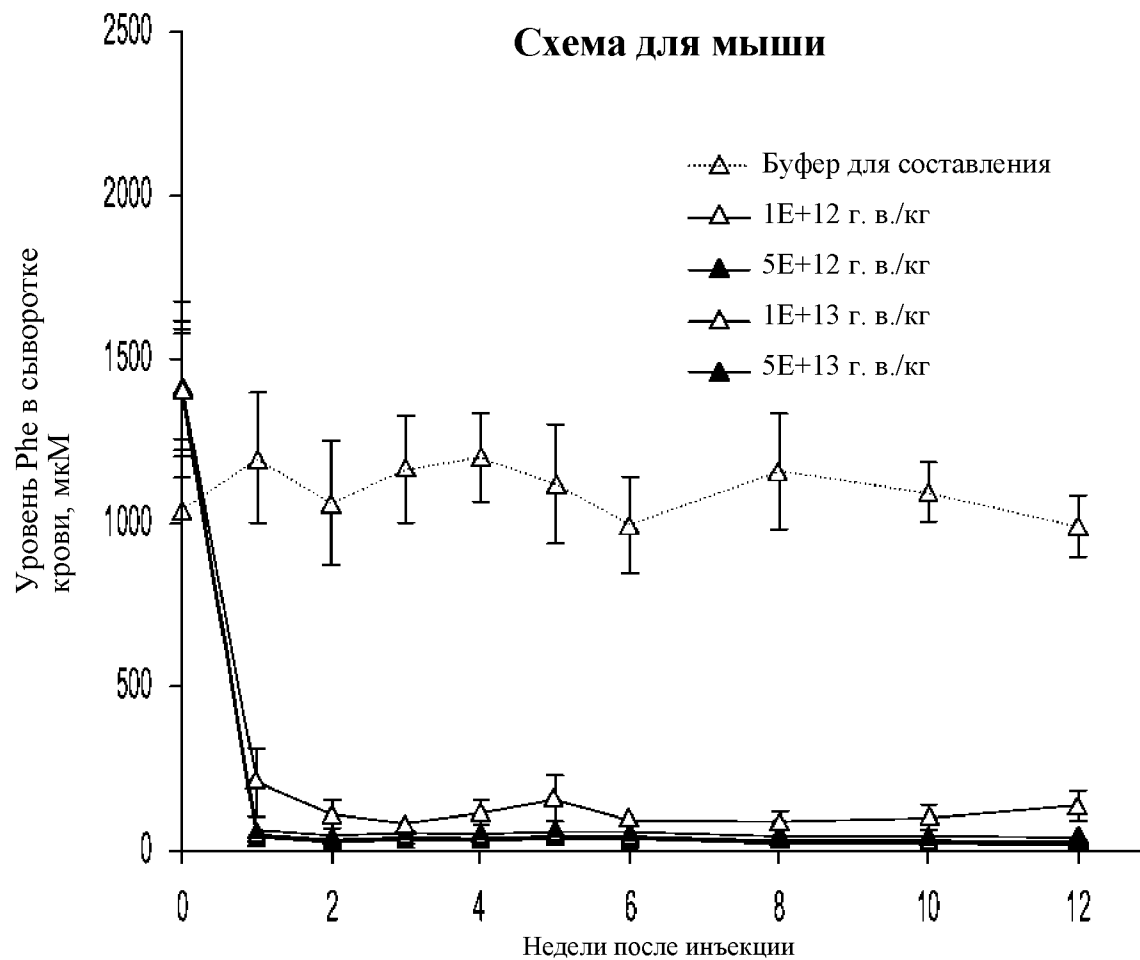


Фиг. 10G

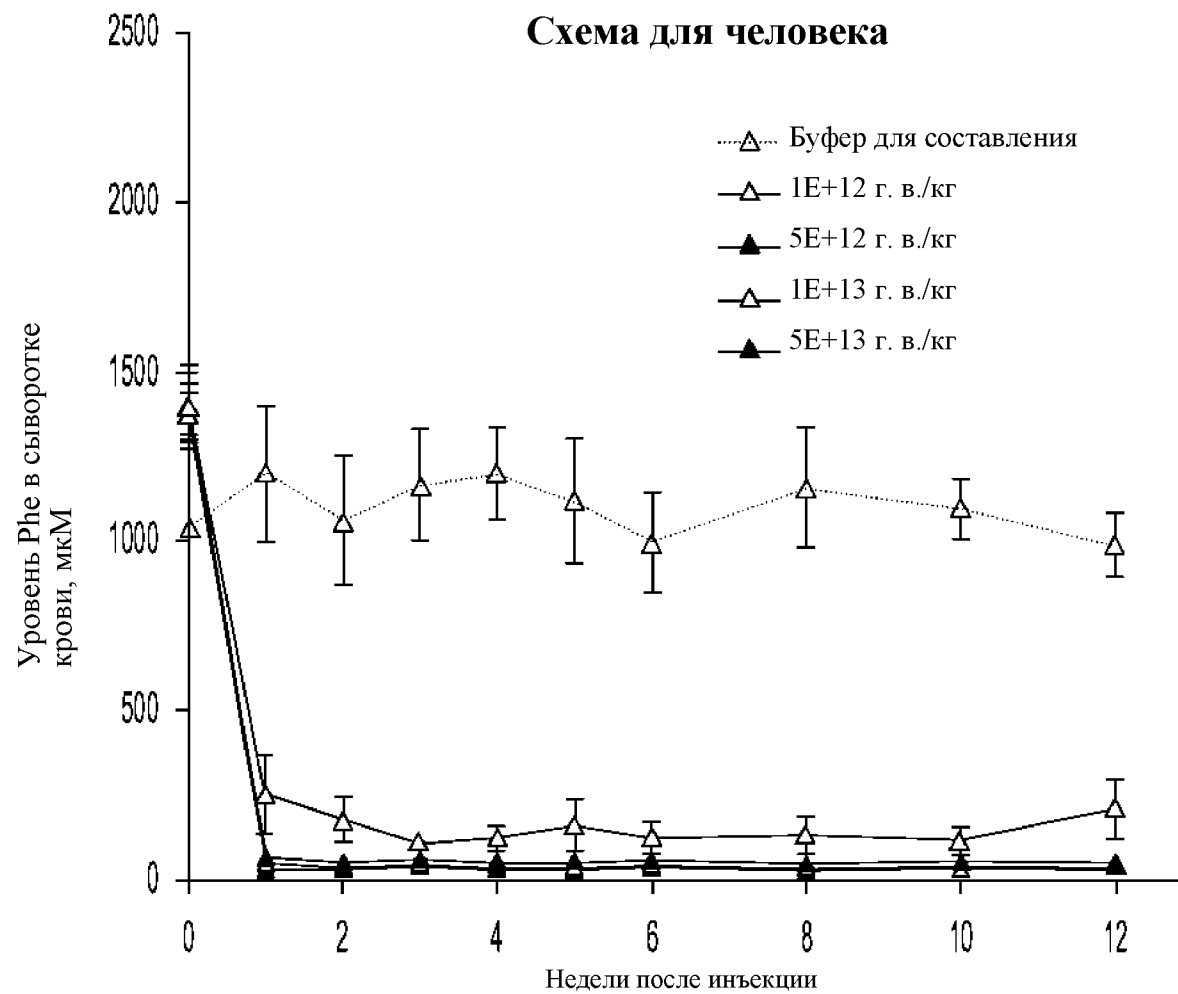


Фиг. 10H

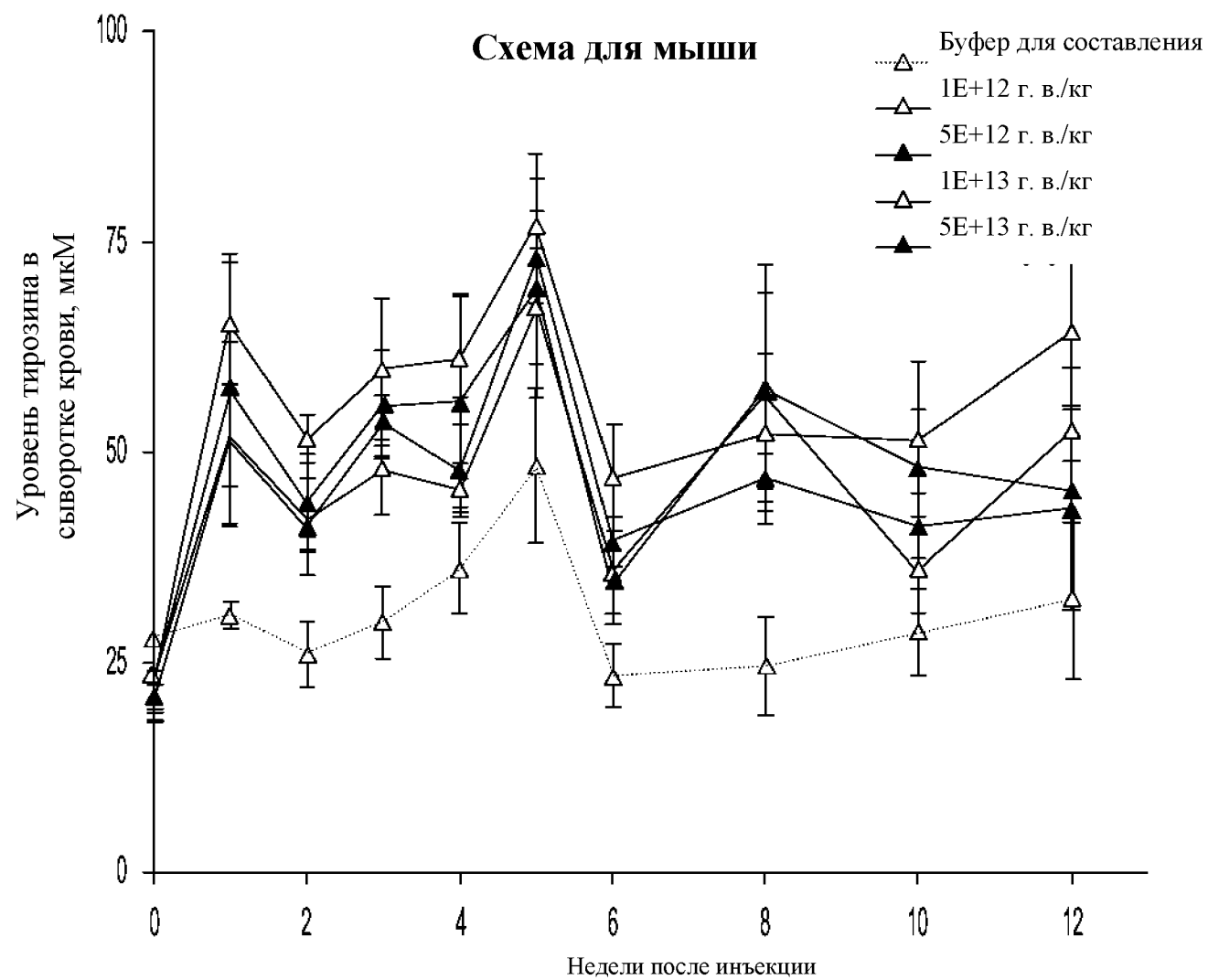




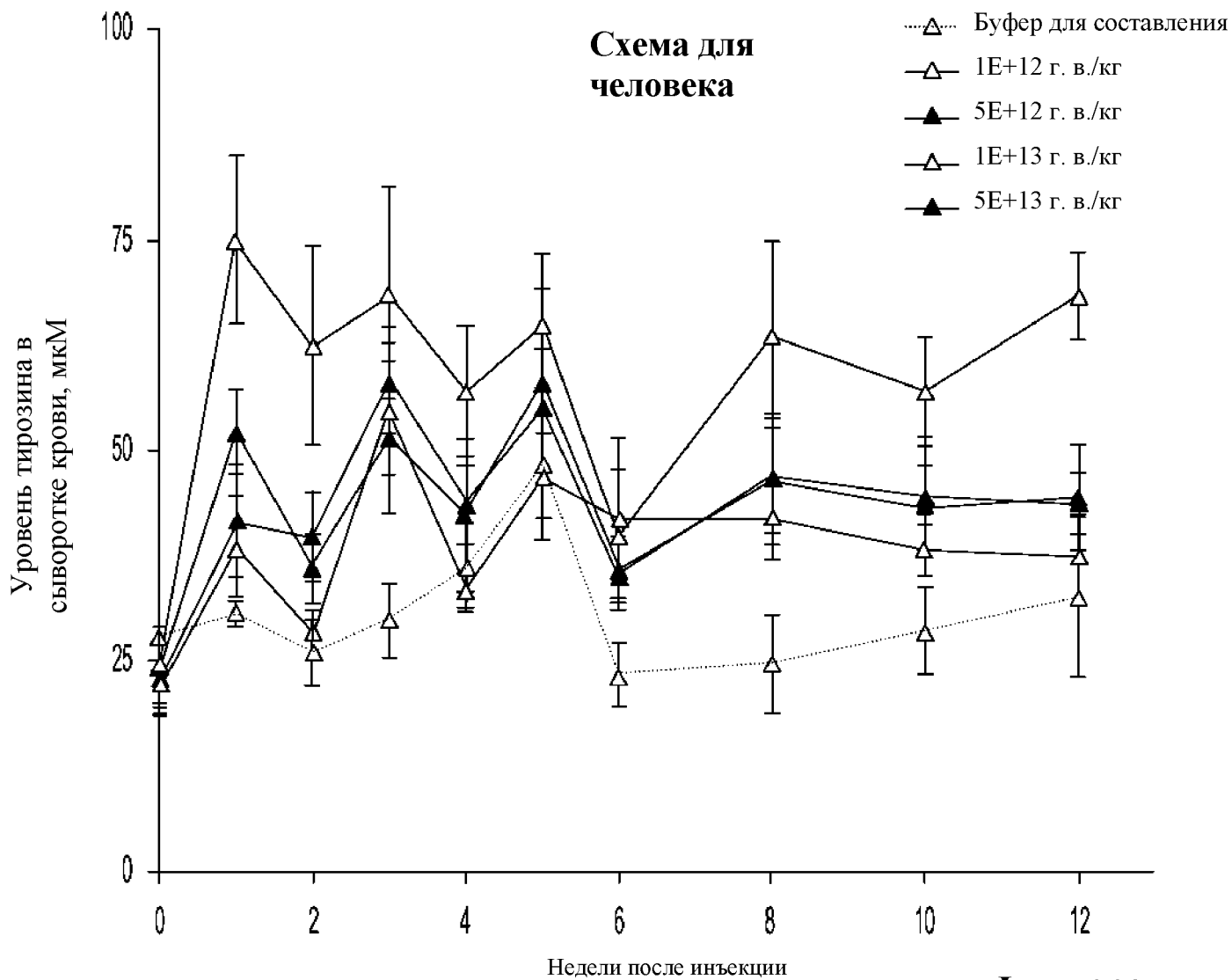
Фиг. 10I



Фиг. 10J

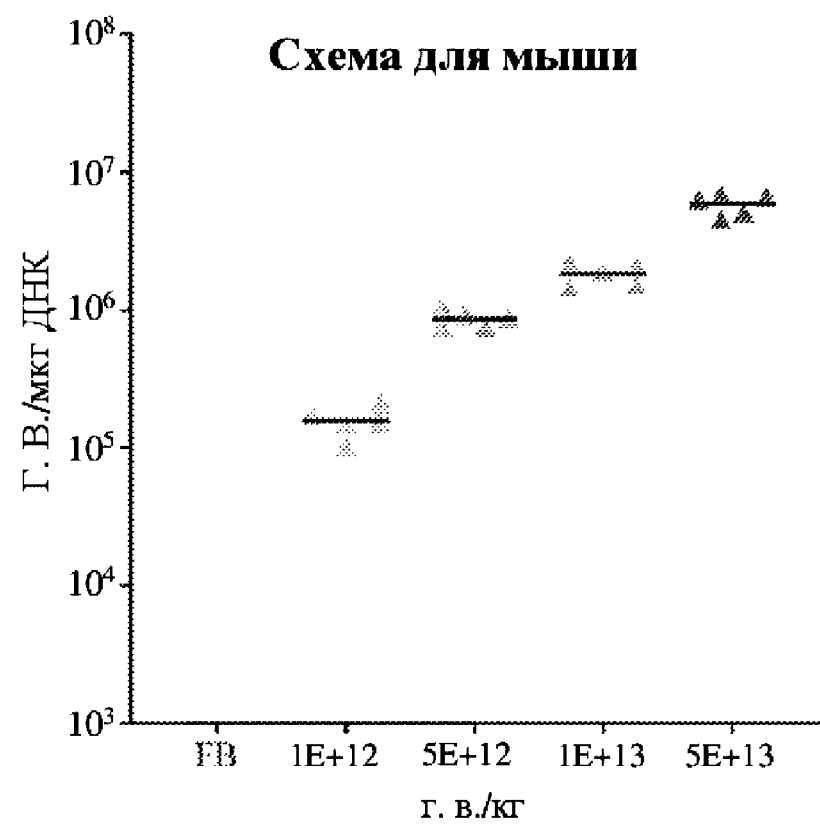


Фиг. 10К

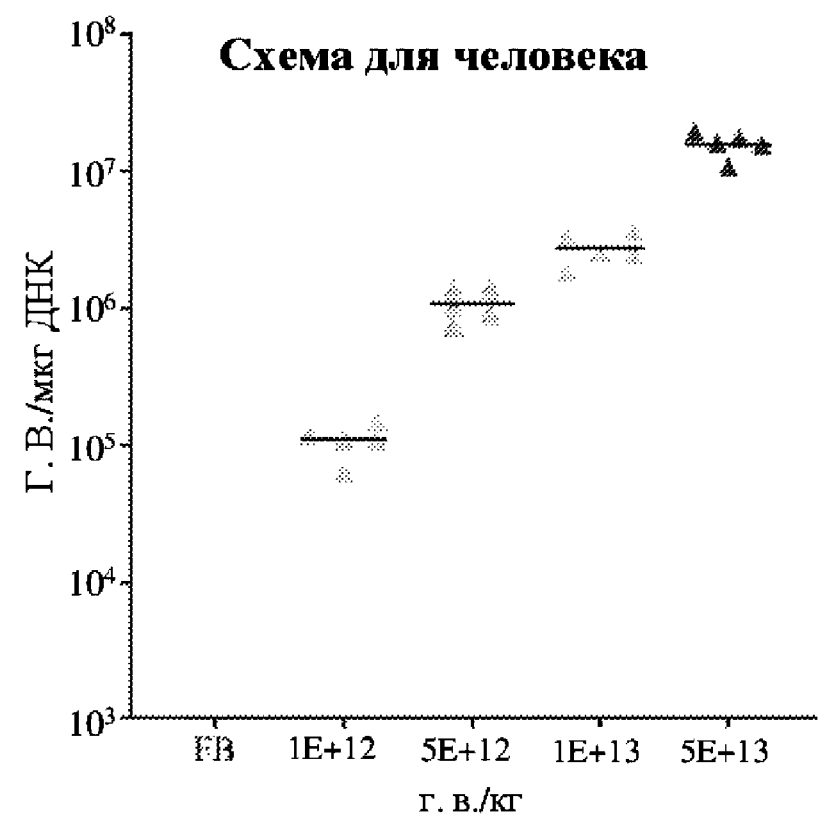


Фиг. 10L

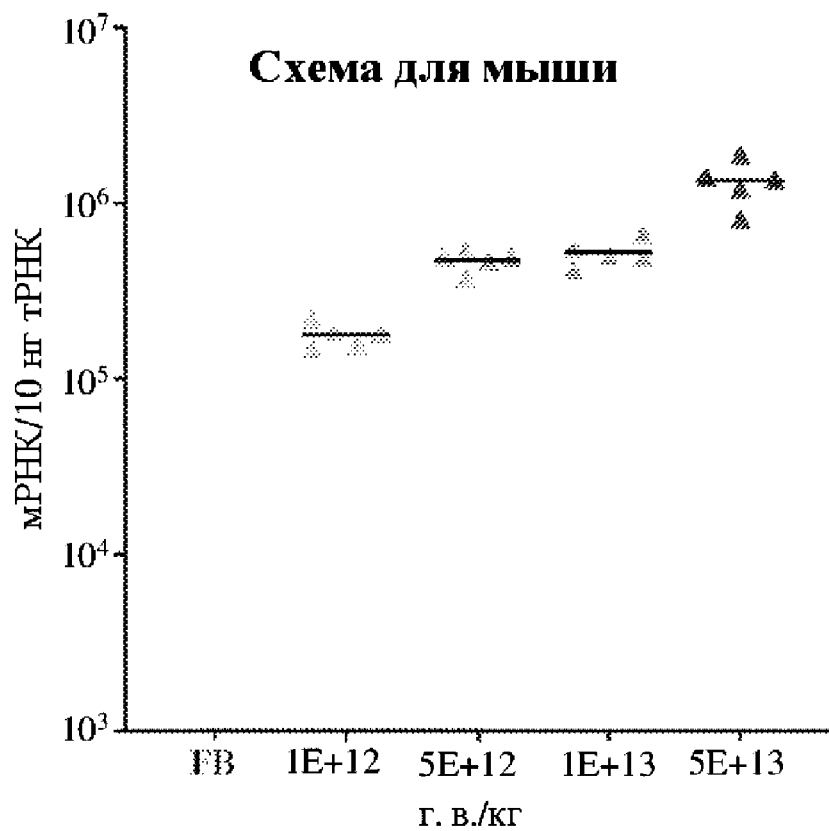
Фиг. 10M



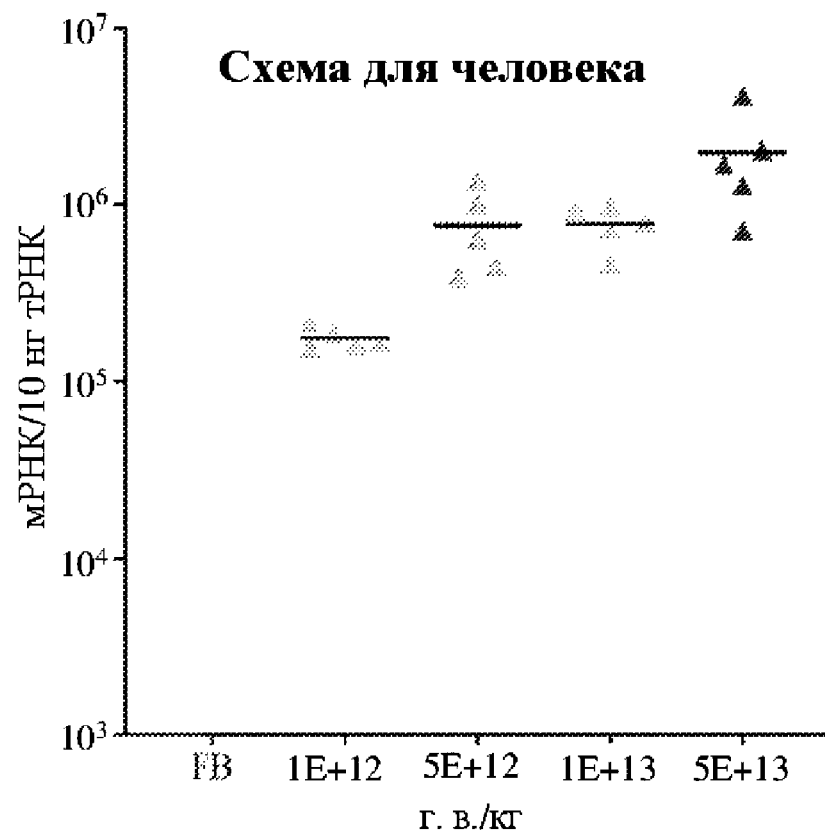
Фиг. 10N



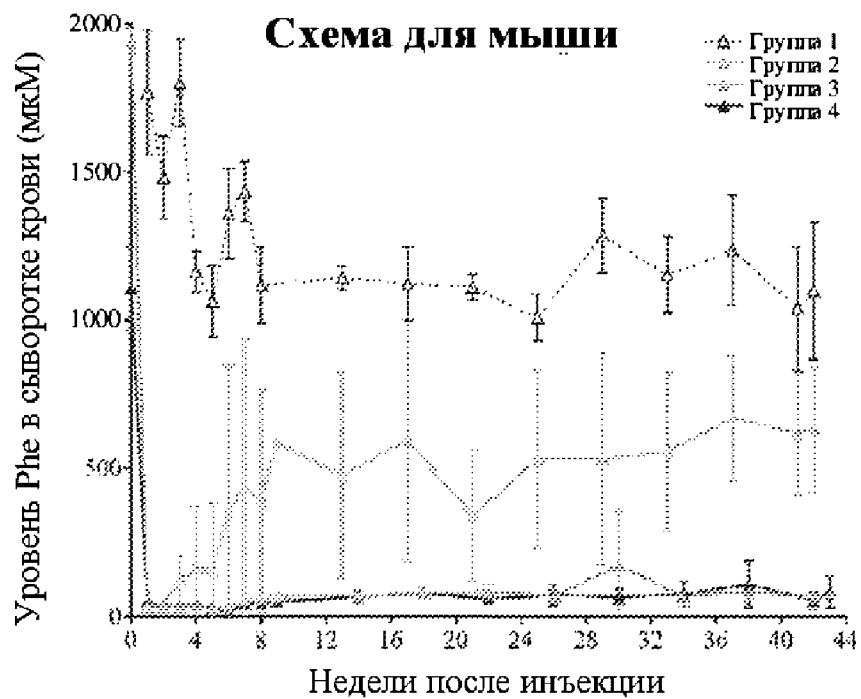
Фиг. 100



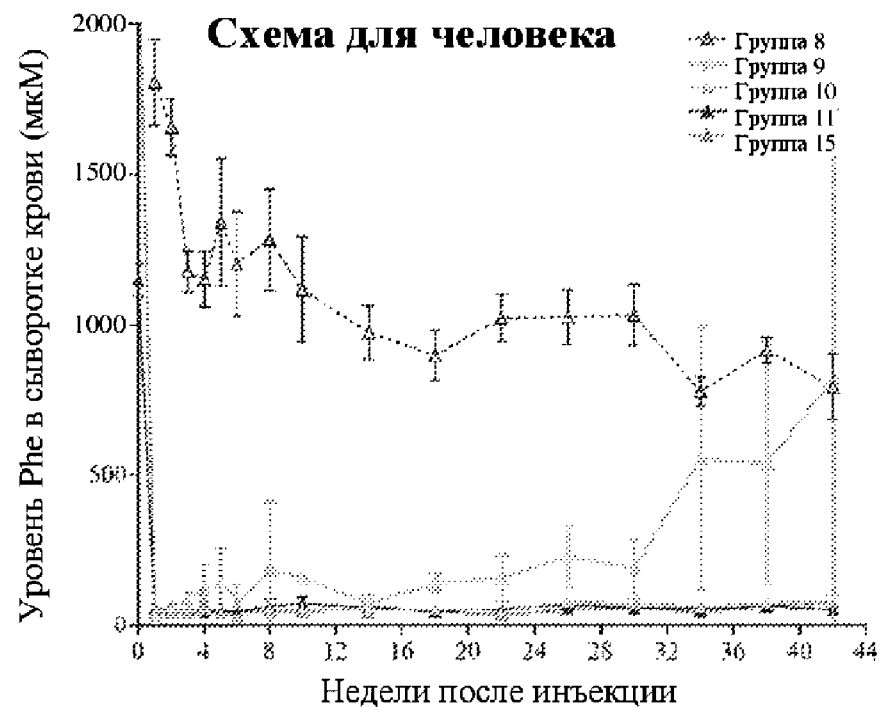
Фиг. 10Р



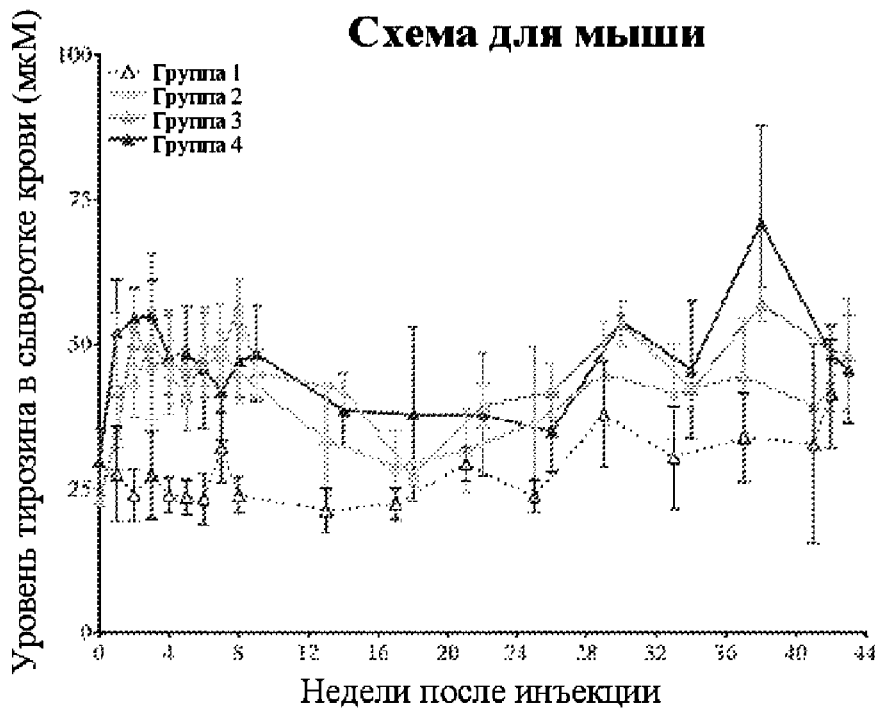
Фиг. 11А



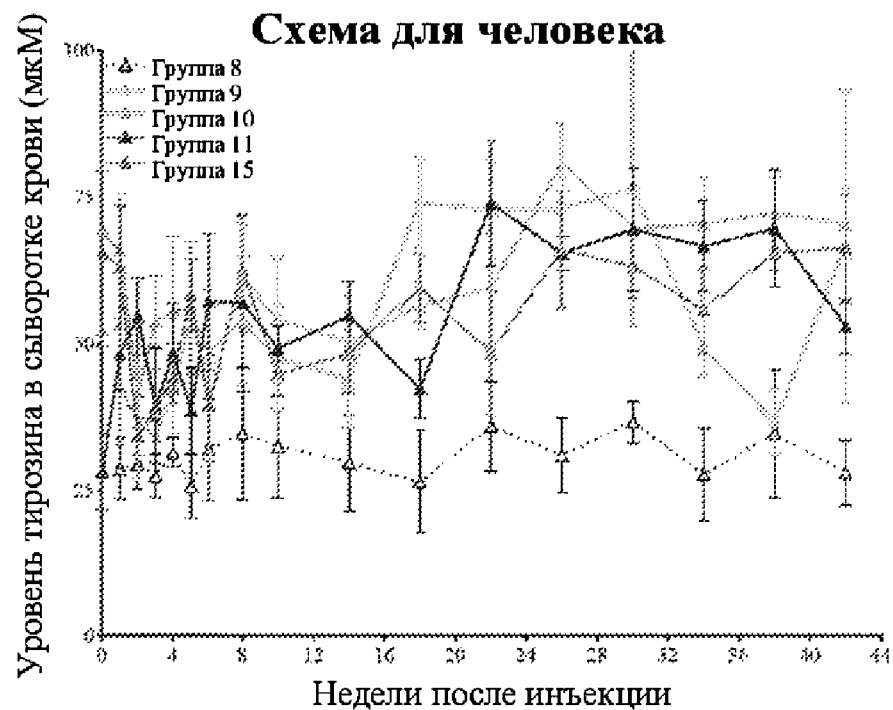
Фиг. 11В



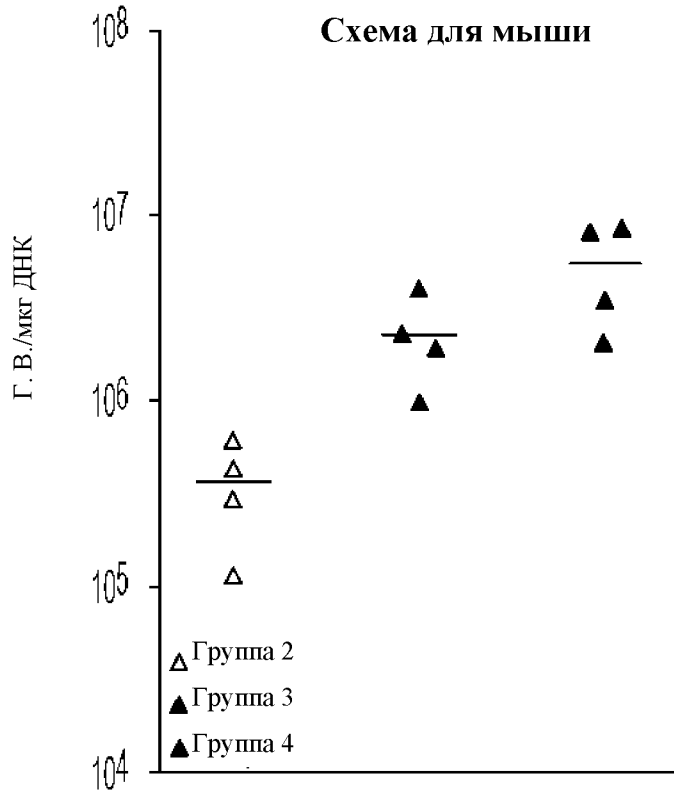
Фиг. 11С



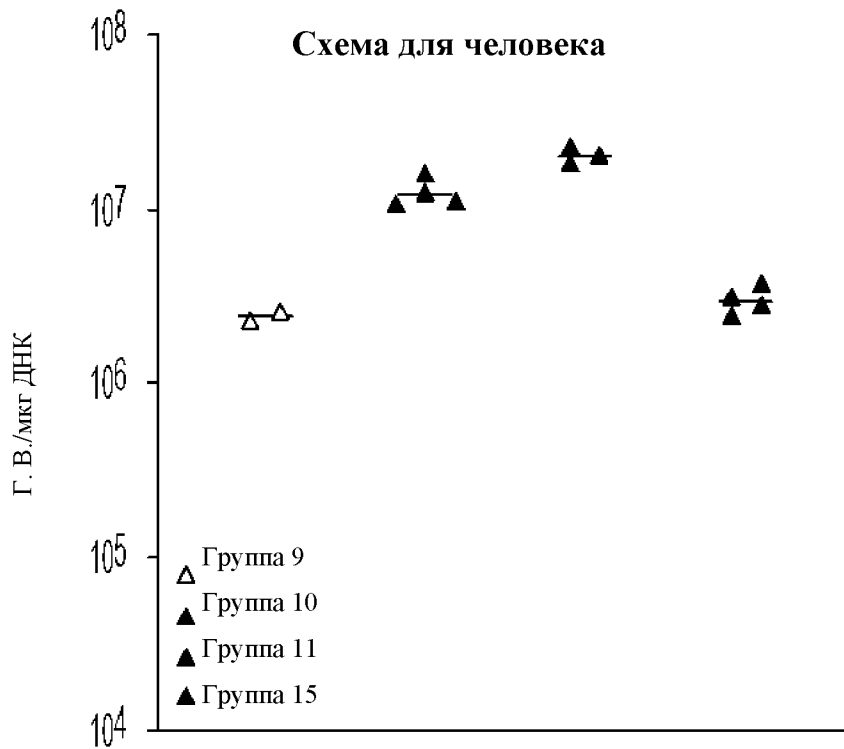
Фиг. 11D



33/46

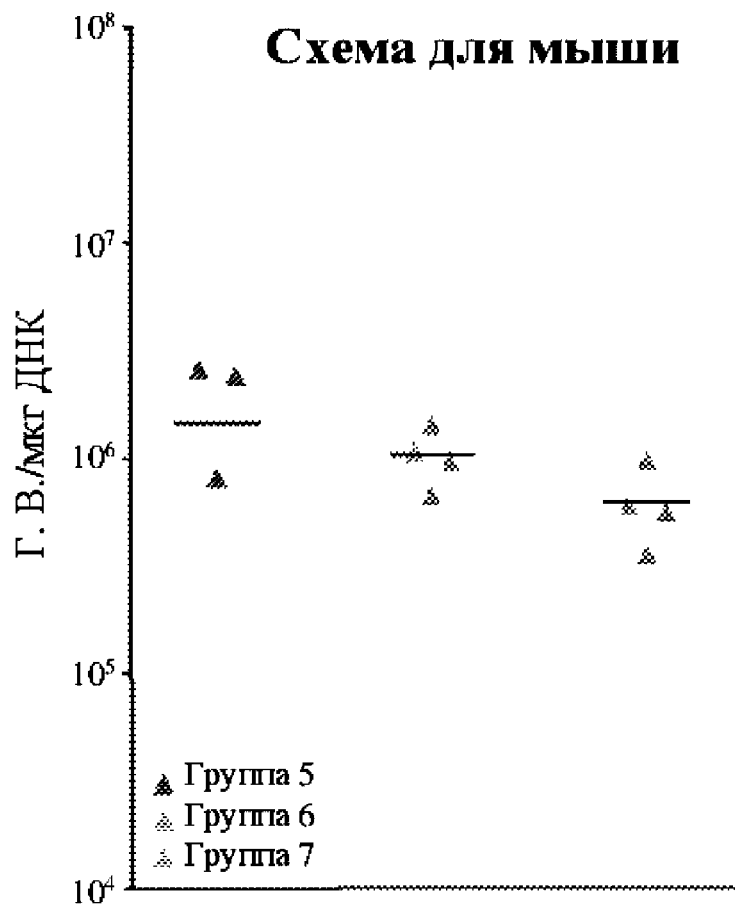


Фиг. 11Е



Фиг. 11F

Фиг. 11G



Фиг. 11H

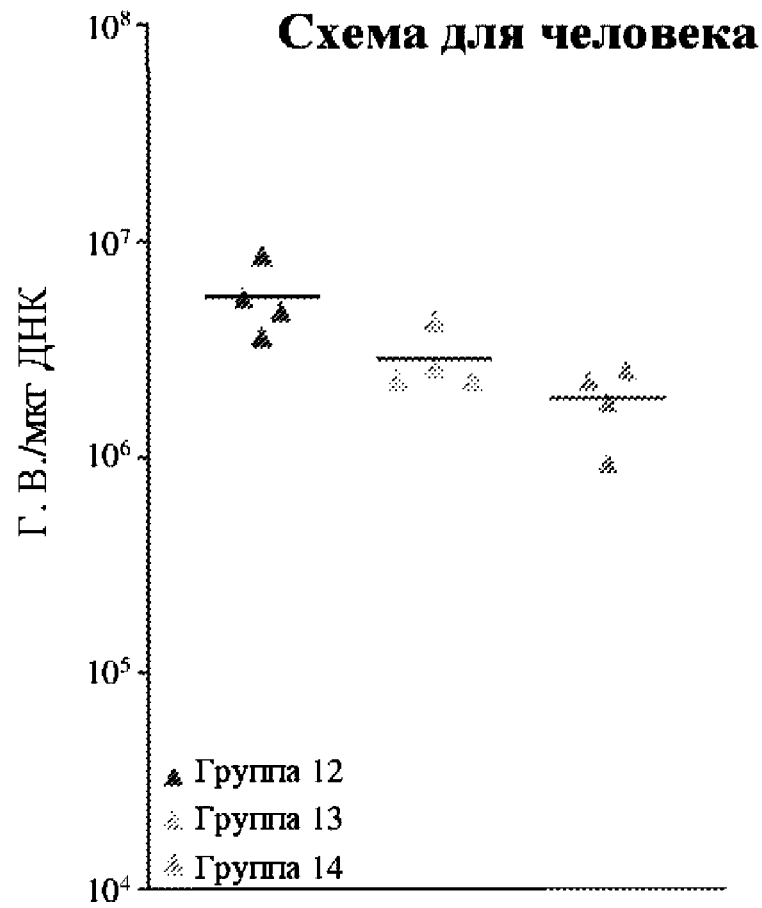
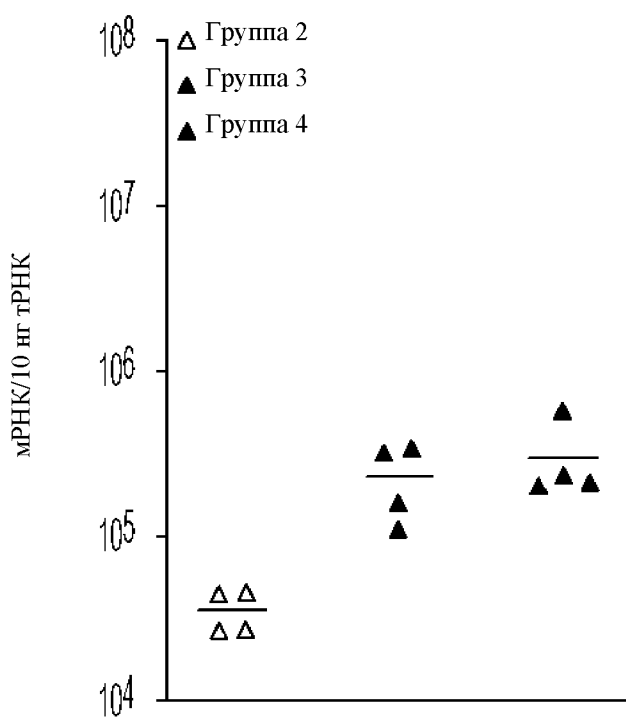
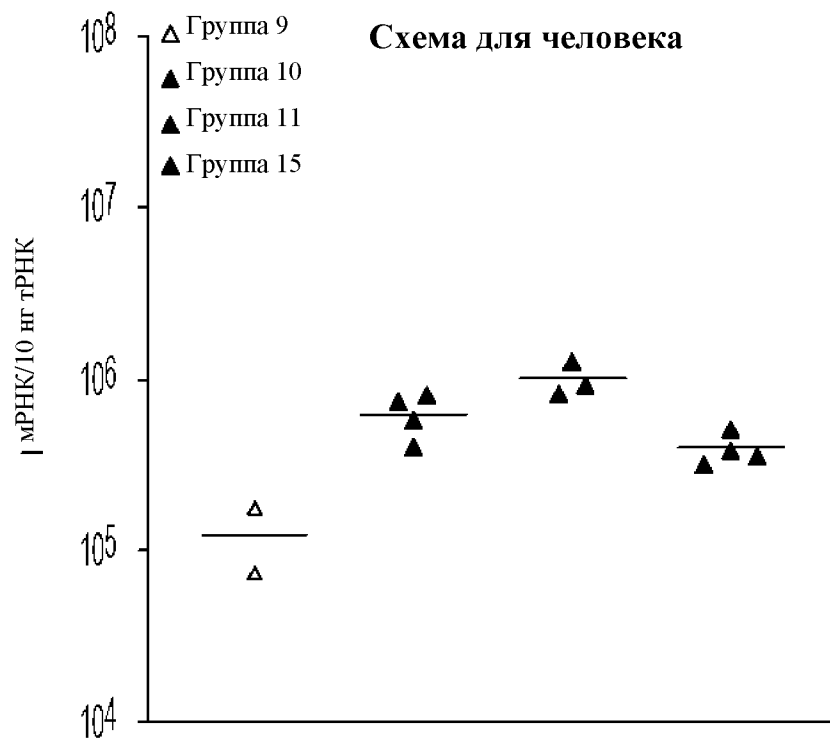


Схема для мыши



Фиг. 11I

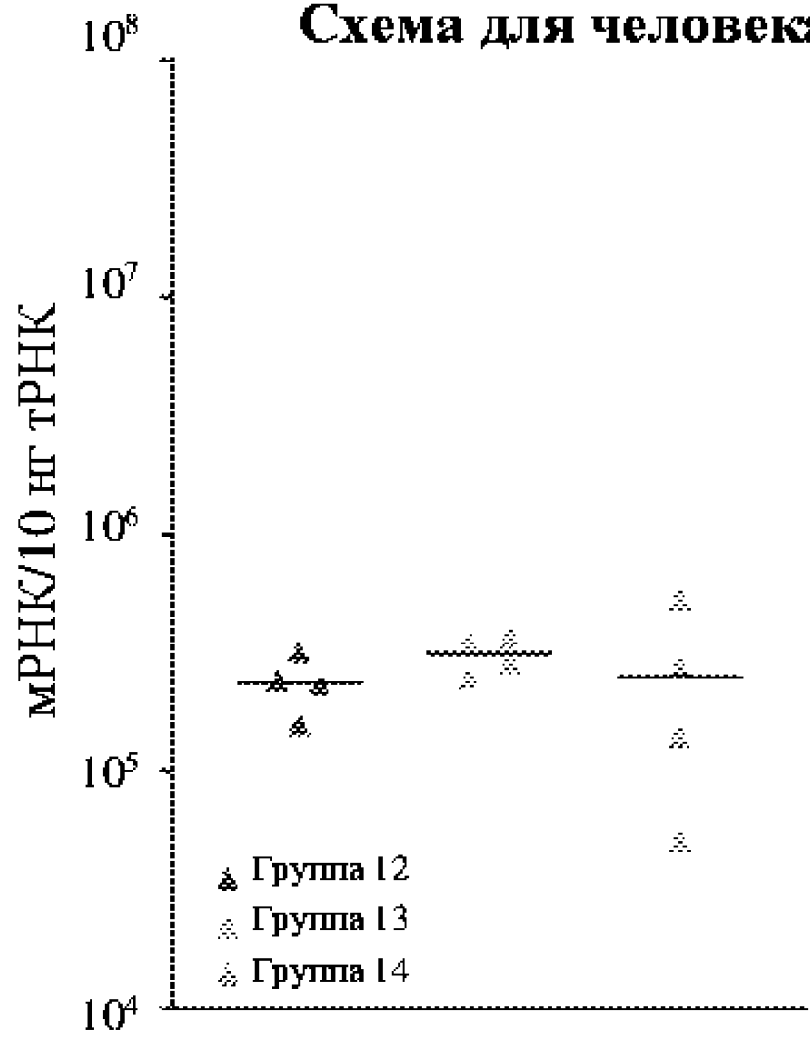
Схема для человека



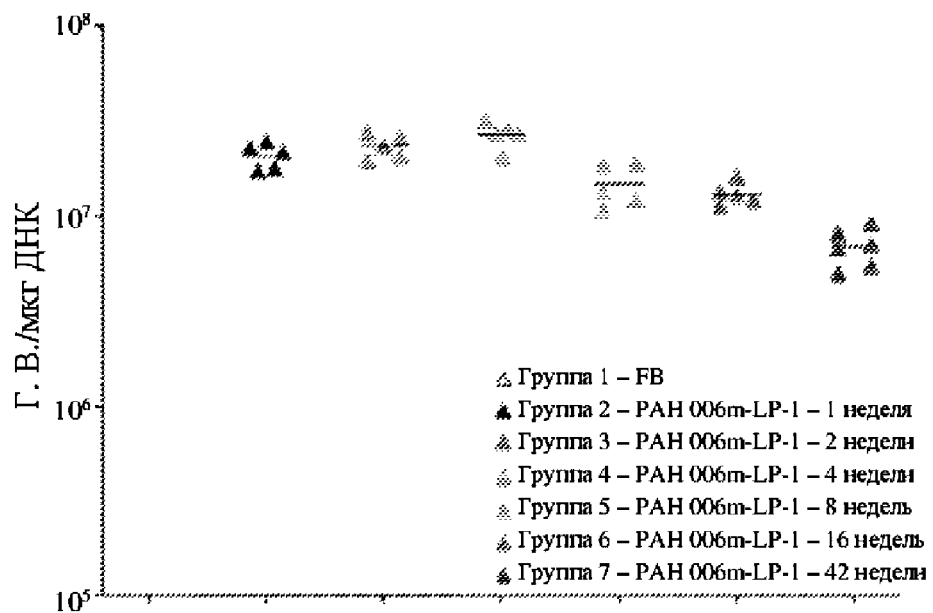
Фиг. 11J

Фиг. 11К

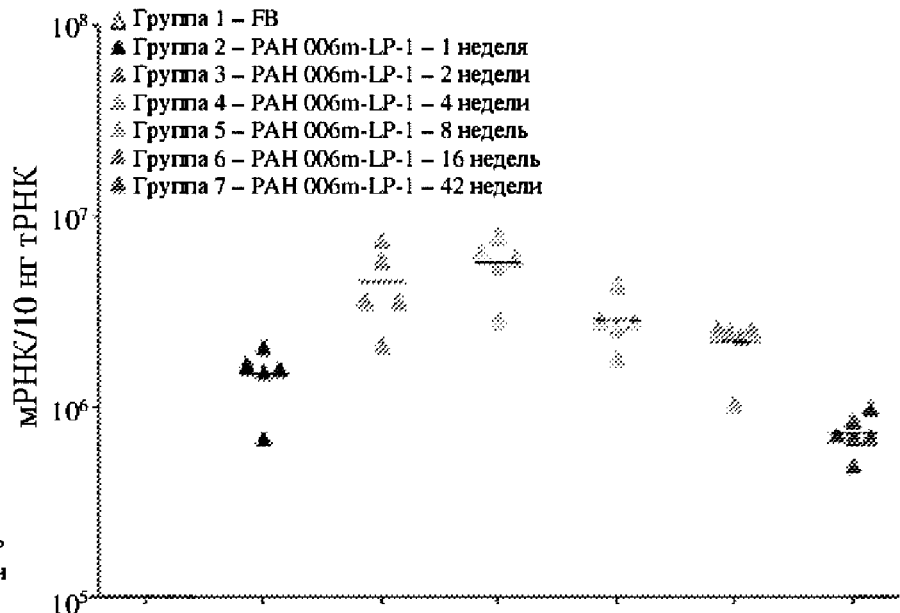
Схема для человека



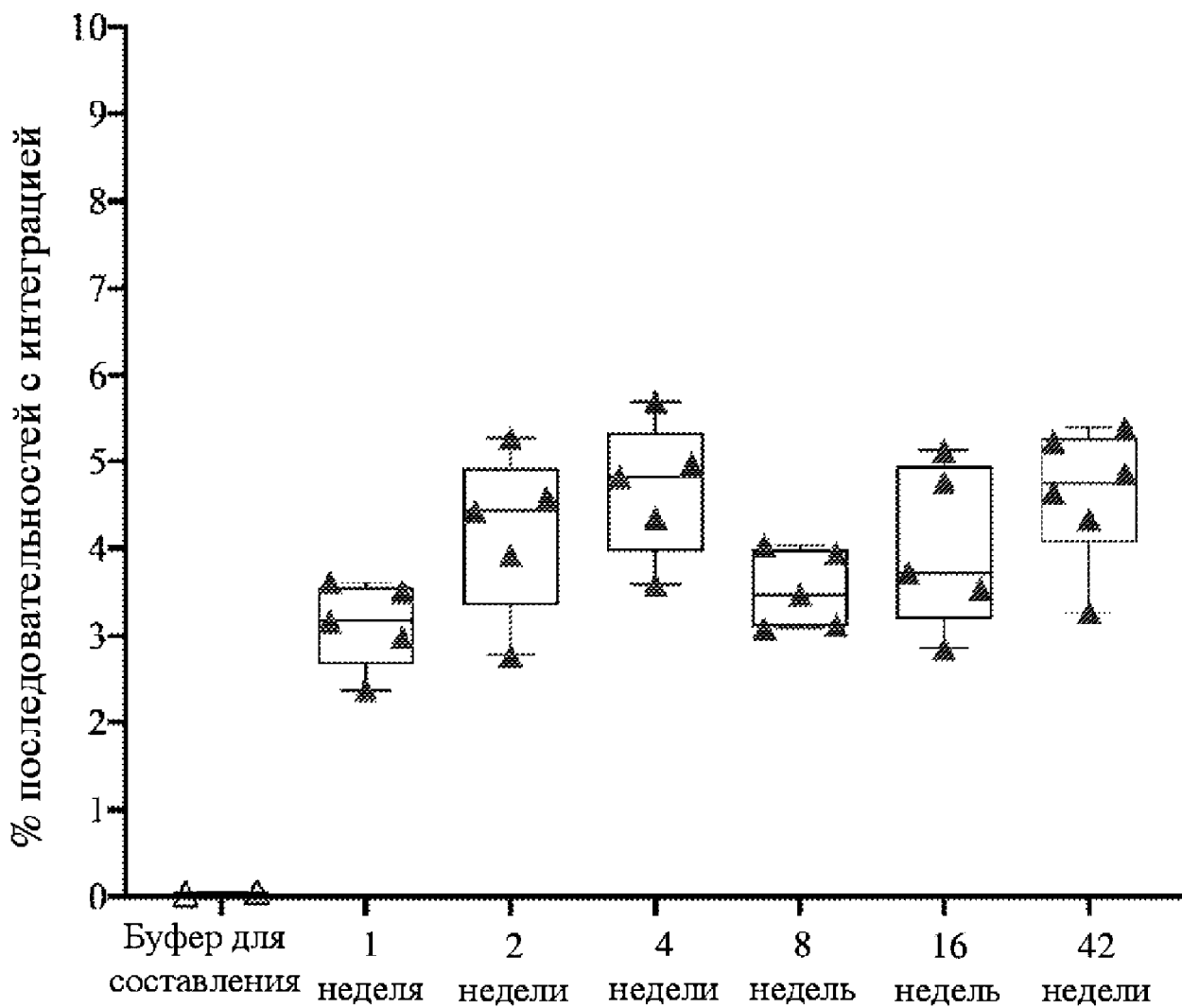
Фиг. 12А



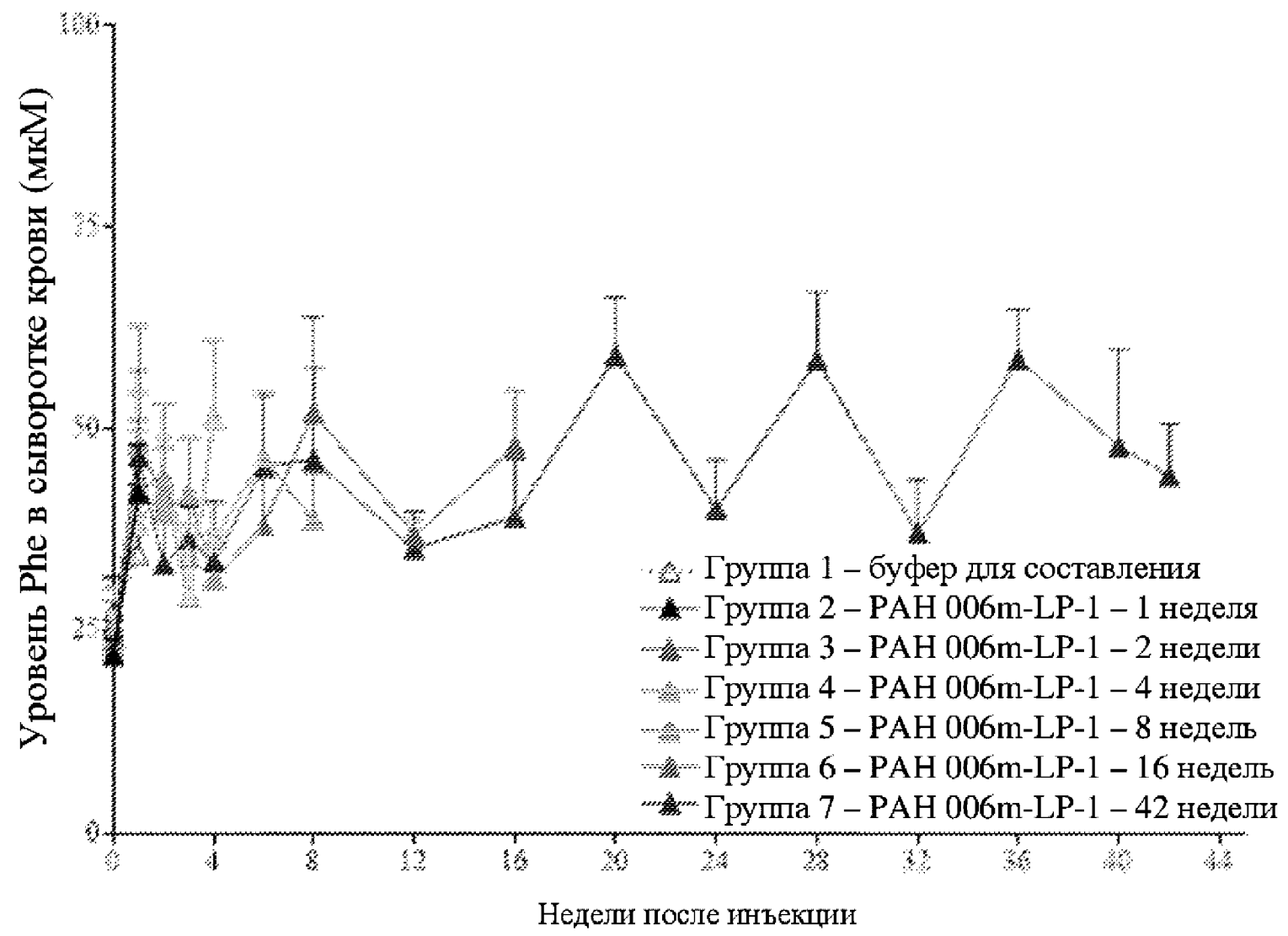
Фиг. 12В



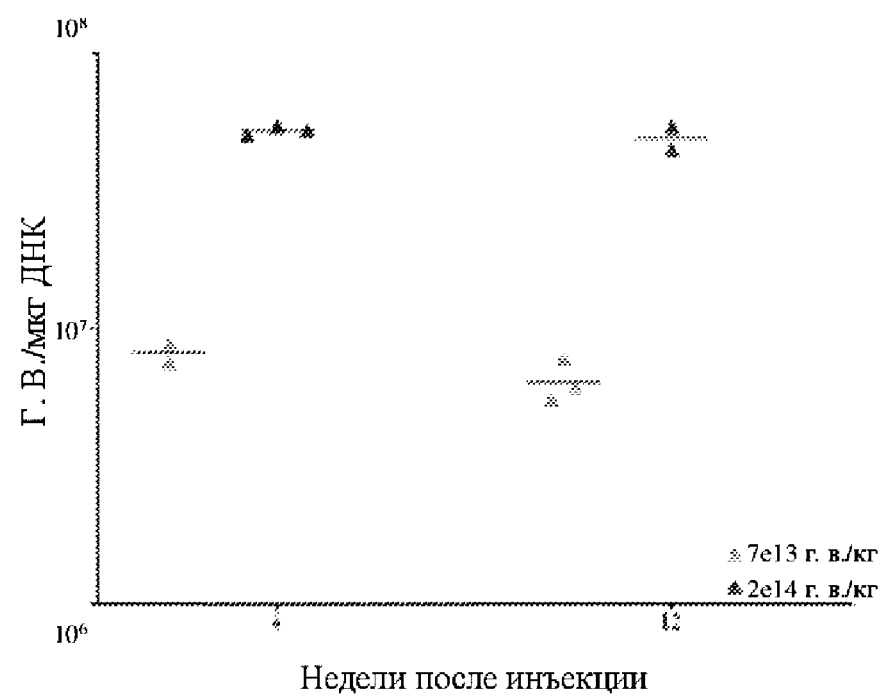
Фиг. 12С



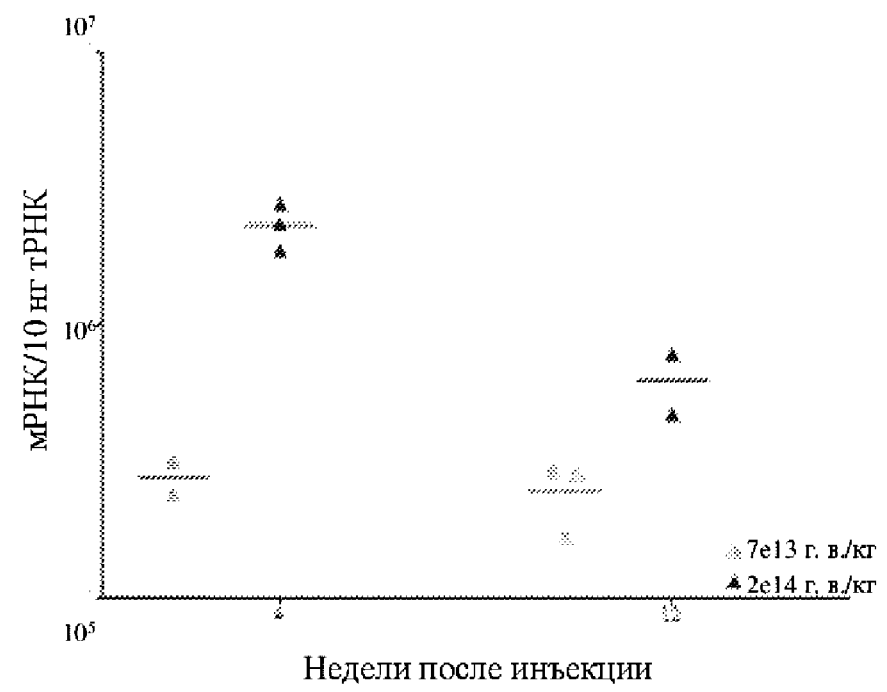
Фиг. 12Е



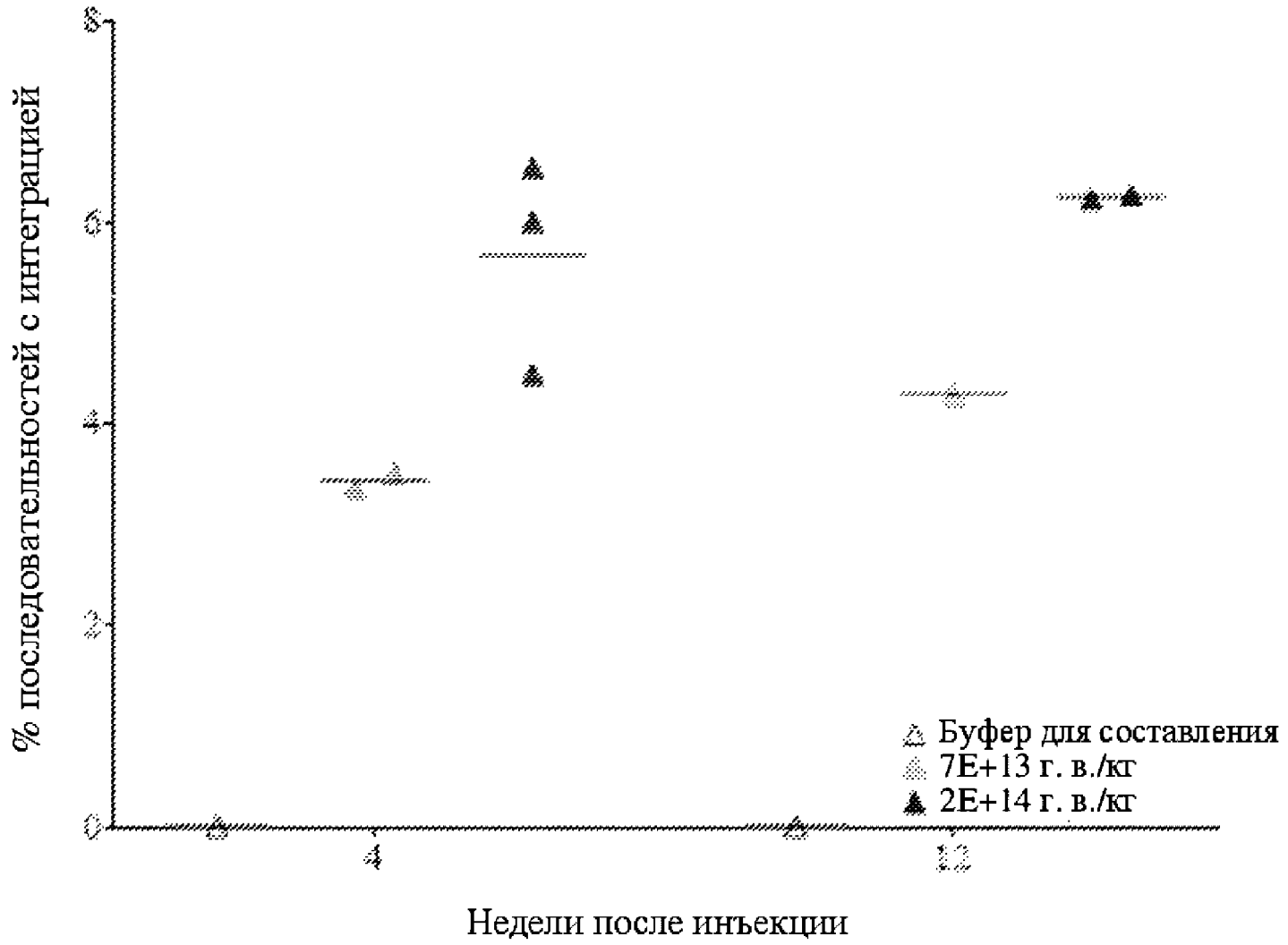
Фиг. 13А

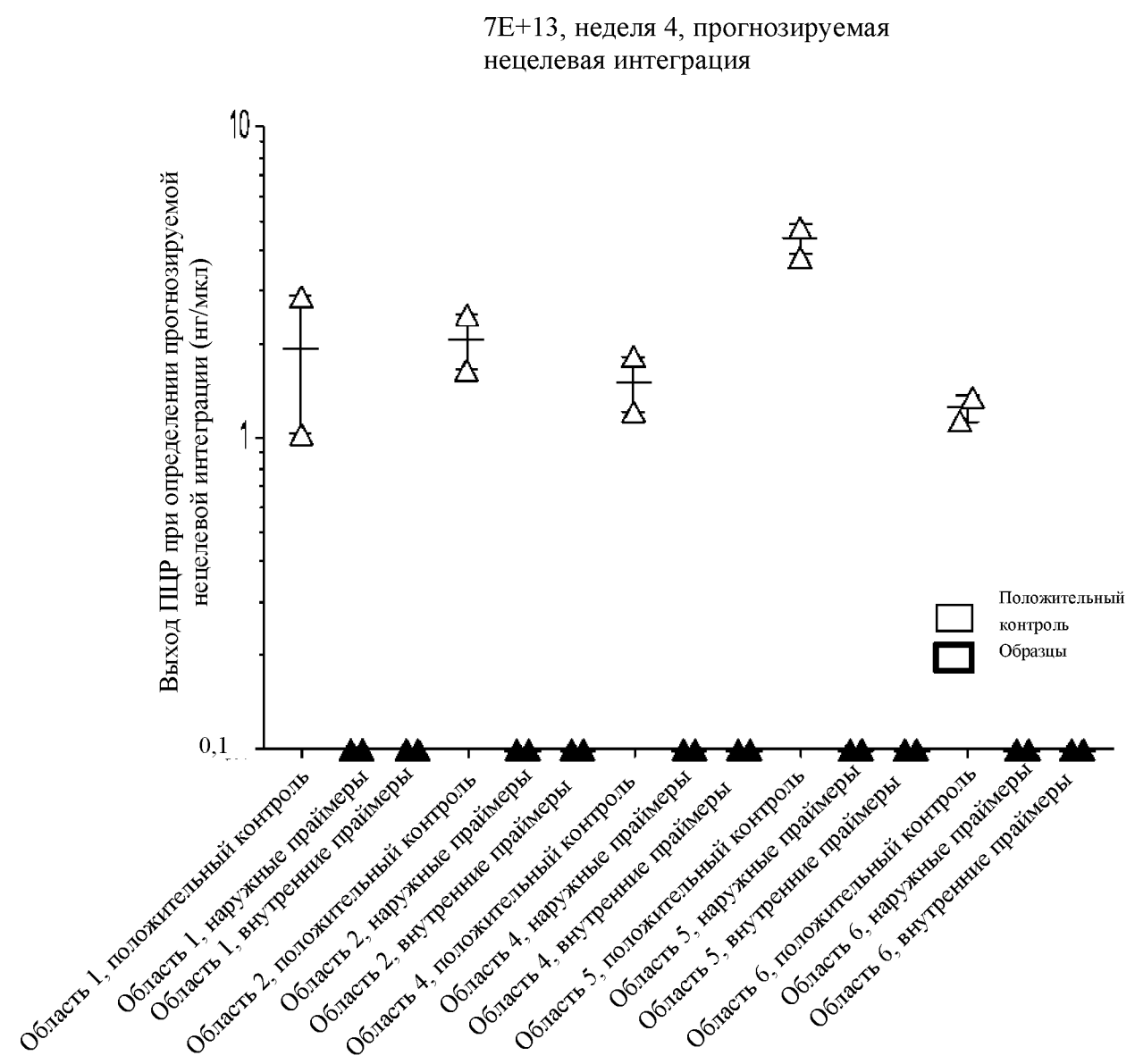


Фиг. 13В

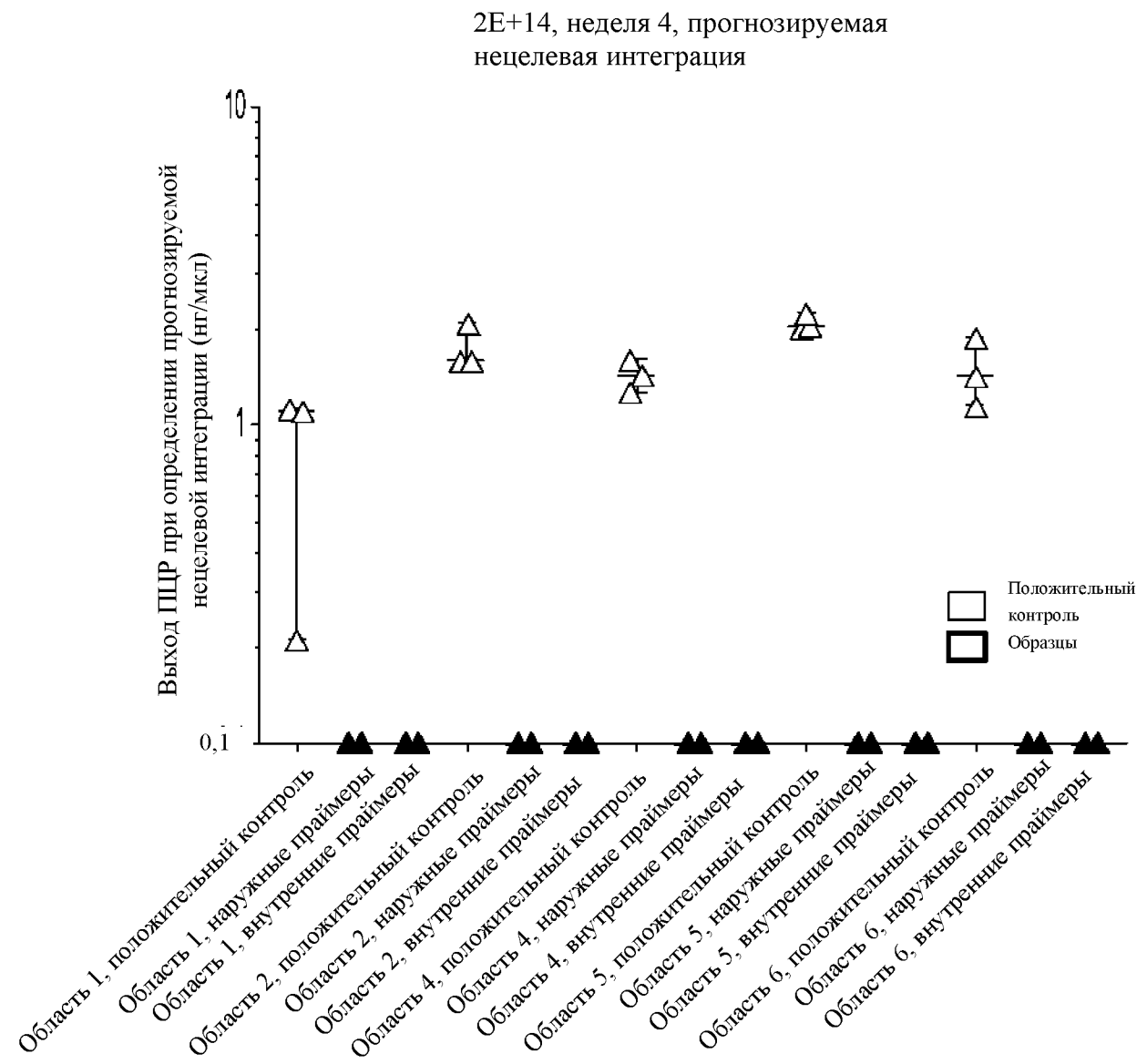


Фиг. 13С

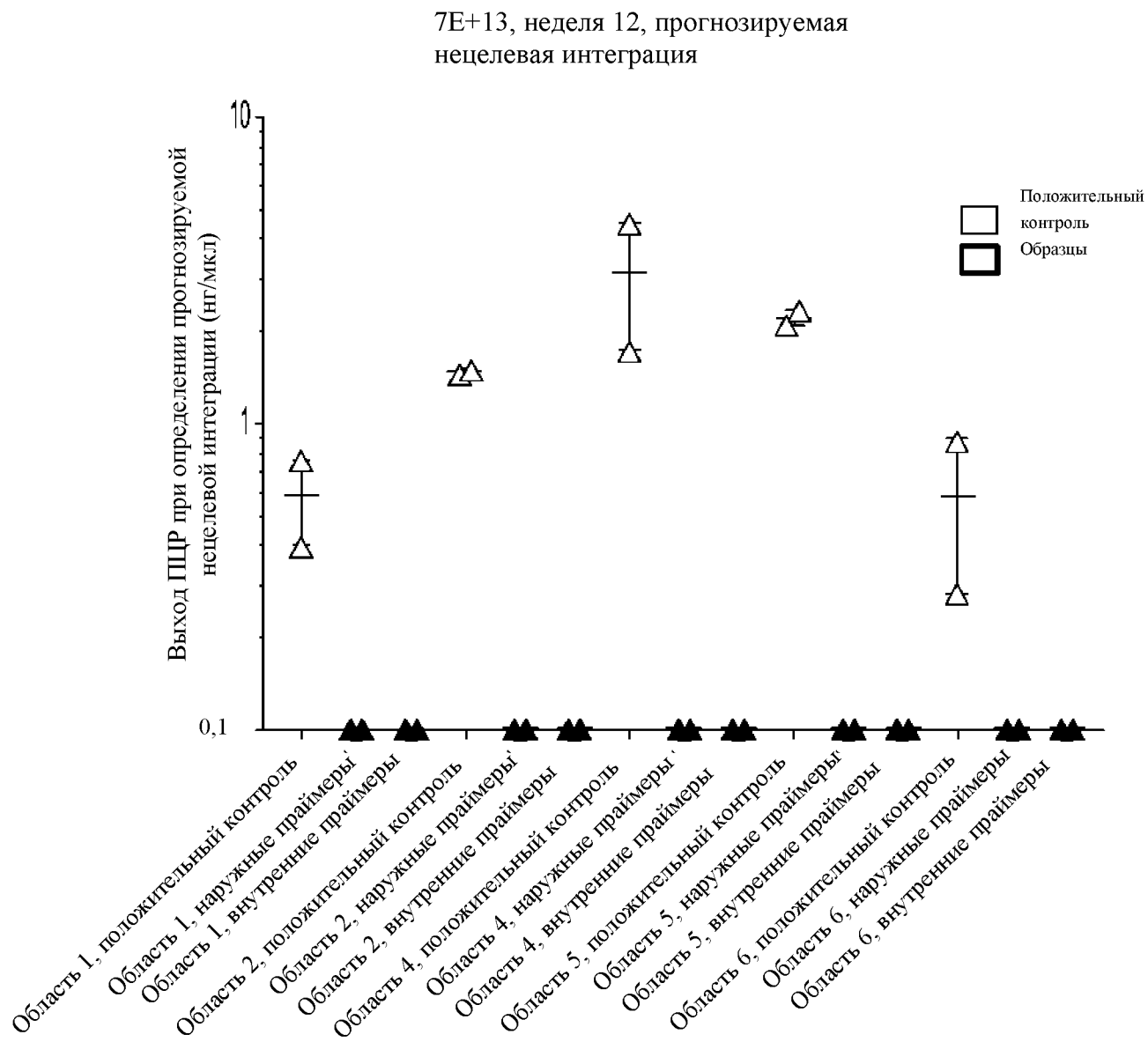




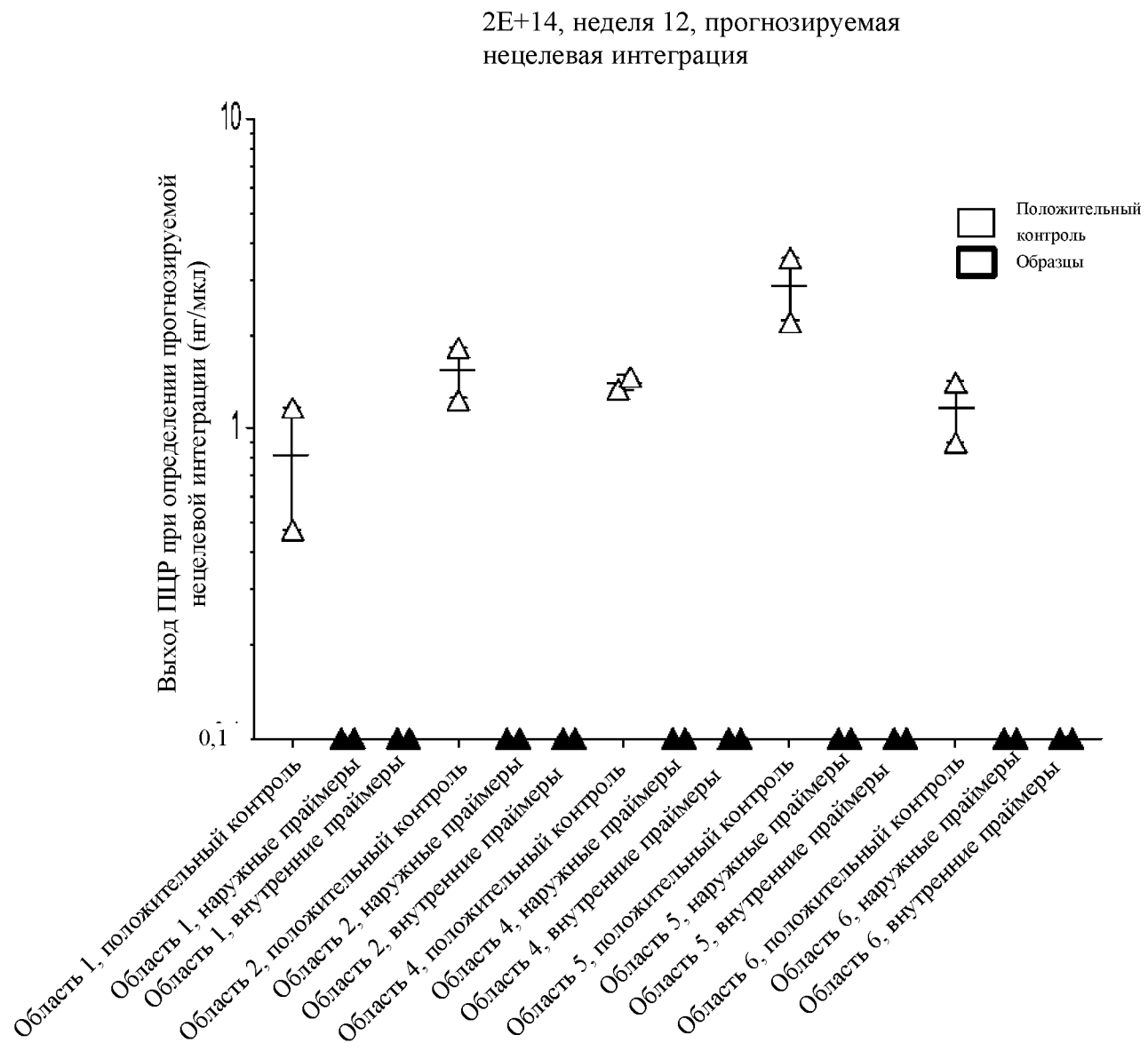
Фиг. 14А



Фиг. 14В



Фиг. 14С



Фиг. 14D