

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391071** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.09.21

(51) Int. Cl. **C07D 225/02** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.11

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ**

(31) **63/112,457**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.11.11**

Хеппеншталь Пауль Александр (DE)

(33) **US**

(74) Представитель:

(86) **PCT/EP2021/081424**

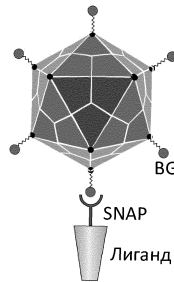
Нилова М.И. (RU)

(87) **WO 2022/101363 2022.05.19**

(71) Заявитель:

**ЕВРОПИАН МОЛЕКЮЛАР
БИОЛОДЖИ ЛАБОРАТОРИ (DE);
БОРЕА ТЕРАПЬЮТИКС С.Р.Л. (IT)**

(57) Настоящее изобретение относится к новым капсидам вируса с модифицированной поверхностью и рекомбинантным вирионам, содержащим их. Кроме того, настоящее изобретение относится к промежуточным соединениям для получения капсидов вирусов с модифицированной поверхностью. Указанные капсиды вирусов с модифицированной поверхностью разработаны для селективной и/или более эффективной доставки генотерапевтического средства. Капсиды вирусов с модифицированной поверхностью, когда они включены в рекомбинантный вирион, можно применять для лечения заболевания, которое характеризуется генетической аномалией.



A1

202391071

202391071

A1

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

1. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/112457, поданной 11 ноября 2020 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

2. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был подан через EFS-Web и тем самым полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 07 января 2022 г., называется P207315WO_SL.txt и имеет размер 6345 байт.

3. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к улучшенным капсидам вируса с модифицированной поверхностью для доставки генов и генной терапии. Предложены частицы аденоассоциированного вируса (AAV), которые содержат модифицированный белок капсида. Настоящее изобретение также относится, в некоторых вариантах реализации, к способам получения улучшенного капсида вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением путем удаления природных сайтов связывания в капсидах аденоассоциированного вируса (AAV) и введения лигандов в указанный капсид для получения AAV с повышенной эффективностью трансдукции и/или которые селективно трансдуцируют клетки-мишени.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к капсиду вируса с модифицированной поверхностью для применения при лечении заболевания и способы лечения заболевания, включающие введение капсидов вируса с модифицированной поверхностью нуждающемуся в этом субъекту. Еще один аспект настоящего изобретения относится к капсидам вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением для трансфекции клеток, например, в качестве инструмента доставки генов в фундаментальных исследованиях.

4. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Введение молекул, несущих генетическую информацию, в клетки является полезным инструментом в современной медицине и в фундаментальных

исследованиях. Предпочтительные способы включают применение носителей для доставки генов, полученных из вирусов, включая аденовирусы, ретровирусы, лентивирусы, вирусы коровьей оспы и аденоассоциированные вирусы. Среди них рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (AAV) стали предпочтительными вирусами для генной терапии *in vivo* вследствие отсутствия патогенности, неспособности к репликации и стабильной экспрессии. В настоящее время проводятся более 100 клинических испытаний с применением векторов на основе AAV, и два продукта генной терапии AAV недавно были одобрены FDA, а именно Воретиген непарвовек-рзил (Voretigene neparvovect-rzyl) (лукстурна (LUXTURNA)) для лечения наследственного заболевания сетчатки и онасемноген абепарвовек-ксиои (onasemnogene aberparvovect-xioi) (Золгенсма (ZOLGENSMA)) для лечения спинальной мышечной атрофии.

[0005] Аденоассоциированные вирусы являются представителями рода Dependovirus семейства Parvoviridae. Эти вирусы не имеют оболочки; вирусный геном содержится в икосаэдрическом белковом капсиде. Взаимодействие капсида белка с полисахаридами, белками и гликопротеинами поверхности клеток млекопитающих вызывает интернализацию вириона клеткой-мишенью млекопитающего. Различия в аминокислотной последовательности белкового капсида среди природных изолятов AAV приводят к различным паттернам связывания с белками поверхности клеток млекопитающих, а следовательно, и к различным паттернам инфекционности по отношению к клеткам, или тропизма.

[0006] Kern et al. (*J. Virology* 77 (20): 11072-11081, 2003) описали, что инфицирование клеток аденоассоциированным вирусом (AAV) 2 типа (AAV-2) опосредовано связыванием с гепарансульфатпротеогликаном, и с ним может конкурировать гепарин. Мутационный анализ белков капсида AAV-2 показал, что группа основных аминокислот (аргинины 484, 487, 585 и 588 и лизин 532) участвуют в связывании гепарина и клеток HeLa. Эти аминокислоты расположены в трех кластерах в области тройного шипа капсида AAV-2. У мышей распределение в тканях рекомбинантного AAV-2, мутированного по R484 и R585, свидетельствовало о заметном снижении инфицирования печени по сравнению с инфекцией рекомбинантным AAV дикого типа, но продолжавшемся инфицировании сердца. Исследователи предположили, что, хотя связывание гепарина влияет на инфекционность AAV-2, оно, по-видимому, не является

необходимым. Afione et al. (J. Virology 89(3):1660-1672, 2014) провели аналогичный анализ для идентификации остатков в капсиде, которые участвуют в связывании AAV5 с клетками млекопитающих.

[0007] Капсиды, используемые в современной генной терапии AAV, имеют ограниченную практическую ценность. Низкая эффективность трансдукции желательных тканей принуждает к введению высоких титров рекомбинантного вируса, что приводит к нецелевой трансдукции и токсичности, особенно токсичности для печени. Другим ограничением современных подходов является то, что многие современные капсиды AAV неэффективны в отношении трансдукции определенных типов клеток, к которым должен быть доставлен генетический груз для эффективной терапии.

[0008] Для разработки модифицированных капсидов, которые изменяют специфичность связывания с клетками рекомбинантного AAV, для применения в генной терапии используются различные подходы.

[0009] Один из подходов состоит в поиске новых природных изолятов у людей, отличных от человека приматов и других млекопитающих. См., например, WO 2018/160582; WO 2015/121501; WO 2020/223232. Эти подходы не дают уверенности в том, что будет обнаружен капсид, имеющий искомый тропизм.

[0010] Другой подход заключается в мутировании первичной аминокислотной последовательности белков капсида путем замен без вставки пептида. Как правило, конструируют библиотеки со случайными мутациями аминокислот, сконцентрированными в требуемой области поверхности капсида. Затем библиотеку подвергают скринингу *in vivo* и идентифицируют капсиды, способные трансдуцировать определенные ткани и клетки, путем выделения из определенных тканей. Сходный подход заключается в применении методов *in silico* для экстраполяции по капсидным последовательностям известных изолятов AAV для предсказания новых функциональных капсидов, у которых может быть измененный тропизм к типам тканей и клеток. Эти предсказанные капсиды затем синтезируют и проводят скрининг *in vivo* для выявления паттернов трансдукции тканей. См., например, US 9695220; US 10738087 и WO 2019/217911. Эти эмпирические подходы основаны на создании

библиотек высокой сложности и эмпирической оценке. Как следствие, выявление искомого тропизма полагается на счастливый случай.

[0011] Более целевой подход заключается в изменении аминокислотной последовательности белков капсида путем вставки пептида, который, как известно, связывается с определенным типом клеток, посредством вставки в одной рамке считывания области, кодирующей пептид, нацеленный на клетки, в ген капсида (САР). См., например, WO 2019/207132; WO 2021/077000; WO 2017/100671 и WO 2020/068990. Тем не менее у этого подхода есть ограничения: вставки должны быть расположены таким образом, чтобы они значительно не препятствовали сборке вириона в процессе производства рекомбинантного продукта, и должны быть расположены на вирусном капсиде таким образом, чтобы запускать продуктивное взаимодействие с мишенью на поверхности клетки млекопитающего и последующую интернализацию.

[0012] Кроме того, все эти подходы к инженерии капсидов создают совершенно новые белковые капсиды, которые не могут использоваться в генной терапии без обширного доклинического и клинического исследования.

[0013] Существует потребность в новых способах изменения тканевой специфичности капсидов AAV, которые не полагаются на случайное открытие и не снижают эффективность продукции или, при введении, не снижают эффективность трансдукции.

[0014] В WO 2020/225363 описаны способы модификации капсидов AAV интактных вирионов после их сборки с применением химической конъюгации лигандов с известной специфичностью нацеливания на клетки и описаны капсиды с модифицированной поверхностью, полученные этими способами. Существует потребность в расширении и оптимизации таких подходов к модификации после сборки.

5. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0015] Ввиду вышеуказанных ограничений сохраняется потребность в разработке новых вирусных платформ с более высокой эффективностью и специфичностью трансдукции соответствующих тканей-мишеней, которые улучшили бы трансдукцию

определенных представляющих интерес клеток и/или которые могут быть эффективными при доставке более низкого титра.

[0016] Одним из аспектов настоящего изобретения является химическая модификация капсида вируса, чтобы он позволял присоединение лиганда, и присоединение к указанному капсиду представляющего интерес лиганда. В нескольких вариантах реализации природные сайты связывания в капсиде AAV удаляют перед модификацией вируса, чтобы он позволял присоединение лиганда.

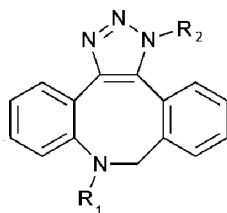
[0017] В одном аспекте настоящего изобретения предложен капсид вируса с модифицированной поверхностью, содержащий один или более из перечисленных: лиганд, ковалентно конъюгированный с белком капсида вируса посредством линкера, причем линкер содержит: сшитый фрагмент, причем сшитый фрагмент образуется в результате реакции между первым и вторым представителями способной образовывать сшивку пары; и один или более необязательных спейсеров.

[0018] В нескольких вариантах реализации первый и второй представители способной образовывать сшивку пары участвуют в реакции, выбранной из: реакции катализируемого Cu(I) циклоприсоединения азид-алкин (CuAAC), реакции стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-азид (SPAAC), реакции стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-нитрон (SPANC), реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEEDD) и лигирования по Штаудингеру и реакции [4+1] циклоприсоединения.

[0019] В нескольких вариантах реализации сшитый фрагмент содержит по меньшей мере одно из: восьмичленного кольца и триазольного кольца. В некоторых вариантах реализации сшитый фрагмент содержит как восьмичленное кольцо, так и триазольное кольцо, конденсированные с образованием бициклического фрагмента.

[0020] В нескольких вариантах реализации реакция представляет собой реакцию стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-азид (SPAAC). В некоторых из указанных вариантов реализации способная образовывать сшивку пара содержит циклооктин и азид. В некоторых вариантах реализации циклооктин выбран из дибензилциклооктина (DIBO), дибензоазациклооктина (DBCO) и биарилазациклооктинона (BARAC) или их производного. В некоторых вариантах реализации циклооктин представляет собой DBCO.

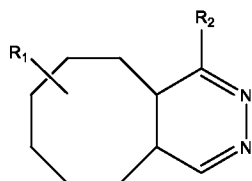
[0021] В нескольких вариантах реализации сшитый фрагмент содержит следующую структуру:



где R_1 и R_2 обозначают точки присоединения к линкеру.

[0022] В нескольких вариантах реализации указанная реакция представляет собой реакцию Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEEDD). В некоторых из указанных вариантов реализации способная образовывать сшивку пара содержит трансциклооктен и тетразин.

[0023] В нескольких вариантах реализации сшитый фрагмент содержит следующую структуру



где R_1 и R_2 обозначают точки присоединения к линкеру.

[0024] В нескольких вариантах реализации линкер содержит один или более спейсеров. В некоторых вариантах реализации один или более спейсеров представляют собой мономеры этиленгликоля, а общее количество мономеров этилена в линкере между вирусом и лигандом составляет в сумме менее 50 мономеров. В некоторых вариантах реализации общее число мономеров этилена в линкере между вирусом и лигандом составляет в сумме менее 25 мономеров. В альтернативных вариантах реализации один или более спейсеров содержат от 1 до 20 мономеров этиленгликоля. В некоторых вариантах реализации каждый из одного или более спейсеров содержит от 2 до 8 мономеров этиленгликоля. В некоторых вариантах реализации каждый из одного или более спейсеров содержит 4 мономера этиленгликоля. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения линкер содержит по меньшей мере два спейсера, каждый из которых содержит 4 мономера полиэтиленгликоля (PEG).

[0025] В нескольких вариантах реализации лиганд представляет собой лиганд, специфичный для типа клеток. В некоторых вариантах реализации лиганд выбран из цитокинов, факторов роста, лектинов, токсинов, одноцепочечных антител, пептидов и их комбинаций.

[0026] В нескольких вариантах реализации указанный линкер ковалентно присоединен к первичной аминогруппе первичной последовательности белка капсида. В некоторых вариантах реализации первичная аминогруппа выбрана из N-концевой аминогруппы, аминокислотного остатка лизина и аминокислотного остатка аргинина. В некоторых вариантах реализации первичная аминогруппа представляет собой боковую цепь аминокислотного остатка лизина.

[0027] В нескольких вариантах реализации линкер ковалентно присоединен к лиганду посредством первичной аминогруппы лиганда.

[0028] В нескольких вариантах реализации линкер ковалентно присоединен к лиганду посредством неприродного аминокислотного остатка первичной последовательности лиганда. В некоторых вариантах реализации указанный неприродный аминокислотный остаток содержит представителя способной образовывать сшивку пары, который участвует в реакции, выбранной из: реакции катализируемого Cu(I) циклоприсоединения азид-алкин (CuAAC), реакции стимулированного напряжением циклоприсоединения алкин-азид (SPAAC), реакции стимулированного напряжением циклоприсоединения алкин-нитрон (SPANC), реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEEDD), лигирования по Штаудингеру и реакции [4+1] циклоприсоединения. В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит фрагмент азид, циклооктин, циклооктен или 1,2,4,5-тетразин.

[0029] В альтернативных вариантах реализации линкер является частью слитого белка лиганда и линкера.

[0030] В нескольких вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью содержит один или более нативных сайтов связывания полисахарида. В нескольких вариантах реализации капсид вируса не был модифицирован для удаления нативного сайта связывания полисахарида. В некоторых вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью характеризуется повышенной

инфекционностью по сравнению с немодифицированным капсидом вируса того же серотипа.

[0031] В нескольких вариантах реализации капсид вируса был модифицирован для удаления одного или более нативных сайтов связывания полисахарида. В некоторых вариантах реализации удаление осуществляют путем мутации аминокислот, которые, как известно, опосредуют связывание гепаринсульфата. В некоторых вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью характеризуется измененным тропизмом по сравнению с немодифицированным капсидом вируса. В некоторых вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью характеризуется улучшенной эффективностью трансдукции по сравнению с немодифицированным капсидом вируса.

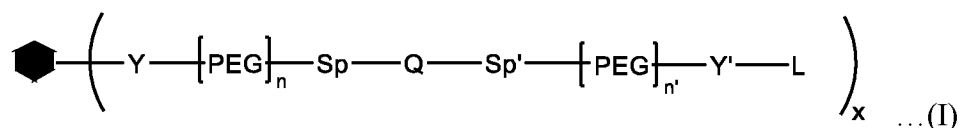
[0032] В нескольких вариантах реализации капсид вируса выбран из капсида аденовируса, капсида аденоассоциированного вируса, капсида ретровируса, капсида лентивируса, капсида вируса простого герпеса и капсида бакуловируса.

[0033] В нескольких вариантах реализации капсид вируса представляет собой капсид аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один из остатков аргинина в положениях 585 и 588 VP1 или в аналогичных положениях в VP2 или VP3 были мутированы. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения остатки аргинина в положениях 585 и 588 VP1 были мутированы на остатки аланина.

[0034] В нескольких вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью дополнительно содержит дисперсные олигомеры PEG или полимеры PEG, соединенные с поверхностью капсида. В нескольких вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью демонстрирует уклонение от изначально присутствующих нейтрализующих антител, более низкую иммуногенность и невидимость для иммунной системы.

[0035] В одном аспекте настоящего изобретения предложен капсид вируса с модифицированной поверхностью, содержащий белок капсида вируса, связанный с

лигандом Формулы I:



где:



представляет собой капсид вируса;

Y и Y' независимо представляют собой присоединяющий фрагмент;

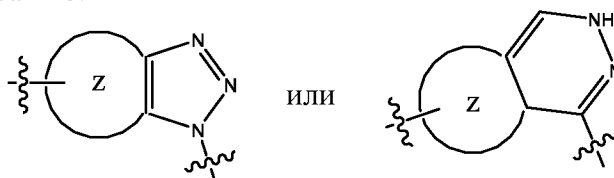
n и n' независимо представляют собой 0 или целое число от 1 до 50,

Sp и Sp' независимо представляют собой необязательный спейсер;

L представляет собой лиганд;

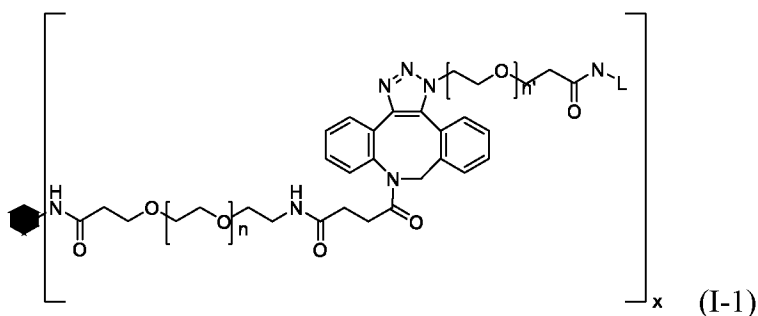
x представляет собой соотношение между лигандом и капсидом вируса и находится в диапазоне от 50 до 250; и

Q выбран из:



где Z представляет собой 7- или 8-членную циклическую или гетероциклическую структуру. В некоторых вариантах реализации x находится в диапазоне от 80 до 120.

[0036] В одном аспекте настоящего изобретения предложен капсид вируса с модифицированной поверхностью, содержащий белок капсида вируса, связанный с лигандом Формулы I-1:



где:



представляет собой капсид вируса;

n и n' независимо представляют собой целое число от 0 до 30;

L представляет собой лиганд; и

x представляет собой целое число от 1 до 300.

[0037] В одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция, содержащая капсид вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим

изобретением, причем среднее соотношение лиганда к капсиду вируса составляет от 50 до 250.

[0038] В одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая вирион, причем вирион содержит капсид вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

[0039] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, имеющего генетическую аномалию, причем указанный способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей вирион, причем вирион содержит капсид вируса с модифицированной поверхностью, предложенный в настоящем документе, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

[0040] В одном аспекте настоящего изобретения предложен капсид вируса с функционализированной поверхностью, содержащий представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров, причем указанный капсид вируса с функционализированной поверхностью пригоден для реакции с функционализированным лигандом, причем указанный лиганд содержит представителя указанной способной образовывать сшивку пары, при этом представители способной образовывать сшивку пары участвуют в реакции, выбранной из: реакции катализируемого Cu(I) циклоприсоединения азид-алкин (CuAAC), реакции стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-азид (SPAAC), реакции стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-нитрон (SPANC), реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEEDD) и лигирования по Штаудингеру и реакции [4+1] циклоприсоединения.

[0041] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения капсида вируса с модифицированной поверхностью, описанного в настоящем документе, включающий этапы:

- i) получения капсида вируса с функционализированной поверхностью путем осуществления реакции белка капсида вируса с линкером, способным вступать в реакцию с капсидом, содержащим первого представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров;

ii) конъюгирования капсида вируса с функционализированной поверхностью с функционализированным лигандом, содержащим второго представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров,

при этом первый и второй представители способной образовывать сшивку пары реагируют с образованием сшитого фрагмента Q; и

iii) получения капсида вируса с модифицированной поверхностью.

[0042] Предпочтительные признаки каждого аспекта настоящего изобретения являются такими же, как для каждого из других аспектов *mutatis mutandis*.

Цитируемые документы, упомянутые в настоящей заявке, включены в максимально возможной степени, разрешенной законом. Хотя настоящее изобретение и его преимущества были подробно описаны, следует понимать, что могут быть сделаны различные изменения, замены и дополнения без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, определенных в прилагаемой формуле изобретения.

6. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0043] Лучшего понимания признаков, аспектов и преимуществ настоящего изобретения можно добиться, принимая во внимание следующее подробное описание, в котором описаны типичные варианты реализации, в которых используются принципы настоящего изобретения, и сопроводительные чертежи, на которых:

[0044] На **Фиг. 1** показано схематическое изображение модификации поверхности капсида вируса, функционализированного группами BG, которые реагируют с мечеными SNAP слитыми лигандами с образованием вируса с модифицированной поверхностью, имеющего улучшенные тропизм и/или эффективность трансдукции генетического груза.

[0045] На **Фиг. 2** показано, что капсид вируса Δ HSPG в соответствии с настоящим изобретением не обладает остаточной инфекционной активностью (темная картинка); конструкцию с удаленным сайтом связывания гепарина протестировали на сенсорных нейронах в модели на мышцах с флуоресцентным репортером. На вставке показано изображение клеток, полученное с помощью фазово-контрастной микроскопии.

[0046] На **Фиг. 3** показано, что поверхность капсида, модифицированная слитым лигандом - агглютинином проростков пшеницы (WGA), - полностью вернула эффективность вирусной трансдукции на уровень 100% (флуоресцентные клетки) при тестировании на сенсорных нейронах в модели на мышах с флуоресцентным репортером, аналогичной той, которая использовалась для **Фиг. 2**.

[0047] На **Фиг. 4a - 4c** показано, что нейротрофические факторы NGF (**Фиг. 4a**), NT3 (**Фиг. 4b**) и BDNF (**Фиг. 4c**) доставляют вирус в различные популяции нейронов, когда они конъюгированы с поверхностью капсида. На вставке показано изображение клеток, полученное с помощью фазово-контрастной микроскопии. Конструкции были протестированы на сенсорных нейронах в модели на мышах с флуоресцентным репортером по аналогии с **Фиг. 2**.

[0048] На **Фиг. 5** показано, что капсид, поверхность которого модифицирована субъединицей В холерного токсина, ретроградно транспортировал вирус к телам нервных клеток при его инъекции в кожу. На вставке показано микроскопическое изображение клеток. Конструкция была протестирована на сенсорных нейронах в модели на мышах с флуоресцентным репортером по аналогии с **Фиг. 2**.

[0049] На **Фиг. 6a - 6c** показана ткань сенсорного нейрона в ганглиях тройничного нерва через три недели после инъекции вируса с лигандом NGF IV в соответствии с настоящим изобретением (**Фиг. 6a**), окрашенная антителом против TrkA (рецептора для NGF, **Фиг. 6b**). Можно увидеть перекрывание сигналов по меньшей мере на 80% (**Фиг. 6c**).

[0050] На **Фиг. 7** показано окрашивание срезов с **Фиг. 6a** антителами против NF200 и IB4, которые преимущественно метят другие нейроны (механорецепторы (зеленый/серый) и непептидергические ноцицепторы, соответственно (синий/темно-серый)). Красные (светло-серые) инфицированные клетки преимущественно отличаются от зеленых и синих клеток.

[0051] На **Фиг. 8a - 8b** показано, что более эффективна доставка генов вирусами с лигандом. На **Фиг. 8a** показан обычный вариант AAV9 RHP.S; на **Фиг. 8b** показан вариант RHP.S с **Фиг. 8a**, дополнительно модифицированный с помощью WGA. Модифицированная WGA конструкция привела к значительному увеличению доставки.

[0052] На **Фиг. 9а - 9f** показана трансдукция нейронов DRG NGF^{R121W}-SNAP::AAV2-ΔHSPG при различных соотношениях модификации. На вставке показано изображение, полученное с помощью фазово-контрастной микроскопии.

[0053] На **Фиг. 10а - 10с** показана трансдукция нейронов DRG частицами нейротрофин-AAV2-ΔHSPG. На **Фиг. 10а - 10с** показано, что связанные с NGF^{R121W}, BDNF и NT3 (соответственно) AAV2-ΔHSPG нацеливаются на морфологически различные подтипы клеток.

[0054] На **Фиг. 11а - 11f** показано влияние длины линкера на эффективность трансдукции NGF^{R121W}-SNAP::AAV2-ΔHSPG в различных сенсорных ганглиях. 3E+10 геномов вируса (гв) вводили ретроорбитально. На **Фиг. 11а - 11с** показаны результаты для более короткого линкера BG-GLA, на **Фиг. 11d - 11f** показаны результаты для более длинного линкера BG-PEG13.

[0055] На **Фиг. 12а - 12d** показано влияние пути введения инъекции на эффективность трансдукции DRG. Гистологический анализ эффективности трансдукции DRG для различных путей введения инъекции. Местная инъекция в кожу (**Фиг. 12а**) или нерв (**Фиг. 12b**). Системная инъекция интраперитонеально (и/п) (**Фиг. 12с**) или внутривенно (в/в) (**Фиг. 12d**).

[0056] На **Фиг. 13а - 13d** подтверждена селективность NGF^{R121W}-SNAP::AAV2-ΔHSPG по отношению к TrkA⁺ клеткам в DRG. Гистологический анализ селективности трансдукции DRG после ретроорбитальной инъекции 3E+10 гв частиц: На **Фиг. 13а** показан флуоресцентный сигнал tdTomato от NGF^{R121W}-SNAP::AAV2-ΔHSPG (красный); на **Фиг. 13b** зеленым цветом показаны TrkA⁺ клетки, идентифицированные с применением антитела против TrkA (зеленый); **Фиг. 13с** представляет собой наложение изображений (оранжевый). На **Фиг. 13d** подсчитано количество инфицированных клеток, которые являются TrkA-положительными клетками, и количество TrkA-положительных клеток, которые инфицированы.

[0057] На **Фиг. 14а - 14с** показана инфекция IL31^{K134A}-AAV2-ΔHSPG *in vivo* кератиноцитов мыши дикого типа. Гистологический анализ селективности трансдукции в коже мышей дикого типа после подкожной инъекции 3E+10 гв частиц. На **Фиг. 14А** показан флуоресцентный сигнал tdTomato от IL31^{K134A}SNAP::AAV2-ΔHSPG (красный). На **Фиг. 14В** показаны кератиноциты, идентифицированные с

применением антитела против К14 (зеленый). На **Фиг. 14С** показано наложение изображений (оранжевый).

[0058] На **Фиг. 15а - 15с** показано, что IL31^{K134A}-AAV2-ΔHSPG не инфицирует кератиноциты в отсутствие рецептора IL31RA. Гистологический анализ селективности трансдукции кожи IL31RA-/- мышей после подкожной инъекции 3E+10 гв частиц. На **Фиг. 15а** показано отсутствие флуоресцентного сигнала от IL31^{K134A}::AAV2-ΔHSPG. На **Фиг. 15b** показаны кератиноциты, идентифицированные с применением антитела против К14 (зеленый). На **Фиг. 15с** показано наложение изображений (оранжевый).

[0059] На **Фиг. 16а - 16с** показана трансдукция СТВ-ΔHSPG-AAV *in vitro* и *in vivo*.

[0060] На **Фиг. 17а - 17b** показана трансдукция WGA-ΔHSPG-AAV *in vitro*.

[0061] На **Фиг. 18а - 18с** показана в/в инъекция WGA::AAV2-ΔHSPG новорожденным мышам. 1E+9 гв WGA::AAV2-ΔHSPG вводили в/в новорожденным мышам. Наблюдалась устойчивая флуоресценция tdTomato в нейронах кожи (**Фиг. 18а**), DRG (**Фиг. 18b**) и спинного мозга (**Фиг. 18с**).

[0062] На **Фиг. 19а - 19с** показан ретроградный транспорт WGA::AAV2-ΔHSPG в головном мозге мыши. 6E+8 гв WGA::AAV2-ΔHSPG вводили путем инъекции в префронтальную кору взрослых мышей. Наблюдалась устойчивая флуоресценция tdTomato в месте инъекции (**Фиг. 19а**) и в таламусе (**Фиг. 19b - 19с**), что указывает на ретроградный транспорт от нервных окончаний к телам клеток.

[0063] На **Фиг. 20а - 20f** показано повышение эффективности трансдукции PHP.S DRG с применением WGA-ΔHSPG-AAV при различных соотношениях вирус:лиганд.

[0064] На **Фиг. 21** показано добавление IB4::AAV2-ΔHSPG в культуру нейронов DRG. 1E+9 гв IB4::AAV2-ΔHSPG добавляли в культуру нейронов DRG. Устойчивая флуоресценция tdTomato наблюдалась в большинстве нейронов небольшого размера.

[0065] На **Фиг. 22а - 22d** показана инъекция *in vivo* IB4::AAV2-ΔHSPG взрослой мыши. Инъекция IB4::AAV2-ΔHSPG путем подкожной, интраневральной и интраспинальной инъекции. (**Фиг. 22а**) Мечение сосудистой сети IB4::AAV2-ΔHSPG после подкожной инъекции. (**Фиг. 22b**) Тотальный препарат DRG из мыши, которой вводили IB4::AAV2-ΔHSPG путем инъекции в седалищный нерв. (**Фиг. 22с**) Срез

спинного мозга мыши, которой вводили IB4::AAV2-ΔHSPG путем инъекции в левый седалищный нерв и окрашивали IB4-488. Перекрытие сигналов на ипсилатеральной стороне. (Фиг. 22d) Меченая микроглия из мыши, которой вводили IB4::AAV2-ΔHSPG путем инъекции в спинной мозг.

[0066] На Фиг. 23 показан график эффективности трансдукции возрастающими концентрациями AAV2 дикого типа (соответствующие изображения на Фиг. 24a - 24f) и IB4-AAV2 (соответствующие изображения на Фиг. 24g - 24l), добавленными к клеткам PC12.

[0067] На Фиг. 24a - 24l показана флуоресценция GFP клеток PC12, обработанных каждой концентрацией AAV2 дикого типа (Фиг. 24a - 24f) и IB4-AAV2 (Фиг. 24g - 24l).

[0068] На Фиг. 25 показан график эффективности трансдукции возрастающими концентрациями AAV9 дикого типа (соответствующие изображения на Фиг. 26a - 26f) и IB4-AAV9 (соответствующие изображения на Фиг. 26g - 26l), добавленными к клеткам PC12.

[0069] На Фиг. 26a - 26l показана флуоресценция GFP клеток PC12, обработанных каждой концентрацией AAV9 дикого типа (Фиг. 26a - 26f) или IB4-AAV9 (Фиг. 26g - 26l).

[0070] На Фиг. 27a - 27d показаны типичные изображения флуоресценции GFP для IB4, конъюгированного с ΔHSPG-AAV2 при возрастающих молярных соотношениях без спейсера, и добавленного к клеткам PC12.

[0071] На Фиг. 28a - 28d показаны типичные изображения для конструкций IB4:ΔHSPG-AAV2, полученных при возрастающих количествах реакционноспособного линкера с коротким спейсером PEG n = 3 и добавленных к клеткам PC12.

[0072] На Фиг. 29a - 29d показаны типичные изображения конструкций IB4:ΔHSPG-AAV2, полученных при возрастающих количествах линкера, способного вступать в реакцию с капсидом, со средним спейсером PEG n = 8 и добавленных к клеткам PC12.

[0073] На **Фиг. 30a - 30d** показаны типичные изображения конструкций IB4:ΔHSPG-AAV2, полученных при возрастающих количествах линкера, способного вступать в реакцию с капсидом, с длинным спейсером PEG = 16 и добавленных к клеткам PC12.

[0074] На **Фиг. 31** показан количественный анализ средней интенсивности флуоресценции GFP в каждой клетке при возрастающих молярных соотношениях лиганда к вирусу с различными длинами линкеров (n = 3, среднее +/- CO).

[0075] На **Фиг. 32a - 32s** показаны изображения флуоресценции GFP, соответствующие эффективности трансдукции клеток PC12 вирусной конструкцией WGA:AAV2ΔHSPG, содержащей линкер с различной длиной спейсера, то есть (n) PEGn (единицы этиленгликоля) со стороны вируса (V) и стороны лиганда WGA (L), причем вирус функционализирован различными молярными количествами линкера.

[0076] На **Фиг. 33** показана диаграмма средней интенсивности флуоресценции GFP клеток PC12, трансдуцированных вирусом AAV2ΔHSPG, модифицированным WGA, содержащим различные спейсеры линкера. Нанесенные на график данные соответствуют средней эффективности трансдукции.

[0077] На **Фиг. 34** показана диаграмма эффективности трансдукции отдельных клеток PC12, обработанных конструкциями вируса AAV2ΔHSPG, поверхность которых модифицирована WGA, содержащим различные спейсеры линкера, по сравнению с немодифицированным вирусом (красная пунктирная линия).

[0078] На **Фиг. 35** показана средняя эффективность трансдукции клеток PC12, обработанных конструкциями вируса AAV2ΔHSPG, поверхность которых модифицирована WGA, содержащим различные спейсеры линкера, по сравнению с немодифицированным вирусом.

[0079] На **Фиг. 36** показан количественный анализ экспрессии, показывающий только комбинации дискретных и дисперсных PEG с худшей эффективностью.

[0080] На **Фиг. 37a - 37d** показаны изображения флуоресценции tdTomato в клетках PC12, обработанных конструкциями AAV2ΔHSPG-WGA, полученными с применением лигирования транс-циклооктена (ТСО)/тетразина, при этом вирус функционализирован различными молярными количествами линкера. На **Фиг. 37e** показан

немодифицированный вирус; на **Фиг. 37f** показаны изображения флуоресценции tdTomato в клетках PC12, обработанных AAV2ΔHSPG-WGA, полученным с применением способных образовывать сшивку пар DBCO/азид при соотношении вирус:линкер $3E+9$ гв: 1,73 нмоль.

[0081] На **Фиг. 38 и 39** показан количественный анализ изображений флуоресценции tdTomato с получением средней эффективности трансдукции и эффективности трансдукции отдельных клеток, соответственно, для клеток PC12, обработанных конструкциями AAV2ΔHSPG-WGA, полученными с применением лигирования TCO/тетразина при различных соотношениях вируса к линкеру, по сравнению с таковыми, полученными для AAV2ΔHSPG-WGA, полученного с применением DBCO/азида при соотношении вирус:линкер $3E+9$ гв: 1,73 нмоль.

[0082] На **Фиг. 40a - 40d** представлены изображения флуоресценции tdTomato в клетках PC12, обработанных конструкциями AAV2ΔHSPG-WGA, полученными с применением лигирования фосфина-NHS/азида при различных соотношениях вируса к линкеру. На **Фиг. 40e** показан немодифицированный вирус; на **Фиг. 40f** показаны изображения флуоресценции tdTomato в клетках PC12, обработанных AAV2ΔHSPG-WGA, полученным с применением способных образовывать сшивку пар DBCO/азид при соотношении вирус:линкер $3E+9$ гв:1,73 нмоль.

[0083] На **Фиг. 41 и 42** показан количественный анализ изображений флуоресценции tdTomato с получением средней эффективности трансдукции и эффективности трансдукции отдельных клеток, соответственно, для клеток PC12, обработанных конструкциями AAV2ΔHSPG-WGA, полученными с применением лигирования фосфин-NHS/азид при различных соотношениях вируса к линкеру, по сравнению с таковыми, полученными для AAV2ΔHSPG-WGA, полученного с применением способных образовывать сшивку пар DBCO/азид при соотношении вирус:линкер $3E+9$ гв:1,73 нмоль.

[0084] На **Фиг. 43** проиллюстрировано количество молекул PEG4-DBCO на AAV9 и количество молекул WGA-PEG4-азид на AAV9 при оптимальной эффективности трансдукции.

[0085] На **Фиг. 44** показано количество лигандов на частицу AAV для конструкции AAV9-PEG4-DBCO::WGA-SNAP-TMR-PEG4-азид и для контрольного AAV9,

инкубированного только с WGA-SNAP-TMR-PEG4-азид без предварительной функционализации линкером DBCO-PEG4-NHS.

[0086] На **Фиг. 45a - 45e** проиллюстрирована флуоресценция GFP или RFP в клетках PC12, обработанных немодифицированным AAV3 дикого типа (**Фиг. 45a**) и WGA-AAV3 (**Фиг. 45b - 45e**), которые были получены при различных соотношениях вирус:линкер.

[0087] На **Фиг. 46** и **47** показан количественный анализ флуоресцентных изображений с получением средней эффективности трансдукции и эффективности трансдукции отдельных клеток, соответственно, в клетках PC12, обработанных полученными конструкциями AAV3ΔHSPG-WGA.

[0088] На **Фиг. 48a - 48e** проиллюстрирована флуоресценция GFP или RFP в клетках PC12, обработанных немодифицированным AAV5 дикого типа (**Фиг. 48a**) и WGA-AAV3 (**Фиг. 48b - 48e**), которые были получены при различных соотношениях вирус:линкер.

[0089] На **Фиг. 49** и **50** показан количественный анализ флуоресцентных изображений с получением средней эффективности трансдукции и эффективности трансдукции отдельных клеток, соответственно, в клетках PC12, обработанных конструкциями AAV6ΔHSPG-WGA, полученными как для **Фиг. 48**.

[0090] На **Фиг. 51a - e** проиллюстрирована флуоресценция GFP или RFP в клетках PC12, обработанных немодифицированным AAV6 дикого типа (**Фиг. 51a**) и WGA-AAV6 (**Фиг. 51b - 51e**), которые были получены при различных соотношениях вирус:линкер.

[0091] На **Фиг. 52** и **53** показан количественный анализ изображений флуоресценции tdTomato с получением средней эффективности трансдукции и эффективности трансдукции отдельных клеток, соответственно, в клетках PC12, обработанных конструкциями WGA-AAV6, полученными как для **Фиг. 51**.

[0092] На **Фиг. 54a - 54e** проиллюстрирована флуоресценция GFP или RFP в клетках PC12, обработанных немодифицированным AAV8 дикого типа (**Фиг. 54a**) и WGA-

AAV8 (**Фиг. 54b - 54e**), которые были получены при различных соотношениях вирус:линкер.

[0093] На **Фиг. 55** и **56** показан количественный анализ флуоресцентных изображений с получением средней эффективности трансдукции и эффективности трансдукции отдельных клеток, соответственно, в клетках PC12, обработанных конструкциями WGA-AAV8, полученными как для **Фиг. 54**.

[0094] **Фиг. 57** проиллюстрирована трансдукция AAV2 клеток HEK293, проанализированная с помощью FACS (нетрансдуцированные клетки - серый, а трансдуцированные клетки - черный).

[0095] На **Фиг. 58a** проиллюстрирована трансдукция AAV2 клеток HEK293, проанализированная с помощью микроскопии. На **Фиг. 58b** проиллюстрирована трансдукция клеток HEK293 AAV2 после делеции гена AAVR.

[0096] На **Фиг. 59a - 59b** представлены типичные изображения трансдукции клеток AAVR-KO HEK293 вектором AAV2 WT (**Фиг. 59a**) и (**Фиг. 59b**) WGA-AAV2.

[0097] На **Фиг. 60a - 60b** представлена средняя интенсивность флуоресценции (MFI) и % tdTomato-положительных клеток, соответственно, данные характеризуют трансдукцию клеток AAVR-KO HEK293 вектором AAV2 WT и WGA-AAV2.

[0098] На **Фиг. 61** представлена синтезированная последовательность аминокислот немолизумаба SNAP, содержащая сигнальную последовательность GP64 против хода транскрипции и метку Sortag, метку SNAP и метку 6xHis по ходу транскрипции (SEQ ID NO: 4). Сигнальная последовательность GP64 показана курсивом, немолизумаб выделен жирным шрифтом, метка Sortag подчеркнута, метка Snap выделена серым шрифтом, 6xHIS выделена серым жирным шрифтом (SEQ ID NO: 3), звездочкой обозначен стоп-кодон ("6xHIS" представлена как SEQ ID NO: 4).

[0099] На **Фиг. 62a - 62c** проиллюстрирован гистологический анализ селективности трансдукции в коже мышей дикого типа после подкожной инъекции 3E+10 гв частиц конструкции немолизумаб-AAV2ΔHSPG. На **Фиг. 62a** показан флуоресцентный сигнал tdTomato для клеток, инфицированных вирусом немолизумаб SNAP AAV2ΔHSPG (красный). На **Фиг. 62b** показаны кератиноциты, идентифицированные с применением

антитела против К14 (зеленый). На **Фиг. 62с** показано наложение изображений, показывающее инфицированные вирусом кератиноциты (оранжевый).

[0100] На **Фиг. 63а - 63b** проиллюстрировано опосредованное антителами человека распознавание и нейтрализация AAV2 с модифицированной поверхностью, функционализированного с применением различных количеств линкера DBCO-PEGn. На **Фиг. 63а** показано связывание IgG, содержащегося в объединенной человеческой сыворотке, с AAV2, функционализированным с применением различных количеств линкера DBCO-PEGn, измеренное с помощью ELISA и выраженное в единицах оптической плотности (ОП), измеренных на длине волны 450 нм. На **Фиг. 63b** проиллюстрирован анализ нейтрализации, выполненный на клетках HEK293T, в котором немодифицированный и модифицированный вирус предварительно инкубировали с различными разведениями объединенной человеческой сыворотки, где процент ингибирования трансдукции указан для каждого разведения сыворотки.

[0101] На **Фиг. 64а - 64с** проиллюстрированы распознавание антителами и нейтрализация после химической модификации AAV2 с применением линкеров с различной длиной PEG как на вирусе, так и на лиганде. На **Фиг. 64а** проиллюстрировано связывание IgG человека с AAV2, модифицированным линкером PEG различной длины для вируса и лиганда, измеренное, как для **Фиг. 63а**. На **Фиг. 64b - 64с** проиллюстрирована нейтрализующая активность антител человека в отношении немодифицированного и модифицированного вируса, предварительно инкубированного с различными разведениями объединенной сыворотки человека, как для **Фиг. 63b**, где 4 вирус = DBCO PEG4; 2К вирус = DBCO-PEG2000; 5К лиганд = WGA-PEG5000-азид; 4 лиганд = WGA-PEG4-азид).

[0102] На **Фиг. 65а - 65n** проиллюстрирован анализ нейтрализации с применением немодифицированного вируса и AAV2-WGA на клетках PC12. Немодифицированный вирус (**Фиг. 65а - 65g**) и AAV2-WGA, модифицированный с применением PEG4-азида (**Фиг. 65h - n**), инкубировали с 2-кратными серийными разведениями сыворотки мышей, иммунизированных AAV2, перед добавлением к клеткам PC12.

[0103] На **Фиг. 66а - 66f** проиллюстрирован анализ нейтрализации на первичных нейронах DRG с применением немодифицированного вируса (**Фиг. 66а - 66с**) и AAV2-WGA, модифицированного с применением PEG4-азида (**Фиг. 66d - 66f**).

Немодифицированный вирус и AAV2-WGA предварительно инкубировали с разведениями сыворотки мыши, содержащей антитела против AAV2, перед добавлением в культуры DRG.

7. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

7.1. Определения

[0104] Используемый в настоящем документе термин «гAAV» обозначает рекомбинантный вирион, содержащий рекомбинантную конструкцию нуклеиновой кислоты, упакованную в капсид AAV.

[0105] Рекомбинантная конструкция нуклеиновой кислоты (синоним «рекомбинантный геном вируса») содержит полинуклеотидную полезную нагрузку (синоним «груз»), расположенную между инвертированными концевыми повторами AAV. Полезная нагрузка может представлять собой экспрессируемый полинуклеотид или конструкцию ДНК, которая предоставляет матрицу для направляемой гомологией репарации. В различных вариантах реализации экспрессируемый полинуклеотид кодирует белок (например, трансген, кодирующий терапевтический белок) или кодирует микроРНК, киРНК или направляющую РНК для аппарата редактирования генов или редактирования РНК, такого как CRISPR, ADAR и ADAT.

[0106] Термины «AAV», «аденоассоциированный вирус», «вирус AAV», «вирион AAV», «вирусная частица AAV», «частица AAV», «вектор на основе аденоассоциированного вируса» и «вектор AAV» используются в настоящей заявке синонимично для обозначения гAAV.

[0107] В настоящем документе «связывание капсида» или «связывание капсида с модифицированной поверхностью» с белком, полисахаридом или протеогликаном на поверхности клеток млекопитающих подразумевает связывание рекомбинантного вириона, обычно гAAV, который содержит указанный капсид или капсид с модифицированной поверхностью.

[0108] В настоящем документе термины «лечить» или «лечение» используются в их самом широком общепринятом клиническом смысле. Указанные термины включают, без ограничения, уменьшение признака или симптома заболевания; улучшение признака или симптома заболевания; облегчение симптомов; уменьшение степени

заболевания; стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания; задержку или замедление прогрессирования заболевания; улучшение или смягчение состояния заболевания; ремиссию (либо частичную, либо полную), либо детектируемую, либо недетектируемую; излечение; продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

[0109] «Эффективное количество» представляет собой количество частицы AAV в соответствии с настоящим изобретением, эффективное для лечения заболевания.

[0110] Используемый в настоящей заявке термин «предотвращение» или «предотвращать» при применении в контексте субъекта относится к профилактике заболевания, обычно у субъекта, подверженного риску развития заболевания, например, при присутствии геномной мутации.

[0111] Используемый в настоящей заявке термин «тропизм» относится к предпочтительной инфекции и/или трансдукции капсидом вируса определенных клеток или тканей. В предпочтительном варианте реализации для модификации тропизма капсида AAV капсидам придают определенные свойства, такие как определенные аффинности к рецепторам на поверхности клетки-мишени, которыми они не обладают в природе.

[0112] В контексте настоящего изобретения термин «субъект», используемый в некоторых вариантах реализации, предпочтительно относится к млекопитающему, такому как мышь, крыса, морская свинка, кролик, кошка, собака, обезьяна или, предпочтительно, человек. Термин «пациент» предпочтительно относится к млекопитающему, такому как мышь, крыса, морская свинка, кролик, лошадь, крупный рогатый скот, корова, кошка, собака, обезьяна или предпочтительно человек, например, пациент, представляющий собой человека, которому требуется диагностика, прогноз или терапия. Субъект в соответствии с настоящим изобретением может находиться в опасности пострадать от заболевания, такого как бактериальная инфекция, вирусная инфекция, грибковая инфекция или паразитарная инфекция. Более подробное описание медицинских показаний, относящихся к контексту данного изобретения, приведено в других местах в настоящей заявке.

[0113] Термин «необязательно замещенный» означает, что данный химический фрагмент (например, алкильная группа) может (но не обязательно должен) быть связан

с другими заместителями (например, гетероатомами). Например, алкильная группа, которая необязательно замещена, может представлять собой полностью насыщенную алкильную цепь (например, чистый углеводород). В качестве альтернативы, одна и та же необязательно замещенная алкильная группа может иметь заместители, отличные от водорода. Например, она может в любой точке цепи быть связана с атомом галогена, гидроксильной группой или любым другим заместителем, описанным в настоящем документе. Таким образом, термин «необязательно замещенный» означает, что данный химический фрагмент способен содержать другие функциональные группы, но не обязательно имеет какие-либо дополнительные функциональные группы. Подходящие заместители, используемые при необязательном замещении описанных групп, включают, без ограничения, галоген, оксо, —ОН, —СN, —СООН, —СН₂СN, —О—(С₁-С₆)алкил, (С₁-С₆)алкил, (С₁-С₆)алкокси, (С₁-С₆)галогеналкил, (С₁-С₆)галогеналкокси, —О—(С₂-С₆)алкенил, —О—(С₂-С₆)алкинил, (С₂-С₆)алкенил, (С₂-С₆)алкинил, —ОP(O)(ОН)₂, —ОC(O)(С₁-С₆)алкил, —C(O)(С₁-С₆)алкил, —ОC(O)O(С₁-С₆)алкил, —NH₂, —NH((С₁-С₆)алкил), —N((С₁-С₆)алкил)₂, —NHC(O)(С₁-С₆)алкил, —C(O)NH(С₁-С₆)алкил, —S(O)₂(С₁-С₆)алкил, —S(O)NH(С₁-С₆)алкил и S(O)N((С₁-С₆)алкил)₂. Заместители сами по себе могут быть необязательно замещены. В настоящем документе термин «необязательно замещенный» также означает замещенный или незамещенный, значение которых описано ниже. Фрагмент, который содержит дополнительное замещение, в настоящей заявке называют «производным» замещенного фрагмента. Например, замещенный алкилом нитрон является примером производного фрагмента нитрона.

[0114] Термин «замещенный» означает, что указанная группа или фрагмент несет один или более подходящих заместителей, где заместители могут соединяться с указанной группой или фрагментом в одном или более положениях. Например, арил, замещенный циклоалкилом, может означать, что циклоалкил соединяется с одним атомом арила с помощью связи или путем конденсации с арилом и совместного использования двух или более общих атомов.

[0115] Если специально не определено иное, «арил» означает циклическую ароматическую углеводородную группу, имеющую от 1 до 3 ароматических колец, включая моноциклические или бициклические группы, такие как фенил, бифенил или

нафтил. Если он содержит два ароматических кольца (бициклический и т.д.), то ароматические кольца арильной группы необязательно соединены в одной точке (например, бифенил) или конденсированы (например, нафтил). Арильная группа необязательно замещена одним или более заместителями, например, от 1 до 5 заместителями, в любой точке присоединения. Примеры заместителей включают, но не ограничены перечисленными: -галоген, оксо, —ОН, —СN, —СООН, —СН₂СN, —О—(С₁-С₆)алкил, (С₁-С₆)алкил, (С₁-С₆)алкокси, (С₁-С₆)галогеналкил, (С₁-С₆)галогеналкокси, —О—(С₂-С₆)алкенил, —О—(С₂-С₆)алкинил, (С₂-С₆)алкенил, (С₂-С₆)алкинил, —ОP(O)(ОН)₂, —ОC(O)(С₁-С₆)алкил, —C(O)(С₁-С₆)алкил, —ОC(O)O(С₁-С₆)алкил, —NH₂, —NH((С₁-С₆)алкил), —N((С₁-С₆)алкил)₂, —NHC(O)(С₁-С₆)алкил, —C(O)NH(С₁-С₆)алкил, —S(O)₂(С₁-С₆)алкил, —S(O)NH(С₁-С₆)алкил и S(O)N((С₁-С₆)алкил)₂.

[0116] Сами заместители необязательно замещены. Кроме того, когда они содержат два конденсированных кольца, арильные группы необязательно имеют ненасыщенное или частично насыщенное кольцо, конденсированное с полностью насыщенным кольцом. Типичные кольцевые системы этих арильных групп включают, но не ограничены перечисленными: фенил, бифенил, нафтил, антраценил, феналенил, фенантренил, инданил, инденил, тетрагидронафталенил, тетрагидробензоаннулилен и тому подобное.

[0117] Галоген («halogen») или гало- («halo») означает фтор, хлор, бром или йод.

[0118] «Алкил» означает насыщенный углеводород с прямой или разветвленной цепью, содержащий 1 - 12 атомов углерода. Примеры (С₁-С₆) алкильной группы включают, но не ограничены перечисленными: метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, изопропил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, изопентил, неопентил и изогексил.

[0119] «Алкокси» означает насыщенный углеводород с прямой или разветвленной цепью, содержащий 1 - 12 атомов углерода, содержащий концевой «О» в цепи, например, —О(алкил). Примеры алкоксигрупп включают, без ограничения,

метоксигруппы, этоксигруппы, пропоксигруппы, бутоксигруппы, трет-бутоксигруппы или пентоксигруппы.

[0120] «Алкенил» означает ненасыщенный углеводород с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащий 2 - 12 атомов углерода. «Алкенильная» группа содержит по меньшей мере одну двойную связь в цепи. Двойная связь алкенильной группы может быть неконъюгированной или конъюгированной с другой ненасыщенной группой. Примеры алкенильных групп включают этенил, пропенил, н-бутенил, изобутенил, пентенил или гексенил. Алкенильная группа может быть незамещенной или замещенной и может быть прямой или разветвленной.

[0121] «Алкинил» означает ненасыщенный углеводород с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащий 2 - 12 атомов углерода. «Алкинильная» группа содержит по меньшей мере одну тройную связь в цепи. Примеры алкинильных групп включают этинил, пропаргил, н-бутинил, изобутинил, пентинил или гексинил. Алкинильная группа может быть незамещенной или замещенной.

[0122] «Циклоалкил» или «карбоциклил» означает моноциклическое или полициклическое насыщенное углеродное кольцо, содержащее 3 - 18 атомов углерода. Примеры циклоалкильных групп включают, без ограничений, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептанил, циклооктанил, норборанил, норборенил, бицикло[2,2,2]октанил или бицикло[2,2,2]октенил и их производные. (С₃-С₈) циклоалкил представляет собой циклоалкильную группу, содержащую от 3 до 8 атомов углерода. Циклоалкильная группа может быть конденсированной (например, декалин) или мостиковой (например, норборнан).

[0123] «Галогеналкил» означает алкильную группу, замещенную одним или более галогенами. Примеры галогеналкильных групп включают, но не ограничены перечисленными: трифторметил, дифторметил, пентафторэтил, трихлорметил и т.д.

[0124] «Галогеналкокси» означает алкоксигруппу, замещенную одним или более галогенами. Примеры галогеналкильных групп включают, но не ограничены перечисленными: трифторметокси, дифторметокси, пентафторэтокси, трихлорметокси и т.д.

[0125] Используемый в настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый» означает химические соединения и композиции, которые при введении человеку являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают токсичности или аллергической или аналогичной нежелательной реакции, такой как расстройство желудка, головокружение и тому подобное. Предпочтительно в настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, в частности, у людей.

[0126] В настоящей заявке «терапевтический индекс» представляет собой параметр, выражающий терапевтическую эффективность активного лекарственного средства. Например, он низкий, когда подразумевается, что необходима высокая концентрация активного вещества для достижения терапевтической эффективности, или когда доза, необходимая для получения эффективности, вызывает токсичность. Напротив, высокий терапевтический индекс подразумевает, что доза, необходимая для обеспечения терапевтической эффективности активного вещества, низка и/или когда низка токсичность активного лекарственного средства.

7.2. Другие конвенции о толковании

[0127] Несмотря на то, что способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, можно применять при практической реализации или тестировании способов и композиций химических веществ, подходящие способы и материалы описаны ниже. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие источники, упомянутые в настоящем документе, в полном объеме включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[0128] Необходимо отметить, что в контексте настоящего описания и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, указание «антитела или антигенсвязывающего фрагмента» включает множество таких антител и антигенсвязывающих фрагментов и указание «рекомбинантного аденоассоциированного вируса» включает указание одного или более рекомбинантных аденоассоциированных вирусов и их эквивалентов, известных специалистам в данной

области техники, и так далее. Также следует отметить, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключить любые необязательные элементы. Таким образом, предполагается, что данное утверждение служит в качестве предшествующей основы для использования такой исключительной терминологии, как «только», «лишь» и т.п., применительно к перечислению элементов формулы изобретения или использованию «негативных» признаков.

[0129] Следует понимать, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов реализации, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте реализации. Напротив, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта реализации, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов реализации, относящихся к настоящему изобретению, конкретно включены в объем настоящего изобретения и описаны в настоящем документе, как если бы каждая комбинация была описана отдельно и в явном виде. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов реализации и их элементов также конкретно включены в объем настоящего изобретения и описаны в настоящем документе, как если бы каждая такая подкомбинация была описана в настоящей заявке отдельно и в явном виде.

[0130] Публикации, обсуждаемые в настоящей заявке, представлены исключительно по причине их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Приведенные даты публикаций могут отличаться от фактических дат публикаций, которые могут потребовать независимого подтверждения.

[0131] В тех случаях, когда указан диапазон значений, следует понимать, что перечисленные конечные точки диапазона входят в него. Кроме того, каждое промежуточное значение, вплоть до десятой доли нижнего предела, если иное явным образом не следует из контекста, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в этом указанном диапазоне входят в объем настоящего изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, и также входят в объем настоящего изобретения, с учетом любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. В тех случаях, когда указанный диапазон включает один или оба

предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также входят в объем настоящего изобретения.

[0132] Диапазоны, приведенные в настоящем документе, понимаются как сокращенное обозначение для всех значений в пределах указанного диапазона, включая указанные конечные точки. Например, диапазон от 1 до 50 понимают как включающий любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50, включая поддиапазоны, такие как от 11 до 48 или от 39 до 41.

[0133] Используемый в настоящем документе термин «приблизительно» может допускать некоторую степень вариабельности значения или диапазона, например, в пределах 10% от указанного значения или указанного предела диапазона.

7.3. Капсид вируса с модифицированной поверхностью

[0134] В соответствии с настоящим изобретением предложен капсид вируса с модифицированной поверхностью, который содержит лиганд, ковалентно конъюгированный с белком капсида вируса посредством линкера, содержащего сшитый фрагмент Q. Также предложены рекомбинантные вирионы, которые содержат капсид вируса с модифицированной поверхностью.

[0135] В нескольких вариантах реализации предложенный капсид вируса с модифицированной поверхностью придает рекомбинантному вириону, частью которого он является, улучшенную эффективность трансдукции, улучшенную селективность к типу клетки или как улучшенную эффективность трансдукции, так и улучшенную селективность к типу клетки, по сравнению с немодифицированным рекомбинантным вирионом, например, содержащим капсид вируса, имеющий такую же первичную аминокислотную последовательность, но который не был модифицирован, как описано в настоящем документе, путем сшивания с лигандом.

[0136] В соответствии с настоящим изобретением предложен капсид вируса с функционализированной поверхностью, содержащий первого представителя способной образовывать сшивку пары. Также предложен функционализированный лиганд, содержащий второго представителя способной образовывать сшивку пары,

причем первый и второй представители способной образовывать сшивку пары реагируют с образованием сшитого фрагмента Q. Капсид вируса с функционализированной поверхностью может быть сшит, то есть конъюгирован, с лигандом, имеющим комплементарного представителя способной образовывать сшивку пары.

[0137] В нескольких вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью в композиции содержит x конъюгированных лигандов, где x представляет собой среднее количество конъюгированных лигандов на капсид в композиции, что также называют в настоящей заявке соотношением лигандов на капсид или Л:К. В нескольких вариантах реализации x равен от 1 до 500. В некоторых вариантах реализации x равен от 1 до 300. В некоторых вариантах реализации x равен от 100 до 200. В некоторых вариантах реализации x равен от 110 до 190. В некоторых вариантах реализации x равен от 130 до 170. В нескольких вариантах реализации x равен 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295 или 300, или диапазону, заданному любыми двумя из указанных чисел. В некоторых вариантах реализации x равен приблизительно 1350, приблизительно 140, приблизительно 145, приблизительно 150, приблизительно 155, приблизительно 160, приблизительно 165, приблизительно 170, приблизительно 175 или приблизительно 180. В некоторых вариантах реализации x равен от приблизительно 55 до приблизительно 85. В некоторых вариантах реализации x равен от приблизительно 140 до приблизительно 160. В некоторых вариантах реализации x равен от приблизительно 135 до приблизительно 165. В некоторых вариантах реализации x равен от приблизительно 130 до приблизительно 170. В некоторых вариантах реализации x равен приблизительно 150. В некоторых вариантах реализации x находится в диапазоне между любыми двумя из чисел, представленных выше.

[0138] Также в соответствии с настоящим изобретением предложены линкеры, способные вступать в реакцию с капсидом, содержащие (i) способный вступать в реакцию с капсидом фрагмент, способный ковалентно присоединяться к белку капсида вируса, и (ii) представителя способной образовывать сшивку пары.

[0139] В вариантах реализации настоящего изобретения капсид вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением получают с помощью следующих этапов:

i) получения капсида вируса с функционализированной поверхностью путем осуществления реакции белка капсида вируса с линкером, способным вступать в реакцию с капсидом, содержащим первого представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров; и

ii) конъюгирования капсида вируса с функционализированной поверхностью с функционализированным лигандом, содержащим второго представителя способной образовывать сшивку пары,

при этом первый и второй представители способной образовывать сшивку пары вступают в реакцию с образованием сшитого фрагмента Q; и

iii) получения капсида вируса с модифицированной поверхностью.

7.3.1. Способная образовывать сшивку пара

[0140] Для осуществления ковалентной конъюгации лиганда с капсидом вируса для создания капсида вируса с модифицированной поверхностью рекомбинантные вирионы подвергают поверхностной функционализации с получением белков капсида вируса с функционализированной поверхностью, которые затем приводят в реакцию с функционализированным лигандом. Каждый из капсида с функционализированной поверхностью и функционализированного лиганда содержит представителя способной образовывать сшивку пары. Представители способной образовывать сшивку пары вступают в реакцию с образованием фрагмента Q, который ковалентно сшивает капсид вируса с лигандом.

[0141] В типичных вариантах реализации представители способной образовывать сшивку пары являются биоортогональными. Используемый в настоящей заявке термин биоортогональная химия относится к любому химическому процессу, который может протекать внутри живых систем, не мешая природным биохимическим процессам, или может протекать *in vitro*, не мешая биохимической/биологической активности продуктов реакции. Был разработан ряд стратегий химической конъюгации, которые отвечают требованиям биоортогональности, включая 1,3-

диполярное циклоприсоединение между азидами и циклооктинами (также называемое клик-химией без меди), между нитронами и циклооктинами, образование оксимов/гидразонов из альдегидов и кетонов, тетразиновое лигирование, например, циклоприсоединение s-тетразина и производных транс-циклооктена, или клик-реакцию на основе изоцианидов, а в последнее время - квадрициклановое лигирование.

7.3.1.1 CuAAC

[0142] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара выбрана из химических фрагментов, которые участвуют в катализируемом Cu(I) циклоприсоединении азид-алкин (CuAAC). В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит азид и алкин. В соответствии с настоящим изобретением также предложены производные этих фрагментов, которые сохраняют требуемую химическую реактивность. В некоторых вариантах реализации сшитый фрагмент Q содержит 5 - членное гетероатомное кольцо. В некоторых вариантах реализации сшитый фрагмент Q содержит 1,4-триазол.

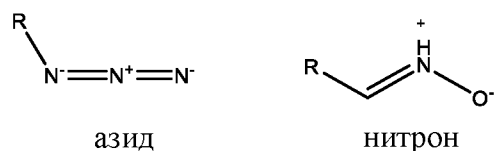
7.3.1.2 SPAAC и SPANC

[0143] В отличие от CuAAC, клик-химия без Cu модифицирована, чтобы быть биоортогональной, путем устранения цитотоксического медного катализатора, что позволяет реакции протекать быстро и без токсичности для живых клеток. Вместо меди в реакции используют стимулированное напряжением циклоприсоединение алкин-азид (SPAAC). Клик-химия без меди была приспособлена для применения нитронов в качестве 1,3-диполя вместо азидов, и применяется для модификации пептидов.

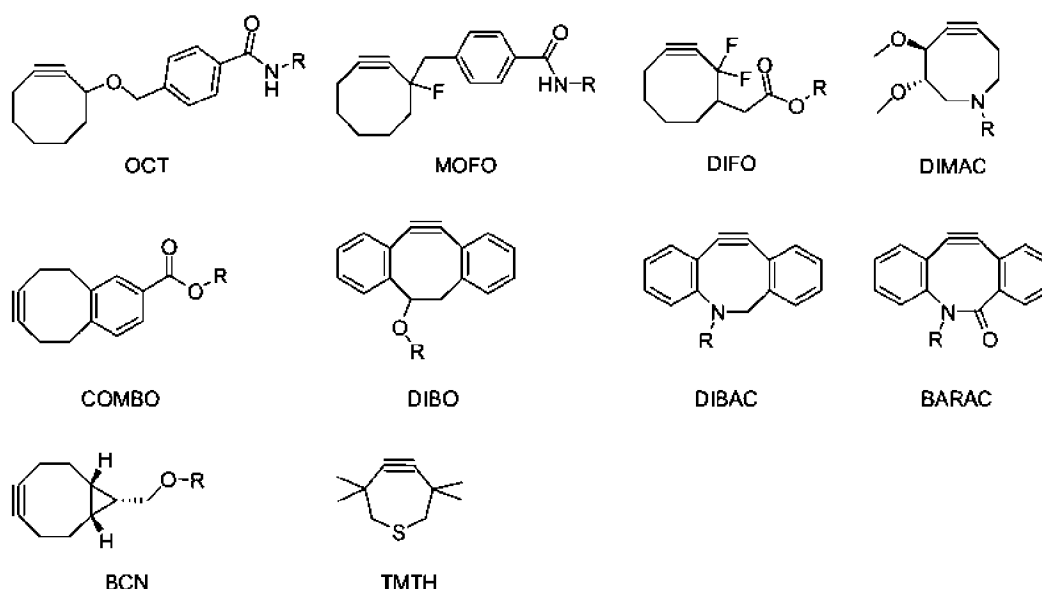
[0144] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара выбрана из химических фрагментов, которые участвуют в стимулируемом напряжением циклоприсоединении алкин-нитрон (SPANC). В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит азид и нитрон. В соответствии с настоящим изобретением также предложены производные этих фрагментов, которые сохраняют требуемую химическую реактивность. В некоторых вариантах реализации сшитый фрагмент Q содержит изоксазолин.

[0145] В нескольких вариантах реализации способная образовывать сшивку пара представляет собой азид и нитрон, как показано ниже, где R-группа представляет собой точку присоединения к способному вступать в реакцию с капсидом линкеру или

функционализованному лиганду. В соответствии с настоящим изобретением также предложены производные этих фрагментов, которые сохраняют требуемую химическую реактивность. Например, все заместители как на атомах углерода, так и на атомах азота диполя нитрона, а также ациклические и эндоциклические нитроны допустимы.

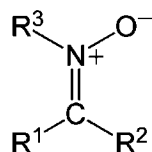


[0146] В нескольких вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит аналог циклооктина. В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит аналог циклооктина, например, показанные ниже аналоги, где группа R представляет собой точку присоединения к способному вступать в реакцию с капсидом линкеру или функционализованному лиганду. В соответствии с настоящим изобретением также предложены производные этих фрагментов, которые сохраняют требуемую химическую реактивность.

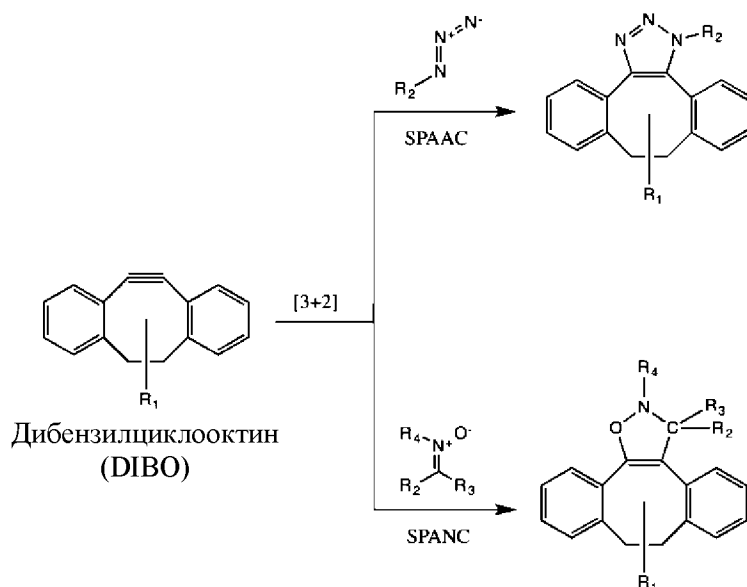


[0147] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит аналог дибензилциклооктина, выбранный из группы дибензилциклооктина (DIBO), дибензоазациклооктина (DIBAC или DBCO) и биарилазациклооктинона (BARAC). В настоящем документе также предложены производные этих фрагментов, которые сохраняют требуемую химическую реактивность.

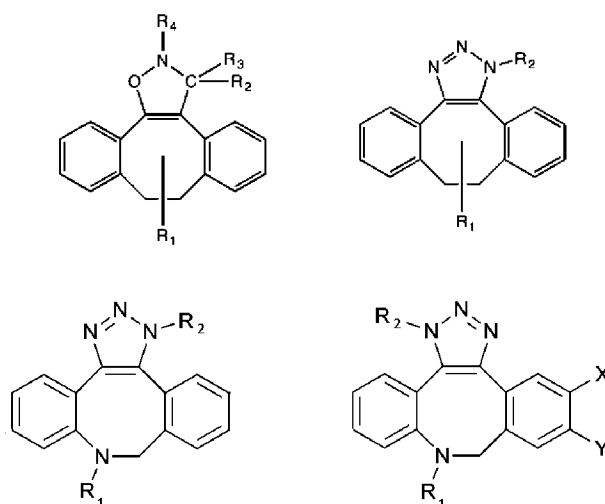
[0148] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит нитрон приведенной ниже структуры, где группа R1 представляет собой точку присоединения к способному вступать в реакцию с капсидом линкеру или функционализированному лиганду. R2 и R3 особо не ограничены. В нескольких вариантах реализации R2 и R3 независимо выбраны из водорода и C-C₄ алкильных групп, таких как метильная, этильная, пропильная и бутильная группы. В соответствии с настоящим изобретением также предложены производные этих фрагментов, которые сохраняют требуемую химическую реактивность.



[0149] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит аналог дибензилциклооктина, описанный выше, и либо 1,3-нитрон, либо азид. В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит дибензилциклооктин (или его аналог) и либо 1,3-нитрон, либо азид, как показано ниже, где группа R₁ представляет собой точку присоединения к вирусному капсиду или способному вступать в реакцию с капсидом линкеру, и где группа R₂ либо на азиде, либо на нитроне представляет собой точку присоединения к функционализированному лиганду. В альтернативных вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит дибензилциклооктин (или его аналог) и либо 1,3-нитрон, либо азид, как показано ниже, где группа R₁ представляет собой точку присоединения к лиганду, и где группа R₂ либо на азиде, либо на нитроне представляет собой точку присоединения к капсиду вируса с функционализированной поверхностью или способному вступать в реакцию с капсидом линкеру.



[0150] В некоторых вариантах реализации сшитый фрагмент Q содержит циклический фрагмент, соответствующий любому из приведенных ниже фрагментов, где R_1 и R_2 представляют собой точку присоединения к капсиду вируса. R_3 и R_4 могут представлять собой H или любой заместитель, описанный в настоящем документе, при условии, что замещенные производные сохраняют желаемую химическую реактивность, и также предложены в настоящем документе.



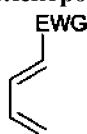
7.3.1.3 IEDDA

[0151] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит химические фрагменты, которые участвуют в реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEDDA). В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит бедный электронами диен

и богатый электронами диенофил. Примеры таких групп известны в данной области техники и описаны в других источниках, например, в публикации F. Thalhammer, et al., *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, 6851–6854; и B. L. Oliveira, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, 46, 4895-4950. В нескольких вариантах реализации бедный электронами диен содержит электроноакцепторную группу в качестве заместителя на диене, как проиллюстрировано ниже. В нескольких вариантах реализации богатый электронами диенофил содержит электронодонорную группу в качестве заместителя на диенофиле, как проиллюстрировано ниже.

Обращенные электронные требования

Бедный электронами диен

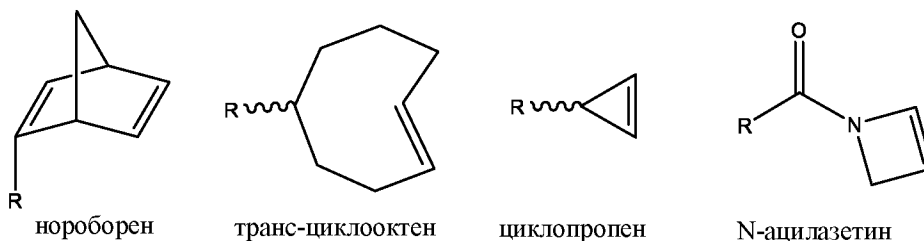


Богатый электронами диенофил

[0152] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит химические фрагменты, которые участвуют в [4+2]-циклоприсоединении Дильса-Альдера: реакции между диеном и диенофилом с образованием шестичленного кольца в виде $\pi 4s + \pi 2s$ посредством супраповерхностного/супраповерхностного взаимодействия 4π -электронов диена с 2π -электронами диенофила. В отличие от реакции Дильса-Альдера с обычными электронными требованиями, где богатый электронами диен реагирует с бедным электронами диенофилом, в реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEDDA) богатый электронами диенофил реагирует с бедным электронами диеном. Алкиновые диенофилы при реакции позволяют напрямую получить соответствующий пиридазин.

[0153] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит триазин (например, 1, 2, 4-триазин), тетразин (Tz) (например, 1,2,4,5-тетразины, также называемые s-тетразином) или напряженный диенофил, такой как норборен, транс-циклооктен (ТСО), циклопропен или N-ацилазетин. В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит фрагмент, приведенный ниже в качестве примера, где R-группа представляет собой точку присоединения к способному вступать в реакцию с капсидом линкеру, капсиду вируса с функционализированной поверхностью или функционализированному лиганду в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с настоящим изобретением

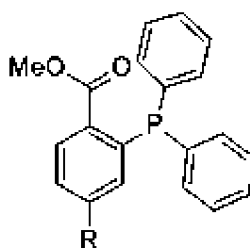
также предложены производные этих фрагментов, которые сохраняют требуемую химическую реактивность. В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара содержит ТСО и тетразин.



7.3.1.1 Лигирование по Штаудингеру

[0154] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара выбрана из химического фрагмента, который участвует в реакции Штаудингера, такого как азид, фосфин (PPh_2) или фосфит, которые способны реагировать с образованием иминофосфорана.

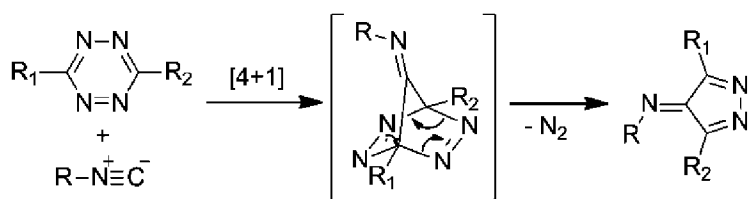
[0155] В некоторых вариантах реализации способный образовывать сшивку фрагмент представляет собой трифенилфосфин, такой как трифенилфосфин, показанный ниже, где группа R представляет собой точку присоединения к способному вступать в реакцию с капсидом линкеру в соответствии с настоящим изобретением. Производные этого фрагмента, которые сохраняют желательную химическую реактивность, также предложены в настоящем документе.



7.3.1.2 [4+1]-циклоприсоединение

[0156] В некоторых вариантах реализации способная образовывать сшивку пара выбрана из химического фрагмента, который участвует в [4+1]-циклораспределении, за которым следует ретро-реакция Дильса-Альдера с элиминированием N_2 , например, в виде изоцианида или 1,2,4,5-тетразина.

[0157] В нескольких вариантах реализации способный образовывать сшивку фрагмент представляет собой изоцианид, как показано ниже, где группа R представляет собой точку присоединения, например, к способному вступать в реакцию с капсидом линкеру. В нескольких вариантах реализации способный образовывать сшивку фрагмент представляет собой 1,2,4,5-тетразин, как показано ниже, где группа R1 или R2 представляет собой точку присоединения, например, к лиганду. В соответствии с настоящим изобретением также предложены производные этих фрагментов, которые сохраняют требуемую химическую реактивность.



7.3.1.1 Реакции с метками

[0158] В некоторых вариантах реализации способный образовывать сшивку фрагмент представляет собой биоортогональную метку, известную в данной области техники, такую как метка SNAP, метка CLIP, метка HaloTag или метка LUMIO, или химическую группу, которая реагирует с этими метками, например, бензилгуаниновую группу, бензилцитозиновою группу или хлоралкановую группу. В некоторых вариантах реализации один представитель способного образовывать сшивку фрагмента содержит метку SNAP, а другой представитель способного образовывать сшивку фрагмента содержит бензилгуаниновую группу.

7.3.2. Сшитый фрагмент – Q

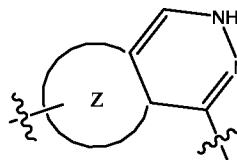
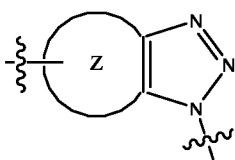
[0159] В одном аспекте настоящего изобретения **капсид вируса с модифицированной поверхностью** содержит фрагмент Q, который представляет собой фрагмент, образованный в ходе **реакции между способной образовывать сшивку парой**, как описано в настоящем документе.

[0160] В некоторых вариантах реализации Q содержит продукт реакции CuAAC. В некоторых вариантах реализации Q содержит продукт реакции SPAAC. В некоторых вариантах реализации Q представляет собой продукт реакции SPANC. В некоторых вариантах реализации Q содержит продукт реакции IEDD. В некоторых вариантах

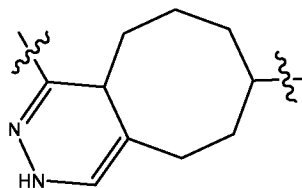
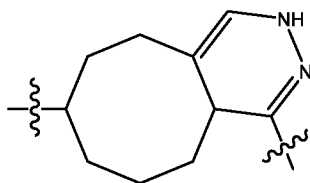
реализации Q содержит продукт лигирования по Штаудингеру. В некоторых вариантах реализации Q содержит продукт реакции [4+1] циклораспределения. В нескольких вариантах реализации Q содержит продукт реакции, стимулируемой напряжением, например, SPAAC, SPANC и IEEDD.

[0161] В некоторых вариантах реализации Q содержит циклический фрагмент. В некоторых вариантах реализации Q содержит бициклический фрагмент. В некоторых вариантах реализации Q содержит трициклический фрагмент. В некоторых вариантах реализации Q содержит 5 - 8-членное карбоциклическое кольцо, содержащее от 0 до 3 гетероатомов, выбранных из O, S или N. В некоторых вариантах реализации Q содержит восьмичленное кольцо, содержащее от 0 до 1 гетероатома, выбранного из O и N. В некоторых вариантах реализации Q содержит пятичленное кольцо, содержащее от 0 до 3 гетероатомов, выбранных из O и N. В некоторых вариантах реализации Q представляет собой триазольное кольцо. В некоторых вариантах реализации Q содержит шестичленное кольцо, содержащее 0 - 3 гетероатома, выбранных из O и N. В некоторых вариантах реализации Q содержит шестичленное кольцо, содержащее 2 гетероатома N.

[0162] В нескольких вариантах реализации, где Q содержит циклический фрагмент, Q представляет собой структуру, представленную ниже, где Z представляет собой 7- или 8-членный карбоцикл, содержащий 0 - 3 гетероатома, выбранных из O или N.



[0163] В нескольких вариантах реализации настоящего изобретения Q содержит структуру, представленную ниже:



7.3.3. Капсид вируса с функционализированной поверхностью

[0164] В одном аспекте настоящего изобретения предложен капсид вируса с функционализированной поверхностью, причем поверхность капсида вируса **функционализована так, чтобы она содержала представителя способной образовывать сшивку пары**. В нескольких вариантах реализации белок капсида вируса функционализируют путем **реакции со способным вступать в реакцию с капсидом линкером**. В нескольких вариантах реализации поверхность капсида вируса содержит **неприродную аминокислоту**, содержащую способный образовывать сшивку фрагмент. В нескольких вариантах реализации капсид вируса содержит **слитый белок, содержащий биоортогональную метку** в первичной последовательности по меньшей мере одного белка капсида.

[0165] В вариантах реализации настоящего изобретения предложен капсид вируса с функционализированной поверхностью, причем поверхность капсида вируса функционализована путем реакции со способным вступать в реакцию с капсидом линкером. В нескольких вариантах реализации капсид вируса с функционализированной поверхностью содержит у способных вступать в реакцию с капсидом линкерных групп, где у представляет собой количество способных вступать в реакцию с капсидом линкеров, прикрепленных к каждому капсиду вируса.

[0166] В нескольких вариантах реализации настоящего изобретения предложена композиция, содержащая капсид вируса с функционализированной поверхностью, где Y представляет собой среднее количество способных вступать в реакцию с капсидом линкеров, присоединенных к каждому капсиду.

7.3.3.1 Способный вступать в реакцию с капсидом линкер

[0167] Способный вступать в реакцию с капсидом линкер в соответствии с настоящим изобретением содержит i) способный вступать в реакцию с поверхностью капсида фрагмент, доступный для создания ковалентного соединения с поверхностью капсида, и ii) представителя способной образовывать сшивку пары, выбранного таким образом, чтобы он был способен взаимно реагировать с другим представителем способной образовывать сшивку пары, которым функционализирован лиганд в соответствии с настоящим изобретением.

7.3.3.1.1 Спейсер

[0168] Способный вступать в реакцию с капсидом линкер необязательно дополнительно содержит один или более спейсерных фрагментов. Спейсерный фрагмент конкретно не ограничен и может представлять собой любой спейсер, известный в данной области техники. В нескольких вариантах реализации спейсер содержит один или более мономеров этиленгликоля, то есть представляет собой полиэтиленгликоль, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ или [PEG] $_n$, также известный как «дискретный полиэтиленгликоль» или «dPEG n», где «n» представляет собой количество звеньев этиленоксида (или «этиленгликоля»). В некоторых вариантах реализации n равен 0. В некоторых вариантах реализации n равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100.

7.3.3.1.2 Способный вступать в реакцию с поверхностью капсида фрагмент

[0169] В соответствии с настоящим изобретением, способный вступать в реакцию с поверхностью капсида фрагмент конкретно не ограничен и включает любой фрагмент, который способен ковалентно присоединяться к желательной поверхности капсида.

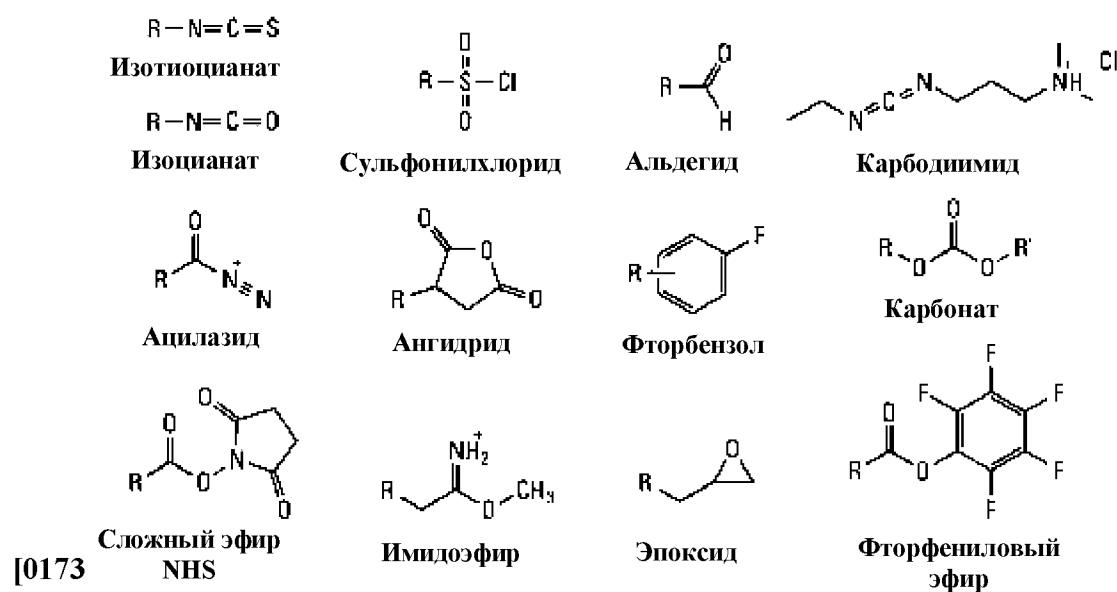
[0170] В нескольких вариантах реализации способный вступать в реакцию с поверхностью капсида фрагмент ковалентно присоединяют к выставленному на поверхности остатку аминокислоты в первичной последовательности белка капсида с применением известных методик мечения белка по конкретному остатку.


[0171] В нескольких вариантах реализации указанный аминокислотный остаток присутствует в капсидном белке дикого типа. В других вариантах реализации аминокислотный остаток встроен в первичную аминокислотную последовательность капсида.

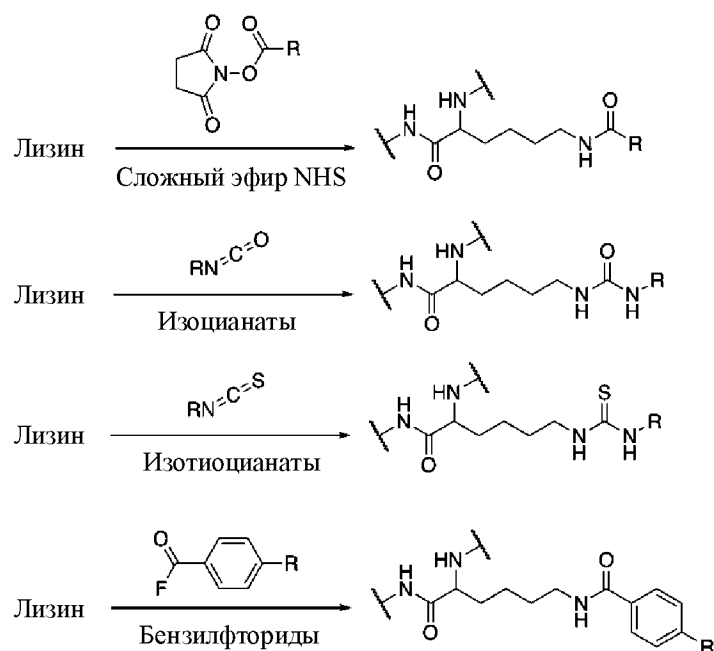
i. Первичный амин поверхности капсида

[0172] В нескольких вариантах реализации указанный способный вступать в реакцию с поверхностью капсида фрагмент содержит химическую группу, которая вступает в реакцию с первичными аминами ($-NH_2$). Первичные амины присутствуют на N-конце каждого белка капсида и в боковой цепи аминокислотных остатков лизина (Lys, K) в белковой последовательности капсида. Типичные химические группы, которые вступают в реакцию с первичными аминами, включают изотиоцианаты, изоцианаты, ацилазиды, сложные эфиры NHS, сульфонилхлориды, альдегиды, глиоксали,

эпоксиды, оксираны, карбонаты, арилгалогениды, имидоэфиры, карбодиимиды, ангидриды и фторфениловые эфиры. Большинство из них конъюгируются с аминами путем либо ацилирования, либо алкилирования. В нескольких вариантах реализации указанный способный вступить в реакцию с поверхностью капсида фрагмент содержит сложный эфир NHS или имидоэфир, например, такие, как проиллюстрированные ниже, где группа R представляет собой точку присоединения к способному вступить в реакцию с капсидом линкеру.



[0174] В нескольких вариантах реализации указанный способный вступить в реакцию с поверхностью капсида фрагмент ковалентно присоединяется к выставленному на поверхности остатку лизина первичной последовательности белка капсида. В некоторых из указанных вариантов реализации указанный способный вступить в реакцию с поверхностью капсида фрагмент содержит сложный эфир NHS, изоцианат, изотиоцианат или бензилфторид, как показано ниже, где группа R представляет собой точку присоединения к способному вступить в реакцию с капсидом линкеру, а  символы обозначают точки присоединения остатка лизина в белковой последовательности капсида.




[0175] В нескольких вариантах реализации способный вступить в реакцию с капсидом линкер содержит сложный эфир N-гидроксисукцинимид (сложный эфир NHS). Сложные эфиры NHS представляют собой реакционноспособные группы, образованные путем активации карбодиимидом карбоксилатных молекул. Активированный сложным эфиром NHS способный вступить в реакцию с капсидом линкер реагирует с первичными аминами в условиях от физиологических до слабощелочных (pH от 7,2 до 9) с образованием стабильных амидных связей. В ходе реакции высвобождается N-гидроксисукцинимид (NHS).

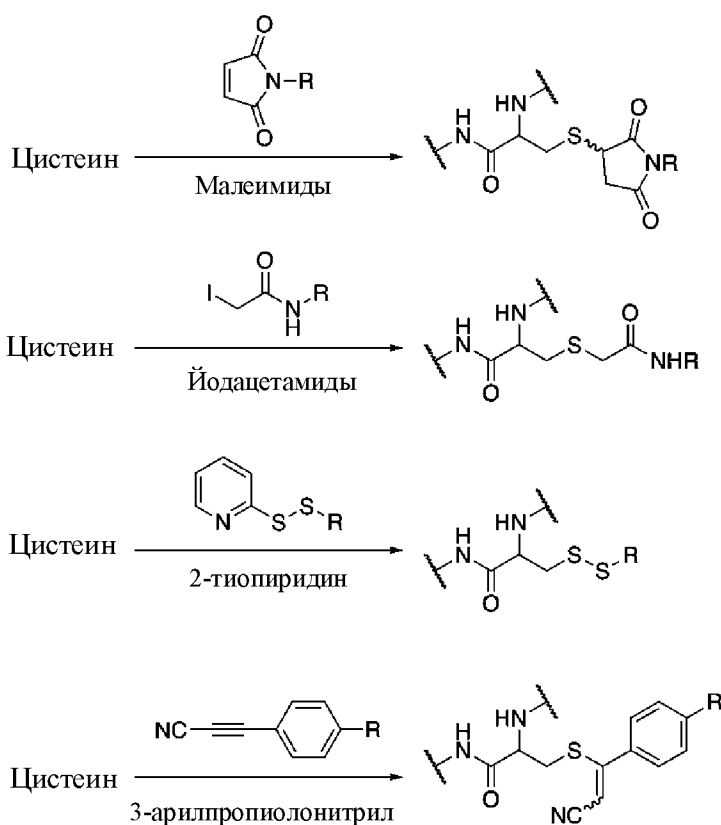
[0176] В нескольких вариантах реализации способный вступить в реакцию с капсидом линкер содержит сложный эфир тетрафторфенила (TFP). Сложные эфиры TFP представляют собой реакционноспособные группы, образованные путем активации карбодиимидом карбоксилатных молекул. Сложный эфир TFP карбоновых кислот вступает в реакцию с первичными аминами с той же скоростью, что и сложный эфир NHS, образуя ковалентную амидную связь, которая идентична той, которая образуется в результате реакции между первичными аминами и сложными эфирами NHS.

ii. Сульфгидрильная группа на поверхности капсида

[0177] В нескольких вариантах реализации способный вступить в реакцию с поверхностью капсида фрагмент ковалентно присоединяется к выставленной на

поверхности сульфгидрильной группе. В нескольких вариантах реализации указанный способный вступать в реакцию с поверхностью капсида фрагмент ковалентно присоединяется к выставленному на поверхности остатку цистеина первичной последовательности белка капсида.

[0178] В некоторых из указанных вариантов реализации указанный способный вступать в реакцию с поверхностью капсида фрагмент содержит малеимид, йодацетамид, 2-тиопиридин или 3-арилпропиолонитрил, как показано ниже, где группа R представляет собой точку присоединения к способному вступать в реакцию с капсидом линкеру, а символы  обозначают точки присоединения остатка лизина в белковой последовательности капсида.



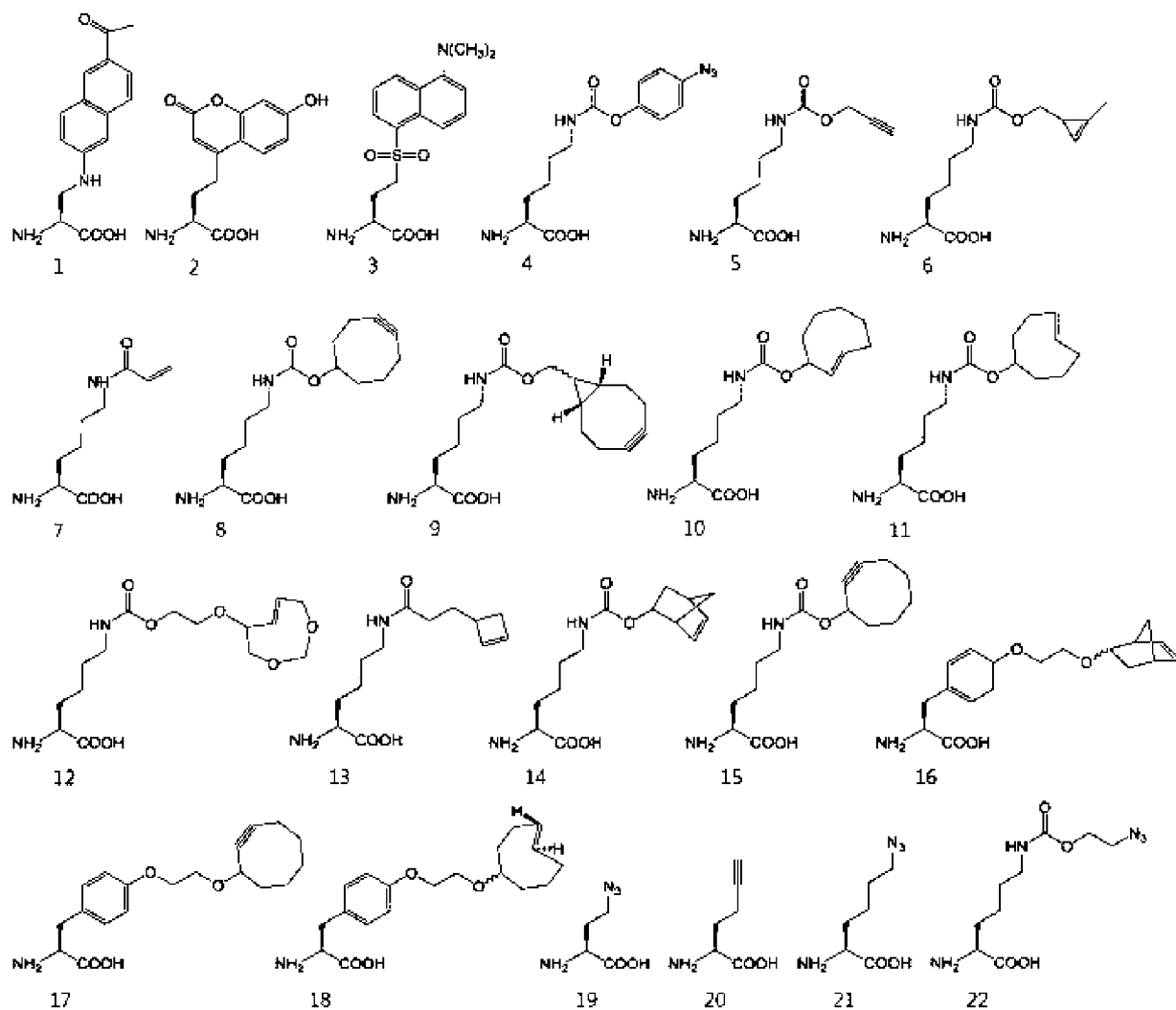
[0179] В нескольких вариантах реализации способный вступать в реакцию с капсидом линкер содержит малеимид. Малеймид и его производные получают из малейинового ангидрида путем обработки аминами с последующей дегидратацией. Малеймидная группа специфически реагирует с сульфгидрильными группами, когда рН реакционной

смеси составляет от 6,5 до 7,5; результатом является образование стабильной тиоэфирной связи, которая необратима.

iii. Неприродные аминокислоты

[0180] В нескольких вариантах реализации поверхность капсида вируса содержит один или более белков, которые содержат неприродную аминокислоту, содержащую способный образовывать сшивку фрагмент.

[0181] В некоторых вариантах реализации неприродная аминокислота выбрана из: 1: 3-(6-ацетилнафталин-2-иламино)-2-аминопропионовой кислоты (ANAP), 2: (S)-1-карбоксит-3-(7-гидрокси-2-оксо-2H-хромен-4-ил)пропан-1-амина (CouAA), 3: 3-(5-(диметиламино)нафталин-1-сульфонамид)пропановой кислоты (Дансилаланина), 4: N^{ϵ} -азидобензилоксикарбонил-лизина (PABK), 5: пропаргил-L-лизин (PrK), 6: N^{ϵ} -(1-метилциклопроп-2-енкарбоксамидо)-лизина (CpK), 7: *N*-акриллизина (AcK), 8: N^{ϵ} -(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил-L-лизина (CoK), 9: бицикло[6,1,0]нон-4-ин-9-илметанол-лизина (BCNK), 10: транс-циклоокт-2-ен-лизина (2'-ТСОК), 11: транс-циклоокт-4-ен-лизина (4'-ТСОК), 12: диоксо-ТСО-лизина (DOTСОК), 13: 3-(2-циклобутен-1-ил)пропановой кислоты (CbK), 14: N^{ϵ} -норборнен-2-илоксикарбонил-L-лизина (NBOK), 15: циклооктин-лизина (СОК), 16: 5-норборнен-2-ол-тирозина (NOR), 17: циклоокт-2-инол-тирозина (COY), 18: (E)-2-(циклоокт-4-ен-1-илоксил)этанол-тирозина (DS1/2), 19: азидогомоаланина (AHA), 20: гомопропаргилглицина (HPG), 21: азидонорлейцина (ANL), и 22: N^{ϵ} -2-азидеоэтилоксикарбонил-L-лизина (NEAK), как проиллюстрировано ниже.



7.3.4. Функционализированный лиганд

[0182] В одном аспекте настоящего изобретения предложен функционализированный лиганд, причем указанный лиганд функционализирован таким образом, что он содержит представителя способной образовывать сшивку пары. В нескольких вариантах реализации настоящего изобретения лиганд функционализирован путем реакции со способным вступать в реакцию с лигандом линкером. В нескольких вариантах реализации лиганд представляет собой полипептид, и указанный полипептид мутирован таким образом, что он содержит неприродную аминокислоту, содержащую способный образовывать сшивку фрагмент. В некоторых вариантах реализации лиганд представляет собой слитый белок, содержащий биоортогональную метку в первичной последовательности лиганда.

7.3.4.1 Способный вступать в реакцию с лигандом линкер

[0183] Способный вступать в реакцию с лигандом линкер в соответствии с настоящим изобретением содержит i) способный вступать в реакцию с лигандом фрагмент, доступный для создания ковалентного соединения с поверхностью лиганда, и ii) представителя способной образовывать сшивку пары, доступного для биоортогонального конъюгирования с капсидом вируса с функционализированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением.

7.3.4.1.1 Спейсер

[0184] Способный вступать в реакцию с лигандом линкер необязательно дополнительно содержит по меньшей мере один спейсерный фрагмент. Спейсерный фрагмент конкретно не ограничен и может представлять собой любой спейсер, известный в данной области техники. В нескольких вариантах реализации спейсер содержит мономеры этиленгликоля, т.е. полиэтиленгликоль, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ или [PEG] $_n$, также известный как «дискретный полиэтиленгликоль» или «dPEG n », где « n » представляет собой количество звеньев этиленоксида (или «этиленгликоля»). В некоторых вариантах реализации n равен 0. В некоторых вариантах реализации n равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100. В некотором варианте реализации n равен 4.

7.3.4.1.2 Способный вступать в реакцию с лигандом фрагмент

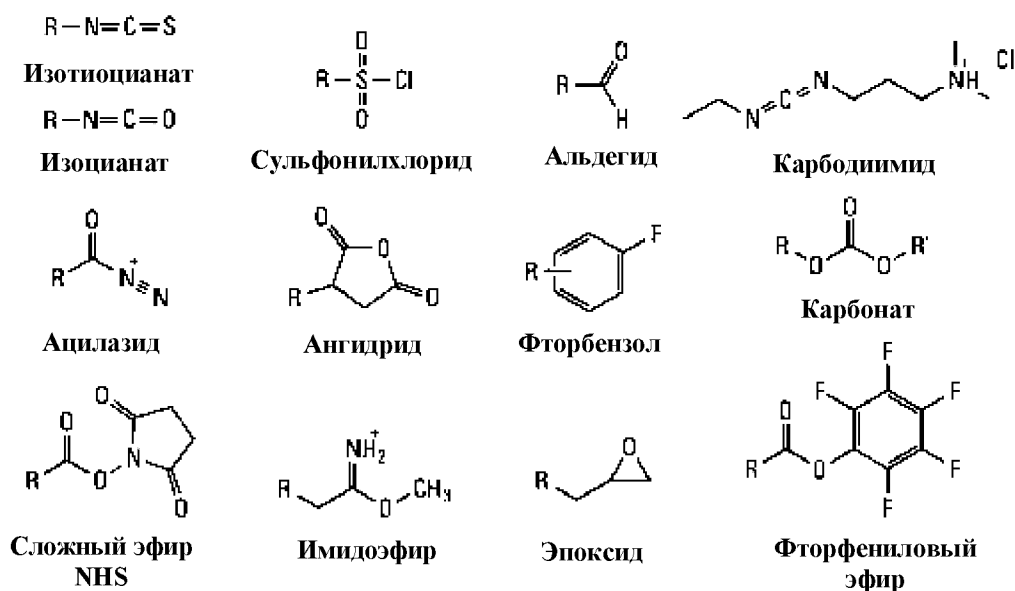
[0185] В соответствии с настоящим изобретением способный вступать в реакцию с лигандом фрагмент конкретно не ограничен и включает любой фрагмент, который способен ковалентно присоединяться к желательному лиганду.

[0186] В нескольких вариантах реализации, в которых лиганд представляет собой пептид, олигопептид или полипептид, способный вступать в реакцию с лигандом фрагмент присоединяют к аминокислотному остатку в первичной последовательности белка лиганда с применением известных методик мечения белка по конкретному остатку.


[0187] В нескольких вариантах реализации аминокислотный остаток присутствует в белке лиганда дикого типа. В других вариантах реализации аминокислотный остаток встроен в первичную аминокислотную последовательность лиганда.

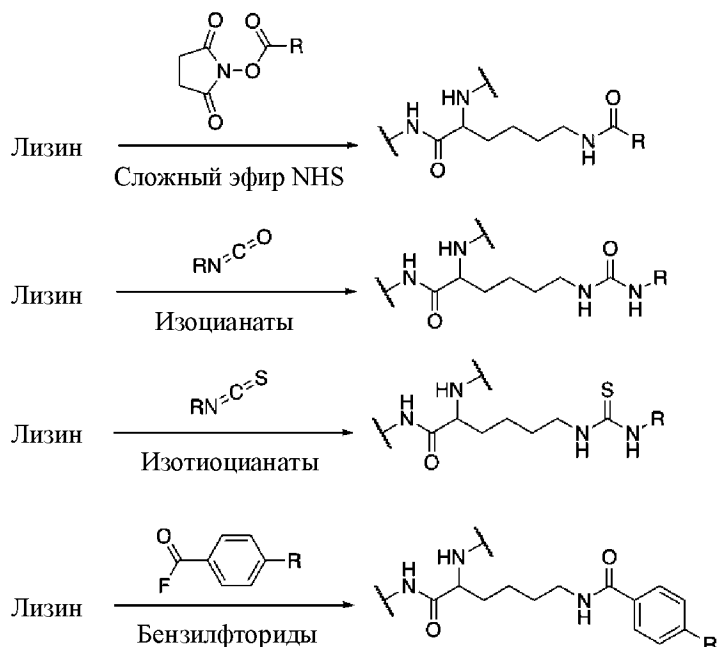
i. Первичный амин лиганда

[0188] В нескольких вариантах реализации указанный способный вступить в реакцию с лигандом фрагмент содержит химическую группу, которая вступает в реакцию с первичными аминами ($-\text{NH}_2$). В вариантах реализации, в которых лиганд представляет собой полипептид, первичные амины присутствуют на N-конце каждого белка лиганда и в боковой цепи аминокислотных остатков лизина (Lys, K) в белковой последовательности лиганда. Типичные химические группы, которые вступают в реакцию с первичными аминами, включают изотиоцианаты, изоцианаты, ацилазиды, сложные эфиры NHS, сульфонилхлориды, альдегиды, глиоксали, эпоксиды, оксираны, карбонаты, арилгалогениды, имидоэфиры, карбодиимиды, ангидриды и фторфениловые эфиры. Большинство из этих химических групп конъюгируются с аминами путем либо ацилирования, либо алкилирования. В нескольких вариантах реализации указанный способный вступить в реакцию с поверхностью лиганда фрагмент содержит сложный эфир NHS или имидоэфир, например, такие как проиллюстрированные ниже, где группа R представляет собой точку присоединения к способному вступить в реакцию с лигандом линкеру.



[0189] В нескольких вариантах реализации, в которых лиганд представляет собой полипептид, способный вступить в реакцию с лигандом фрагмент ковалентно присоединяется к выставленному на поверхности остатку лизина первичной последовательности белка лиганда. В некоторых из указанных вариантов реализации указанный способный вступить в реакцию с поверхностью лиганда фрагмент содержит

сложный эфир NHS, изоцианат, изотиоцианат или бензилфторид, как показано ниже, где группа R представляет собой точку присоединения к способному вступить в реакцию с лигандом линкеру, а символы  обозначают точки присоединения остатка лизина в белковой последовательности лиганда.




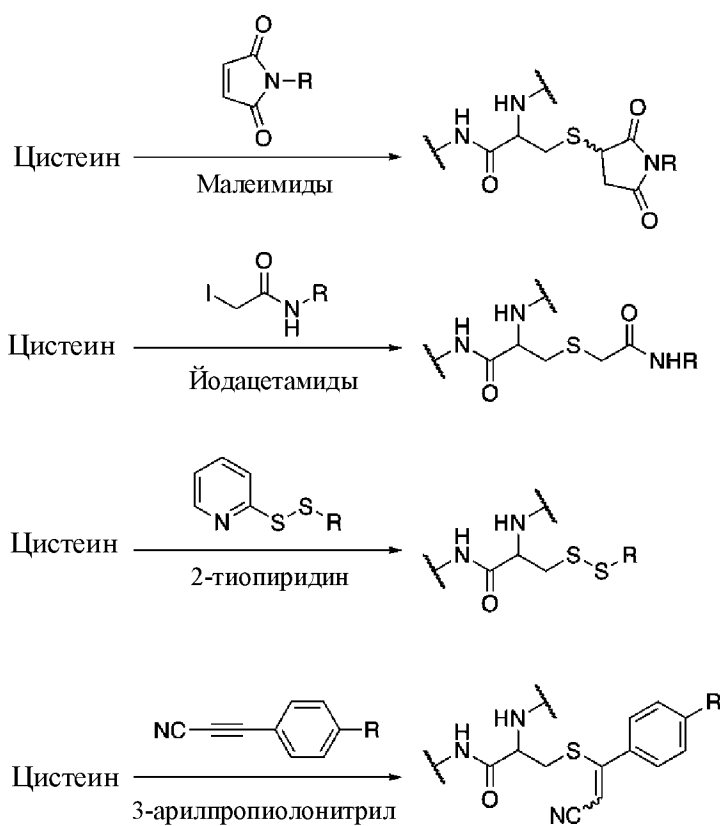
[0190] В нескольких вариантах реализации способный вступить в реакцию с лигандом линкер содержит сложный эфир N-гидроксисукцинимида (сложный эфир NHS). Сложные эфиры NHS представляют собой реакционноспособные группы, образованные путем активации карбодиимидом карбоксилатных молекул. Способный вступить в реакцию с лигандом линкер, активированный сложным эфиром NHS, вступает в реакцию с первичными аминами в условиях от физиологических до слабощелочных (pH от 7,2 до 9) с образованием стабильных амидных связей. В ходе реакции высвобождается N-гидроксисукцинимид (NHS).

ii. Сульфгидрильная группа лиганда

[0191] В нескольких вариантах реализации способный вступить в реакцию с лигандом фрагмент ковалентно присоединяется к выставленной на поверхности сульфгидрильной группе. В нескольких вариантах реализации, в которых лиганд представляет собой полипептид, способный вступить в реакцию с лигандом фрагмент

ковалентно присоединяется к остатку цистеина первичной последовательности белка лиганда.

[0192] В некоторых из этих вариантов реализации указанный способный вступить в реакцию с лигандом фрагмент содержит малеимид, йодацетамид, 2-тиопиридин или 3-арилпропиолонитрил, как показано ниже, где группа R представляет собой точку присоединения к способному вступить в реакцию с капсидом линкеру, а символы  обозначают точки присоединения остатка лизина в белковой последовательности лиганда.

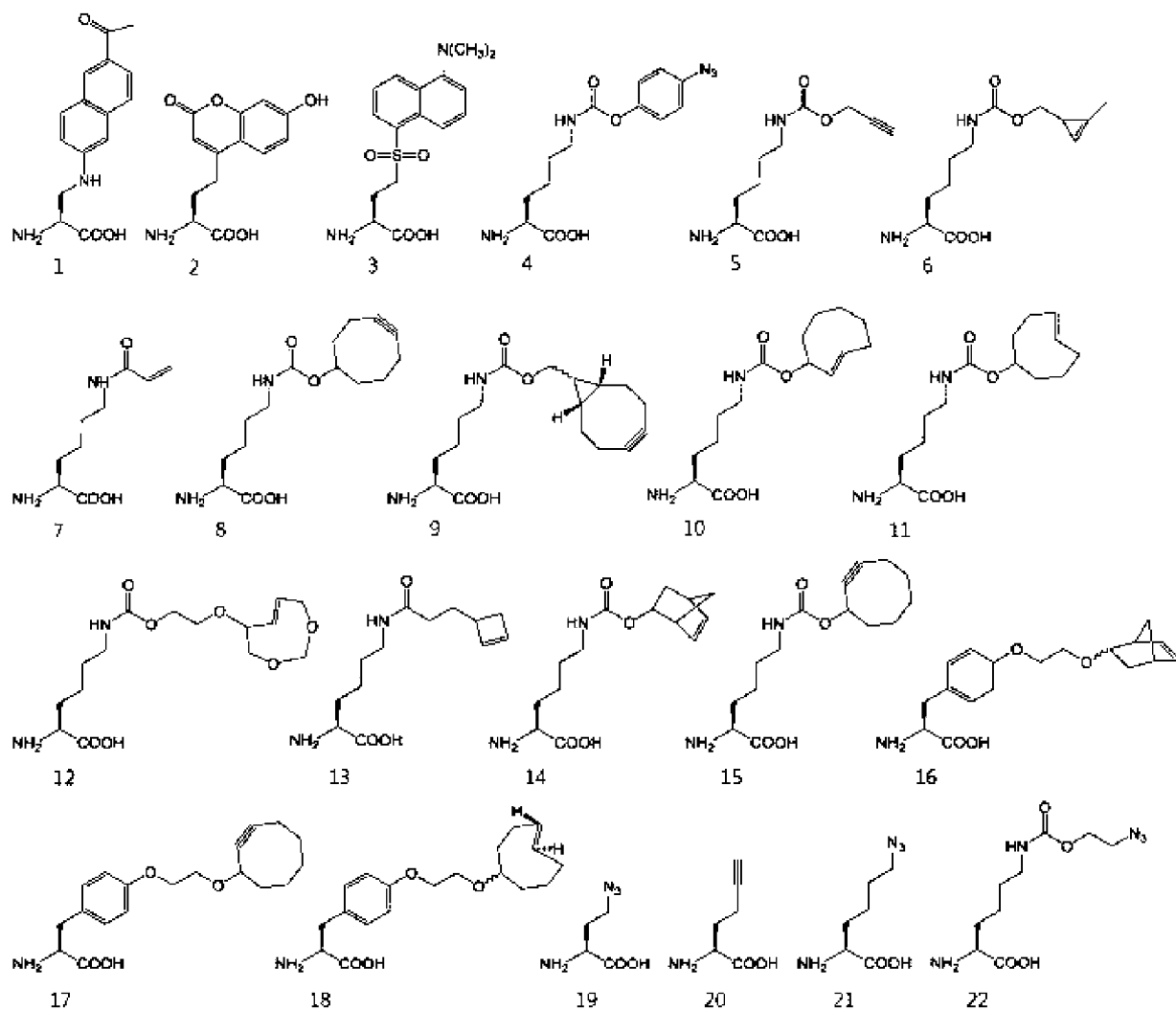


[0193] В нескольких вариантах реализации способный вступить в реакцию с лигандом линкер содержит малеимид. Малеимид и его производные получают из малеинового ангидрида путем обработки аминами с последующей дегидратацией. Малеимидная группа специфически реагирует с сульфгидрильными группами, когда рН реакционной смеси составляет от 6,5 до 7,5; результатом является образование стабильной тиоэфирной связи, которая необратима.

iii. Неприродные аминокислоты

[0194] В нескольких вариантах реализации лиганд представляет собой полипептид, который был мутирован таким образом, чтобы он содержал неприродную аминокислоту, содержащую способный образовывать сшивку фрагмент.

[0195] В некоторых вариантах реализации полипептид лиганда мутирован таким образом, что он содержит одну или более из неприродных аминокислот, выбранных из: 1: 3-(6-ацетилнафталин-2-иламино)-2-аминопропионовой кислоты (ANAP), 2: (S)-1-карбоксит-3-(7-гидрокси-2-оксо-2H-хромен-4-ил)пропан-1-амина (CouAA), 3: 3-(5-(диметиламино)нафталин-1-сульфонамид)пропановой кислоты (Дансилаланина), 4: *N*^ε-*n*-азидобензилоксикарбонил-лизина (PABK), 5: пропаргил-L-лизина (PrK), 6: *N*^ε-(1-метилциклопроп-2-енкарбоксамидо)-лизина (CpK), 7: *N*-акриллизина (AcK), 8: *N*^ε-(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил-L-лизина (CoK), 9: бицикло[6,1,0]нон-4-ин-9-илметанол-лизина (BCNK), 10: транс-циклоокт-2-ен-лизина (2'-ТСОК), 11: транс-циклоокт-4-ен-лизина (4'-ТСОК), 12: диоксо-ТСО-лизина (DOTСОК), 13: 3-(2-циклобутен-1-ил)пропановой кислоты (CbK), 14: *N*^ε-норборнен-2-илоксикарбонил-L-лизина (NВOK), 15: циклооктин-лизина (СОК), 16: 5-норборнен-2-ол-тирозина (NOR), 17: циклоокт-2-инол-тирозина (COY), 18: (E)-2-(циклоокт-4-ен-1-илоксил)этанол-тирозина (DS1/2), 19: азидогомоаланина (AHA), 20: гомопротаргилглицина (HPG), 21: азидонорлейцина (ANL), 22: *N*^ε-азидеоэтилоксикарбонил-L-лизина (NEAK).



iv. Слитые белки со вступающими в реакцию с меткой молекулами

[0196] В вариантах реализации настоящего изобретения лиганд представляет собой слитый белок, содержащий метку, которая способна связываться со своим соответствующим партнером по связыванию с высокой аффинностью, такую как метка SNAP, метка CLIP, метка HaloTag, метка Lumio и другие метки, известные специалистам в данной области техники.

[0197] Бензилгуанин, бензилцитозин и хлоралкан распознаются «суицидным» ферментом, таким как SNAP. В контексте настоящего изобретения бензилгуанин или бензилцитозин необязательно могут быть замещены с образованием производных бензилгуанина или бензилцитозина. Под производными бензилгуанина или производными бензилцитозина понимают бензилгуаниновую или бензилцитозиновою

группу, которая модифицирована, но которая, тем не менее, распознается суицидным ферментом.

[0198] Молекула метки может представлять собой любую молекулу или биомолекулу, которая способна специфично связываться с другой молекулой. Примеры могут включать метку SNAP, метку CLIP, метку Lumio или метку HaloTag. Например, аффинная метка может представлять собой метку SNAP - мутант алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы. Важно отметить, что одним из субстратов для метки SNAP является бензилгуанин. Коммерчески доступные продукты, которые можно применять в рамках настоящего изобретения, включают, например, метку HaloTag от Promega, метку Lumio от Life Technologies и метки SNAP/CLIP от NEB.

[0199] Самометящие белковые метки доступны для приобретения в различных векторах экспрессии. Метка SNAP представляет собой полипептид из 182 остатков (19,4 кДа), который можно слить с любым представляющим интерес белком и дополнительно специфически и ковалентно пометить подходящим лигандом, таким как флуоресцентный краситель. Белок метки SNAP представляет собой сконструированную версию общераспространенного фермента AGT млекопитающих, кодируемого у людей геном O6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT). Метку SNAP получали с применением стратегии направленной эволюции, которая приводила к получению варианта hAGT, который допускает производные O6-бензилгуанина вместо репарации алкилированных производных гуанина в поврежденной ДНК.

[0200] Метка CLIP была дополнительно сконструирована из метки SNAP таким образом, чтобы она допускала производные O2-бензилцитозина в качестве субстратов вместо O6-бензилгуанина. Позднее был разработан вариант с разделением метки SNAP, подходящий для анализа комплементации белков и исследований белок-белкового взаимодействия.

[0201] HaloTag представляет собой самометящую белковую метку. Это пептид из 297 остатков (33 кДа), полученный из бактериального фермента, сконструированный для ковалентного связывания с синтетическим лигандом. HaloTag представляет собой гидролазу, которая содержит генетически модифицированный активный сайт, который специфично связывается с реакционноспособным хлоралкановым линкером и обладает

повышенной скоростью связывания лиганда. Реакция, в результате которой образуется связь между белковой меткой и хлоралкановым линкером, протекает быстро и по существу необратима в физиологических условиях благодаря концевому хлору на части линкера. В вышеупомянутой реакции нуклеофильная атака реакционноспособного хлоралканового линкера вызывает вытеснение галогена аминокислотным остатком, что приводит к получению ковалентного промежуточного соединения алкил-фермент. Это промежуточное соединение затем будет гидролизоваться аминокислотным остатком в гидролазе дикого типа. Это приведет к регенерации фермента после реакции. Тем не менее, в модифицированной галогеналкандегалогеназе (HaloTag) промежуточный продукт реакции не может вступить в следующую реакцию, поскольку он не может быть гидролизован вследствие мутации в ферменте. Это приводит к тому, что промежуточный продукт сохраняется в виде стабильного ковалентного аддукта, с которым не происходят обратные реакции.

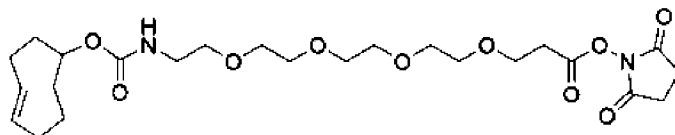
[0202] Существует два этапа в использовании этой системы: клонирование и экспрессия представляющего интерес белка в виде слитого с меткой SNAP® белка и мечение указанного слитого белка выбранным субстратом метки SNAP. Метка SNAP представляет собой небольшой белок на основе белка репарации ДНК человека - Об-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы (hAGT). Субстрат метки SNAP в этом случае представляет собой уходящую группу гуанина, присоединенную к бензильному линкеру. В реакции мечения замещенная бензильная группа субстрата ковалентно присоединяется к метке SNAP.

[0203] Система мечения белка меткой SNAP позволяет специфичное, ковалентное присоединение практически любой молекулы к представляющему интерес белку.

7.3.5. Примеры реакционноспособных линкеров

[0204] Следующие реакционноспособные линкеры подходят для применения либо в качестве способного вступать в реакцию с капсидом линкера, либо в качестве способного вступать в реакцию с лигандом линкера в соответствии с различными вариантами реализации настоящего изобретения.

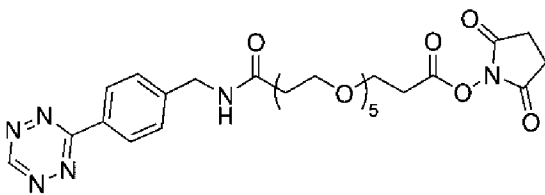
7.3.5.1.1 TCO-PEG4-NHS



[0205]

[0206] Синоним(ы): транс-циклооктен-PEG4-NHS; эмпирическая формула (порядок Хилла): C₂₄H₃₈N₂O₁₀; молекулярная масса: 514,57.

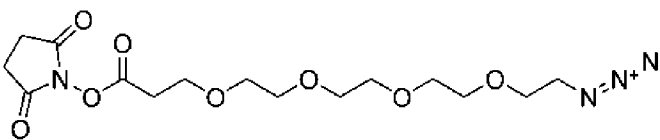
7.3.5.1.2 Тетразин-PEG5-NHS



[0207]

[0208] Тетразин-PEG5-сложный эфир NHS представляет собой аминореактивный линкер, часто применяемый для модификации белков, пептидов или аминомодифицированных олигонуклеотидов фрагментом тетразина.

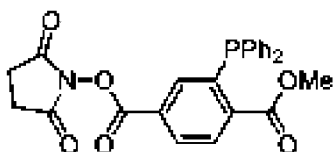
7.3.5.1.3 Азидо-PEG4-NHS



[0209]

[0210] Также упоминается в настоящем документе как «азид-PEG4-NHS».

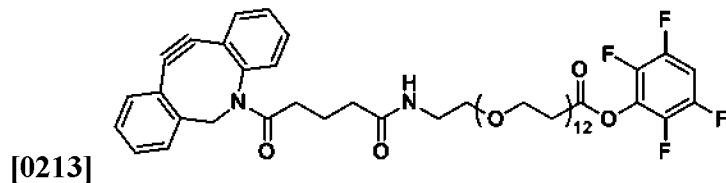
7.3.5.1.4 Фосфин-NHS



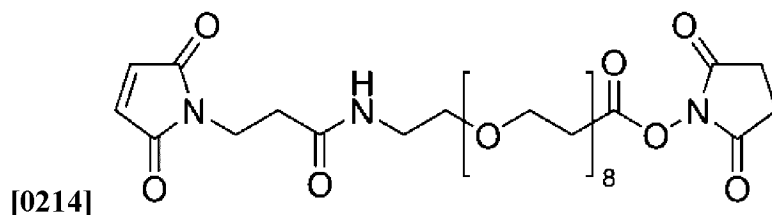
[0211]

[0212] Молекулярная масса: 461,40.

7.3.5.1.5 DBCO-PEG12-сложный эфир TFP



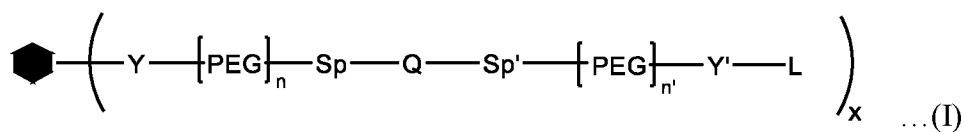
7.3.5.1.6 **Малеимид-PEG8-сукцинимидиловый сложный эфир**




[0215] Малеимид-PEG8-сукцинимидиловый сложный эфир, 2,5-диоксо-1-пирролидиниловый сложный эфир 31-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1Н-пиррол-1-ил) -29-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25-октаокса-28-азагентакриконтановой кислоты, малеимид-PEG8-сложный эфир NHS, 2,5-диоксо-1-пирролидиниловый сложный эфир 31-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1Н-пиррол-1-ил)-29-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25-октаокса-28-азагентакриконтановой кислоты, малеимид-PEG8-сложный эфир NHS.

7.3.1. **Капсид вируса с модифицированной поверхностью формулы I**

[0216] В некоторых вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью соответствует Формуле I



где:

-  — представляет собой капсид вируса;
- Y представляет собой присоединяющий фрагмент;
- Y' представляет собой присоединяющий фрагмент;
- Q представляет собой сшитый фрагмент;

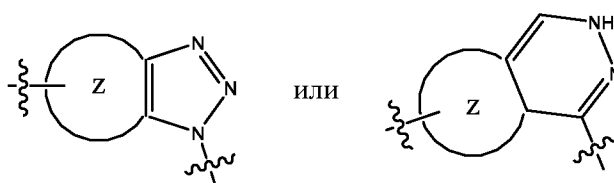
PEG - мономер этиленгликоля;
 n и n' независимо представляют собой целое число от 0 до 100,
 Sp и Sp' независимо представляют собой необязательный спейсер;
 L представляет собой лиганд; и
 x представляет собой целое число от 1 до 300, от 100 до 200, от 120 до 180 или равное приблизительно 150.

[0217] В некоторых вариантах реализации присоединяющий фрагмент Y образуется в ходе реакции между способным вступать в реакцию с капсидом фрагментом и белком капсида. В некоторых вариантах реализации присоединяющий фрагмент Y образуется в результате реакции между сложным эфиром NHS и первичной аминогруппой аминокислоты белка капсида. В нескольких вариантах реализации указанная аминогруппа представляет собой боковую цепь лизина, присутствующего в первичной последовательности белка капсида. В нескольких вариантах реализации аминогруппа представляет собой лизин, присутствующий в первичной последовательности белка капсида AA'V дикого типа.

[0218] В некоторых вариантах реализации присоединяющий фрагмент Y' образуется в результате реакции между способным вступать в реакцию с лигандом фрагментом и лигандом. В некоторых вариантах реализации присоединяющий фрагмент Y' образуется в результате реакции между сложным эфиром NHS и аминогруппой лиганда.

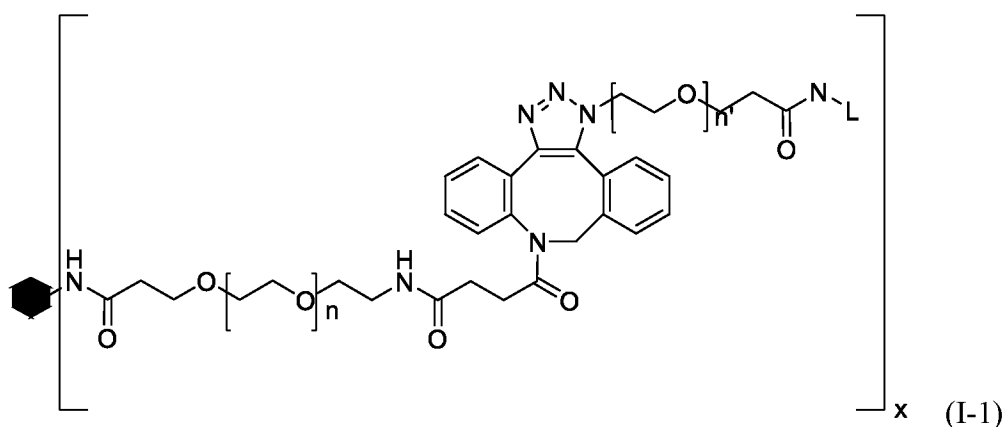
[0219] В некоторых вариантах реализации Q представляет собой продукт, образующийся в результате реакции между представителями способной образовывать сшивку пары. В некоторых вариантах реализации Q представляет собой сшитый фрагмент, образованный в результате реакции DBCO и азидогруппы.

[0220] В некоторых вариантах реализации Q выбран из:



где Z представляет собой 7- или 8-членную циклическую или гетероциклическую структуру.

[0221] В некоторых вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью соответствует Формуле I-1:



где:



представляет собой капсид вируса;

n и n' независимо представляют собой целое число, выбранное из 0 - 30;

L представляет собой лиганд; и

x представляет собой целое число от 50 до 250.

[0222] В некоторых вариантах реализации n представляет собой целое число, выбранное из от 0 до 100. В некоторых вариантах реализации n независимо выбран из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 и 100.

[0223] В некоторых вариантах реализации n' представляет собой целое число, выбранное из от 0 до 100. В некоторых вариантах реализации n' выбран из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 и 100.

7.3.2. Лиганды

[0224] Лиганд для применения в соответствии с настоящим изобретением особо не ограничен, при условии, что указанный лиганд пригоден для конъюгации с поверхностью капсида вируса, описанной в настоящем документе. В нескольких вариантах реализации лиганд выбран из белкового лиганда, у которого есть когнантный белок, расположенный на поверхности клеток млекопитающего, такой как рецепторы. В нескольких из указанных вариантов реализации когнантный белок участвует в трансдукции капсида вируса с модифицированной поверхностью.

[0225] В нескольких вариантах реализации лиганд представляет собой лиганд, специфичный для типа клеток. В некоторых вариантах реализации лиганд выбран из полипептидов, белков, моносахаридов или полисахаридов, из стероидных гормонов, из пептида с мотивом RGD, из витаминов, из малых молекул или из нацеливающих пептидов. Также предложены антитела (например, одноцепочечные) и нанотела; ферменты, такие как протеазы, гликозидазы, липазы, пептидазы; иммуноглобулины, такие как CD47 (сигнал «не ешьте меня»); протеазы IgG, такие как IdeZ и IdeS; адъюванты на основе белка и низкомолекулярные адъюванты для вакцинации.

[0226] В соответствии с одним вариантом реализации специфичный для типа клеток лиганд получают из белков, таких как трансферрин, эпидермальный фактор роста EGF, основной фактор роста фибробластов bFGF.

[0227] В соответствии с одним вариантом реализации специфичный для типа клеток лиганд получают из моно- или полисахаридов, таких как галактоза, N-ацетилгалактозамин и манноза.

[0228] В соответствии с одним вариантом реализации специфичный для типа клеток лиганд получают из витаминов, таких как фолаты.

[0229] В соответствии с одним вариантом реализации специфичный для типа клеток лиганд получают из малых молекул, включая напроксен, ибупрофен или другие известные связывающие белки молекулы.

[0230] В некоторых вариантах реализации лиганд выбран из белкового лиганда, такого как фактор роста или цитокин; субъединицы токсина, такой как субъединица В холерного токсина; лектина, такого как изолектин В4 или агглютинин проростков пшеницы; фактора адгезии, такого как лактадгерин; антитела или его одноцепочечного переменного фрагмента, такого как антитело против CD-34; более конкретно, фрагмента рекомбинантного ScFv антитела против CD-34 *E. coli*, пептида, такого как лиганд опиоидного рецептора дельторфин; и нуклеазы для редактирования генов, такой как Cas9.

7.3.3. Капсиды вирусов

[0231] В вариантах реализации настоящего изобретения капсид вируса конкретно не ограничен. В нескольких вариантах реализации капсид вируса выбран из капсидов

вирусов без оболочки, таких как аденовирус или аденоассоциированный вирус. В нескольких вариантах реализации капсид вируса выбран капсидов вирусов с оболочкой, таких как ретровирусы, лентивирусы, вирус простого герпеса и бакуловирусы. Варианты реализации настоящего изобретения включают не встречающиеся в природе капсиды и включают биологическое или химическое изменение или вариацию встречающегося в природе белка капсида, отличное от изменения первичной аминокислотной последовательности или в дополнение к нему.

7.3.3.1 AAV

[0232] Все рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (гAAV или AAV, используют в настоящем документе взаимозаменяемо) могут применяться в рамках настоящего изобретения. Такие частицы AAV способны трансдуцировать широкий спектр постмитотических клеток *in vivo* у млекопитающего, например, (включая, но не ограничиваясь перечисленными) мышечные клетки, гепатоциты и нейроны.

[0233] В нескольких вариантах реализации капсид AAV содержит белок капсида VP1, VP2 и/или VP3 встречающегося в природе серотипа AAV. В нескольких вариантах реализации AAV содержит один или более не встречающихся в природе белков капсида VP1, VP2 и/или VP3. В некоторых из указанных вариантов реализации не встречающийся в природе белок капсида VP1, VP2 или VP3 отличается по первичной аминокислотной последовательности от встречающихся в природе белков капсида. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения не встречающийся в природе капсид содержит биологическое или химическое изменение или вариацию встречающегося в природе белка капсида AAV, отличное от изменения первичной аминокислотной последовательности или в дополнение к нему.

[0234] В различных вариантах реализации белки капсида представляют собой белки встречающегося в природе серотипа AAV - AAV1, AAV2, AAV3B, AAV5, AAV6, AAV8 или AAV9. В различных вариантах реализации белок капсида выбран из белков капсида, описанных в публикациях PCT/US2014/060163, USP9695220, PCT/US2016/044819, PCT/US2018/032166, PCT/US2019/031851 и PCT/US2019/047546, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0235] Капсид аденоассоциированного вируса может быть выбран из всех идентифицированных природных серотипов и, в частности, из AAV2, AAV3b, AAV5, AAV8, AAV9 и AAV10, и еще более конкретно может представлять собой AAV2.

[0236] Кроме того, аденоассоциированный вирус может быть выбран из синтетических серотипов, полученных неприродными способами, такими как, но не ограничиваясь перечисленными: мутагенез капсида, вставки или делеции из последовательности капсида пептидов, перетасовка капсидов из различных серотипов или предковая реконструкция.

[0237] Капсиды AAV для применения в соответствии с настоящим изобретением получают любым способом, известным в данной области техники, без ограничения. Например, капсиды AAV могут быть получены несколькими способами, включая: временную трансфекцию клеток HEK293, стабильные клеточные линии, инфицированные Ad или HSV, клетки млекопитающих, инфицированные Ad или HSV (экспрессирующие гер-сар и трансген), или клетки насекомых, инфицированные бакуловирусными векторами (экспрессирующие гер-сар и трансген). Капсиды AAV, полученные любым из этих способов, можно применять для получения капсида вируса с функционализированной поверхностью и с модифицированной поверхностью, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации векторы получают путем временной трансфекции способом с применением фосфата кальция-HeBS клеток HEK293 двумя плазмидами: pHelper, PDP2-KANA, кодирующей AAV Rep2-Cap2 и гены-помощники аденовируса (E2A, вирус-ассоциированной (VA) РНК и E4), и pVector ss-CAG-eGFP, что проиллюстрировано в предложенных примерах.

[0238] В нескольких вариантах реализации капсид AAV в соответствии с настоящим изобретением содержит одну или более последовательностей невирусного происхождения, при необходимости.

[0239] В нескольких вариантах реализации капсид AAV состоит из трех перекрывающихся белков капсида (VP1, VP2, VP3), содержащих уникальный N-конец VP1, общую часть VP1/VP2 и часть, которая является общей для VP1, VP2 и VP3.

[0240] В некоторых вариантах реализации один или более белков капсида содержат аминокислотные группы, которые встречаются в природе, то есть первичная последовательность соответствует белку капсида дикого типа. В альтернативных вариантах реализации

первичная последовательность одного или более белков капсида содержит аминокислоты, которые встроены в последовательность белка капсида дикого типа. В некоторых из указанных вариантов реализации указанные встроенные аминокислоты содержат одну или более аминокислотных групп, присутствующих на поверхности капсида, и участвуют в функционализации поверхности одного или более белков капсида. В некоторых вариантах реализации встречающиеся в природе или встроенные аминокислотные группы, которые участвуют в функционализации поверхности капсида, выбраны из лизина, аргинина и цистеина. В конкретных вариантах реализации указанная аминокислота представляет собой лизин.

[0241] В соответствии с конкретным вариантом реализации капсид AAV содержит один или более белков капсида дикого типа из встречающихся в природе серотипов.

[0242] В соответствии с другим конкретным вариантом реализации капсид AAV содержит генетически модифицированный белок капсида. В некоторых вариантах реализации генетически модифицированный белок капсида представляет собой встречающийся в природе серотип, сконструированный таким образом, что он содержит одну или более генетических модификаций (мутацию, вставки или делеции). В альтернативном варианте реализации капсид гAAV состоит из одного или более синтетических белков капсида. В конкретных вариантах реализации капсид AAV сконструирован таким образом, чтобы модифицировать естественный тропизм, например, чтобы уменьшить связывание гепарина.

[0243] В рамках настоящего изобретения синтетический капсид содержит любую комбинацию белков капсида из природных, генетически модифицированных и искусственно созданных (путем случайных мутаций, перетасовки последовательностей, конструирования *in silico* и т. д.) серотипов, которые способны собираться и образовывать новый капсид вируса AAV, о существовании которого в природе не известно.

[0244] В настоящее время идентифицировано более 100 серотипов AAV, которые различаются по способности связывания белков капсида со специфическими рецепторами на поверхности клетки, и которые могут трансдуцировать различные типы клеток. AAV2 был первым серотипом, клонированным в бактериальную плазмиду, и с тех пор его применяли в качестве вируса сравнения для идентификации

других серотипов. Двенадцать серотипов (AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и AAV12) были тщательно протестированы для выявления их способности трансдуцировать определенные типы клеток и дифференцированы по мотивам белков капсида, которые связывают специфические рецепторы на поверхности клетки для прикрепления к клеткам. В контексте настоящего изобретения предпочтительным является капсид AAV, выбранный из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12. Однако следует понимать, что любой другой капсид AAV можно применять в контексте настоящего изобретения.

[0245] В одном варианте реализации частица аденоассоциированного вируса (AAV) в соответствии с настоящим изобретением выбрана из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и AAV12. Наиболее часто применяемыми системами переноса генов на сегодняшний день являются производные вирусов, например, аденоассоциированный вирус 2 типа (AAV2), AAV9 и AAV8. В конкретных вариантах реализации капсид гAAV представляет собой капсид AAV-2 и AAV-9, где капсидные белки необязательно дополнительно сконструированы таким образом, чтобы уменьшить или модифицировать нативный тропизм, например, чтобы уменьшить связывание гепарина.

7.3.3.2 Удаление природного связывающего фрагмента

[0246] В конкретных вариантах реализации капсида аденоассоциированного вируса (гAAV) в соответствии с настоящим изобретением гAAV выбран из встречающегося в природе серотипа, у которого удален природный сайт связывания с клетками, который позволяет связывание с гепарансульфатпротеогликанами.

[0247] В конкретных вариантах реализации устранение связывания с гепарином осуществили путем замены по меньшей мере одного из аргинина 585 или аргинина 588 VP1 и/или аналогичного аргинина в VP2 или VP3 на другую аминокислоту, такую как аланин. В нескольких вариантах реализации изменен по меньшей мере один из аргинина 448 и аргинина 451 в VP2 или 383 и 386 в VP3.

[0248] В конкретных вариантах реализации капсид аденоассоциированного вируса (AAV) в соответствии с настоящим изобретением состоит из по меньшей мере одного белка, который представляет собой мутированный белок дикого типа, например, где

сконструированный/мутированный белок выбран из белка дикого типа, представляющего собой VP1, VP2 и/или VP3. В качестве альтернативы, два из белков VP1, VP2 и/или VP3 в указанном капсиде мутированы, или все три белка VP1, VP2 и VP3 в указанном капсиде модифицированы. В конкретных вариантах реализации по меньшей мере одна часть, например, одна аминокислота, по меньшей мере одного из белков, которые должны быть модифицированы в указанном капсиде, мутирована (заменена, вставлена или удалена). Тем не менее, также возможно мутировать множество частей белков VP1, VP2 и VP3 в указанном капсиде, например, множество аминокислот, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или любое другое количество частей или аминокислот. В конкретных вариантах реализации по меньшей мере один из аргининов 484, 487, 585 и 588 и лизин 532 VP1, и/или аналогичный аргинин в VP2 или VP3, удалены путем их замены на другую аминокислоту, такую как аланин.

7.3.1. Маскировка от иммунной системы с помощью PEG

[0249] В соответствии с другим конкретным вариантом реализации поверхность капсида вируса может быть модифицирована в соответствии со способами, известными в данной области техники, чтобы она содержала агент для стерической защиты, чтобы избежать взаимодействия с нейтрализующими антителами. В нескольких вариантах реализации агент для стерической защиты получен из синтетических полимеров, таких как полиэтиленгликоль (PEG) или рНРМА. Полимеры PEG получают с помощью процессов полимеризации, и они содержат гетерогенную смесь различных размеров и молекулярных масс, которая может охарактеризована пуассоновским распределением длин и молекулярных масс цепей, также известным как индекс полидисперсности (PDI), индекс дисперсности или просто дисперсность (обозначают символом «Đ»). Указанная молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, и Đ (или PDI) дает представление о диапазоне молекулярных масс в образце.

7.3.2. Груз капсида

[0250] Груз - нуклеиновые кислоты, - упакованный внутри капсида гAAV с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой любой вид молекул нуклеиновых кислот, пригодный для трансдукции клеток с помощью гAAV.

[0251] В нескольких вариантах реализации полезная нагрузка или груз капсида гAAV представляет собой экспрессируемый полинуклеотид. В некоторых вариантах реализации экспрессируемый полинуклеотид кодирует белок (например, кодирует терапевтический белок). В некоторых вариантах реализации экспрессируемый полинуклеотид кодирует трансген. В некоторых вариантах реализации экспрессируемый полинуклеотид может быть транскрибирован с образованием направляющей РНК, транскрибирующей РНК CRISPR (тракрРНК), матричной РНК (мРНК), микроРНК (миРНК) или кшРНК.

[0252] В нескольких вариантах реализации изобретения полезная нагрузка доставляет конструкцию гомологичной ДНК для направляемой гомологией репарации.

[0253] В нескольких вариантах реализации указанная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую внутриклеточные антитела (например, для нейтрализации определенных белков внутри клеток), молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие пептидные токсины (например, для блокирования ионных каналов в пути боли), молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие оптогенетические механизмы реагирования (например, для включения или выключения нейронной активности с помощью света), молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие фармакогенетические инструменты (например, для включения или выключения нейронной сигнализации с применением химических лигандов, которые не оказывают препятствующего фармакологического действия), молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие редактирующие молекулы на основе CRISPR для точного редактирования генов, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие эпигенетические инструменты на основе CRISPR для регулирования экспрессии генов, и/или молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие гены самоубийства, вызывающие гибель клеток.

[0254] Предпочтительно, когда груз содержит нуклеазу для редактирования генов, такую как Cas9, груз дополнительно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, такую как гРНК и/или специфическая ДНК, которая должна быть вставлена в геном хозяина. В некоторых из указанных вариантов реализации груз содержит трансген, который, как известно, связан с генетическим расстройством.

[0255] Специалист в данной области техники осведомлен о других нуклеазах для редактирования гена, помимо Cas9, таких как Cpf1, TALEN, ZFN или хоуминг-эндонуклеаза. Кроме того, может быть удобно сконструировать с применением управляемых ДНК систем интерференции Аргонавт (DAIS). Как правило, указанный белок Аргонавт (Ago) гетерологично экспрессируется с полинуклеотида, введенного в указанную клетку, в присутствии по меньшей мере одного экзогенного олигонуклеотида (ДНК-гида), придающего специфичность расщепления предварительно определенного локуса указанному белку Ago. Системы TALEN и Cas9 описаны, соответственно, в WO 2013/176915 и WO 2014/191128. Нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) первоначально описаны в Kim, YG; Cha, J.; Chandrasegaran, S. («Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain») (1996). Proc Natl Acad Sci USA 93 (3):1156-60). Cpf1 представляет собой систему CRISPR Cas 2 класса, описанную Zhang et al. (Cpf1 is a single RNA-guided Endonuclease of a Class 2 CRIPR-Cas System. (2015). Cell;163:759-771). Семейство генов аргонавтов (AGO) было первоначально описано в Guo S, Kemphues KJ. («Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed.») (1995). Cell;81(4):611-20).

7.4. Способы получения капсидов вирусов с модифицированной поверхностью

[0256] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения рекомбинантного капсида вируса с модифицированной поверхностью. В некоторых вариантах реализации предложенный капсид предназначен для применения для трансдукции нуклеиновыми кислотами эукариотических клеток, обычно клеток млекопитающего, в частности, клеток человека. В нескольких вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью представляет собой рекомбинантный аденовирусный вирион. В нескольких вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью представляет собой рекомбинантный вирион AAV.

[0257] Указанный способ включает этап сшивания, т.е. ковалентного конъюгирования, лиганда с белком капсида вируса с помощью линкера, содержащего сшитый фрагмент Q. Предпочтительно лиганд вводит в указанный капсид по меньшей мере один сайт связывания мишени на поверхности клетки млекопитающего, необязательно при этом

природный сайт связывания мишени на поверхности клетки в указанном капсиде удален, например, удален ранее.

[0258] В одном варианте реализации описанный в настоящем документе способ получения капсида вируса с модифицированной поверхностью включает следующие этапы:

i) получения капсида вируса с функционализированной поверхностью путем осуществления реакции белка капсида вируса с линкером, способным вступать в реакцию с капсидом, содержащим первого представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров;

ii) конъюгирования капсида вируса с функционализированной поверхностью с функционализированным лигандом, содержащим второго представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров,

при этом первый и второй представители способной образовывать сшивку пары реагируют с образованием сшитого фрагмента Q; и

iii) получения капсида вируса с модифицированной поверхностью.

[0259] Как упомянуто выше, если указанный природный сайт связывания мишени на поверхности клетки млекопитающего в указанном капсиде присутствует и не удален, и поверхность капсида модифицирована таким образом, что она содержит по меньшей мере один лиганд в соответствии с настоящим изобретением, то предложенный капсид вируса с модифицированной поверхностью имеет более высокий уровень инфекционности (т.е. улучшенную трансдукцию - большую эффективность или аналогичную эффективность при более низком титре) по сравнению с капсидом, поверхность которого не была модифицирована, как описано в настоящем документе. В альтернативных вариантах реализации, если указанный природный сайт связывания мишени на клетке млекопитающего в указанном капсиде удален (например, путем генетической модификации известного сайта связывания гепарина) до модификации поверхности капсида таким образом, чтобы она содержала лиганд, то предложенный капсид с модифицированной поверхностью имеет один или более из i) модифицированного тропизма и ii) улучшенной трансдукции по сравнению с

капсидом, поверхность которого не была модифицирована, как описано в настоящем документе.

[0260] Частица аденоассоциированного вируса (AAV), полученная указанным выше способом, предпочтительно выбрана из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, hu68, rh.10 и их комбинаций.

[0261] Любой из белков частицы аденоассоциированного вируса (AAV), который необходимо получить указанным выше способом, может быть модифицирован. Предпочтительно, по меньшей мере, один из белков VP1, VP2 или VP3 в указанном капсиде модифицирован с помощью указанного выше способа. В качестве альтернативы, модифицированы два белка из VP1, VP2 и/или VP3 в указанном капсиде, или модифицированы все три белка VP1, VP2 и VP3 в указанном капсиде. Предпочтительно, модифицирована по меньшей мере одна часть, например, по меньшей мере одна аминокислота по меньшей мере одного из белков, которые необходимо модифицировать в указанном капсиде. Однако также возможно модифицировать множество частей белков VP1, VP2 и VP3 в указанном капсиде, например, множество аминокислот, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или любое другое число частей или аминокислот. Предпочтительно, по меньшей мере один из аргининов 484, 487, 585 и 588 и лизин 532 VP1 и/или аналогичный аргинин в VP2 или VP3 удалены путем их замены на другую аминокислоту, такую как аланин.

[0262] Белок капсида из природного серотипа AAV (при необходимости, дополнительно генетически модифицированный), такой как VP1, VP2 или VP3, химически модифицируют по определенным аминокислотам. Примеры таких модификаций хорошо известны в данной области техники и обобщены, например, в R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2005, содержание которого включено в настоящую заявку посредством ссылки. Химическая модификация аминокислот включает, но не ограничена модификациями путем: ацилирования, амидинирования, пиридоксилерования лизина, восстановительного алкилирования, тринитробензилирования аминогрупп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), амидной модификации карбоксильных групп и сульфгидрильной модификации путем окисления цистеина надмуравьиной кислотой с получением цистеиновой кислоты, образования производных ртути, образования смешанных дисульфидов с другими тиольными соединениями, реакции с

малеимидом, карбоксиметилирования йодуксусной кислотой или йодацетамидом и карбамоилирования цианатом при щелочном pH, но не ограничиваясь указанными способами. Для этого специалист в данной области техники обращается к 15 главе Current Protocols in Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000, полное содержание которого явно включено в настоящий документ) за более обширной методологией, относящейся к химической модификации белков.

[0263] В нескольких вариантах реализации описанного выше способа получения улучшенного аденоассоциированного вируса (AAV) модификация капсида включает как удаление природных сайтов связывания, так и введение сайтов связывания лигандов, например, посредством функционализации поверхности капсида с помощью способного вступать в реакцию с поверхностью капсида фрагмента. В некоторых других вариантах реализации природный сайт связывания капсида AAV остается неизменным, т.е. не удален, и вводят по меньшей мере один сайт связывания лиганда или лиганд в соответствии с настоящим изобретением.

[0264] В нескольких вариантах реализации природный сайт связывания удален описанным выше способом для получения улучшенной частицы аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный природный сайт связывания позволяет связывание с гепарансульфатпротеогликанами. В некоторых из этих вариантов реализации природный сайт связывания удален путем замены по меньшей мере одного из аргининов 585 и 588 VP1 и/или аналогичного аргинина в VP2 или VP3 на другую аминокислоту, такую как аланин.

[0265] В нескольких вариантах реализации сайт связывания лиганда, введенный в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой сайт, который позволяет ковалентное присоединение лигандов. В некоторых из этих вариантов реализации указанный сайт связывания лиганда выбран из бензилгуаниновой группы, которая присоединена к доступным остаткам лизина, более предпочтительно путем осуществления реакции указанного капсида с бензилгуанин N-гидроксисукцинимидом (BG-NHS) и/или бензилцитозин N-гидроксисукцинимидом (BC-NHS).

[0266] В настоящем изобретении предпочтительно применяют метки, которые способны связываться со своими специфичными лигандами с высокой аффинностью, такие как метка SNAP, метка CLIP, метка HaloTag, метка Lumio и другие. Молекула

метки, введенная указанным выше способом, может представлять собой любую молекулу или биомолекулу, которая способна специфично связываться с другой молекулой. Примеры могут включать метку SNAP, метку CLIP, метку Lumio или метку HaloTag. Например, аффинная метка может представлять собой метку SNAP - мутант алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы. Важно отметить, что одним из субстратов для метки SNAP является бензилгуанин. Коммерчески доступные продукты, которые можно применять в рамках настоящего изобретения, включают, например, метку HaloTag от Promega, метку Lumio от Life Technologies и метки SNAP/CLIP от NEB. Указанный сайт связывания лиганда в том виде, в котором он был введен, предпочтительно присоединен к эпсилон-аминогруппе или первичному амину указанного доступного остатка лизина.

[0267] Соответственно, более предпочтительным является описанный выше способ получения улучшенной частицы аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный способ дополнительно включает этап присоединения лиганда к указанной бензилгуаниновой и/или указанной бензилцитозиновогой группе, в частности, метки HaloTagTM, метки SNAPTM или метки CLIPTM.

[0268] Указанный лиганд, который должен быть присоединен, может представлять собой любой вид лиганда, но предпочтительно выбран из белкового лиганда, такого как фактор роста или цитокин; субъединицы токсина, такой как субъединица В холерного токсина; лектина, такого как изолектин В4 или агглютинин проростков пшеницы; фактора адгезии, такого как лактадгерин; антитела, такого как антитело против CD-34; пептида, такого как лиганд опиоидного рецептора дельторфин; и нуклеазы для редактирования генов, такой как Cas9.

7.5. Составы

[0269] В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен описанный выше капсид вируса с модифицированной поверхностью для применения при лечении заболевания, причем указанный AAV вводят субъекту в жидкой, сухой или полутвердой форме, такой как, например, в форме таблетки, покрытой оболочкой таблетки, шипучей таблетки, капсулы, порошка, гранулята, покрытой сахаром таблетки, пастилки, пилюли, ампулы, капель, суппозитория, эмульсии, мази, геля, настойки, пасты, крема, влажного компресса, раствора для полоскания горла,

растительного сока, назального средства, ингаляционной смеси, аэрозоля, жидкости для полоскания рта, спрея для рта, спрея для носа или комнатного спрея.

[0270] В некоторых вариантах реализации предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный вирион, причем рекомбинантный вирион содержит капсид вируса с модифицированной поверхностью, предложенный в настоящем документе, с содержащимся в нем рекомбинантным грузом нуклеиновой кислоты, причем фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавители, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или вспомогательное вещество. Такие фармацевтически приемлемые носители, разбавители, солюбилизаторы, наполнители, консерванты и/или вспомогательные вещества можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

[0271] Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей капсид вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением, совместно с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем и/или разбавителем, т.е. в комбинации с фармацевтически приемлемыми добавками, носителями, разбавителями, растворителями, наполнителями, скользящими веществами, вспомогательными веществами, связующими веществами или стабилизаторами. Предпочтительно, указанную композицию вводят указанному субъекту в виде спреев, покрытий, пен, лосьонов, гелей, жидкостей для полоскания рта, пероральных составов или инъекций. Указанная композиция может быть введена указанному субъекту системно, перорально или любым другим клинически/медицински приемлемым способом.

[0272] Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему: а) капсид вируса с модифицированной поверхностью, описанный и/или предназначенный для применения в соответствии с настоящим изобретением, или фармацевтическую композицию, содержащую капсид вируса с модифицированной поверхностью, описанный в настоящем изобретении, б) письменные инструкции по применению указанного капсида вируса с модифицированной поверхностью или указанной фармацевтической композиции в целевом сайте; и необязательно контейнер, вмещающий капсид вируса с модифицированной поверхностью для применения или композицию и письменные инструкции.

[0273] Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к применению описанного выше набора для профилактики, лечения и/или подавления вирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в указанном лечении.

7.6. Способы лечения заболевания

[0274] В объем настоящего изобретения также входит способ лечения субъекта, подверженного риску развития и/или прогрессирования заболевания, в том числе моногенного или полигенного генетического заболевания, в котором пациенту вводят терапевтически эффективное количество частицы AAV, предложенной в соответствии с настоящим изобретением. В этом контексте термин «терапевтически эффективный» описывает количество частиц AAV, достаточное для лечения заболевания, такого как генетическое заболевание, путем регрессии симптомов. Терапевтически эффективным также может быть количество, достаточное для предотвращения возникновения симптомов заболевания, такого как генетическое заболевание. Наличие риска возникновения заболевания может быть результатом, например, генетических и/или фенотипических симптомов, которые предрасполагают к заболеванию. В нескольких вариантах реализации определено, что пациент с риском генетического заболевания является носителем гена или имеет дефект гена, связанного с генетическим заболеванием.

[0275] В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания, которое можно лечить генной терапией, причем указанный способ включает введение капсида вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением субъекту, нуждающемуся в этом.

[0276] Клетки и/или субъекты, которых должны лечить капсидами вирусов с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно происходят от млекопитающего, в частности, от человека. Тем не менее, настоящее изобретение может быть полезным также в ветеринарии, процедурах культивирования клеток или даже при болезнях клеток растений, в зависимости от сходства механизмов проникновения в клетки. В нескольких вариантах реализации указанная клетка, подвергаемая лечению, представляет собой клетку млекопитающего, прокариотическую клетку или клетку растения. В конкретных вариантах реализации указанная клетка, подвергаемая лечению, представляет собой клетку человека.

[0277] В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен описанный выше способ лечения заболевания, включающий введение капсида вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением субъекту, нуждающемуся в этом, причем указанный капсид вируса с модифицированной поверхностью вводят субъекту в жидкой, сухой или полутвердой форме, такой как, например, в форме таблетки, таблетки, покрытой оболочкой, шипучей таблетки, капсулы, порошка, гранулята, таблетки, покрытой сахарной оболочкой, пастилки, пиллюли, ампулы, капле, суппозитория, эмульсии, мази, геля, настойки, пасты, крема, влажного компресса, раствора для полоскания горла, растительного сока, назального агента, ингаляционной смеси, аэрозоля, жидкости для полоскания рта, спрея для рта, спрея для носа или комнатного спрея.

[0278] Заболевание, подлежащее лечению описанным выше способом лечения заболевания, который включает введение субъекту капсида вируса с модифицированной поверхностью. В некоторых вариантах реализации указанное заболевание выбрано из следующих заболеваний: рак, наследственное моногенное заболевание, такое как наследственное заболевание сетчатки, генетическое заболевание кожи, такое как синдром Олмстеда или семейный первичный локализованный амилоидоз кожи, инфекционное заболевание, аденолейкодистрофия, дефицит альфа-1 антитрипсина, дефицит ароматических L-аминокислот, болезнь Баттена, мышечная дистрофия Беккера, бета-талассемия, болезнь Канавана, хроническая гранулематозная болезнь, синдром Криглера-Найяра, муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшенна, болезнь Фабри, семейный аденоматозный полипоз, семейная гиперхолестеринемия, семейный дефицит лецитин-холестерин-ацилтрансферазы, анемия Фанкони, галактосиалидоз, болезнь Гоше, гиратная атрофия, гемофилия А, гемофилия В, синдром Гурлера (мукополисахаридоз типа I), синдром Хантера (мукополисахаридоз типа II), хорея Хантингтона, пограничный буллезный эпидермолиз, поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз, недостаточность адгезии лейкоцитов, тазово-плечевая мышечная дистрофия, дефицит липопротеинлипазы, метахроматическая лейкодистрофия, синдром Слая (мукополисахаридоз типа VII), синдром Нетертона, дефицит орнитин-транскарбамилазы, болезнь Помпе, дефицит пуриновой нуклеозидфосфорилазы, рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз, Санфилиппо А (мукополисахаридоз типа IIIA), Санфилиппо В (мукополисахаридоз типа IIIB),

серповидно-клеточная анемия, тяжелый комбинированный иммунодефицит, спинальная мышечная атрофия, болезнь Тея-Сакса, синдром Вискотта-Олдрича, болезнь фон Гирке (болезнь накопления гликогена типа Ia), X-сцепленная миотубулярная миопатия, анемия терминальной стадии болезни почек, стенокардия (стабильная, нестабильная, рефрактерная), стеноз коронарной артерии, критическая ишемия конечностей, сердечная недостаточность, перемежающаяся хромота, ишемия миокарда, заболевание периферических сосудов, легочная гипертензия, венозные язвы, аденовирусная инфекция, цитомегаловирусная инфекция, инфекция вирусом Эпштейна-Барр, инфекция вирусом гепатита В, инфекция вирусом гепатита С, ВИЧ/СПИД, грипп, японский энцефалит, малярия, детское респираторное заболевание, респираторно-синцитиальный вирус, столбняк, туберкулез, гинекологический рак, рак молочной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак вульвы, рак нервной системы, глиобластома, лептоменингеальный канцероматоз, глиома, астроцитомы, нейробластома, ретинобластома, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак ободочной и прямой кишки, метастазы в печень, рак печени после гепатита, карцинома поджелудочной железы, карцинома желчного пузыря, гепатоцеллюлярная карцинома, рак мочевого пузыря, неоплазия предстательной железы, почек, мочевого пузыря, неоплазия аногенитальной области, рак кожи, меланома (злокачественная/метастатическая), рак головы и шеи, карцинома носоглотки, плоскоклеточная карцинома, рак пищевода, рак легкого, аденокарцинома, мелкоклеточный/немелкоклеточный, мезотелиома, гематологический рак, лейкоз, лимфома, множественная миелома, саркома, герминогенный рак, синдром Ли-Фраумени, рак щитовидной железы, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, синдром запястного канала, хроническая черепно-мозговая травма, синдром кубитального канала, диабетическая нейропатия, эпилепсия, гигантская аксональная нейропатия, поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз, рассеянный склероз, тяжелая миастения, боль, болезнь Паркинсона, периферическая невропатия, спинальная мышечная атрофия типа 2, ахроматопсия, возрастная макулярная дегенерация, хороидеремия, диабетический макулярный отек, глаукома, врожденный амавроз Лебера, макулярная телеангиэктазия типа 2, пигментный ретинит, поверхностное помутнение роговицы, X-сцепленный ретиношизис, артрит (ревматоидный, воспалительный, дегенеративный), дегенеративное заболевание суставов, тяжелое воспалительное заболевание прямой кишки, язвенный колит, хроническое заболевание почки, диабетическая язва, язва стопы, гиперактивность

детрузора, эректильная дисфункция, переломы, потеря слуха, наследственная миопатия с тельцами включения, реакция трансплантат против хозяина у пациентов с трансплантатом, мукозит слизистой оболочки полости рта, гипофункция околоушных слюнных желез, системная склеродермия, диабет I типа и заживление ран, или их комбинации.

[0279] Также предложен способ лечения заболевания, включающий введение капсида вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением нуждающемуся в этом субъекту, при этом указанный капсид вируса с модифицированной поверхностью вводят указанному субъекту или клетке в форме фармацевтической композиции, например, в комбинации с фармацевтически приемлемыми добавками, носителями, разбавителями, растворителями, наполнителями, скользящими веществами, вспомогательными веществами, связующими веществами или стабилизаторами. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанную композицию вводят указанному субъекту в форме спреев, покрытий, пен, лосьонов, гелей, жидкостей для полоскания рта, составов для перорального применения или инъекций. Указанная композиция может быть введена указанному субъекту системно, перорально или любым другим клинически/медицински приемлемым способом.

[0280] Еще один аспект настоящего изобретения относится к капсиду вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением для применения для трансфекции клетки, например, в качестве инструмента доставки генов в исследованиях. Указанное применение также может быть в косметических целях, и в объем настоящего изобретения входит способ косметического лечения по аналогии с медицинским лечением, описанным в настоящей заявке. Для этого введение капсида вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением субъекту или в клетку также можно осуществить в форме косметической композиции, например, в сочетании с косметически безопасными и приемлемыми добавками, носителями, разбавителями, растворителями, наполнителями, скользящими веществами, вспомогательными веществами, связующими веществами или стабилизаторами. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанную композицию вводят указанному субъекту в форме спреев, покрытий, пен, лосьонов, гелей, жидкостей для полоскания рта, составов для

перорального применения или инъекций. Указанная композиция может быть введена указанному субъекту системно, перорально или любым другим клинически/косметически приемлемым способом.

[0281] Квалифицированный специалист осведомлен о способах применения векторов, происходящих из AAV, для переноса генов *in vitro* и *in vivo*, таких как те, которые были описаны в WO 93/09239, US4797368, US 5139941 и EP 488 528.

[0282] Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему: а) капсид вируса с модифицированной поверхностью для трансфекции клеток, б) письменные инструкции по применению капсида вируса с модифицированной поверхностью для трансфекции клеток; и, необязательно, контейнер, вмещающий капсид вируса с модифицированной поверхностью и письменные инструкции.

7.6.1. Показания

[0283] Другой аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантным вирионам, содержащим капсид вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением для применения для лечения заболевания, и способам лечения заболевания путем введения эффективного количества рекомбинантных вирионов, содержащих капсид вируса с модифицированной поверхностью, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации композиции, предложенные в настоящем документе, предназначены для применения при лечении, включающем генную терапию. Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением предложено применение композиции капсида вируса с модифицированной поверхностью для получения лекарственного средства для генной терапии. Также в соответствии с настоящим изобретением предложен способ лечения, включающий генную терапию, причем указанный способ включает введение композиции капсида вируса с модифицированной поверхностью.

[0284] Вид заболевания, которое можно лечить или предотвращать с помощью капсида вируса с модифицированной поверхностью для применения в соответствии с настоящим изобретением, особо не ограничен. Заболевания, которые подлежат лечению или предотвращению с помощью капсида вируса с модифицированной поверхностью для применения в соответствии с настоящим изобретением, включают

такие заболевания, которые можно лечить с помощью генной терапии, такие как рак, наследственное моногенное заболевание, такое как наследственное заболевание сетчатки, генетическое заболевание кожи, такое как синдром Олмстеда или семейный первичный локализованный амилоидоз кожи, инфекционное заболевание, атаксия, аденолейкодистрофия, дефицит альфа-1 антитрипсина, дефицит ароматических L-аминокислот, болезнь Баттена, мышечная дистрофия Беккера, бета-талассемия, болезнь Канавана, хроническая гранулематозная болезнь, синдром Криглера-Найяра, муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшенна, болезнь Фабри, семейный аденоматозный полипоз, семейная гиперхолестеринемия, семейный дефицит лецитин-холестерин-ацилтрансферазы, анемия Фанкони, галактосиалидоз, болезнь Гоше, гиратная атрофия, гемофилия А и В, синдром Гурлера (мукополисахаридоз типа I), синдром Хантера (мукополисахаридоз типа II), хорея Хантингтона, пограничный буллезный эпидермолиз, поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз, недостаточность адгезии лейкоцитов, тазово-плечевая мышечная дистрофия, дефицит липопротеинлипазы, метахроматическая лейкодистрофия, синдром Слая (мукополисахаридоз типа VII), синдром Нетертона, дефицит орнитин-транскарбамилазы, болезнь Помпе, дефицит пуриновой нуклеозидфосфорилазы, рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз, Санфилиппо А (мукополисахаридоз типа IIIA), Санфилиппо В (мукополисахаридоз типа IIIB), серповидно-клеточная анемия, тяжелый комбинированный иммунодефицит, спинальная мышечная атрофия, болезнь Тея-Сакса, синдром Вискотта-Олдрича, болезнь фон Гирке (болезнь накопления гликогена типа Ia), X-сцепленная миотубулярная миопатия, анемия терминальной стадии болезни почек, стенокардия (стабильная, нестабильная, рефрактерная), стеноз коронарной артерии, критическая ишемия конечностей, сердечная недостаточность, перемежающаяся хромота, ишемия миокарда, заболевание периферических сосудов, легочная гипертензия, венозные язвы, аденовирусная инфекция, цитомегаловирусная инфекция, инфекция вирусом Эпштейна-Барр, инфекция вирусом гепатита В, инфекция вирусом гепатита С, ВИЧ/СПИД, грипп, японский энцефалит, малярия, детское респираторное заболевание, респираторно-синцитиальный вирус, столбняк, туберкулез, гинекологический рак, рак молочной железы, яичника, шейки матки, вульвы, рак нервной системы, глиобластома, лептоменингеальный канцероматоз, глиома, астроцитомы, нейробластома, ретинобластома, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак ободочной и прямой кишки, метастазы в печень, рак печени после гепатита, карцинома

поджелудочной железы, карцинома желчного пузыря, гепатоцеллюлярная карцинома, рак мочеполовой системы, неоплазия предстательной железы, почек, мочевого пузыря, неоплазия аногенитальной области, рак кожи, меланома (злокачественная/метастатическая), рак головы и шеи, карцинома носоглотки, плоскоклеточная карцинома, рак пищевода, рак легкого, аденокарцинома, мелкоклеточный/немелкоклеточный, мезотелиома, гематологический рак, лейкоз, лимфома, множественная миелома, саркома, герминогенный рак, синдром Ли-Фраумени, рак щитовидной железы, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, синдром запястного канала, хроническая черепно-мозговая травма, синдром кубитального канала, диабетическая нейропатия, эпилепсия, гигантская аксональная нейропатия, поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз, рассеянный склероз, тяжелая миастения, боль, болезнь Паркинсона, периферическая невропатия, спинальная мышечная атрофия типа 2, ахроматопсия, возрастная макулярная дегенерация, хороидеремия, диабетический макулярный отек, глаукома, врожденный амавроз Лебера, макулярная телеангиэктазия типа 2, пигментный ретинит, поверхностное помутнение роговицы, X-сцепленный ретиношизис, артрит (ревматоидный, воспалительный, дегенеративный), дегенеративное заболевание суставов, тяжелое воспалительное заболевание прямой кишки, язвенный колит, хроническое заболевание почки, диабетическая язва/язва стопы, гиперактивность детрузора, эректильная дисфункция, переломы, потеря слуха, наследственная миопатия с тельцами включения, реакция трансплантат против хозяина у пациентов с трансплантатом, мукозит слизистой оболочки полости рта, гипофункция околоушных слюнных желез, системная склеродермия, диабет I типа и/или заживление ран.

[0285] В некоторых вариантах реализации атаксия, подлежащая лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой атаксию, связанную с наследственным расстройством, состоящим из дегенерации мозжечка или позвоночника, и может проявляться перекрывающейся мозжечковой и даже сенсорной атаксией. Наследственные расстройства, вызывающие атаксию, включают аутосомно-доминантные расстройства, такие как спиноцеребеллярная атаксия, эпизодическая атаксия и дентато-рубро-паллидо-люйсова атрофия, а также аутосомно-рецессивные расстройства, такие как атаксия Фридрейха (сенсорная и мозжечковая, с преобладанием первой) и болезнь Ниманна-Пика, атаксия-телеангиэктазия (сенсорная и мозжечковая, с преобладанием второй) и абетаполипротеинемия. Примером X-

сцепленного атаксического состояния является редкий синдром ассоциированного с ломкой X-хромосомой тремора/атаксии или FXTAS.

[0286] В некоторых вариантах реализации показание, подлежащее лечению, представляет собой дефицит липопротеинлипазы, крупно-В-клеточную лимфому, бета-талассемию, мантийноклеточную лимфому, заболевание периферических артерий, связанное с фактором роста эндотелия сосудов, плоскоклеточную карциному головы и шеи, спинальную мышечную атрофию, дефицит аденозиндезаминазы (ADA-SCID), меланому у пациентов с рецидивирующими поражениями кожи, В-клеточный лимфобластный лейкоз или врожденный амавроз Лебера.

[0287] В некоторых вариантах реализации показания, которые подлежат лечению, включают болезнь Шарко-Мари-Тута (все типы), ганглиозидоз (все типы), генетическую эпилепсию (т.е. синдром Драве), комплекс туберозного склероза, повреждение спинного мозга, все демиелинизирующие наследственные моторные и сенсорные невропатии (HMSN), болезнь Краббе, прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию, нейрофиброматоз 1 и 2, эссенциальный тремор, синдром ломкой X хромосомы, синдром Леша-Нихена, миотоническую дистрофию, множественную системную атрофию (MSA), синдром Зелвегера, нейромиелит зрительного нерва или болезнь Девика, центральный понтинный миелинолиз, миелопатии, такие как спинная сухотка (сифилитическая миелопатия), лейкоэнцефалопатии, такие как прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия, лейкодистрофии и синдром Гийена-Барре и его хронический аналог - хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию.

[0288] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения показание, которое подлежит лечению, представляет собой периферическую нейропатию, ассоциированную с анти-MAG, или состояния, связанные с дефицитом меди (периферическая нейропатия, миелопатия и редко оптическая нейропатия), или прогрессирующую воспалительную нейропатию.

7.6.2. Способы введения

[0289] Другой аспект настоящего изобретения относится к способам введения капсида вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением для применения для лечения заболевания.

[0290] В нескольких вариантах реализации капсид вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением может быть введен непосредственно или опосредованно с применением подходящих средств, известных в данной области техники. Способы и применения в соответствии с настоящим изобретением включают доставку и введение композиции капсида вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением системно, регионарно или местно, или любым путем, например, путем инъекции, инфузии, перорально (например, путем проглатывания или вдыхания) или топически (например, трансдермально). Примеры путей введения и доставки включают следующие пути: внутривенный (в/в), внутрисуставной, интраперитонеальный (и/п), внутриартериальный, внутримышечный, парентеральный, подкожный, интраплевральный, топический, дермальный, интрадермальный, трансдермальный, парентеральный, например, трансмукозальный, интракраниальный, интраспинальный, пероральный (алиментарный), слизистый, дыхательный, интраназальный, интубационный, внутрилегочный, путем внутрилегочной инстилляцией, буккальный, сублингвальный, внутрисосудистый, интратекальный, внутриполостной, ионофоретический, внутриглазной, офтальмологический, в зрительный нерв, внутрижелезистый, внутрь органа, внутрилимфатический, интратекальный, интрацистернальный. Ожидаются усовершенствования в средствах предоставления индивиду или клетке, ткани, органу указанного индивида композиции капсида вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением с учетом прогресса, который уже был достигнут на сегодняшний день. Такие будущие усовершенствования, разумеется, могут быть включены для достижения упомянутого эффекта настоящего изобретения. В некоторых вариантах реализации на этапе введения капсида вируса с модифицированной поверхностью в соответствии с настоящим изобретением композицию капсида растворяют в растворе, совместимом со способом доставки. В некоторых вариантах реализации состав для внутривенного, подкожного, внутримышечного, интратекального, внутрисуставного и/или внутрижелудочкового введения представляет собой композицию капсида, составленную в виде физиологического солевого раствора.

7.7. Примеры

Обобщение экспериментальных наблюдений

[0291] Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) стал предпочтительным вектором доставки генов *in vivo* как в фундаментальных исследованиях, так и для клинического применения. Рекомбинантные векторы AAV не осуществляют сайт-специфического встраивания в геном хозяина, и это, в сочетании с незначительной иммуногенностью, делает их одной из самых безопасных стратегий генной терапии (Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 2017;31:317-34). Несмотря на их явные преимущества перед другими вирусными векторами для применения *in vivo*, у AAV все же есть некоторые ограничения. Например, они неэффективны для трансдукции некоторых типов клеток; в результате, для эффективного переноса генов часто требуются высокие титры. Это, в свою очередь, приводит к нецелевым действиям в результате трансдукции неподходящих типов клеток, значительно повышает производственные затраты и приводит к токсичности.

[0292] Усилия по улучшению опосредованной AAV доставки генов первоначально были сосредоточены на использовании серотипов дикого типа, которые демонстрируют различный тропизм к разным типам клеток. Путем получения псевдотипированных AAV, содержащих трансгены, фланкированные ITR из серотипа 2, и капсиды из других серотипов дикого типа, можно модифицировать специфичность трансдукции рекомбинантного вектора. Совсем недавно были разработаны синтетические капсиды AAV, которые содержат капсидные белки, полученные в результате направленной эволюции или рационального дизайна (Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated *In vivo* Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018;8:87-104). Этот подход проиллюстрирован разработкой сконструированных капсидов AAV-PHP.eB и AAV-PHP.S, которые трансдуцируют центральную и периферическую нервную систему (Chan KY, Jang MJ, Yoo BB, Greenbaum A, Ravi N, Wu WL, et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci* 2017;20:1172-9). Эти варианты могут быть системно введены мышам для нацеливания на весь головной мозг или периферические ганглии. Однако, несмотря на успех таких подходов, у векторов AAV, в которых была сконструирована первичная аминокислотная последовательность

белков капсида VP1, VP2 и/или VP3, все еще есть некоторые недостатки, такие как высокие титры, необходимые для системной трансдукции, и сомнения насчет их трансляционного потенциала за рамками моделей на грызунах.

[0293] Одним из аспектов решения этих проблем авторами настоящего изобретения было предоставление метода на основе химии белка, который облегчает целевую доставку капсида вируса (в составе рекомбинантного вириона AAV) с инкапсидированным в него грузом в выбранные клетки. В этом описании авторы предлагают сшивание лигандов с капсидом AAV посредством биоортогональной химии для улучшения тропизма и/или для повышения эффективности трансдукции. В некоторых вариантах реализации лиганд капсида вируса с модифицированной поверхностью связывается со своими когнантными рецепторами на поверхности клеток млекопитающего для селективного опосредования доставки гена в типы клеток, на которых выставлен соответствующий когнантный рецептор, обеспечивая тем самым целевую доставку вирусного гена.

[0294] В некоторых из экспериментов, описанных ниже, авторы настоящего изобретения получили неинфекционный вирус AAV серотипа 2 путем мутации связывающего гепарансульфатпротеогликан мотива в капсиде (Kern A, Schmidt K, Leder C, Müller OJ, Wobus CE, Bettinger K, et al. Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids. *Journal of Virology* 2003;77:11072-81) (R585/588A, названный AAV2-ΔHSPG), а затем химически модифицировали выставленные на поверхности остатки лизина на собранном капсиде ΔHSPG-AAV2 реакционноспособным линкером, содержащим представителя способной образовывать сшивку пары, например, бензилгуанин (BG) и циклооктин (DBCO). Затем авторы смогли сшить с вирусом функционализированные лиганды со слитыми с ними меткой SNAP или азидной функциональной группой и восстановить инфекционность вируса зависимым от рецептора образом.

[0295] Изначально авторы протестировали систему с применением белковых лигандов, таких как нейротрофины и цитокины (IL31), поскольку рецепторы для этих молекул экспрессируются в субпопуляциях клеток в коже и периферической нервной системе. Затем авторы продолжили сравнивать белковые лиганды, такие как одноцепочечные антитела (scFv), против тех же рецепторов, чтобы понять, улучшают ли они нацеливание на лиганд. Авторы также исследовали другие классы лигандов, такие как

холерный токсин В (СТВ) и различные лектины, с целью кодировать в AAV ту же функциональную группу, которая есть у лигандов, например, для ретроградного транспорта в случае СТВ или улучшенного связывания с углеводами на поверхности клеток в случае лектинов.

[0296] Параллельно авторы настоящего изобретения также оценили другие биоортогональные химические реакции в дополнение к конъюгации BG-метка SNAP и эффект от включения более длинных спейсеров в линкер. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что реакция стимулируемой напряжением клик-химии азид-алкин (SPAAC) между дибензоцилооктиновой группой (DBCO) и азидогруппой неожиданно дополнительно повышает эффективность. Это позволяет легко конъюгировать AAV с коммерчески доступными пептидными и белковыми лигандами без необходимости получать слитые со SNAP белки.

[0297] Таким образом, полученные авторами результаты свидетельствуют о том, что этот подход к химической модификации имеет ряд преимуществ по сравнению с капсидами AAV с модифицированной последовательно. В отличие от капсидов с модифицированной последовательностью, для которых пока еще было определено лишь несколько тканеспецифических вариантов для тканей человека, несмотря на огромные усилия в исследованиях, в подходе авторов настоящего изобретения задействуется огромное количество известных взаимодействий рецептор-лиганд клеток человека для придания тропизма. В отличие от капсидов с модифицированной последовательностью, для которых необходимо эмпирически определить тропизм к тканям, когда авторы настоящего изобретения удаляют природный сайт связывания капсида AAV с клетками, то этот подход обеспечивает высокую специфичность нацеливания на клетки, которую придает специфичность присоединенного лиганда к рецептору. И когда присоединены лиганды, которые повышают трансдукцию без удаления или изменения нативного сайта связывания капсида с клеткой, достигается большая эффективность трансдукции без значительного изменения известного тропизма.

[0298] Кроме того, подход авторов совместим с любой платформой для получения AAV, не влияя на выход вируса. Способы, предложенные в настоящем документе, также недороги для осуществления и масштабируемы от мелкомасштабных применений в исследованиях до производства в клинических масштабах. Наконец,

предоставленная платформа для модификации поверхностей капсидов AAV является модульной, что позволяет практически любую комбинацию вирус/лиганд, и это должно облегчить ее переход с моделей на грызунах на пациентов-людей.

[0299] В Таблице 1 ниже обобщены некоторые эксперименты с AAV с лигандами, подробно описанные ниже в Примерах 1 - 8.

Таблица 1								
Лиганд	Класс	Рецептор	Маркер	Тип AAV	Химия	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Примечания
NGF ^{R121W}	Белок	TrkA	Ноцицепторов	AAV2-ΔHSPG	BG-SNAP	Клетки PC12, нейроны DRG, органотипическая культура спинного мозга	и/п, в/в, интраневральный, подкожный	Перекрывание с окрашиванием антителом против TrkA в DRG
BDNF	Белок	TrkB	Механорецепторов	AAV2-ΔHSPG	BG-SNAP	Нейроны DRG		
NT3	Белок	TrkC	Проприорецепторов	AAV2-ΔHSPG	BG-SNAP	Нейроны DRG		
IL31 ^{K134A}	Белок	IL31RA/OSMR	Кератиноцитов и прурецепторов	AAV2-ΔHSPG	BG-SNAP	Первичные кератиноциты	Подкожный	Отсутствие сигнала у мышей IL31RA ^{-/-}
<u>Немолизумаб</u>	scFv	IL31RA	Кератиноцитов и прурецепторов	AAV2-ΔHSPG	BG-SNAP и DBCO-азид	Планируется	и/п, в/в, подкожный	
Субъединица В холерного токсина	Субъединица токсина	Ганглиозид GM1	Крупных нейронов DRG. Ретроградный индикатор	AAV2-ΔHSPG	BG-SNAP и DBCO-азид	Нейроны DRG	Подкожный, интраневральный	
Агглютинин проростков пшеницы	Лектин	N-ацетилглюкозамин	Всех нейронов	AAV2-ΔHSPG, PHP.S	BG-SNAP и DBCO-азид	Клетки PC12, нейроны DRG, органотипическая культура спинного мозга	в/в, интраневральный, подкожный, префронтальная кора	Также повышает эффективность PHP.S в нейронах DRG.
Изолектин В4	Лектин	α-галактоза	Сосудов, неперитидергических ноцицепторов, микроглии	AAV2-ΔHSPG, AAV2, AAV9	DBCO-азид	Клетки PC12, нейроны DRG, органотипическая культура спинного мозга	Интраневральный, подкожный, спинной мозг	Также повышает эффективность AAV2 и AAV9 в клетках PC12.

[0300] В последующих экспериментах авторы настоящего изобретения использовали другие способные образовывать сшивку пары, которые не требуют добавления слияний с меткой SNAP для функционализации лиганда.

Пример 1. Удаление природных сайтов связывания в AAV2

[0301] Одна из целей ранних экспериментов авторов настоящего изобретения состояла в том, чтобы сконструировать капсид аденоассоциированного вируса (AAV) таким образом, чтобы вирус селективно трансдуцировал представляющие интерес клетки. Это было достигнуто путем удаления природных сайтов связывания с клетками в нативном(-ых) белке(-ах) капсида AAV, например, путем мутации, как описано в настоящем документе. Затем капсид химически функционализировали для конъюгации с функционализированным лигандом. Биоортогонально функционализированные лиганды затем ковалентно присоединяли к вирусу и тестировали *in vitro* на клетках и *in vivo* на мышах. Хотя исследовали AAV2, AAV9 и PHP.S, эти примеры также можно легко применять и по отношению к другим капсидам вируса.

[0302] AAV2 связывается с гепарансульфатпротеогликанами через аргинин 585 и 588. Эти положения были мутированы на аланин для создания делеции ΔHSPG с мутациями в гене CAP R585A + R588A.

[0303] Плазида pTAV2-0 содержит весь геном AAV-2 из pAV-2, включая оба инвертированных концевых повтора, клонированных в сайт BamHI pBluescript II. Субплазида, содержащая подходящий фрагмент AAV-2, была создана и применена в качестве матрицы для реакций сайт-направленного мутагенеза. Мутагенез был выполнен с применением набора QuikChange для сайт-направленного мутагенеза от Stratagene (Амстердам, Нидерланды), в соответствии с протоколом производителя. Для каждого мутанта были разработаны два комплементарных праймера ПЦР, содержащие последовательность замены, фланкированную от 15 до 20 гомологичными парами оснований на каждой стороне от мутации. Мутантные плазмиды были идентифицированы путем секвенирования ДНК. Фрагмент, содержащий подходящую мутацию, затем субклонировали в плазмидный остов (например, pTAV2-0), содержащий остальную часть белка, и полный фрагмент секвенировали для проверки дополнительных мутаций при ПЦР.

[0304] Рекомбинантный AAV2-ΔHSPG, несущий мутации в гене CAP R585A + R588A (Kern A, Schmidt K, et al. Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids. *Journal of virology* 2003;77:11072-81) и несущий tdTomato под контролем промотора CAG в качестве груза, получали либо в клетках HEK293, либо в клетках насекомых SF21, как описано ранее (Grieger JC, et al. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* 2006;1:1412-28; Wu Y, et al. A Recombinant Baculovirus Efficiently Generates Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in Cultured Insect Cells and Larvae. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018;10:38-47). Клетки собирали через 5 дней после инфицирования, лизировали 0,5% тритоном X-100, обрабатывали нуклеазами, концентрировали тангенциальной проточной фильтрацией и очищали с применением изопикнического ультрацентрифугирования (Dias Florencio G, et al.. Simple downstream process based on detergent treatment improves yield and *in vivo* transduction efficacy of adeno-associated virus vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2015;2:15024). Титрование генома вектора проводили с применением количественной ПЦР (кПЦР) с праймерами, нацеленными на промоторную область груза вируса (Grieger 2006).

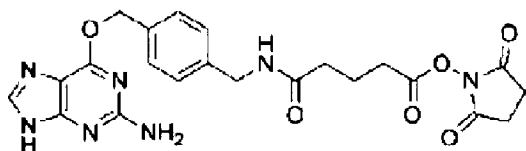
Пример 2. Функционализация BG-NHS ΔHSPG, чтобы он позволял присоединение лигандов с меткой SNAP

[0305] Селективное присоединение лигандов к белкам, например, мечение белка, часто осуществляют путем включения биоортогональных групп в белок с последующими хемоселективными модификациями. Этот подход также называют «пометь и измени» («tag and modify»). Разработано множество биоортогональных реакций, которые можно классифицировать на: (1) реакции конденсации с помощью карбониллов, (2) клик-реакции с помощью азидов, (3) реакции циклоприсоединения Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (DAINV) и другие реакции циклоприсоединения, (4) катализируемые переходными металлами реакции сочетания и снятия защитных групп и (5) реакции мечения по остаткам цистеина, описанные выше.

[0306] В первой серии экспериментов, которые провели авторы настоящего изобретения, бензилгуанин (BG) присоединяли к выставленному на поверхности лизину путем осуществления реакции вируса с бензилгуанином-сложным эфиром NHS (также называемым субстратом метки SNAP, BG-NHS или BG-GLA-NHS). Для этого с

помощью иглы безводный DMSO добавляли во флакон с сухим лигандом метки SNAP - BG-NHS - до желаемой конечной концентрации (например, 20 мМ) при комнатной температуре. Белок, который предстояло функционализировать амином, разбавляли в растворителе (ФБР) до нужной конечной концентрации. Указанные два препарата смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 180 минут с последующим удалением непрореагировавших компонентов с применением центрифужного фильтрующего блока с пределом отсечения по молекулярной массе (MWCO) 100 кДа.

BG-GLA-NHS:



Пример 3. Рекомбинантные лиганды с С-концевыми метками SNAP

[0307] При использовании этой системы есть два этапа: клонирование и экспрессия представляющего интерес белка в виде слитой молекулы с меткой SNAP[®] и мечение полученной слитой молекулы выбранным субстратом метки SNAP. Метка SNAP представляет собой небольшой белок на основе белка репарации ДНК человека - Об-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы (hAGT). Субстрат метки SNAP в этом случае представляет собой уходящую группу гуанина, присоединенную к бензильному линкеру. В реакции мечения замещенная бензильная группа субстрата ковалентно присоединяется к метке SNAP.

[0308] Система мечения белка меткой SNAP позволяет специфичное ковалентное присоединение практически любой молекулы к представляющему интерес белку (в Примере 4 ниже описаны проведенные эксперименты).

[0309] Рекомбинантные лиганды с С-концевыми метками SNAP получали в *E. coli* или в клетках млекопитающих. Для ковалентных присоединений лиганды с меткой SNAP затем присоединяли к модифицированному BG вирусу (см. **Фиг. 1**) путем добавления насыщающих концентраций лиганда с меткой SNAP и инкубации при комнатной температуре в течение ночи. Избыток непрореагировавшего лиганда удаляли путем

пропускания реакционной смеси через центрифужный фильтрующий блок с MWCO 100 кДа.

[0310] Для настоящего изобретения эксперименты проводили в соответствии с инструкциями к набору SNAP-Cell® Starter Kit (NEB), содержащему плазмиду для экспрессии в млекопитающих (pSNAPf), кодирующую метку SNAP®, фланкированную сайтами рестрикции для клонирования представляющего интерес гена, с модификациями для цели настоящего изобретения.

Пример 4. Нацеливание и повышение эффективности трансдукции - тестирование *in vitro* и *in vivo* модифицированного BG-GLA-NHS капсида ΔHSPG AAV с рекомбинантными лигандами с С-концевыми метками SNAP

[0311] Приведенную выше стратегию модификации поверхности капсида тестировали с множеством классов лигандов, чтобы определить, может ли лиганд изменять тропизм, а именно с белковыми лигандами, такими как факторы роста, цитокины и т. д.; субъединицами токсинов, такими как субъединица В холерного токсина; лектинами, такими как изолектин В4 или агглютинин проростков пшеницы; факторами адгезии, такими как лактадгерин; антителами, такими как антитело против CD-34 (маркер стволовых клеток); и пептидами, такими как лиганд дельторфинового опиоидного рецептора.

Пример 4а. Капсид ΔHSPG неинфекционный, капсид вируса с модифицированной поверхностью восстанавливает свою эффективность трансдукции

[0312] Сначала было показано, что частица вируса ΔHSPG, в соответствии с настоящим изобретением, не обладает остаточной инфекционной активностью, как это было протестировано на сенсорных нейронах в модели на мышах с флуоресцентным репортером (Фиг. 2). Слияние с агглютинином проростков пшеницы (WGA, лектин; т.е. WGA-SNAP) (поверхность капсида вируса, модифицированная WGA с помощью химии линкера BG/SNAP) улучшило эффективность вирусной трансдукции до 100% или даже лучше при тестировании на сенсорных нейронах в той же модели на мышах с флуоресцентным репортером (Фиг. 3).

[0313] Затем было протестировано несколько лигандов: нейротрофические факторы NGF, NT3 и BDNF (белковые лиганды) доставляли вирус в различные специфические

популяции нейронов, то есть они придавали разный тропизм в зависимости от фактора, применяемого в капсидной конструкции, протестированной в модели на мышах с флуоресцентным репортером (**Фиг. 4а - 4с**). Субъединица В холерного токсина (токсин) специфично направляла вирус ретроградно к телам нервных клеток (т.е. специфично к компартментам/частям клеток) (**Фиг. 5**). В аналогичных тестах лактадгерин (фактор адгезии) специфично направлял вирус к макрофагам и нейронам, на поверхности которых выставлен фосфатидилсерин, и дельторфин (пептид) специфично направлял вирус к нейронам, экспрессирующим опиоидные рецепторы мю и дельта.

[0314] В экспериментах, показанных на **Фиг. 6а - 6б**, поверхность капсида, модифицированную лигандом NGF IV, вводили в ганглии тройничного нерва, затем через три недели собирали и анализировали ткань сенсорных нейронов. Срезы ткани окрашивали антителом против TrkA (рецептор для NGF), и было обнаружено очень хорошее перекрывание. Окрашивание антитела TrkA не идеально, поэтому перекрывание 80% очень существенно.

[0315] В экспериментах, показанных на **Фиг. 7**, срезы с **Фиг. 6а - 6с** были окрашены антителами против NF200 и IB4, которые метят другие нейроны (механорецепторы и непептидергические ноцицепторы, соответственно). Опять же, эти маркеры не идеальны, но можно видеть, что зеленые и синие клетки отличаются от красных инфицированных клеток.

[0316] В качестве отрицательного контроля, введение лиганда IL31 посредством вируса мыши с нокаутом рецептора IL31 не приводит к инфекции.

[0317] Таким образом, все меченые лигандом вирусы успешно и специфично трансдуцировали только те клетки, которые экспрессируют соответствующий рецептор, как при нанесении *in vitro* на культивируемые клетки, так и при введении *in vivo* мышам, т.е. указанные вирусы могут быть инъецированы системно или местно и могут селективно нацеливаться на различные популяции клеток.

Пример 4б. Нацеливание на TrkA+ ноцицепторы

[0318] В этом примере конструкция капсида с модифицированной поверхностью была нацелена на TrkA+ ноцицепторы в периферической нервной системе. Лиганд

NGF^{R121W}, который связывает, но не активирует TrkA, был сшит с ΔHSPG-AAV2 (капсид получен, как описано выше) с грузом tdTomato. Полученную конструкцию вводили мышам путем инъекции подкожно, интраневрально, ретроорбитально и интраперитонеально. Через три недели флуоресценцию детектировали и количественно анализировали с применением антитела против TrkA.

[0319] Было установлено, что для ретроорбитального применения 80% TrkA⁺ клеток были инфицированы NGF-AAV. 83% инфицированных NGF-AAV клеток были TrkA⁺. Было также установлено, что различные пути введения существенно не различались по своим высокоэффективным результатам.

Пример 4с. Нацеливание на IL31RA+ рецепторы зуда

[0320] В этом примере на IL31RA нацеливались с помощью AAV, поверхность которого была модифицирована так, что она содержала лиганд, нацеленный на IL31^{K134A}, который связывается, но не активирует IL31RA. IL31RA был сшит с ΔHSPG-AAV2 (капсид, описанный выше) с грузом tdTomato. Конструкция была инъецирована мышам дикого типа и мышам с нокаутом IL31RA. Через три недели была детектирована флуоресценция от репортерного гена, и провели количественный анализ перекрытия с применением антитела против кератина 14. Было обнаружено, что целевые клетки были практически полностью положительными по K14. Важно, что у мышей с нокаутом IL31RA не детектировалась экспрессия tdTomato.

Пример 4d. Нацеливание с помощью изолектина B4

[0321] В этом примере изолектин B4 (IB4) был конъюгирован с ΔHSPG-AAV2, описанным выше, с грузом tdTomato. IB4 может быть применен в качестве маркера для сосудов, непептидергических ноцицепторов и/или микроглии. Конструкцию вводили путем инъекции подкожно, интраневрально или интраспинально. Через три недели была детектирована флуоресценция. Было обнаружено, что целевые клетки были практически полностью положительными, независимо от пути введения.

Пример 4е. Нацеливание с помощью агглютинина проростков пшеницы

[0322] В этом примере агглютинин проростков пшеницы (WGA) был конъюгирован с ΔHSPG-AAV2, описанным выше, с грузом tdTomato. WGA связывается с N-ацетилглюкозамином на клеточной мембране большинства нейронов и применяется в

качестве (транссинаптического) индикатора. Конструкцию инъецировали внутривенно новорожденным мышам в день P1 или интракортикально взрослым мышам. Через три недели была обнаружена флуоресценция от репортерного гена.

[0323] Было обнаружено, что доставка генов более эффективна в случае вирусов с лигандом (см. **Фиг. 8a - 8b**). Культивированные нейроны DRG были инфицированы вариантом AAV9 PHP.S (1E+9 геномов вектора (гв)), и было установлено, что указанная выше модифицированная конструкция WGA привела к значительному увеличению доставки (см. **Фиг. 8b**).

Пример 5. Нацеливание с помощью лигандов нейротрофинов

[0324] Авторы настоящего изобретения выбрали лиганды нейротрофины NGF, BDNF и NT3 для конъюгации с AAV2-ΔHSPG, поскольку их рецепторы метят функционально различные популяции периферических сенсорных нейронов. Авторы настоящего изобретения также создали мутантный NGF^{R121W}, который связывает TrkA, но не передает сигнал через него. Таким образом, NGF^{R121W} был выбран для оценки нацеливания на AAV с помощью лиганда.

[0325] В качестве стратегии конъюгации авторы настоящего изобретения сначала попытались кодировать метку CLIP на N-конце белка VP2 AAV2 с целью присоединения меченых SNAP лигандов с помощью бифункциональных линкеров. Этот подход не был успешным, потому что капсиды вирусов AAV не смогли поддерживать включение метки CLIP, и вместо этого продуцировались лишь с белками VP1 и VP3 в их капсиде. Авторы настоящего изобретения дополнительно исследовали вставку более мелких меток, таких как Spytag, для последующей конъюгации со слитыми лигандом и Spycatcher. Вставка Spytag в положение 588 в капсиде вируса привела к появлению вирусных частиц, содержащих Spytag, однако выход был снижен более чем в 10 раз. Эти эксперименты иллюстрируют трудности, связанные с генетической инженерией капсида AAV для присоединения нацеливающих лигандов.

[0326] Для решения этой проблемы авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что, поскольку капсид AAV содержит большое количество выставленных на поверхности остатков лизина (более 1000), он должен поддаваться модификации с помощью аминореактивных химических групп, таких как сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды (NHS). Таким образом, теоретически, авторы настоящего

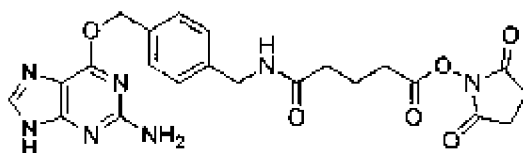
изобретения могли бы украсить капсид AAV способными вступать в реакцию с меткой SNAP группами бензилгуанина (BG) посредством реакции мечения зондом NHS-BG. Поэтому авторы настоящего изобретения провели реакции с диапазоном молярных соотношений BG-GLA-NHS к AAV2-ΔHSPG и нанесли полученный очищенный продукт на выделенные нейроны ганглия заднего корешка (DRG). В результате этого эксперимента авторы настоящего изобретения определили, что модифицированный NGF^{R121W}AAV2-ΔHSPG действительно трансдуцировал популяцию нейронов DRG при оптимальном молярном соотношении BG-GLA-NHS к AAV2-ΔHSPG, составляющем 3E+9 гв вируса на 1,73 нмоль линкера, в то время как AAV2-ΔHSPG отдельно был неэффективен (Фиг. 9a - 9f). После этого авторы настоящего изобретения оптимизировали реакцию (см. способы ниже) и обнаружили, что после того, как оптимальное соотношение для каждого препарата AAV было определено опытным путем, модификация работает с широким диапазоном реакционноспособных линкеров, например, таковых с производными сложного эфира NHS, концентраций и чистоты вируса и классами лигандов.

Способы

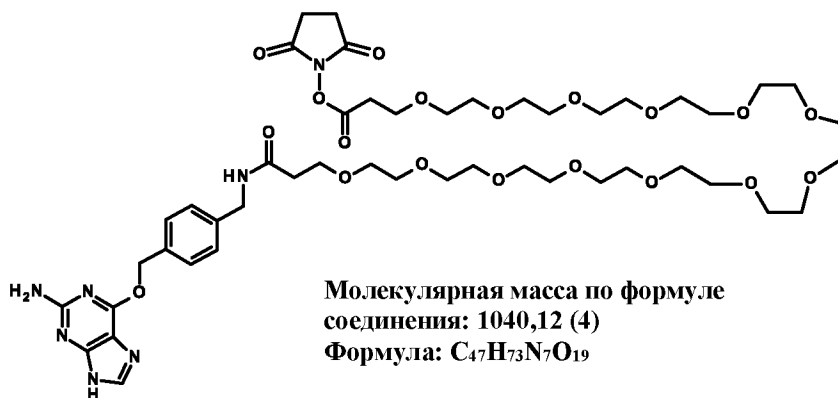
[0327] Рекомбинантный AAV2-ΔHSPG получали в соответствии с процедурой, описанной в Примере 1.

Пример 5a. Нацеливание с помощью NGF^{R121W}-SNAP::AAV2-ΔHSPG

[0328] NGF^{R121W}-SNAP продуцировали в клетках млекопитающих, как описано ранее (Nocchi L, et al. Nerve growth factor-mediated photoablation of nociceptors reduces pain behavior in mice. *Pain* 2019). Для конъюгации с AAV проводили реакцию очищенного AAV2-ΔHSPG с BG-GLA-NHS (NEB) или BG-PEG13-NHS (синтез по заказу) при предполагаемом молярном соотношении гв к линкеру NHS, составляющем 3E+9 гв вируса на 1,73 нмоль линкера, в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа и дополнительно инкубировали с 5 мкМ NGF^{R121W}-SNAP в течение ночи при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего NGF^{R121W}-SNAP удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и сшитый продукт ресуспендировали в ФБР.



BG-GLA-NHS



Молекулярная масса по формуле
соединения: 1040,12 (4)
Формула: C₄₇H₇₃N₇O₁₉

BG-PEG13-NHS

Интъекции *in vivo* и проводка тканей

[0329] Для экспериментов с интъекциями *in vivo* мышам проводили анестезию 2 - 2,5% изофлураном, а затем вводили интъекции подкожным, интраневральным, интраперитонеальным или ретроорбитальным (в/в) путями. Для подкожной интъекции в подошвенную поверхность лапы вводили 3E+10 гв NGF^{R121W}-SNAP::AAV2-ΔHSPG в объеме 10 мкл. Для интраневральной интъекции в седалищный нерв вводили 3E+9 гв NGF^{R121W}-SNAP::ΔHSPG-AAV2 в объеме 2 мкл. Для интраперитонеальной интъекции и ретроорбитальных интъекций вводили 8E+10 гв или 3E+10 гв NGF^{R121W}-SNAP::ΔHSPG-AAV2. Через 3 недели ганглии заднего корешка и ганглии тройничного нерва собирали, фиксировали в 4% параформальдегиде, просветляли в ScaleS и подготавливали в виде тотальных препаратов образцов. В некоторых экспериментах также делали срезы DRG толщиной 10 мкм, инкубировали с блокирующим раствором, содержащим 5% сыворотки и 0,3% тритона X в ФБР, в течение 30 мин, а затем с антителом против TrkA (R&D systems, 1:200) в блокирующем растворе в течение ночи при 4 °С. В блокирующий раствор добавляли вторичные антитела на 1 – 2 ч и предметные стекла закрепляли с помощью ProLong Gold. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 и анализировали в ImageJ.

Результаты

[0330] Для тестирования вирусной трансдукции *in vitro* $1E+9$ гв в 100 мкл ФБР добавляли к нейронам ганглия заднего корешка в 96-луночном планшете. Флуоресценцию отслеживали ежедневно, и обычно она проявлялась через 24 часа, достигая максимума через 4 дня. Как показано на **Фиг. 10а - 10с**, AAV2-ΔHSPG, связанный с NGF^{R121W} , BDNF и NT3, нацеливается на морфологически различные субпопуляции клеток.

[0331] Для тестирования вирусной трансдукции *in vivo* $NGF^{R121W}::AAV2-\Delta HSPG$ в 10 мкл ФБР вводили мышам либо внутриорбитально, либо интраперитонеально, либо интраневрально, либо подкожно. Через 3 недели мышей умерщвляли, и собирали ткани для мониторинга флуоресценции репортерного гена в разных органах.

Пример 5b. Влияние длины линкера на трансдукцию $NGF^{R121W}::AAV2-\Delta HSPG$ в DRG

[0332] В первоначальных экспериментах авторы настоящего изобретения протестировали два различных реакционноспособных линкера: короткий, названный BG-GLA-NHS, доступный для приобретения у NEB, и «длинный», названный BG-PEG13-NHS, который авторы настоящего изобретения синтезировали самостоятельно. Эквивалентные количества ($3E+10$ гв) $NGF^{R121W}::AAV2-\Delta HSPG$, модифицированного либо BG-GLA-NHS, либо BG-PEG13-NHS, вводили внутриорбитально мышам и собирали DRG для оценки эффективности трансдукции. См. **Фиг. 11а - 11f**. В результате этих экспериментов стало ясно, что более длинный линкер работает намного лучше, чем более короткий, без привязки к какой-либо конкретной теории, одним возможным объяснением может быть большая стабильность и/или потенциальное уклонение от иммунной системы *in vivo*.

[0333] Авторы настоящего изобретения дополнительно сравнили пути введения путем инъекции $NGF^{R121W}::AAV2-\Delta HSPG$ и обнаружили, что системная инъекция приводит к более высоким уровням трансдукции DRG вирусом по сравнению с местными подкожными или интраневральными инъекциями. См. **Фиг. 12а - 12d**. Это было неожиданным, потому что когда авторы настоящего изобретения вводили другие немодифицированные серотипы AAV системно, они наблюдали очень низкую трансдукцию, даже для PHP.S, который, как сообщается, функционирует при внутриорбитальной инъекции (Chan KY, et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive

gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci* 2017;20:1172-9). Эти данные иллюстрируют эффективность такого подхода.

[0334] Наконец, авторы настоящего изобретения оценили специфичность опосредованной NGF^{R121W}::AAV2-ΔHSPG доставки генов путем сбора DRG из инфицированных животных, получения срезов и окрашивания антителами против рецептора NGF - TrkA. Авторы наблюдали сильную корреляцию между инфицированными вирусом клетками и присутствием рецепторов TrkA: 80% положительных по TrkA клеток были инфицированы NGF^{R121W}::AAV2-ΔHSPG, а 83% инфицированных NGF^{R121W}::AAV2-ΔHSPG клеток были положительными по TrkA. См. **Фиг. 13а - 13d**.

Пример 5с. Нацеливание с помощью IL31^{K134A}::AAV2-ΔHSPG

[0335] Интерлейкин 31 (IL31) был выбран в качестве нацеливающего лиганда, поскольку его рецепторы IL31RA и OSMR экспрессируются на высоком уровне на кератиноцитах и играют ключевую роль в воспалительном зуде (Furie M, et al. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy* 2018;73:29-36). Авторы настоящего изобретения получили мутантный IL31^{K134A}, который связывается с IL31RA, но не передает сигнал через него (Nocchi L, et al. Interleukin-31-mediated photoablation of pruritogenic epidermal neurons reduces itch-associated behaviours in mice. *Nat Biomed Eng* 2019;3:114-25), и конъюгировали его с AAV2-ΔHSPG, как описано выше. IL31^{K134A}::AAV2-ΔHSPG вводили путем подкожной инъекции 3E+10 гв мышам и через три недели кожу собирали, получали срезы и окрашивали антителом против K14 - маркером кератиноцитов. Как показано на **Фиг. 14а - 14с**, авторы настоящего изобретения наблюдали почти 100-процентное перекрытие окрашиваний инфицированных вирусом клеток и положительных по K14 кератиноцитов. Важно отметить, что поскольку флуоресценция сохранялась дольше, чем 8 - 10-дневное обновление эпидермиса у мышей (Potten CS, Saffhill R, Maibach HI. Measurement of the transit time for cells through the epidermis and stratum corneum of the mouse and guinea-pig. *Cell Tissue Kinet* 1987;20:461-72), эти данные показывают, что эпидермальные стволовые клетки также были мишенью в этом эксперименте. Действительно, транскриптомные исследования показывают, что IL31RA экспрессируется в базальных кератиноцитах в интерфолликулярном и фолликулярном эпидермисе, многие из которых являются эпидермальными

стволовыми клетками (Joost S, Zeisel A, Jacob T, Sun X, La Manno G, Lonnerberg P, et al. Single-Cell Transcriptomics Reveals that Differentiation and Spatial Signatures Shape Epidermal and Hair Follicle Heterogeneity. Cell Syst 2016;3:221-37 e9).

[0336] Для дальнейшего исследования селективности доставки гена IL31^{K134A}::AAV2-ΔHSPG авторы использовали линию мышей с нокаутом по IL31RA (IL31RA^{-/-}) (Nocchi 2018). Авторы не смогли детектировать какой-либо сигнал репортера tdtomato в мышцах IL31RA^{-/-}, которым вводили путем подкожной инъекции IL31^{K134A}::AAV2-ΔHSPG, что указывает на то, что трансдукция действительно рецептор-специфична, см. Фиг. 15a - 15c.

Материалы и методы

Получение векторов AAV

[0337] Рекомбинантный AAV2-ΔHSPG получали в соответствии с процедурой, описанной в Примере 1.

Химическая модификация и соединение IL31^{K134A}-SNAP с AAV2-ΔHSPG

[0338] IL31^{K134A}-SNAP был получен, как описано ранее (Nocchi 2019). Для модификации поверхности AAV проводили реакцию очищенного AAV2-ΔHSPG с BG-PEG13-NHS (синтез по заказу) при предполагаемом молярном соотношении гв к линкеру NHS, составляющем от 3E+9 гв вируса на 1,73 нмоль линкера, в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа и дополнительно инкубировали с 5 мкМ IL31^{K134A}-SNAP в течение ночи при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего функционализированного лиганда удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и конъюгированный продукт ресуспендировали в ФБР.

Инъекции *in vivo* и проводка тканей

[0339] Для экспериментов с инъекциями *in vivo* мышей дикого типа или IL31RA^{-/-} анестезировали 2 - 2,5% изофлураном, а затем 3E+10 гв IL31^{K134A}-SNAP::AAV2-ΔHSPG в 10 мкл ФБР вводили путем подкожной инъекции в ухо. Через 3 недели кожу собирали, фиксировали в 4% параформальдегиде в течение ночи и получали срезы

толщиной 40 мкм. Срезы окрашивали в течение ночи при 4 °С кроличьим антителом против K14 (Covance, разведение 1:200) в ФБР, содержащем 5% козьей сыворотки + 0,3% тритон-Х. Вторичное антитело против антител кролика, меченое Alexa488, разводили 1:1000 и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в темноте. Предметные стекла закрепляли с помощью ProLong Gold, и получали изображения с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 и анализировали их в программном обеспечении ImageJ.

Результаты

[0340] IL31 был выбран в качестве нацеливающего лиганда, поскольку его рецепторы IL31RA и OSMR экспрессируются на высоком уровне на кератиноцитах и играют ключевую роль в воспалительном зуде (Figue 2018). Кроме того, ранее авторы настоящего изобретения создали мутантный IL31^{K134A}, который связывается с IL31RA, но не передает сигнал через него (Nocchi 2019), и продемонстрировали, что его можно использовать для нацеливания на сигнальный путь зуда.

[0341] IL31^{K134A}::AAV2-ΔHSPG вводили путем подкожной инъекции мышам и исследовали срезы кожи на предмет перекрывания с окрашиванием K14 - маркером кератиноцитов. Как показано на **Фиг. 14а - 14с**, авторы наблюдали почти 100-процентное перекрывание между инфицированными вирусом клетками и положительными по K14 кератиноцитами. Важно отметить, что поскольку флуоресценция сохранялась дольше, чем 8 - 10-дневное обновление эпидермиса у мышей (Potten 1987), эти данные указывают на то, что эпидермальные стволовые клетки также были мишенью в этом эксперименте. Действительно, транскриптомные исследования показывают, что IL31RA экспрессируется в базальных кератиноцитах в интерфолликулярном и фолликулярном эпидермисе, многие из которых являются эпидермальными стволовыми клетками (Joost 2016).

[0342] Для дальнейшего исследования селективности доставки гена IL31^{K134A}::AAV2-ΔHSPG авторы использовали линию мышей с нокаутом по IL31RA (IL31RA^{-/-}), которую они получили ранее (Nocchi 2019). Авторы не смогли детектировать какой-либо сигнал от репортерного гена tdTomato у мышей IL31RA^{-/-}, которым вводили путем подкожной инъекции IL31^{K134A}::AAV2-ΔHSPG (**Фиг. 15а - 15с**), что указывает на то, что трансдукция действительно рецептор-специфична.

Пример 6. Нацеливание с помощью субъединицы В холерного токсина

Уровень техники

[0343] Субъединица В холерного токсина (СТВ) была выбрана, потому что это классический ретроградный индикатор, и авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что, соединив ее с AAV, они смогут добиться транспорта AAV от нервных окончаний обратно к телам клеток. Природная склонность серотипов AAV дикого типа к ретроградному транспорту низка, и, следовательно, существует неудовлетворенная потребность, как в генной терапии, так и в фундаментальной науке, в создании платформы, которая позволит транспортировать AAV вдоль проекционных нейронов. В предыдущих попытках решить эту проблему использовали направленную эволюцию для конструирования функциональной группы для ретроградного транспорта в капсиде AAV2 (rAAV2-ретро) (Tervo DG, et al. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron* 2016;92:372-82). Тем не менее, авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что если СТВ (и, возможно, любой другой ретроградный индикатор) будет способствовать ретроградному транспорту AAV, то это позволит простое последующее превращение любого AAV в ретроградный AAV.

Способы

[0344] Первоначально авторы получили слитый белок СТВ-SNAP в *E. coli*, но обнаружили, что присутствие метки SNAP уменьшает его ретроградный транспорт. Следовательно, авторы приобрели немодифицированный СТВ и поместили его азидо-PEG4-сложный эфир NHS. Вкратце, СТВ привели в реакцию с 10-кратным молярным эквивалентом азидо-PEG4-сложный эфир NHS в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Непрореагировавшие азидогруппы удаляли путем диализа с помощью мембраны с MWCO 2 кДа. Для конъюгации с AAV привели реакцию очищенного AAV2-ΔHSPG, полученного как описано выше, с DBCO-PEG4-NHS в молярном соотношении 3×10^9 гв вируса на 1,73 нмоль линкера в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа и дополнительно инкубировали с 5 мкМ СТВ-PEG4-азид в течение ночи при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего лиганда удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и СТВ-ΔHSPG-AAV ресуспендировали в ФБР.

Результаты

[0345] Для тестирования вирусной трансдукции *in vitro* $1E+9$ гв СТВ-ΔHSPG-AAV в 100 мкл ФБР добавляли к нейронам ганглия заднего корешка в 96-луночном планшете. Флуоресценцию отслеживали ежедневно, и обычно она проявлялась через 24 часа, достигая максимума через 4 дня. Известно, что СТВ метит крупные нейроны DRG (предполагаемые механорецепторы), и действительно СТВ-ΔHSPG-AAV трансдуцирует крупные нейроны, как показано на **Фиг. 16а**.

[0346] Для тестирования вирусной трансдукции *in vivo* $3E+9$ гв СТВ-ΔHSPG-AAV вводили путем подкожной инъекции мышам. Через 3 недели мышей умерщвляли, и собирали ткань для мониторинга флуоресценции клеток. Авторы наблюдали флуоресцентный сигнал в волокнах седалищного нерва и в крупных нейронах в DRG, см. **Фиг. 16b** и **16с**, соответственно.

[0347] В текущих экспериментах авторы также конъюгировали СТВ с AAV2 дикого типа и вводили его в головной мозг мышей. Цель авторов настоящего изобретения состояла в непосредственном сравнении ретроградного транспорта СТВ-AAV2 с таковым для AAV2 дикого типа.

Пример 7. Нацеливание с помощью лектинов

[0348] Лектины выбрали, поскольку они специфически связываются с теми же углеводами на поверхности клеток, которые используют AAV для прикрепления к клеткам. Таким образом, авторы пришли к выводу, что путем конъюгации лектинов с AAV2-ΔHSPG можно имитировать и улучшить природные серотипы AAV. В первоначальных экспериментах авторы проводили скрининг нескольких конъюгатов лектин-AAV2-ΔHSPG для выявления способности к трансдукции органотипических культур спинного мозга. Затем авторы выбрали агглютинин проростков пшеницы (WGA) и изолектин B4 (IB4) для дальнейшего исследования с целью изучения также лектина *Lens culinaris* (чечевицы) и лектина *Wisteria floribunda* (WFL, глицинии) в будущем.

Общие методы

[0349] Лектины взаимодействовали с 20-кратным молярным эквивалентом азидо-PEG4-сложный эфир NHS в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной

температуре. Непрореагировавшие азидогруппы удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Для поверхностной функционализации AAV проводили реакцию очищенного AAV2-ΔHSPG, полученного как описано выше, с DBCO-PEG4-NHS при молярном соотношении гв к линкеру $3E+9$ гв вируса на $1,73$ нмоль линкера в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа и дополнительно инкубировали с 5 мкМ лектин-PEG4-азид в течение ночи при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего лиганда удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и полученную конструкцию лектин-ΔHSPG-AAV ресуспендировали в ФБР.

Пример 7а. Нацеливание с помощью WGA::AAV2-ΔHSPG

Химическая модификация и соединение WGA с AAV2-ΔHSPG

[0350] WGA функционализировали 20-кратным молярным эквивалентом азидо-PEG4-сложный эфир NHS в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Непрореагировавший реакционноспособный линкер удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Для поверхностной функционализации AAV проводили реакцию очищенного AAV2-ΔHSPG, полученного как описано выше, с DBCO-PEG4-NHS при предполагаемом молярном соотношении гв к DBCO-PEG4-NHS $3E+9$ гв вируса на $1,73$ нмоль линкера в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа и дополнительно инкубировали с 5 мкМ WGA-PEG4-азид в течение ночи при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего лиганда удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и полученную конструкцию WGA-ΔHSPG-AAV ресуспендировали в ФБР.

[0351] Для тестирования вирусной трансдукции *in vitro* $1E+9$ гв WGA::AAV2-ΔHSPG в 100 мкл ФБР добавляли к нейронам ганглия заднего корешка в 96-луночном планшете. Флуоресценцию контролировали ежедневно, и она была заметна через 24 часа, достигнув пика через 4 дня, см. **Фиг. 17а**. WGA::AAV2-ΔHSPG трансдуцировал практически все клетки в чашке. Учитывая эту видимую высокую эффективность, авторы настоящего изобретения также попробовали использовать WGA::AAV2-

Δ HSPG для других трудно трансдуцируемых типов клеток, таких как ранние эмбрионы мышей. Бластисты отсекали у мышей и выращивали *in vitro* в 100 мкл среды KSOM, содержащей $1,6E+9$ гв WGA::AAV2- Δ HSPG. Флуоресценцию отслеживали ежедневно, и она была заметна через 24 часа, достигая максимума через 4 дня, когда 100% клеток были флуоресцентными, см. **Фиг. 17b**.

[0352] Все изображения получали с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 и анализировали в ImageJ.

[0353] Для того чтобы определить, нацеливается ли WGA::AAV2- Δ HSPG на периферические нейроны *in vivo* у мышей, авторы осуществили системные инъекции новорожденным мышам. Для экспериментов на новорожденных мышатах детенышам в день P1 вводили $1E+9$ гв WGA::AAV2- Δ HSPG в 1 мкл ФБР в поверхностную височную вену, как описано ранее (Stoica L, Ahmed SS, Gao G, Sena-Estevés M. Gene transfer to the CNS using recombinant adeno-associated virus. *Curr Protoc Microbiol* 2013;Chapter 14:Unit14D 5). Через 5 недель мышей умерщвляли, и собирали кожу, ганглии заднего корешка (DRG) и спинной мозг и фиксировали в 4% параформальдегиде. Кожу просветляли с помощью ScaleS и подготавливали в виде тотальных препаратов образцов, делали срезы DRG и спинного мозга толщиной 10 мкм и закрепляли на предметных стеклах.

[0354] У новорожденных мышей, которым вводили путем в/в инъекции $1E+9$ гв WGA::AAV2- Δ HSPG, авторы обнаружили устойчивую трансдукцию по всей периферической нервной системе в коже, DRG и спинном мозге, но не в центральной нервной системе. См. **Фиг. 18a - 18c**. Авторы обнаружили устойчивую флуоресценцию tdTomato по всей периферической нервной системе, которая проявлялась в нервных волокнах в коже (**Фиг. 18a**), телах клеток в DRG (**Фиг. 18b**) и центральных окончаниях в спинном мозге (**Фиг. 18c**). Авторы не наблюдали флуоресценции в центральной нервной системе, что указывает на то, что WGA::AAV2- Δ HSPG не пересекает гематоэнцефалический барьер.

[0355] Авторы также исследовали, подвергается ли WGA::AAV2- Δ HSPG ретроградному транспорту в головном мозге, путем инъекции модифицированного вируса в префронтальную кору головного мозга и исследования тел клеток проекционных нейронов в таламусе на наличие флуоресценции.

[0356] Для инъекции в головной мозг взрослых мышей, мышей анестезировали 2 - 2,5% изофлураном. Осуществляли краниотомию, и 6E+8 гв WGA::AAV2-ΔHSPG в 500 нл ФБР вводили путем инъекции в префронтальную кору с применением стандартных стереотаксических методик в следующих координатах: M/L = 0,500, A/P = -1,700, D/V = -1,8 (Stoica 2013). Через 5 недель мышей перфузировали 4% параформальдегидом, собирали головной мозг и делали коронарные срезы толщиной 100 мкм. Срезы перед визуализацией окрашивали с помощью DAPI.

[0357] Как можно видеть на **Фиг. 19а - 19с**, авторы обнаружили устойчивый сигнал в срезах головного мозга в месте инъекции (**Фиг. 19а**) и в телах клеток проекционных нейронов в таламусе (**Фиг. 19б и 19с**).

Пример 7б. Повышение эффективности с помощью WGA::PHP.S

[0358] Для того чтобы исследовать, можно ли также использовать функционализацию поверхности синтетического вектора AAV лигандом WGA для повышения эффективности его трансдукции, авторы функционализировали поверхность PHP.S, который, как было продемонстрировано ранее, эффективно трансдуцировал нейроны DRG. Проводили реакцию очищенного PHP.S, полученного, как описано выше, с DBCO-PEG4-NHS при молярных соотношениях гв:линкер, составляющих 1E+9 гв на 0,43 нмоль, 0,87 нмоль, 1,73 нмоль, 2,6 нмоль или 3,47 нмоль DBCO-PEG4-NHS, в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа и дополнительно инкубировали с 0,1 нмоль WGA-PEG4-азид в течение ночи при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего функционализованного WGA удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и полученную конструкцию WGA-PHP.S ресуспендировали в ФБР. Затем немодифицированный и модифицированный PHP.S добавляли к нейронам DRG в количестве 1E+9 гв в 100 мкл ФБР. На **Фиг. 20а - 20f** можно видеть, что WGA-PHP.S существенно повышал эффективность трансдукции при добавлении к нейронам DRG при титрах, эквивалентных таковым для немодифицированного PHP.S (1E+9 гв). Это можно было наблюдать в диапазоне молярных количеств DBCO-PEG4-NHS от 0,43 нмоль до 3,47 нмоль.

Пример 7с. Нацеливание с помощью IB4::AAV2-ΔHSPG

[0359] IB4 используют в качестве маркера сосудистой сети на периферии неоптико-чувствительных сенсорных нейронов в DRG и микроглии в центральной нервной системе. Таким образом, авторы настоящего изобретения протестировали подкожную, интраневральную и интраспинальную инъекцию IB4::AAV2-ΔHSPG мышам.

Химическая модификация и соединение IB4 с AAV2-ΔHSPG

[0360] Проводили реакцию IB4 с 20-кратным молярным эквивалентом азидо-PEG4-сложный эфир NHS в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Непрореагировавший азидо-линкер удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Для конъюгации с AAV проводили реакцию очищенного AAV2-ΔHSPG с DBCO-PEG4-NHS при предполагаемом молярном соотношении гв к DBCO-PEG4-NHS 3×10^9 гв вируса на 1,73 нмоль линкера в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа, а затем инкубировали с 5 мкМ IB4-PEG4-азид в течение ночи при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего IB4 удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и IB4-ΔHSPG-AAV ресуспендировали в ФБР.

Применение *in vitro*, инъекции *in vivo* и проводка тканей

[0361] Для экспериментов на культивируемых сенсорных нейронах собирали DRG из мышей и инкубировали в 1 мг/мл коллагеназы IV и 0,05% трипсина, с каждым в течение 25 мин при 37°C. Клетки фильтровали и суспендировали в среде, содержащей DMEM, 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки, 0,8% глюкозы и 100 Ед пенициллина/стрептомицина, и высевали на покровные стекла, обработанные поли-L-лизин. На следующий день среду удаляли и к клеткам добавляли 1×10^9 гв IB4::AAV2-ΔHSPG в 100 мкл ФБР. Через 2 часа ФБР заменяли средой, и клетки поддерживали при 37°C в течение 5 дней перед визуализацией с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver A1.

[0362] Для экспериментов с инъекциями *in vivo* мышей анестезировали 2 - 2,5% изофлураном, а затем вводили им инъекции подкожным, интраневральным или интраспинальным путями. Для подкожной инъекции в подошвенную поверхность

лапы вводили $3E+10$ гв IB4::AAV2-ΔHSPG в объеме 10 мкл. Для интраневральной инъекции в седалищный нерв вводили $3E+9$ гв IB4::ΔHSPG-AAV2 в объеме 2 мкл. Для интраспинальной инъекции в поясничный отдел спинного мозга вводили $6E+8$ гв IB4::ΔHSPG-AAV2 в объеме 1 мкл. Через 3 недели ткань собирали, фиксировали в 4% параформальдегиде, просветляли в ScaleS и подготавливали в виде тотальных препаратов образцов. Для интраневральных инъекций также делали срезы спинного мозга толщиной 10 мкм и окрашивали IB4-488, как описано ранее (Dhandapani R, Arokiaraj CM, Taberner FJ, Pacifico P, Raja S, Nocchi L, et al. Control of mechanical pain hypersensitivity in mice through ligand-targeted photoablation of TrkB-positive sensory neurons. *Nature communications* 2018;9:1640). Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 и анализировали в ImageJ.

Результаты

[0363] В периферической нервной системе IB4 используется в качестве маркера неопиоидергических сенсорных нейронов. Таким образом, авторы сначала проверили, будет ли IB4::AAV2-ΔHSPG трансдуцировать эту популяцию нейронов *in vitro*. Как показано на **Фиг. 21**, авторы наблюдали устойчивую флуоресценцию tdTomato в культивируемых нейронах DRG, которая была ограничена в основном клетками небольшого диаметра, что указывает на неопиоидергические сенсорные нейроны. IB4 также используется в качестве маркера сосудистой сети на периферии и микроглии в центральной нервной системе. Поэтому авторы протестировали различные пути введения мышам, чтобы определить, будет ли IB4::AAV2-ΔHSPG нацеливаться на эти структуры *in vivo*. После подкожной инъекции IB4::AAV2-ΔHSPG, авторы обнаружили экспрессию tdTomato в эндотелиальных клетках и гладкомышечных клетках, окружающих кровеносные сосуды (**Фиг. 22а**). При инъекции $3E+9$ гв IB4::ΔHSPG-AAV2 в левый седалищный нерв авторы наблюдали флуоресценцию в неопиоидергических нейронах в DRG (**Фиг. 22b**) и их окончаниях в спинном мозге (**Фиг. 22с**). Для того чтобы выяснить, совпадает ли эта экспрессия с положительными по IB4 нейронами, авторы окрашивали срезы спинного мозга меченым флуоресцентной меткой IB4-488. Как показано на **Фиг. 22с**, авторы наблюдали четкое перекрывание в ипсилатеральном спинном мозге окрашивания трансдуцированных IB4::ΔHSPG-AAV2 нейронов и окрашивания IB4-488, которое отсутствовало в контралатеральном спинном мозге. Наконец, после инъекции IB4::ΔHSPG-AAV2 в

спинной мозг авторы обнаружили устойчивую экспрессию tdTomato в микроглии (Фиг. 22d).

Пример 7d. Значительное повышение эффективности с помощью IB4::AAV2-HSPG и IB4::AAV9-HSPG

Способы

Получение AAV

[0364] Рекомбинантные AAV2 и AAV9 с грузом GFP получали в SF21 или HEK293, соответственно, как описано ранее (Grieger 2006 и Wu 2018). Клетки собирали через 5 дней после инфицирования, лизировали 0,5% тритоном X-100, обрабатывали нуклеазой, концентрировали тангенциальной проточной фильтрацией и очищали с помощью изопикнического ультрацентрифугирования (Dias Florencio G, Precigout G, Beley C, Buclez PO, Garcia L, Benchaouir R. Simple downstream process based on detergent treatment improves yield and *in vivo* transduction efficacy of adeno-associated virus vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2015; 2:15024). Титрование генома вектора проводили с применением кПЦР с праймерами, нацеленными на промоторную область вирусного груза (Grieger 2006).

Химическая модификация и соединение IB4 с AAV2 или AAV9

[0365] Проводили реакцию IB4 с 20-кратным молярным эквивалентом азидо-PEG4-сложный эфир NHS в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Непрореагировавший азидо-линкер удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Для конъюгации с AAV проводили реакцию очищенного AAV2 или AAV9 с DBCO-PEG4-NHS при предполагаемом молярном соотношении гв к DBCO-PEG4-NHS $3E+9$ гв вируса на 1,73 нмоль линкера в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа, а затем инкубировали с 5 мкМ IB4-PEG4-азид в течение ночи при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего IB4 удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и IB4-AAV2 или IB4-AAV9 ресуспендировали в ФБР.

Добавление *in vitro* к клеткам PC12

[0366] Клетки PC12 поддерживали при 37 °C в среде DMEM/F12, содержащей 5% лошадиную сыворотку, 5% фетальную бычью сыворотку и 100 Ед пенициллина/стрептомицина. Различные концентрации AAV2 дикого типа, AAV9 дикого типа, IB4-AAV2 или IB4-AAV9 инкубировали с клетками PC12 в ФБР в течение 2 часов. После этого среду заменяли и клетки поддерживали при 37 °C в течение 5 дней, а затем фиксировали в 4% ПФА, окрашивали DAPI и визуализировали с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver A1. Изображения анализировали путем измерения флуоресценции GFP в каждой положительной по DAPI клетке и построения графика средних значений +/- СО для каждого титра.

Результаты

[0367] Клетки PC12 трудно трансдуцировать с применением серотипов AAV дикого типа, таких как AAV2 или AAV9. Поэтому авторы настоящего изобретения заинтересовались, повысит ли конъюгация AAV2 или AAV9 с IB4 эффективность трансдукции AAV этого типа клеток. Как показано на графике на **Фиг. 23** и изображениях на **Фиг. 24a - 24f**, авторы не смогли обнаружить флуоресценцию GFP в клетках, обработанных AAV2, при любой концентрации от $2E+7$ до $5E+9$ гв. Тем не менее, конъюгация IB4 с AAV существенно повышала эффективность трансдукции (**Фиг. 24g - 24l**), так что были видны разрозненные GFP-положительные клетки при $5E+8$ гв, и эффективность возрастала до более чем 80% при $5E+9$ гв. Количественный анализ этих значений (измеренных как интенсивность флуоресценции GFP во всех клетках) показал, что при $5E+8$ гв конъюгация IB4 с AAV2 повышала эффективность в 15 раз, в то время как при $1E+9$ гв повышение эффективности было в 38 раз, а при $5E+9$ гв повышение эффективности было в 104 раза.

[0368] Аналогичным образом, флуоресценция GFP в обработанных клетках PC12 не детектировалась ни при одной концентрации AAV9 дикого типа, см. график на **Фиг. 25** и **Фиг. 26a - 26f**. Напротив, среди клеток, обработанных IB4-AAV9, продемонстрировали повышение количества GFP-положительных клеток, начиная с концентраций $5E+8$ гв, причем высокая эффективность наблюдалась при $5E+9$ гв, см. график на **Фиг. 25** и **Фиг. 26g - 26l**. Примечательно, что в клетках PC12, обработанных $1E+9$ гв, конъюгация IB4 с AAV9 повышала эффективность в 9 раз, в то время как при $5E+9$ гв повышение было в 84 раза по сравнению с диким типом.

Пример 8. Влияние длины линкера на эффективность трансдукции

Способы

Получение AAV

[0369] Рекомбинантный AAV2-ΔHSPG получали в соответствии с процедурой, описанной в Примере 1.

Химическая модификация и соединение IB4 с AAV2-ΔHSPG

[0370] Проводили реакцию IB4 (8,8 нмоль) с 20-кратным молярным эквивалентом азидо-PEGn-сложный эфир NHS (176 нмоль) в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Непрореагировавшие азидогруппы удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Для конъюгации с AAV, проводили реакцию 6E+12 очищенного AAV2-ΔHSPG с 0,17 нмоль, 0,52 нмоль, 1,73 нмоль или 5,2 нмоль DBCO в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа и дополнительно инкубировали с 0,1 нмоль IB4-PEG4-азид в течение ночи при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего IB4 удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и модифицированный AAV ресуспендировали в ФБР.

[0371] Были исследованы следующие комбинации линкеров, представленные в Таблице 2 (и указан коммерческий источник молекулы):

Таблица 2				
	Азидо-PEGn-NHS (L)	DBCO-PEGn-NHS (V)	Всего PEGn	Изображения флуоресценции GFP
Нет спейсера	0 (от <u>Thermo</u>)	0 (от <u>Sigma</u>)	0	Фиг. 26 a - d
Короткий	2 (от <u>Broadpharm</u>)	1 (от <u>Broadpharm</u>)	3	Фиг. 27 a - d
Средний	4 (от <u>Thermo</u>)	4 (от <u>Sigma</u>)	8	Фиг. 28 a - d
Длинный	8 (от <u>Sigma</u>)	8 (от <u>Broadpharm</u>)	16	Фиг. 29 a - d

Добавление *in vitro* к клеткам PC12

[0372] Клетки PC12 поддерживали при 37 °С в среде DMEM/F12, содержащей 5% лошадиную сыворотку, 5% фетальную бычью сыворотку и 100 Ед пенициллина/стрептомицина. Частицы IB4::AAV2-ΔHSPG, конъюгированные при различных молярных соотношениях и различной длине линкера, инкубировали с клетками PC12 в ФБР в течение 2 часов. После этого среду заменяли и клетки поддерживали при 37 °С в течение 5 дней, а затем фиксировали в 4% ПФА, окрашивали DAPI и визуализировали с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver A1. Изображения анализировали путем измерения флуоресценции GFP в каждой положительной по DAPI клетке и построения графика средних значений +/- СО для каждого титра. См. Фиг. 30.

Результаты и интерпретация

[0373] В этих экспериментах авторы настоящего изобретения исследовали влияние длины линкера (т.е. количества спейсеров мономера этиленгликоля) на эффективность трансдукции. Авторы выбрали клетки PC12 в качестве линии клеток-мишеней, поскольку их трудно трансдуцировать с применением стандартных векторов AAV (таким образом, уменьшая фон), и IB4 в качестве нацеливающего лиганда, поскольку он сильно связывается с этими клетками. Авторы провели эксперименты для 4 различных длин линкеров и измерили эффективность каждого линкера, используя диапазон молярных соотношений. Аргументация здесь заключалась в том, что каждый линкер может по-разному реагировать с вирусом или лигандом, и что применяя диапазон соотношений модификации можно будет уловить любые изменения в эффективности реакции и, в конечном счете, эффективности трансдукции окончательных конструкций.

[0374] При рассмотрении данных, представленных на графике на Фиг. 31, ясно, что отсутствие спейсера между AAV и лигандом оказывает сильное негативное влияние на эффективность трансдукции. Очень мало клеток были трансдуцированы капсидами с модифицированной поверхностью, полученными с 0,17 нмоль, 0,52 нмоль и 1,73 нмоль NHS-DBCO, и только при 5,2 нмоль авторы наблюдали существенную инфекцию. Это интересно, потому что это показывает, что даже при отсутствии какого-либо спейсера между лигандом и вирусом все еще можно трансдуцировать клетки. Однако для этого

требуются высокие концентрации NHS-DBCO к AAV для получения конструкции. Без привязки к какой-либо конкретной теории, одна из возможностей заключается в том, что, возможно, реакция сшивания между нацеливающим лигандом-азидом и AAV-DBCO ограничена стерическим препятствием и что для прохождения реакции требуется оптимальное покрытие вируса группами DBCO. Короткий спейсер всего с PEG_n = 3 PEG показал лучшие результаты, чем отсутствие спейсера вообще, но опять же, при низких молярных соотношениях (0,17 нмоль) эффективность была снижена. Интересно, что при более высоких соотношениях модификации эта длина спейсера показала несколько лучшие результаты, чем все остальные длины. Конструкции со средними (n = 8) и длинными (n = 16) спейсерами показали аналогичные результаты и продемонстрировали более высокую эффективность трансдукции, когда их получали при молярном соотношении AAV:лиганд 3E+9 гв вируса на 0,17 нмоль линкера. Эти результаты позволяют предположить, что увеличение длины спейсера в этом диапазоне повышает эффективность трансдукции, особенно при недостаточно оптимальных соотношениях модификации.

Пример 9. Пределы размера линкеров PEG

[0375] Исследовали влияние на эффективность трансдукции AAV клеток PC12 конструкциями AAV, содержащими спейсеры дискретного PEG (dPEG) и дисперсного PEG (pPEG), обеспечивающими различную длину линкера. С этой целью авторы модифицировали поверхность капсида AAV2ΔHSPG лигандом WGA путем объединения (i) капсида, функционализированного линкером, способным вступить в реакцию с капсидом, выбранным из DBCO-PEG_n-NHS (где n равен 4, 12, приблизительно 45 (dPEG 2K), приблизительно 114 (dPEG 5K), приблизительно 228 (dPEG 10K), приблизительно 682 (dPEG 30K)) или DBCO-PEG_n-TFP (где n равен 24), с (ii) лигандом WGA, функционализированным линкером, способным вступить в реакцию с лигандом: азид-PEG_n-NHS (где n равен 4, 12, 24 или около 114 (dPEG 5K)). Конструкции, соответствующие различным исследованным линкерам/спейсерам PEG, дополнительно проиллюстрированы в Таблице 3, где линкер, способный вступить в реакцию с капсидом, представляет собой DBCO-PEG_n-NHS, если он не обозначен как «TFP».

Таблица 3. Конструкции вируса с модифицированной поверхностью, полученные с различными спейсерами PEG_n, присутствующими на линкере, способном вступать в реакцию с лигандом (L), и линкере, способном вступать в реакцию с капсидом (V).

Фиг. 32:		PEG _n (L)	PEG _n (V)	Общая длина (кол-во мономеров этиленгликоля) (приблизительная, если подчеркнута)
a	dPEG4 + dPEG4	4	4	8
b	dPEG12 + dPEG4	12	4	16
c	dPEG24 + dPEG4	24	4	28
d	dPEG4 + dPEG12	4	12	16
e	dPEG12 + dPEG12	12	12	24
f	dPEG24 + dPEG12	24	12	36
g	dPEG4 + dPEG24	4	24 (TFP)	28
h	dPEG12 + dPEG24	12	24 (TFP)	36
i	dPEG24 + dPEG24	24	24 (TFP)	48
j	dPEG4 + pPEG2K	4	2 кДа (45)*	<u>49</u>
k	dPEG4 + pPEG5K	4	5 кДа (114)*	<u>118</u>
l	dPEG4 + pPEG10K	4	10 кДа (228)*	<u>232</u>
m	dPEG4 + pPEG30K	4	30 кДа (682)*	<u>686</u>
n	pPEG5K + dPEG4	5 кДа (114)*	4	<u>118</u>
o	pPEG5K + pPEG2K	5 кДа (114)*	2 кДа (45)*	<u>159</u>
p	pPEG5K + pPEG5K	5 кДа (114)*	5 кДа (114)*	<u>228</u>
q	pPEG5K + pPEG10K	5 кДа (114)*	10 кДа (228)*	<u>342</u>
r	pPEG5K + pPEG30K	5 кДа (114)*	30 кДа (682)*	<u>796</u>

[0376] *Размер полидисперсного PEG представлен в виде средней молекулярной массы. В скобках указано соответствующее среднее количество мономеров этиленгликоля.

Способы

[0377] Рекомбинантный AAV2-ΔHSPG получали в соответствии с процедурой, описанной в Примере 1.

Химическая модификация и соединение WGA с AAV2ΔHSPG с различными линкерами

[0378] WGA (1,7 нмоль) функционализировали путем реакции с 20-кратным молярным эквивалентом способного вступать в реакцию с лигандом линкера азид-PEGn-NHS (54 нмоль) (где n равен 4, 12 или 24) в 100 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Непрореагировавший линкер удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Для конъюгации функционализованного лиганда с AAV сначала получали капсид AAV с функционализированной поверхностью для каждого способного вступать в реакцию с капсидом линкера: DBCO-PEGn-NHS (где n равен 4, 12 или 24) и DBCO-PEGn-TFP (где n равен 4, 12 или 24). Эффективность трансдукции каждой конструкции капсид/лиганд была оптимизирована путем получения каждой конструкции в диапазоне соотношений капсид/лиганд. В частности, каждый капсид AAV с функционализированной поверхностью получали путем осуществления реакции 3E+9 гв очищенного AAV2ΔHSPG с 0,17 нмоль, 0,52 нмоль, 1,73 нмоль и 5,2 нмоль выбранного реакционноспособного линкера в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Затем каждый полученный капсид с функционализированной поверхностью инкубировали с 0,1 нмоль WGA-PEGn-азида (функционализованного нацеливающего лиганда) в течение одного часа при комнатной температуре и в течение ночи при 4°C с получением различных конструкций WGA-AAV2ΔHSPG с модифицированной поверхностью.

Добавление *in vitro* к клеткам PC12

[0379] Клетки PC12 поддерживали при 37 °C в среде DMEM/F12, содержащей 5% лошадиную сыворотку, 5% фетальную бычью сыворотку и 100 Ед пенициллина/стрептомицина. Клетки PC12 инкубировали с 3E+9 гв различных конструкций WGA-AAV2ΔHSPG в ФБР в течение 2 часов. Затем среду заменяли и клетки поддерживали при 37 °C в течение 5 дней, окрашивали хехст и визуализировали с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver A1. Изображения анализировали путем измерения флуоресценции GFP в каждой положительной по хехст клетке и построения графика средних значений +/- СО для каждого титра.

Результаты

[0380] В совокупности результаты, проиллюстрированные на **Фиг. 32 - 36**, демонстрируют, что важно контролировать размер линкера PEG, используемого для модификации вируса, для достижения желаемого повышения эффективности трансдукции, и, по-видимому, оптимальным в тестируемой системе является размер приблизительно PEG12. На стороне лиганда, по-видимому, более длинные линкеры допустимы, включая дисперсный PEG 5000, но не идеальны.

[0381] На **Фиг. 32а - s** представлены изображения меченных хехст клеток PC12, обработанных каждой из полученных конструкций WGA-AAV2ΔHSPG с модифицированной поверхностью. На **Фиг. 32а - s** и на **Фиг. 33 - 36** показано, что наиболее яркие изображения, свидетельствующие о наиболее эффективной трансдукции, были получены в экспериментах, где линкеры содержали PEG (т.е. мономеры этиленгликоля) различной длины с «n» в диапазоне 4 - 24 (или 4 - 12), и где весь линкер содержал всего «n» от 8 до 24 (или 8 - 16) звеньев PEG. Оптимальная комбинация представляла собой DBCO-PEG4 на вирусе и азид-PEG4 на лиганде (всего n = 8) (**Фиг. 32а**), за которой следовали DBCO-PEG12 на вирусе и азид-PEG4 на лиганде (всего n = 16) (**Фиг. 32d**), DBCO-PEG4 на вирусе и азид-PEG12 на лиганде (всего n = 8) (**Фиг. 32b**) и DBCO-PEG12 на вирусе и азид-PEG12 на лиганде (всего n = 24) (**Фиг. 32e**). Единственным условием с применением дисперсных PEG, для которых выявили некоторый сигнал, был WGA-азид-PEG 5000, реагирующий с DBCO-PEG4 на вирусе (**Фиг. 32п**). Комбинации дискретных PEG 4L+4V и 12L+12V показали явно лучшие результаты, чем более длинные дисперсные PEG.

[0382] **Фиг. 33** и **Фиг. 34** дополнительно подтверждают повышение отдельных и средней (соответственно) эффективностей трансдукции клеток PC12, обработанных конструкциями вируса AAV2ΔHSPG, поверхность которых была модифицирована WGA, содержащим спейсеры с линкерами дискретного PEG (т.е. мономеров этиленгликоля), где общее n (сумма мономеров PEG в линкере, образованном между капсидом вируса и лигандом, составляет от 8 до 24.

[0383] На **Фиг. 35** и **36** сравнивают среднюю эффективность трансдукции для выбранных комбинаций дискретных и дисперсных PEG по сравнению с немодифицированным вирусом. На **Фиг. 35** видно, что комбинации дискретного PEG 4L+4V и 12L+12V показал явно лучшие результаты, чем более длинные спейсеры дисперсного PEG. На **Фиг. 36** показаны только комбинации дискретных и дисперсных

PEG с самой худшей эффективностью. Интересно, что только 5KL+4V показал лучшие результаты, чем контроль, позволяя предположить, что ограниченная длина спейсера на линкере со стороны вируса может быть полезна для получения желательной более эффективной трансдукции, в то время как длина спейсера на линкере со стороны лиганда может быть более пригодной для использования более длинных спейсеров.

Пример 10. Способная образовывать сшивку пара DBCO-азид показала лучшие результаты для конструкции WGA-AAV2ΔHSPG

[0384] Затем авторы настоящего изобретения исследовали, улучшат ли различные линкерные химические соединения эффективность трансдукции AAV клеток PC12, если не считать химию DBCO-азид, которую авторы уже исследовали. С этой целью авторы получили конструкции AAV2ΔHSPG -WGA с применением лигирования TCO/тетразин и, отдельно, способные образовывать сшивку пары фосфин-NHS/азид, которые реагируют посредством лигирования по Штаудингеру.

[0385] Химия лигирования TCO/тетразин основана на реакции циклоприсоединения Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями между реагирующей парой транс-циклооктен и тетразин, в результате чего образуется дигидропиридазиновая связь, и, как известно, обладает сверхбыстрой кинетикой ($> 800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), не имеющей себе равных среди других пар биоортогонального лигирования.

[0386] Бифункциональные линкеры NHS-азид и NHS-фосфин содержат сложный эфир NHS, который реагирует с аминами и подходит для дериватизации первичных аминов белков. После того, как белок (капсид или лиганд) функционализирован азидом или фосфином, оба компонента смешивают для эффективного и стабильного соединения. Фосфиновые группы реагируют с азидами посредством реакции Штаудингера с получением промежуточного соединения азилида, которое захватывается с образованием стабильной ковалентной амидной связи.

Способы

[0387] Рекомбинантный AAV2-ΔHSPG получали в соответствии с процедурой, описанной в Примере 1.

[0388] Для получения функционализированных нацеливающих лигандов, используемых в этих экспериментах, готовили 150 мМ исходные растворы тетразин-

PEG5-NHS и азидо-PEG4-NHS в ДМСО. Проводили реакцию WGA (27 мкМ, 1 мг/мл) с 20-кратным молярным эквивалентом тетразин-PEG5-NHS (540 мкМ) или азидо-PEG4-NHS (540 мкМ) в ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Непрореагировавшие линкеры удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа.

[0389] Для получения капсидов вируса с функционализированной поверхностью для использования в этих экспериментах готовили 20 мМ исходный раствор TCO-PEG4-NHS или фосфин-NHS в DMSO. Для модификации поверхности капсида AAV, проводили реакцию 3×10^9 гв очищенного AAV2ΔHSPG с 0,17 нмоль, 0,52 нмоль, 1,73 нмоль и 5,2 нмоль TCO-PEG4-NHS или фосфин-NHS в 20 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Затем AAV с модифицированной TCO или фосфином поверхностью инкубировали с 0,1 нмоль WGA-PEG5-тетразина или WGA-PEG4-азида, соответственно, в течение одного часа при комнатной температуре, а затем в течение ночи при 4 °C.

Добавление *in vitro* к клеткам PC12

[0390] Клетки PC12 поддерживали при 37 °C в среде DMEM/F12, содержащей 5% лошадиную сыворотку, 5% фетальную бычью сыворотку и 100 Ед пенициллина/стрептомицина. Клетки PC12 инкубировали с конструкциями WGA-AAV2ΔHSPG, полученными при различных соотношениях AAV:линкер, описанных выше, в ФБР в течение 2 часов. Затем среду заменяли и клетки поддерживали при 37°C в течение 5 дней, окрашивали хехст и визуализировали с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver A1. Изображения анализировали путем измерения флуоресценции GFP в каждой положительной по хехст клетке и построения графика средних значений +/- СО для каждого титра.

Результаты

[0391] Как показано на **Фиг. 37а - 37f** и **Фиг. 38 - 39**, детектировали очень низкий уровень флуоресценции tdTomato в клетках, обработанных AAV2ΔHSPG, конъюгированным с WGA с применением лигирования TCO/тетразин, что указывает на неэффективную трансдукцию. Несколько большая трансдукция была видна в клетках, обработанных AAV2ΔHSPG, конъюгированным с WGA с применением фосфин-NHS/азида (**Фиг. 40а - 40d** и **Фиг. 41 - 42**); однако наблюдаемая трансдукция

лишь минимально улучшилась по сравнению с немодифицированным AAV2ΔHSPG (Фиг. 37e и 40e). Химической модификацией, которая демонстрирует самую высокую эффективность трансдукции, остается получение конструкций AAV с применением способной образовывать сшивку пары DBCO/азид (Фиг. 37f и 40f).

Пример 11. Определение количества частиц AAV и химическая модификация на поверхности вируса

Уровень техники

[0392] Для количественной оценки степени модификации поверхности капсида AAV авторы использовали стандартный AAV9 (приобретенный у Inovavector) с известной концентрацией капсидов. Используя этот стандарт, авторы затем количественно оценили степень модификации с применением двух стратегий: (1) Авторы провели реакцию NHS-PEG4-DBCO с вирусом, и по поглощению хромофора DBCO рассчитали количество молекул DBCO на капсид. Затем авторы конъюгировали WGA-PEG4-азид с модифицированным AAV9 и, по снижению поглощения DBCO, рассчитали количество лигандов на капсид. (2) Авторы конъюгировали флуоресцентно меченный лиганд азидо (WGA-SNAP-TMR-PEG4-азид) с вирусом для оценки количества лигандов на вирус, снова используя измерения поглощения.

Способы

Модификация AAV9 с помощью DBCO, а затем сшивание с WGA азидо

[0393] 3.6×10^{10} гв AAV9 инкубировали с 52 нмоль DBCO-PEG4-NHS в конечном объеме 97 мкл в течение 3 часов на качалке при комнатной температуре. Это количество линкера было выбрано, поскольку оно приводило к оптимальной эффективности трансдукции при конъюгации с AAV9 и добавлении к клеткам PC12.

[0394] Для модификации вируса WGA-азидо-лигандом проводили реакцию 2,8 нмоль WGA с 20-кратным молярным эквивалентом азидо-PEG4-сложный эфир NHS (56 нмоль) в конечном объеме 100 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре (КТ). После этого непрореагировавшие азидогруппы удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Затем добавляли 242,5 нмоль WGA-азидо и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После модификации образцы трижды промывали с

применением плуроника F68 0,001%, NaCl 200 мМ в ФБР с MWCO 100 кДа для удаления избытка несвязавшихся реагентов. 20 мкл, собранные с колонок, концентрировали с помощью вакуумного концентратора и ресуспендировали в 10 мкл плуроника F68 0,001%, NaCl 200 мМ в ФБР. В дополнение к проведению реакции с WGA-азидо у авторов были еще две группы: 1) AAV9 отдельно и 2) AAV9, инкубированный только с DBCO. Для корректировки на потерю вируса во время реакции и очистки использовали 5 мкл образца для проведения анализа методом капельной цифровой ПЦР (кцПЦР).

Оценка степени химической модификации PEG4-DBCO и WGA-PEG4-азидо на вирусе

[0395] Поглощение измеряли на длине волны 307 нм, которая представляет собой пик поглощения хромофора, встроенного в DBCO. Реакция между AAV9-PEG4-DBCO и WGA-PEG4-азидо должна приводить к утрате хромофора, присутствующего в DBCO, таким образом, разница между общим количеством молекул PEG4-DBCO в образце PEG4-DBCO и PEG4-DBCO+ WGA-PEG4-азид позволит определить количество молекул лиганда, связанных с вирусом.

[0396] Исходные данные обрабатывали следующим образом:

- расчет общего количества молекул PEG4-DBCO на основании поглощения образца (с поправкой на поглощение AAV9 отдельно и остаточное поглощение непрореагировавшего NHS-PEG4-DBCO после очистки реакционной смеси) с применением стандартной кривой зависимости поглощения от концентрации PEG4-DBCO;
- расчет количества молекул PEG4-DBCO на каждом капсиде путем деления общего количества молекул DBCO на общее количество капсидов;
- расчет количества молекул лиганда, связанных с вирусом, путем вычитания количества молекул PEG4-DBCO, присутствующих в образце PEG4-DBCO + WGA-PEG4-азидо, из такового в образце PEG4-DBCO отдельно.

Модификация вируса мечеными флуоресцентной меткой лигандами

[0397] Для модификации вируса меченым флуоресцентной меткой лигандом проводили реакцию 2,8 нмоль WGA-SNAP с 20-кратным молярным эквивалентом

азидо-PEG4-сложный эфир NHS (56 нмоль) в конечном объеме 100 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре (КТ). Непрореагировавшие азидогруппы удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Флуоресцентный BG-тетраметилродамин (BG-TMR от NEB) затем инкубировали при эквимолекулярных концентрациях с WGA-SNAP-азидо в течение 1 часа при КТ с получением WGA-SNAP-TMR-PEG4-азида.

[0398] Для модификации вируса WGA-SNAP-TMR-PEG4-азидом $3,6E+10$ гв AAV9 инкубировали с 52 нмоль DBCO-PEG4-NHS в конечном объеме 97 мкл в течение 3 часов на качалке при КТ. Затем добавляли 242,5 нмоль WGA-SNAP-TMR-PEG4-азида и инкубировали в течение 1 часа при КТ. В качестве контролей использовали 1) AAV9 отдельно; 2) AAV9, инкубированный только с TMR-WGA-азидо без линкера DBCO-PEG4-NHS; и 3) AAV9, инкубированный с WGA-азидо. После модификации образцы трижды промывали с применением плуроника F68 0,001%, NaCl 200 мМ в ФБР с MWCO 100 кДа для удаления избытка несвязавшихся реагентов. 20 мкл, собранные с колонок, были собраны для измерения поглощения света и анализа методом кцПЦР.

[0399] Оценка количества флуоресцентных лигандов на капсид AAV9.

- Поглощение измеряли на длине волны 544 нм, которая представляет собой пик поглощения TMR. Исходные данные обрабатывали следующим образом:
- Вычисление общего количества молекул TMR на основании коэффициента поглощения и экстинкции TMR путем вычитания значений поглощения AAV9 отдельно из значений суммарного поглощения AAV9-PEG4-DBCO::WGA-SNAP-TMR-PEG4-азид;
- Вычисление количества молекул TMR (таким образом, молекул лиганда) на капсиде, деление общего количества молекул TMR на общее количество капсидов;

Результаты

[0400] На основании поглощения DBCO, авторы рассчитали, что количество молекул PEG4-DBCO на вирус составляло приблизительно 210, в то время как количество лигандов WGA-PEG4-азид составляло приблизительно 150 молекул на капсид (**Фиг.**

43). По измерениям с флуоресцентным WGA-SNAP-TMR-PEG4-азидом авторы оценили, что количество лигандов составляло 170 молекул на капсид (Фиг. 44). Количества, полученные с помощью обеих стратегий, соответствуют тому факту, что наиболее распространенный белок капсида AAV VP3 (50 копий VP3 на вирион) содержит 10 лизинов, выставленных на поверхности, что означает приблизительно 500 сайтов связывания для линкера DBCO-PEG4-NHS, и следовательно, для лиганда.

Пример 12. Повышенная инфекционность клинически значимых капсидов

Способы

Получение AAV

[0401] Рекомбинантные AAV3 и AAV8 с грузом GFP были приобретены у Innovavector, тогда как AAV5 с грузом tdTomato был приобретен у Addgene (плазмида №59462). AAV6 с грузом tdTomato был получен в НЕК293Т, как описано ранее (Grieger 2006, Wu 2018). Клетки собирали через 5 дней после инфицирования, лизировали 0,5% тритоном X-100, обрабатывали нуклеазой, концентрировали тангенциальной проточной фильтрацией и очищали с помощью изопикнического ультрацентрифугирования (Dias 2015). Титрование генома вектора проводили с применением кПЦР с праймерами, нацеленными на промоторную область вирусного груза (Grieger 2006).

Химическая модификация и соединение WGA с AAV3, AAV5, AAV6 и AAV8

[0402] Проводили реакцию WGA (1,7 нмоль) с 20-кратным молярным эквивалентом реакционноспособного линкера азидо-PEG4-NHS (54 нмоль) в 100 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре с получением функционализированного нацеливающего лиганда WGA. Непрореагировавший реакционноспособный линкер удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Для конъюгации с AAV, проводили реакцию 3×10^9 гв каждого из очищенных AAV3, AAV5, AAV6 и AAV8 с 0,17 нмоль, 0,52 нмоль, 1,73 нмоль и 5,2 нмоль DBCO-PEGn-NHS в 20 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре, чтобы определить оптимальное соотношение капсида к линкеру для образования капсидов вируса с функционализированной поверхностью. Каждый из полученных продуктов капсидов вируса с функционализированной поверхностью

затем инкубировали с 0,1 нмоль WGA-PEG4-азида в течение одного часа при комнатной температуре и в течение ночи при 4С с получением соответствующего капсида вируса с модифицированной WGA поверхностью.

Добавление *in vitro* к клеткам PC12

[0403] Клетки PC12 поддерживали при 37 °С в среде DMEM/F12, содержащей 5% лошадиную сыворотку, 5% фетальную бычью сыворотку и 100 Ед пенициллина/стрептомицина. Клетки PC12 инкубировали с 3Е+9 гв каждого из продуктов капсидов вируса с модифицированной WGA поверхностью, полученных, как описано выше, в ФБР в течение 2 часов. После этого среду заменяли и клетки поддерживали при 37 °С в течение 5 дней, а затем фиксировали в 4% ПФА, окрашивали DAPI и визуализировали с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver A1. Изображения анализировали путем измерения флуоресценции GFP в каждой положительной по DAPI клетке и построения графика средних значений +/- СО для каждого титра.

Результаты

[0404] Клетки PC12 трудно трансдуцировать с применением серотипов AAV дикого типа, таких как AAV3, AAV6 и AAV8. Поэтому авторы поинтересовались, повысит ли конъюгация этих серотипов AAV с WGA эффективность трансдукции AAV этого типа клеток, повышая эффективность инфекции вирусом по сравнению с немодифицированным вирусом дикого типа. На **Фиг. 45а, 51а и 54а** показано, что авторы не смогли детектировать флуоресценцию GFP или RFP/tdTomato в клетках, обработанных серотипами немодифицированного AAV дикого типа: AAV3, AAV6 и AAV8. Напротив, модификация WGA поверхности серотипов AAV3, AAV6 и AAV8 значительно повышала эффективность трансдукции (**Фиг. 45b - 45e, Фиг. 46 - 47, Фиг. 51b - 51e, Фиг. 52 - 53, Фиг. 54b - 54e и Фиг. 55 - 56**), так что трансдуцированные положительные клетки были видны для всех серотипов при различных молярных количествах реакционноспособного линкера.

[0405] Клетки PC12, обработанные AAV5 дикого типа, демонстрировали более высокий уровень трансдукции (**Фиг. 48а**), чем AAV3, AAV6 и AAV8. Модификация WGA поверхности AAV5 в соответствии с настоящим изобретением значительно повышала эффективность трансдукции (**Фиг. 48b - 48e**). Для клеток

продемонстрировали возрастающее количество положительных по tdTomato клеток для всех продуктов капсидов вируса с модифицированной поверхностью, которые были получены с различными молярными количествами реакционноспособного линкера (Фиг. 49 - 50).

Пример 13. Необходимость AAVR для интернализации модифицированных векторов

Способы

Получение клеток HEK293 с нокаутом (KO) AAVR

[0406] Ген рецептора AAV (AAVR) (K1AA0319L) был нокаутирован в клетках HEK293 с применением технологии CRISPR-Cas9. Вкратце, клетки HEK293 трансфицировали плазмидами spCas9 и гРНК (ATAGGTGTAАСТАСGТCАСТ) (SEQ ID NO: 1), содержащими кассеты для селекции на пурамицине и гигромицине. Клетки выращивали в среде для HEK293 с пурамицином и гигромицином. После размножения проводили селекцию клеток HEK293 с нокаутом (KO) AAVR2 с помощью сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) после инфицирования AAV2 eGFP. Клетки, отрицательные по флуоресценции eGFP, отбирали и дополнительно размножали в среде с пурамицином и гигромицином. Клетки HEK293 инфицировали AAV2 eGFP, очищали с помощью FACS и размножали в общей сложности четыре раза.

Модификация поверхности и сшивание WGA с AAV2

[0407] Проводили реакцию нацеливающего лиганда WGA (1,7 нмоль) с 20-кратным молярным эквивалентом реакционноспособного линкера азид-PEG4-NHS (54 нмоль) в 100 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре с получением функционализированного нацеливающего лиганда. Непрореагировавший реакционноспособный линкер удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. Для конъюгации функционализированного нацеливающего лиганда с AAV2, проводили реакцию 1E+9 гв очищенного AAV2 с 0,17 нмоль DBCO-PEG4-NHS в 20 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Полученный капсид вируса с функционализированной поверхностью инкубировали с 0,1 нмоль WGA-PEG4-азида в

течение одного часа при комнатной температуре и в течение ночи при 4С с получением капсида вируса с модифицированной поверхностью «WGA-AAV2».

Добавление *in vitro* к клеткам AAVR KO HEK293

[0408] WGA-AAV2 или немодифицированный AAV2 добавляли к AAVR KO HEK293 при титре 1E+9 гв. Через 5 дней после трансдукции клетки визуализировали и подсчитывали с помощью программного обеспечения с открытым исходным кодом ImageJ.

Результаты

[0409] В этих экспериментах авторы хотели исследовать, могут ли векторы AAV с поверхностями, модифицированными в соответствии с настоящим изобретением, обойти необходимость рецептора AAVR для проникновения в клетку и трансдукции. Для этого авторы создали линию клеток HEK293, в которой ген AAVR был удален. В нормальных клетках HEK293 авторы наблюдали устойчивую трансдукцию AAV2, что показали с помощью анализа FACS (Фиг. 57) и микроскопии (Фиг. 58a). В клетках AAVR KO HEK293 трансдукция AAV2 tdTomato была значительно снижена (Фиг. 58b).

[0410] Авторы дополнительно исследовали, достаточно ли лиганда WGA для возобновления проникновения AAV2 в клетки AAVR KO. Авторы обнаружили, что инфекция WGA-AAV2 приводила к значительно большему количеству как процентной, так и средней интенсивности флуоресценции (MFI) положительных по tdTomato клеток по сравнению с контролем (немодифицированным AAV2) (Фиг. 59a - b и Фиг. 60a - b). Это указывает на то, что модификация AAV2 с помощью WGA позволяет вектору проникать в клетки даже в отсутствие AAVR, позволяя предположить, что он обходит опосредованную AAVR интернализацию.

Пример 14. Нацеливание на ScFv с помощью немолизумаб-SNAP-AAV2ΔHSPG

Способы

Получение AAV

[0411] Рекомбинантный AAV2-ΔHSPG получали в соответствии с процедурой, описанной в Примере 1.

Получение немолизумаб-SNAP

[0412] Аминокислотную последовательность немолизумаба получали из базы данных структуры IMGT/3D (<http://imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=10064>) (SEQ ID NO: 2). CDR клонировали в остов scFv, содержащий сигнальную последовательность GP64 против хода транскрипции и метку Sortag, метку SNAP и метку 6xHis по ходу транскрипции (SEQ ID NO: 3), что проиллюстрировано на **Фиг. 61** ("6xHis" представлен в SEQ ID NO: 4). Полученную конструкцию клонировали в pFastBac для продукции с применением бакулавиральной экспрессионной системы. Белок получали в клетках насекомых SF9 с применением стандартных способов и очищали из клеточной среды с применением аффинной хроматографии.

Модификация поверхности и сшивание AAV2-ΔHSPG и немолизумаб-SNAP

[0413] Проводили реакцию 3E+10 гв очищенного AAV2-ΔHSPG с 17,3 нмоль BG-PEG13-NHS (синтез по заказу) в 200 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре с получением функционализированного BG капсида вируса. Реакционную смесь очищали с применением центрифужного фильтра с MWCO 100 кДа и дополнительно инкубировали с 1 нмоль функционализированного немолизумаб-SNAP лиганда в течение ночи при комнатной температуре с получением капсида вируса с модифицированной поверхностью «немолизумаб-SNAP::AAV2-ΔHSPG». Избыток непрореагировавшего лиганда удаляли, дважды пропуская через центрифужный блок с MWCO 100 кДа, и капсид вируса с модифицированной поверхностью ресуспендировали в ФБР.

Интъекции *in vivo* и проводка тканей

[0414] Для экспериментов с интъекциями *in vivo* мышей дикого типа анестезировали 2 - 2,5% изофлураном, а затем вводили путем подкожной интъекции в ухо 3E+10 гв немолизумаб-SNAP::AAV2-ΔHSPG в 10 мкл ФБР. Через 3 недели кожу собирали, фиксировали в 4% параформальдегиде в течение ночи и получали срезы толщиной 40 мкм. Срезы окрашивали в течение ночи при 4°C антителом кролика против K14 (Covance, разведение 1:200) в ФБР, содержащем 5% козьей сыворотки + 0,3% тритон-

Х. Вторичное антитело против антител кролика, меченое Alexa488, разводили 1:1000 и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в темноте. Предметные стекла закрепляли с помощью ProLong Gold, и получали изображения с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 и анализировали их в программном обеспечении ImageJ.

Результаты

[0415] Немолизумаб был выбран в качестве scFv, поскольку он специфичен к рецепторам IL31RA и показал некоторую перспективность в клинических испытаниях при умеренном и тяжелом атопическом дерматите (1). Немолизумаб-SNAP::AAV2-ΔHSPG вводили путем подкожной инъекции мышам и исследовали срезы кожи на предмет перекрывания с окрашиванием K14 - маркером кератиноцитов. Как показано на **Фиг. 62a, 62b и 62c**, авторы наблюдали значительное перекрывание между инфицированными вирусом клетками и положительными по K14 кератиноцитами вокруг волосяных фолликулов. Важно отметить, что, поскольку флуоресценция сохранялась дольше, чем 8 - 10-дневное обновление эпидермиса у мышей (2), эти данные указывают на то, что эпидермальные стволовые клетки также были мишенью в этом эксперименте. Действительно, транскриптомные исследования показывают, что IL31RA экспрессируется в базальных кератиноцитах в интерфолликулярном и фолликулярном эпидермисе, многие из которых являются эпидермальными стволовыми клетками (3).

Цитируемые источники

1. Nemoto O, Furue M, Nakagawa H, Shiramoto M, Hanada R, Matsuki S, et al. The first trial of CIM331, a humanized antihuman interleukin-31 receptor A antibody, in healthy volunteers and patients with atopic dermatitis to evaluate safety, tolerability and pharmacokinetics of a single dose in a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *The British journal of dermatology* 2016;174:296-304
2. Potten CS, Saffhill R, Maibach HI. Measurement of the transit time for cells through the epidermis and stratum corneum of the mouse and guinea-pig. *Cell Tissue Kinet* 1987;20:461-72

3. Joost S, Zeisel A, Jacob T, Sun X, La Manno G, Lonnerberg P, et al. Single-Cell Transcriptomics Reveals that Differentiation and Spatial Signatures Shape Epidermal and Hair Follicle Heterogeneity. *Cell Syst* 2016;3:221-37 e9

Пример 15. Исследование невидимости для иммунной системы – уклонения от нейтрализующих антител

[0416] Нейтрализующие антитела, распознающие белки капсида AAV, являются основными препятствиями при опосредованной AAV генной терапии. В настоящее время пациенты, у которых обнаружены даже небольшие титры нейтрализующих антител против AAV, исключаются из клинических испытаний с применением AAV в качестве векторов для генной терапии. Поскольку примерно 50% населения имеет нейтрализующие антитела против AAV с раннего возраста, поиск способа уклонения/обхода гуморального иммунитета будет значительным преимуществом благодаря увеличению пула подходящих пациентов. В настоящее время большое количество исследований в данной области сосредоточено на аспекте уклонения от иммунной системы (Wang M, et al. Prediction of adeno-associated virus neutralizing antibody activity for clinical application. *Gene Ther.* 2015 Dec; 22(12):984-92.) Авторы предположили, что модификация поверхности AAV реакционноспособными линкерами, описанными в настоящем документе, или линкерами и лигандами вместе, может привести к снижению распознавания нейтрализующими антителами.

[0417] Влияние (i) функционализации вируса различными количествами реакционноспособного линкера и (ii) длины линкера либо только на стороне вируса, либо на стороне лиганда и стороне вируса на гуморальный иммунитет против AAV исследовали *in vitro*. Для исследования первого, тестировали связывание IgG человека и нейтрализацию AAV2 дикого типа, функционализированного различным молярным количеством линкера со спейсером фиксированной длины, но в отсутствие лиганда. Для исследования второго, тестировали связывание IgG человека и нейтрализацию AAV2, функционализированного фиксированным количеством спейсеров дискретного PEG (dPEG) и дисперсного ПЭГ (pPEG), и либо оставленного неконъюгированным, либо конъюгированного с WGA, также функционализированным фиксированным количеством спейсеров дискретного PEG (dPEG) и дисперсного PEG (pPEG). Нейтрализация была протестирована на линиях клеток или первичных клетках, в разной степени перmissive для инфекции AAV2 дикого типа.

Материалы

Векторы AAV

[0418] Рекомбинантный AAV2 с грузом tdtomato продуцировали в клетках HEK293T. Клетки собирали через 3 дня после трансфекции, лизировали с помощью тритона X-100 в присутствии РНКазы. Рекомбинантный AAV2 концентрировали путем тангенциальной проточной фильтрации и очищали с применением изопикнического ультрацентрифугирования (Grieger 2006). Титрование AAV проводили с применением кПЦР с праймерами, нацеленными на область ITR груза вируса (Dias 2015).

Объединенная сыворотка человека и сыворотка мыши

[0419] Объединенная сыворотка человека была приобретена у Sigma (номер в каталоге: H4522-20ML). Человеческую сыворотку инактивировали нагреванием для инактивации комплемента или других не являющихся антителами ингибирующих вирусы факторов и хранили в замороженном виде для дальнейшего использования. Сыворотку мыши собирали у мышей через 4 недели после системной инъекции AAV2. Кровь собирали из хвостовой вены и оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин для свертывания. Сгусток удаляли на этапе центрифугирования при 2000 g в течение 10 мин в предварительно охлажденной центрифуге. Надосадочную жидкость, состоящую из сыворотки, собирали и инактивировали нагреванием в течение 30 мин при 56 °C. Сыворотку хранили при -20°C до момента применения.

Способы

Модификация поверхности вируса (AAV2) линкерами DBCO-PEG(12)-NHS с применением различных соотношений вируса к реакционноспособному линкеру

[0420] Как и в предыдущих экспериментах, линкеры 0,52 нмоль, 1,73 нмоль, 5,2 нмоль, 17,3 нмоль, 52 нмоль или 173,3 нмоль DBCO-PEG(12)-NHS конъюгировали с 3E+9 гв AAV2 в 20 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре.

Сшивание функционализированного PEG(n)-азид-NHS WGA с функционализированным DBCO-PEG(n) AAV2 для исследования длин PEG

[0421] Аналогично Примеру 9, капсид AAV2 дикого типа был функционализирован способным вступать в реакцию с капсидом линкером DBCO-PEG_n-NHS, где n равен либо 4, либо 2k, с получением конструкции «4-вирус» или «5k-вирус» соответственно. Лиганд WGA был функционализирован способным вступать в реакцию с лигандом линкером азид-PEG_n-NHS, где n равен 4 или 5K, с получением «4-лиганд» или «5k-лиганд» соответственно. В частности, проводили реакцию WGA (1,7 нмоль) с 20-кратным молярным эквивалентом азид-PEG_n-NHS (54 нмоль) в 100 мкл ФБР при pH 7,2 в течение 3 часов при комнатной температуре. Непрореагировавший линкер удаляли с применением центрифужного фильтра с отсечкой по молекулярной массе MWCO 10 кДа. 0,1 нмоль WGA-PEG(n)-азида соединяли с вирусом с модифицированной поверхностью в реакции сшивания в течение 1 часа при комнатной температуре и далее в течение ночи при 4°C.

ELISA (ИФА)

[0422] Специфические к AAV2 антитела IgG детектировали с применением твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). 96-луночные планшеты ELISA покрывали частицами AAV2, разбавленными в буфере для покрытия (37 mM Na₂CO₃, 63 mM NaHCO₃ в H₂O; pH 9,6), при концентрации 1x10⁹ гв/лунку в течение 2 часов при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °C. Планшеты промывали три раза буфером для промывки (ФБР с 0,05% твин 20). Добавляли блокирующий раствор (ФБР с 0,05% твин 20 и 5% обезжиренного сухого молока) и инкубировали планшеты в течение 2 часов при 37°C. После блокирования планшеты промывали один раз буфером для промывки. Разведения сыворотки добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °C. Планшеты трижды промывали буфером для промывки и инкубировали с конъюгированным с HRP вторичным антителом против IgG, разбавленным в буфере для разведения (ФБР с 0,05% твин 20 и 1% нежирного сухого молока), в течение 1 часа при 37 °C. Планшеты промывали три раза буфером для промывки и добавляли ТМВ - субстрат для HRP. Для остановки реакции добавляли стоп-раствор, содержащий уксусную кислоту, и измеряли поглощение (выраженное в единицах оптической плотности, ОП) на 450 нм с помощью спектрофотометра. Значения ОП регистрировали после вычитания фона, и они коррелировали со степенью связывания антител с иммобилизованным антигеном (AAV).

Анализ нейтрализации с клетками HEK293T (пермиссивная линия клеток)

[0423] Клетки HEK293T поддерживали в DMEM + GlutaMax с добавлением 5% ЭБС и 100 ЕД пенициллина/стрептомицина при 37 °С и 5% CO₂. Для анализа клетки высевали в количестве 3x10⁴ клеток на лунку 96-луночного планшета и добавляли вирус AAV, предварительно инкубированный в течение 1 часа при 37 °С с 2-кратными серийными разведениями сыворотки крови человека или мыши, при MOI 1000. Через 72 часа флуоресценцию трансдуцированных клеток анализировали путем проточной цитометрии с помощью сортировщика клеток S3e Cell Sorter от BioRad.

Анализ нейтрализации с клетками PC12 (слабо пермиссивная линия клеток)

[0424] Клетки PC12 поддерживали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% лошадиной сыворотки, 5% ЭБС и 100 ЕД пенициллина/стрептомицина при 37 °С и 5% CO₂. Для анализа клетки высевали в количестве 3x10⁴ клеток на лунку 96-луночного планшета и добавляли вирус AAV, предварительно инкубированный в течение 1 часа при 37°С с 2-кратными серийными разведениями сыворотки мыши, при MOI 1000. Через 5 дней определяли флуоресценцию трансдуцированных клеток с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver A1.

Анализ нейтрализации с нейронами первичных ганглиев заднего корешка (DRG)

[0425] Чашки со стеклянным дном покрывали каплей 15 мкл раствора поли-L-лизина (исходная концентрация: 1 мг/мл, разбавляли 1:10 H₂O) в течение 1 часа при 37 °С. Через 1 час каплю удаляли и чашки дважды промывали ФБР. Затем в чашки добавляли 15 мкл матригеля, разбавленного 1:50 в ФБР, и инкубировали при 37°С. Перед посевом клеток каплю матригеля удаляли и чашки сушили на воздухе. Затем выделяли DRG из взрослых мышей. Первичные клетки (в основном нейроны и сателлитные клетки) дополнительно выделяли путем обработки DRG коллагеназой при 37°С в течение 25 мин с последующей промывкой и этапом инкубации с трипсином. Реакцию останавливали с помощью 500 мкл полной среды, и суспензию клеток фильтровали, центрифугировали и ресуспендировали в среде для культивирования клеток. В каждую чашку добавляли 10 мкл суспензии клеток. Через 1 час осторожно добавляли 100 мкл среды. На следующий день среду удаляли и в чашки добавляли 200 мкл свежей среды. На следующий день среду заменяли на 100 мкл DMEM + пенициллин/стрептомицин без ЭБС. Через 15 мин безсывороточную среду удаляли и к клеткам добавляли

немодифицированный и модифицированный PEG4-DBCO:азид-PEG4-WGA вирус, который предварительно инкубировали с сывороткой, и через 15 мин добавляли 50 мкл среды. На следующий день в каждую чашку добавляли 2 мл среды DMEM/F12. Визуализацию трансдуцированных клеток проводили через пять дней с помощью конфокального микроскопа.

Результаты

[0426] На **Фиг. 63a** и **63b** показано, что авторы настоящего изобретения химически модифицировали AAV2 различным количеством линкеров DBCO-PEG4 и провели анализ ELISA с объединенной сывороткой человека, которая содержит антитела против AAV2 (**Фиг. 63a**). В соответствии с гипотезой авторов увеличение количества линкера на вирус приводит к снижению распознавания вируса антителами IgG, что видно по почти 80%-ному снижению сигнала ОП при сравнении наибольшего количества линкера (173,3 нмоль) с наименьшим количеством (0,52 нмоль). Тем не менее, при этих повышенных количествах линкера эффективность трансдукции вируса сильно снижается. Эти результаты указывают на то, что при соотношениях линкера к вирусу, используемых для получения конструкций, которые, как было показано, обеспечивают повышенную эффективность трансдукции, как установлено в Примерах 8 и 9 настоящего документа, распознавание вируса антителами изменяется с обратной пропорциональной корреляцией между длиной спейсера и связыванием.

[0427] Авторы настоящего изобретения также провели анализ нейтрализации в клетках HEK293T для дальнейшего выяснения того, коррелировало ли пониженное связывание IgG с AAV2 с линкерами DBCO-PEG12, наблюдаемое при повышенных количествах линкеров, с утратой нейтрализующей активности (**Фиг. 63b**). На **Фиг. 63b** показано, что на нейтрализующую способность антител не влияли конструкции, полученные с количествами линкера 0,52 нмоль, 1,73 нмоль, 5,2 нмоль, 17,3 нмоль, 52 нмоль или 173,3 нмоль на 3×10^9 гв вируса (в частности, количества, которые все еще совместимы с повышенной трансдукцией). Таким образом, несмотря на уменьшение связывания антител, функционализация вируса количествами линкеров, совместимыми с повышенной трансдукцией, вряд ли приведет к ускользанию от нейтрализации.

[0428] Далее авторы исследовали, влияет ли на распознавание антителами увеличение длины спейсера PEG либо на части линкера, которая присоединена только к вирусу,

либо как на вирусе, так и на лиганде. Авторы модифицировали вирус с помощью DBCO-PEG4-NHS («4-вирус»), DBCO-PEG2000-NHS («2К-вирус»), а также модифицированный вирус, поверхность которого сначала функционализировали линкером DBCO-PEG4-NHS, а затем сшивали с WGA-PEG5000-азидом («4-вирус 5К лиганд»), и модифицированный вирус, поверхность которого сначала функционализировали линкером DBCO-PEG2000-NHS, а затем сшивали с WGA-PEG4-азидом («2К-вирус 4 лиганд») (Фиг. 64а). Увеличивая длину спейсера PEG, авторы не наблюдали различий в распознавании AAV антителами при анализе ELISA (Фиг. 64а). Соответственно, не было различий в нейтрализующей способности при увеличении длины PEG линкера DBCO-PEG_n-NHS, а также при изменении длины PEG WGA-PEG-азида (Фиг. 64b - 64c).

[0429] Поскольку авторы не наблюдали каких-либо изменений в анализе нейтрализации с применением высокопермиссивной линии клеток HEK293T, авторы сменили ее на менее пермиссивные клетки линии нервных клеток PC12 (Фиг. 65) и на первичные DRG (Фиг. 66). В этих экспериментах авторы модифицировали поверхность вируса с помощью DBCO-PEG4-NHS, а затем сшивали с WGA-PEG4-азидом и инкубировали вирус с модифицированной поверхностью с серийными разведениями сыворотки мыши, содержащей антитела против AAV2. Как показано на Фиг. 65, в клетках PC12 трансдукция немодифицированным AAV блокируется при всех исследованных разведениях сыворотки, в то время как модифицированный WGA вирус ускользает от распознавания нейтрализующими антителами, начиная с разведения 1:16, что позволяет предположить, без привязки к какой-либо конкретной теории, возможность того, что вирус с модифицированной WGA поверхностью может использовать другой путь для проникновения в клетки PC12, тем самым обходя ингибирование антителами. Авторы также использовали этот анализ нейтрализации в культурах DRG, и также здесь авторы продемонстрировали ускользание вируса с модифицированной WGA поверхностью при разведениях сыворотки, которые полностью нейтрализовали немодифицированный AAV2 (Фиг. 66).

8. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO. 1:

ATAGGTGTAAC TACGTCAC T

SEQ ID NO: 2 - аминокислотная последовательность немоллизумаба

ATGGTTTCTGCTATCGTGCTGTACGTGCTGCTGGCTGCTGCAGCTCACTCCGCTTTCGCTCA
AGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGTGCTGAAGTGAAGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAGGTGTCCT
GCAAGGCTTCCGGTTACACTTTCACCGGCTACATCATGAACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGA
CAGGGACTCGAATGGATGGGCCTGATCAACCCCTACAACGGTGGCACCGACTACAACCCCTCA
GTTCCAGGACCGTGTGACCATCACCGCTGACAAGTCCACCTCCACCGCTTACATGGAAGTGT
CCAGCCTGCGTTCGGAGGACACCGCTGTTTACTACTGCGCTCGTGACGGTTACGACGACGGT
CCCTACACTCTGGAAACCTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACCGTGTGTCATCTGGTGGTGGCGG
TTCTGGCGGTGGTGGTAGCGGAGGTGGTGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT
CTCTGTCCGCTTCAGTGGGCGACCGTGTCACTATCACTTGCCAGGCTTCCGAGGATATCTAC
TCCTTCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACAACGC
TCAGACTGAGGCTCAGGGTGTCCCTCTCGTTTCTCCGGTTCGGTTCGGAACCGACTTTA
CCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCAGCACCCTAC
GACTCCCCACTGACTTTCGGTGGTGGCACCAAGGTCGAGATCAAGTCTCCTCCTCCGGATC
TTCTCCTCTGGTTCTGCTGCTCTGCCCCGAGACTGGTGGTACCCATCACCATCATCATCACT
AA

SEQ ID NO: 3 - синтезированная аминокислотная последовательность немоллизумаба
SNAP

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
GYIMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNGGTDYNPQFQDRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARDGYDDGPYLETWGQGLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASEDIYSFVAWYQQKPKAP
KLLIYNAQTEAQGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYDS
PLTFGGGTKVEIKSSSSGSSSSGSAALPETGGTMDKDCMKRITLDSPLG
KLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPLMQATAWLN
AYFHQPEAIEEFVVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLKVVKFGGEVISYQQL
AALAGNPAATAAVKTALSGNPVPIIPCHRVSSTGAVGGYEGGLAVKEW
LLAHEGHRLGKPGLC THHHHHH

9. ЭКВИВАЛЕНТЫ И ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0430] Хотя изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на предпочтительный вариант реализации и различные альтернативные варианты реализации, специалистам в данной области техники будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения в форму и детали, не отклоняясь от сущности и объема настоящего изобретения.

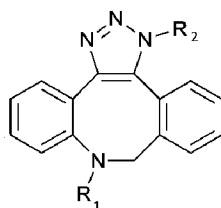
[0431] Все литературные источники, выданные патенты и заявки на патент, цитируемые в тексте настоящего описания, полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки во всех отношениях.

[0432] PCT/EP2020/062713 полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки во всех отношениях.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Капсид вируса с модифицированной поверхностью, содержащий один или более из:
 - лиганда, ковалентно конъюгированного с белком капсида вируса посредством линкера,
 - указанный линкер содержит:
 - сшитый фрагмент, причем указанный сшитый фрагмент образуется в результате реакции между первым и вторым представителями способной образовывать сшивку пары; и
 - необязательно один или более спейсеров.
2. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 1, отличающийся тем, что первый и второй представители способной образовывать сшивку пары участвуют в реакции, выбранной из: реакции катализируемого Cu(I) циклоприсоединения азид-алкин (CuAAC), реакции стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-азид (SPAAC), реакции стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-нитрон (SPANC), реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEEDD) и лигирования по Штаудингеру и реакции $[4+1]$ циклоприсоединения.
3. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный сшитый фрагмент содержит по меньшей мере одно из: восьмичленного кольца и триазольного кольца.
4. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 2, отличающийся тем, что указанная реакция представляет собой реакцию стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-азид (SPAAC).

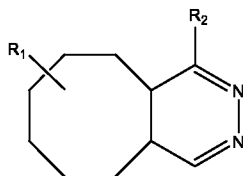
5. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанная способная образовывать сшивку пара содержит циклооктин и азид.
6. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 5, отличающийся тем, что циклооктин выбран из дибензилциклооктина (DIBO), дибензоазациклооктина (DBCO) и биарилазациклооктинона (BARAC) или их производного.
7. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 6, что указанный циклооктин представляет собой DBCO.
8. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный сшитый фрагмент содержит следующую структуру:



где R_1 и R_2 обозначают точки присоединения к линкеру.

9. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 2, отличающийся тем, что указанная реакция представляет собой реакцию Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEEDD).
10. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из пп. 1 - 2 и 9 - 3, отличающийся тем, что указанная способная образовывать сшивку пара содержит трансциклооктен и тетразин.

11. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из пп. 1 - 2 и 9 - 10, отличающийся тем, что указанный сшитый фрагмент содержит следующую структуру.



где R_1 и R_2 обозначают точки присоединения к линкеру.

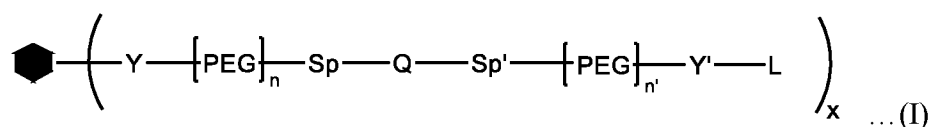
12. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный линкер содержит один или более спейсеров.
13. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 12, отличающийся тем, что один или более спейсеров содержат от 1 до 20 мономеров полиэтиленгликоля.
14. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 13, отличающийся тем, что один или более спейсеров содержат от 2 до 8 мономеров полиэтиленгликоля.
15. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 14, отличающийся тем, что в одном из указанных одного или более спейсеров содержатся 4 мономера полиэтиленгликоля.
16. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 15, содержащий два спейсера, которые содержат 4 мономера полиэтиленгликоля.
17. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой лиганд, специфичный для типа клеток.

18. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный лиганд выбран из цитокинов, факторов роста, лектинов, токсинов, одноцепочечных антител, многоцепочечных антител или антигенсвязывающих фрагментов антител, пептидов и их комбинаций.
19. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный линкер ковалентно присоединен к первичной аминогруппе первичной последовательности белка капсида.
20. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 19, отличающийся тем, что первичная аминогруппа выбрана из N-концевой аминогруппы, эpsilon-аминогруппы лизина и аминогруппы аминокислоты аргинина.
21. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 20, отличающийся тем, что первичная аминогруппа представляет собой эpsilon-аминогруппу аминокислотного остатка лизина.
22. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный линкер ковалентно присоединен к лиганду посредством первичной аминогруппы лиганда.
23. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный линкер ковалентно присоединен к нацеливающему лиганду посредством неприродного аминокислотного остатка первичной последовательности нацеливающего лиганда.
24. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 23, отличающийся тем, что неприродный аминокислотный остаток содержит представителя способной образовывать сшивку пары, который участвует в реакции, выбранной из: реакции катализируемого Cu(I) циклоприсоединения азид-алкин (CuAAC), реакции стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-азид (SPAAC), реакции стимулируемого напряжением циклоприсоединения алкин-нитрон (SPANC),


реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (PEEDD), лигирования по Штаудингеру и реакции [4+1] циклоприсоединения.

25. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 24, отличающийся тем, что указанная способная образовывать сшивку пара содержит фрагмент азид, циклооктин, циклооктен или 1,2,4,5-тетразин.
26. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из пп. 1 - 25, отличающийся тем, что белковая последовательность капсида вируса была мутирована для ослабления или устранения связывания капсида с полисахаридами или протеогликанами клеток млекопитающих.
27. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из пп. 1 - 25, отличающийся тем, что белковая последовательность капсида вируса не была мутирована для ослабления или устранения связывания белка капсида с полисахаридами или протеогликанами клеток млекопитающих.
28. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 26 или 27, характеризующийся повышенной инфекционностью по сравнению с немодифицированным капсидом вируса, имеющим такую же последовательность белка капсида.
29. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный капсид вируса выбран из капсида аденовируса, капсида аденоассоциированного вируса, капсида ретровируса, капсида лентивируса, капсида вируса простого герпеса и капсида бакуловируса.
30. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 29, отличающийся тем, что указанный капсид вируса представляет собой капсид аденоассоциированного вируса (AAV).

31. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 30, отличающийся тем, что по меньшей мере один из остатков аргинина в положениях 585 и 588 VP1 или в аналогичных положениях в VP2 или VP3 был мутирован.
32. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 31, отличающийся тем, что остатки аргинина в положениях 585 и 588 VP1 были мутированы на остатки аланина.
33. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 31 или 32, характеризующийся измененным тропизмом по сравнению с немодифицированным капсидом вируса.
34. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный капсид вируса с модифицированной поверхностью демонстрирует уклонение от изначально присутствующих нейтрализующих антител.
35. Капсид вируса с модифицированной поверхностью формулы I:



где:

 представляет собой капсид вируса;

Y и Y' независимо представляют собой присоединяющий фрагмент;

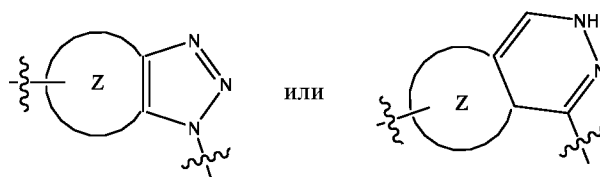
n и n' независимо равны 0 или целому числу от 1 до 50;

Sp и Sp' независимо представляют собой необязательный спейсер;

L представляет собой лиганд;

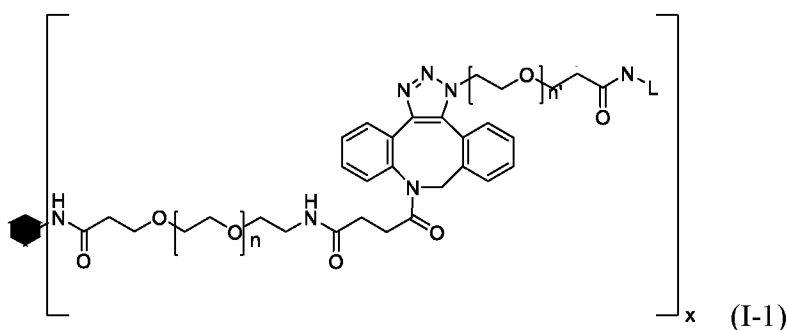
x представляет собой соотношение лиганд/капсид, которое находится в диапазоне от 1 до 500; и

Q выбран из:



где Z представляет собой 7- или 8-членную циклическую или гетероциклическую структуру.

36. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 35, отличающийся тем, что x находится в диапазоне от 100 до 200.
37. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 35, отличающийся тем, что x находится в диапазоне от 130 до 170.
38. Капсид вируса с модифицированной поверхностью формулы I-1:



где:



представляет собой капсид вируса;

n и n' независимо представляют собой целое число, выбранное из 0 - 30;

T представляет собой лиганд; и

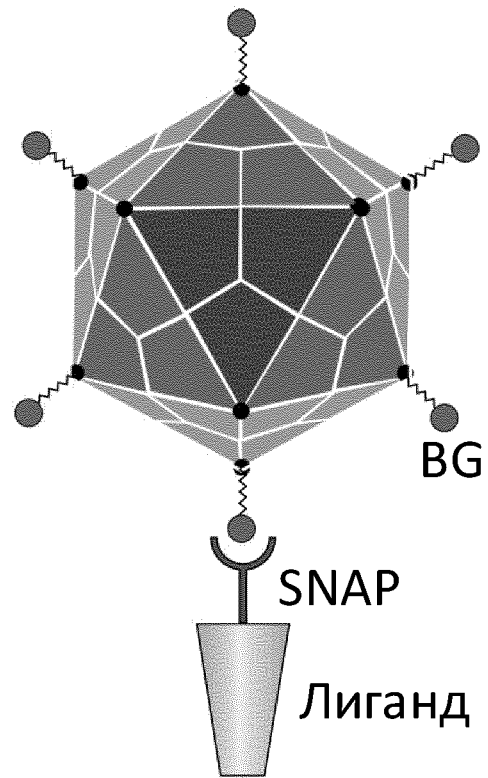
x представляет собой целое число от 1 до 500.

39. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по п. 38, отличающийся тем, что x находится в диапазоне от 100 до 200.

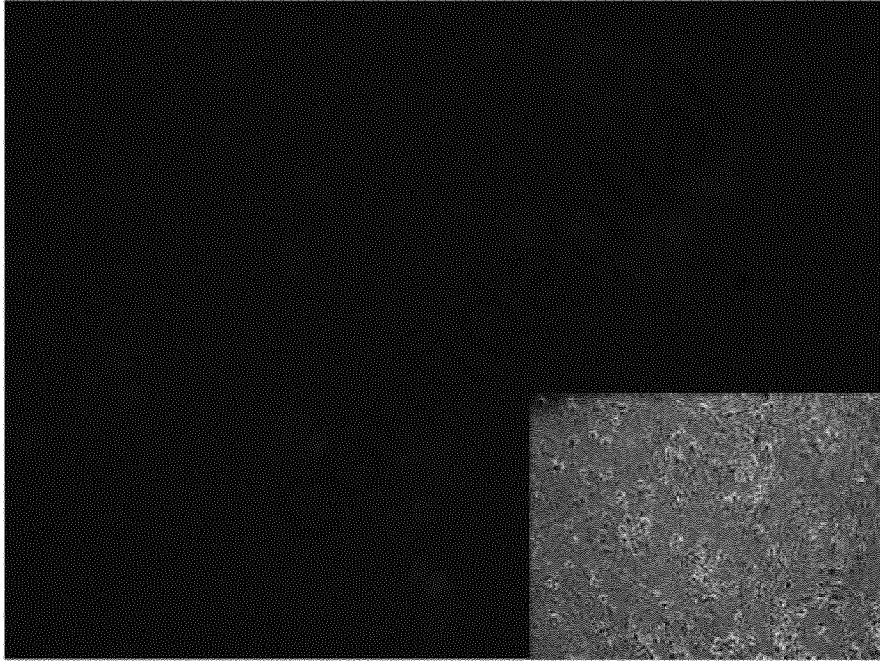
40. Капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из пп. 1 -38, отличающийся тем, что соотношение лигандов на капсид (x) находится в диапазоне от 130 до 170.
41. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один рекомбинантный вирион, причем указанный рекомбинантный вирион содержит капсид вируса с модифицированной поверхностью по любому из пп. 1 - 39 и рекомбинантный полинуклеотид в качестве груза, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, солюбилизатор, наполнитель, консервант, вспомогательное вещество или их комбинацию.
42. Способ лечения пациента, имеющего заболевание, поддающееся лечению путем внутриклеточной доставки рекомбинантного полинуклеотидного груза, причем указанный способ включает:
введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 41,
где рекомбинантный полинуклеотидный груз способен лечить заболевание.
43. Композиция для применения для лечения заболевания, поддающегося лечению путем внутриклеточной доставки рекомбинантного полинуклеотидного груза, причем указанная композиция содержит:
терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции по п. 41,
где груз - рекомбинантный полинуклеотид - способен лечить заболевание.
44. Применение капсида вируса с модифицированной поверхностью по любому из пп. 1 - 39 для производства лекарственного средства для лечения заболевания, поддающегося лечению путем внутриклеточной доставки рекомбинантного полинуклеотидного груза.
45. Капсид вируса с функционализированной поверхностью, содержащий первого представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров, причем указанный капсид вируса с функционализированной поверхностью является подходящим для реакции с функционализированным

лигандом, содержащим второго представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров, при этом представители способной образовывать сшивку пары участвуют в реакции, выбранной из: реакции катализируемого Cu(I) циклоприсоединения азид-алкин (CuAAC), реакции стимулированного напряжением циклоприсоединения алкин-азид (SPAAC), реакции стимулированного напряжением циклоприсоединения алкин-нитрон (SPANC), реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEDD) и лигирования по Штаудингеру и реакции [4+1] циклоприсоединения.

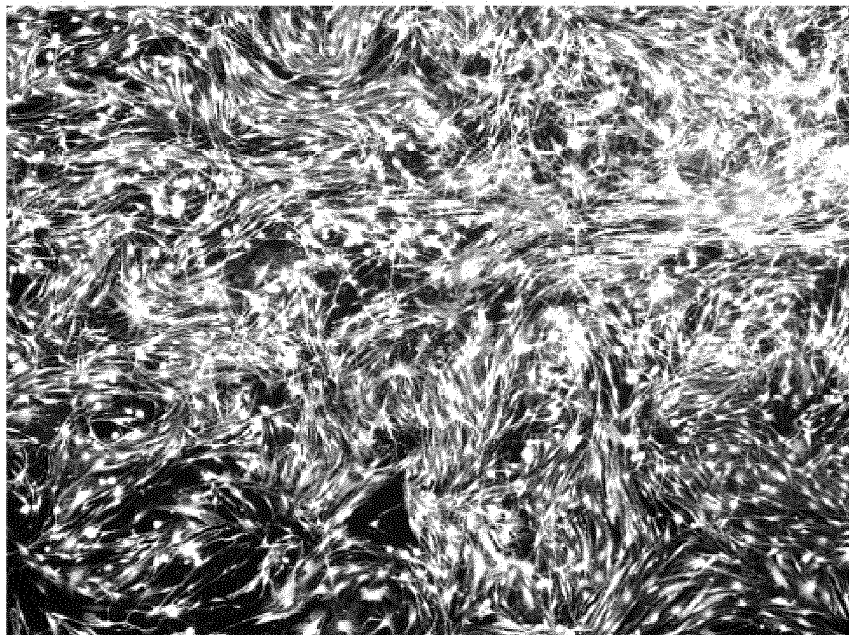
46. Способ получения капсида вируса с модифицированной поверхностью, причем указанный способ включает этапы:
- i) получения капсида вируса с функционализированной поверхностью путем проведения реакции белка капсида вируса с линкером, способным вступать в реакцию с капсидом, причем линкер содержит первого представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров;
 - ii) конъюгирования капсида вируса с функционализированной поверхностью с функционализированным лигандом, содержащим второго представителя способной образовывать сшивку пары и необязательно один или более спейсеров;
- при этом первый и второй представители способной образовывать сшивку пары реагируют с образованием сшитого фрагмента Q.
47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что капсид вируса с модифицированной поверхностью представляет собой капсид по любому из пп. 1 - 39.
48. Рекомбинантный вирион, содержащий капсид с модифицированной поверхностью по любому из пп. 1 - 39 .
49. Рекомбинантный вирион по п. 48, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный вирион представляет собой rAAV.



ФИГ. 1

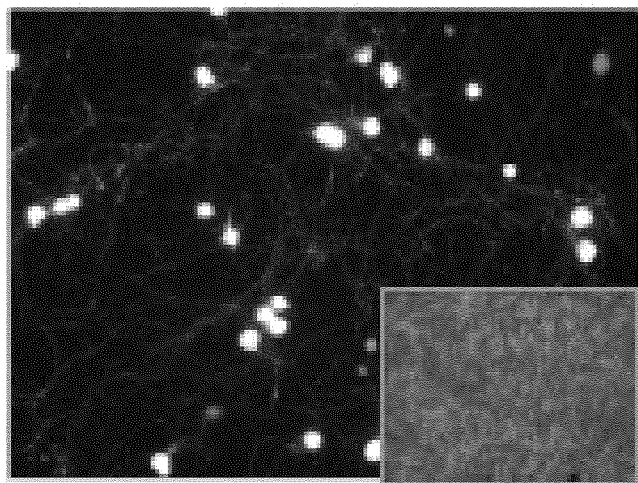


ФИГ. 2



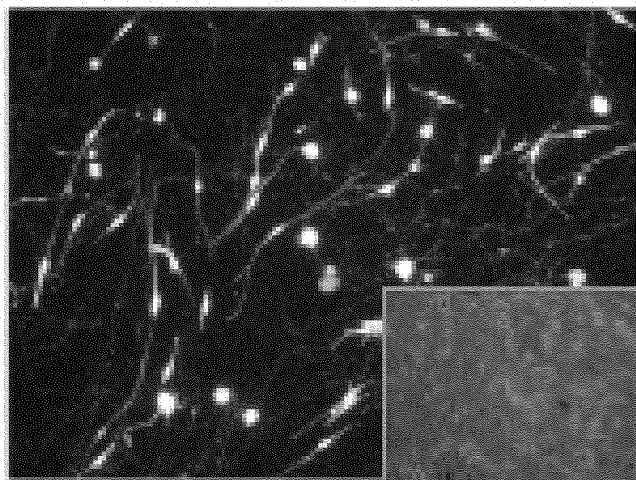
ФИГ. 3

NGF-SNAP



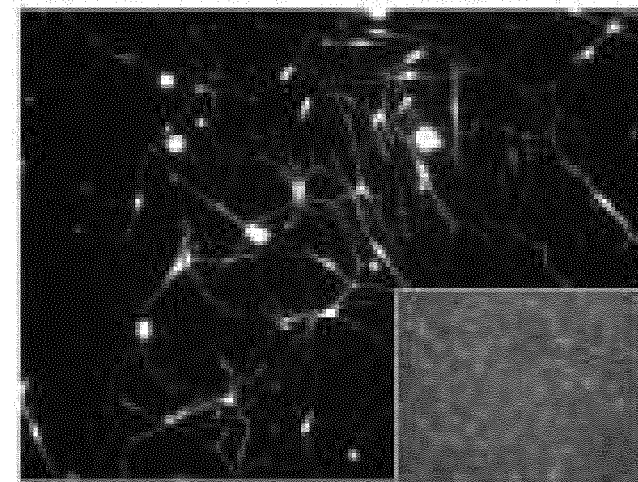
ФИГ. 4а

NT3-SNAP

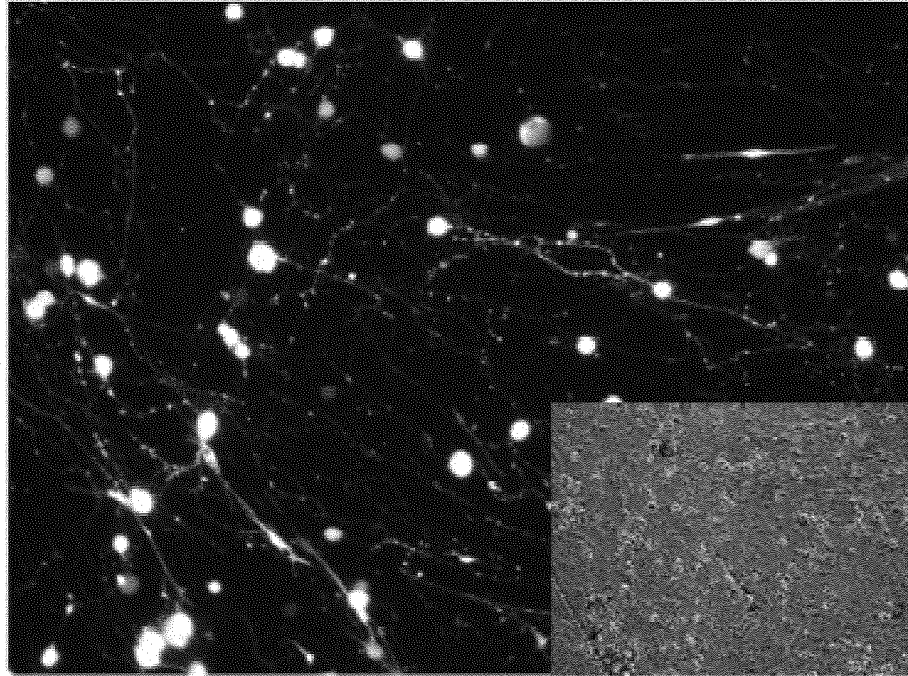


ФИГ. 4b

BDNF-SNAP

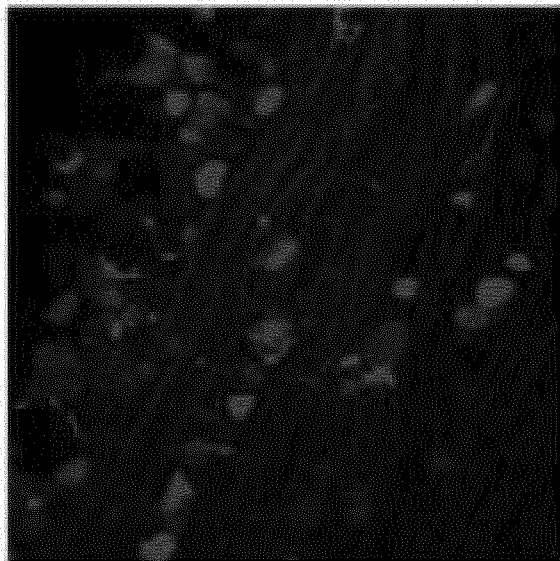


ФИГ. 4с



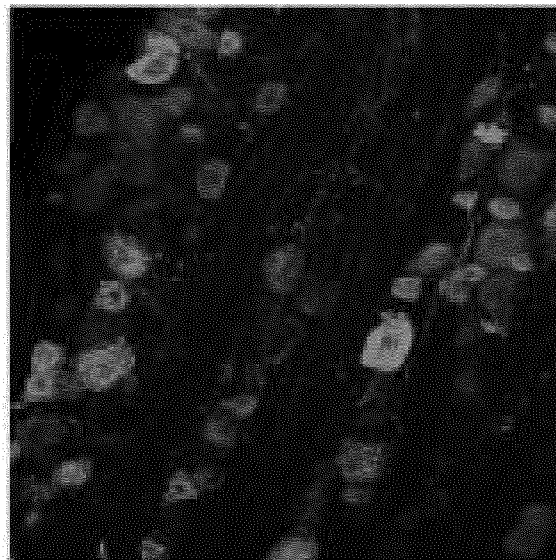
ФИГ. 5

NGF- Δ HSPG



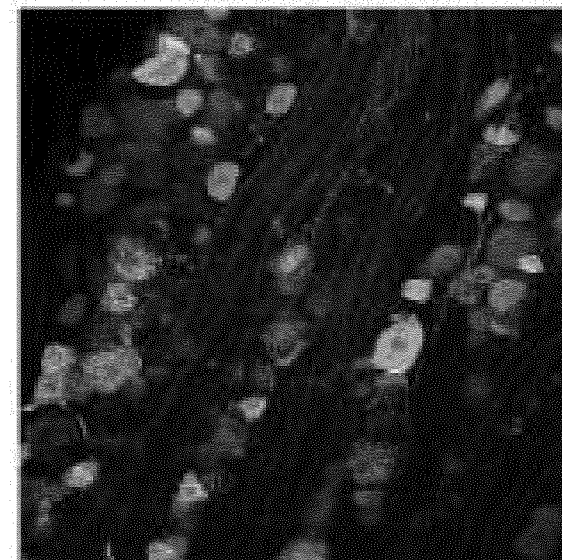
ФИГ. 6а

Антитело против TrkA

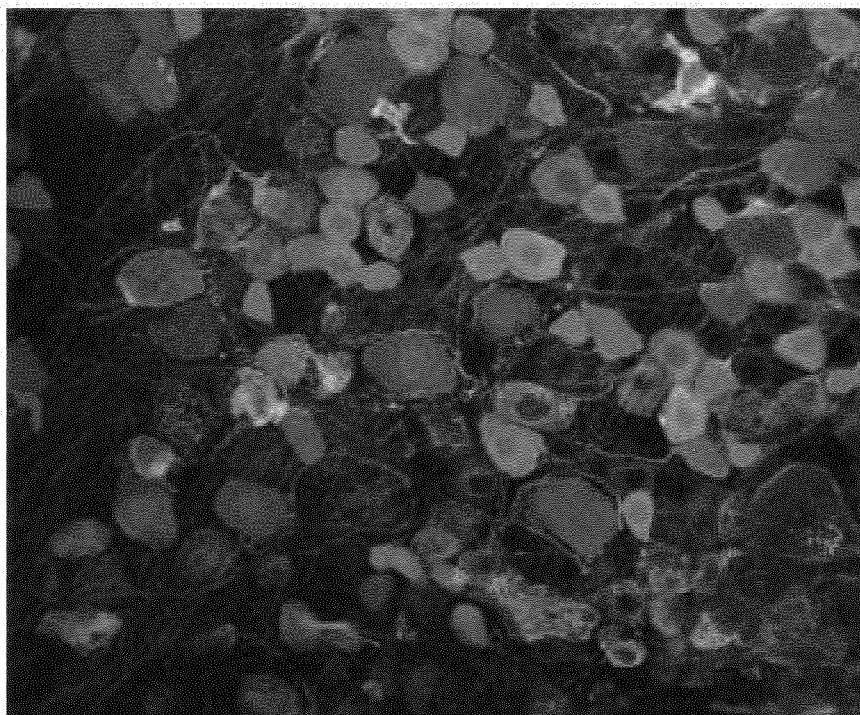


ФИГ. 6b

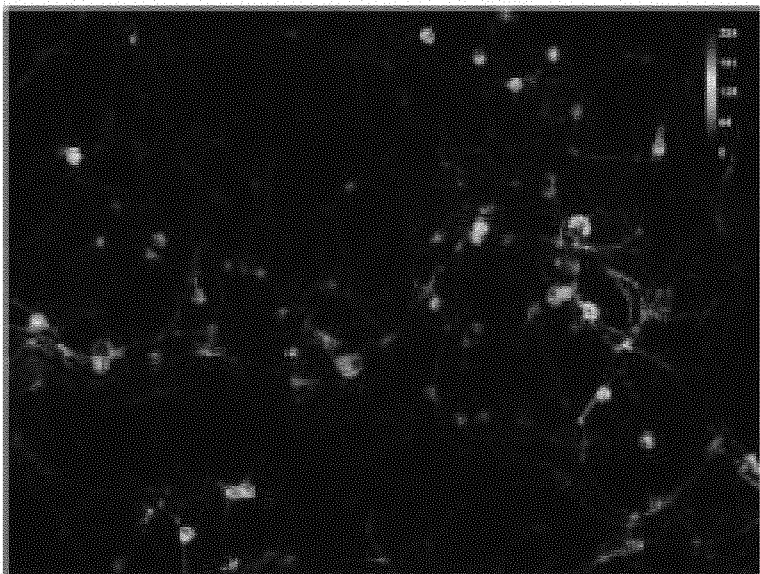
Наложение



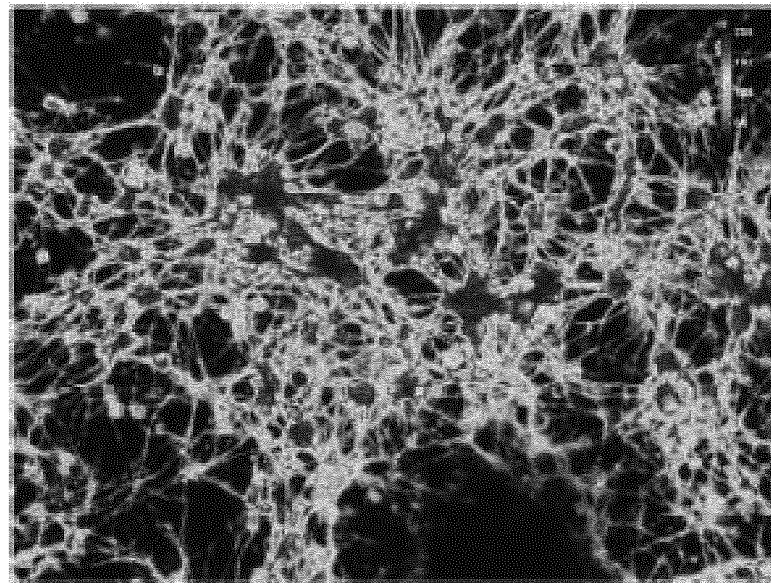
ФИГ. 6с



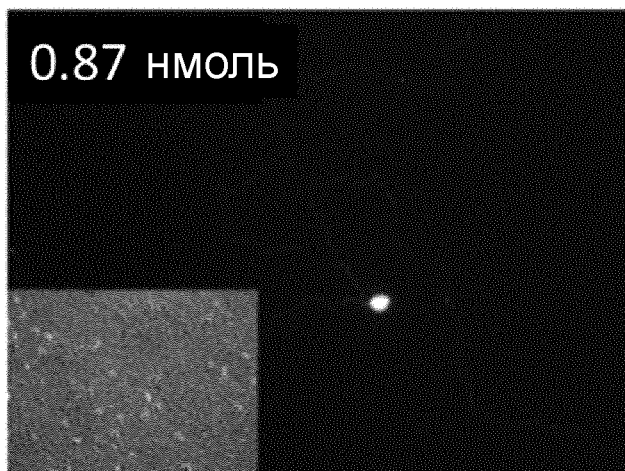
ФИГ. 7



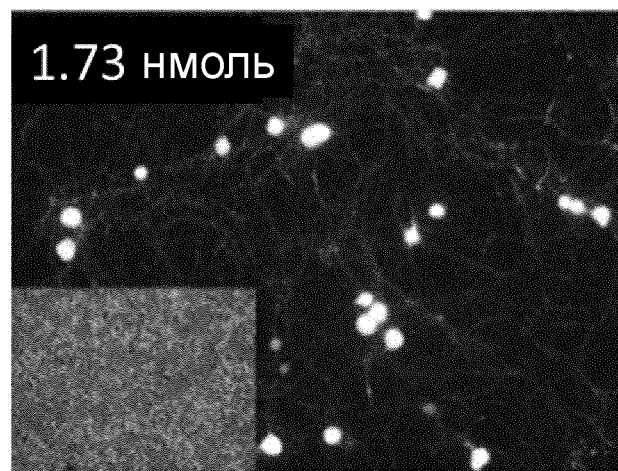
ФИГ. 8a



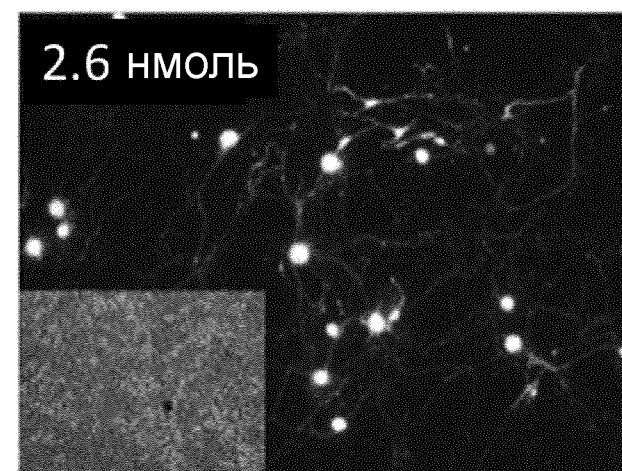
ФИГ. 8b



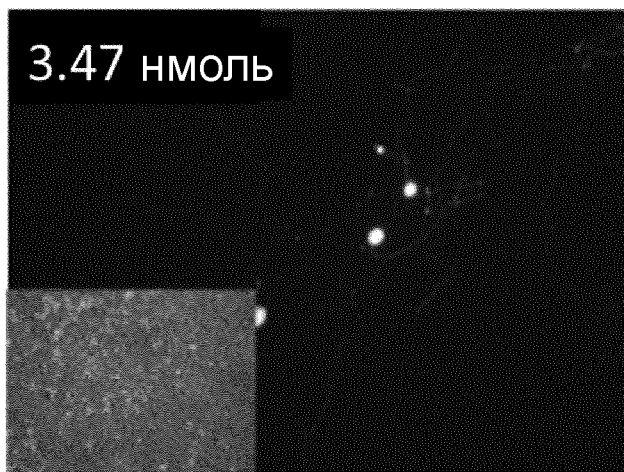
ФИГ. 9а



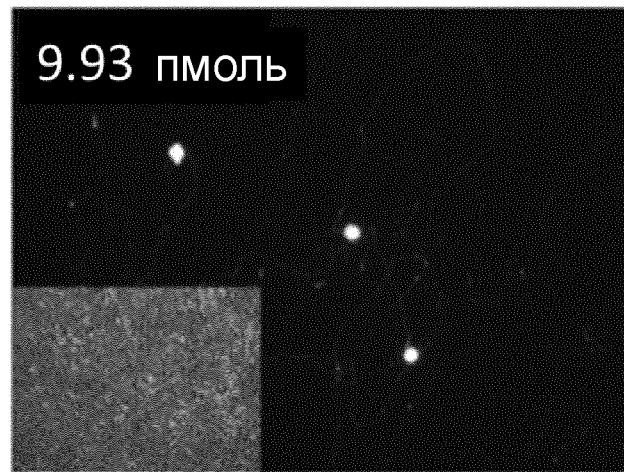
ФИГ. 9b



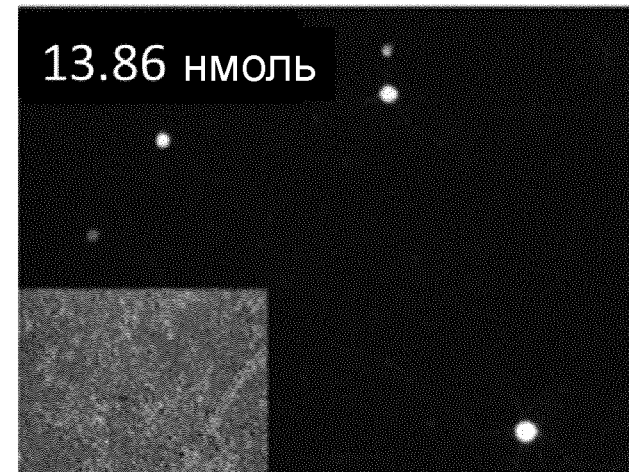
ФИГ. 9с



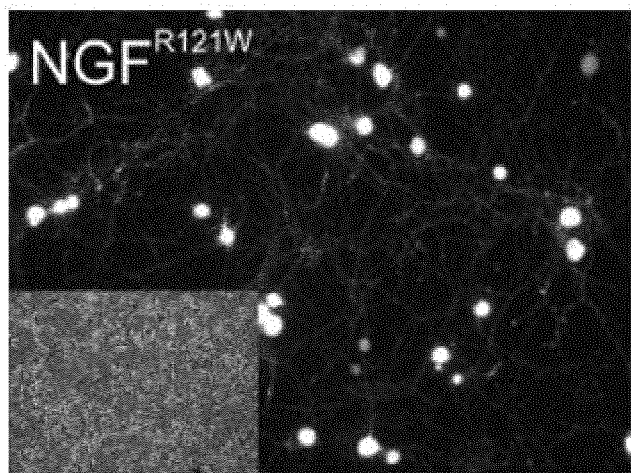
ФИГ. 9d



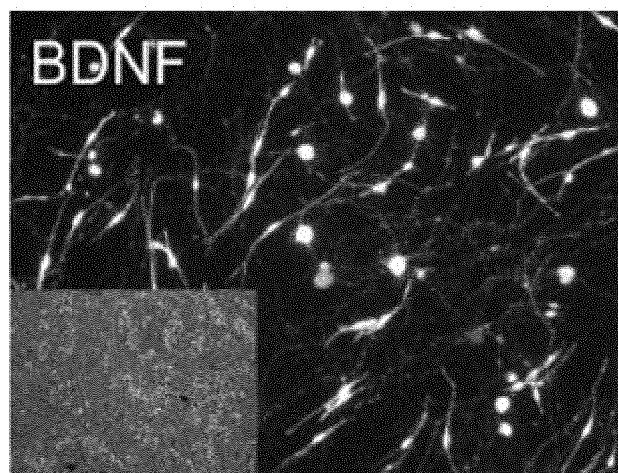
ФИГ. 9e



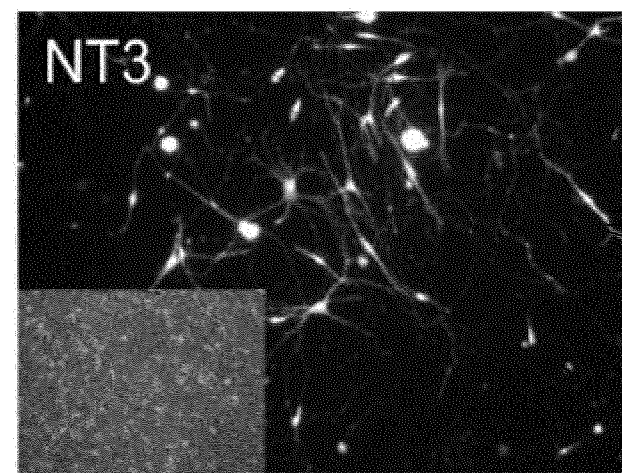
ФИГ. 9f



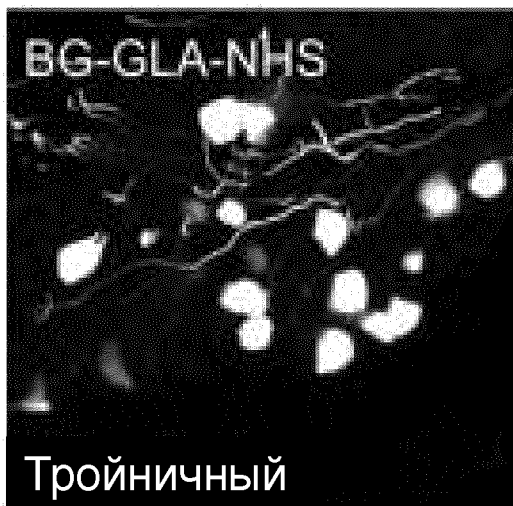
ФИГ. 10а



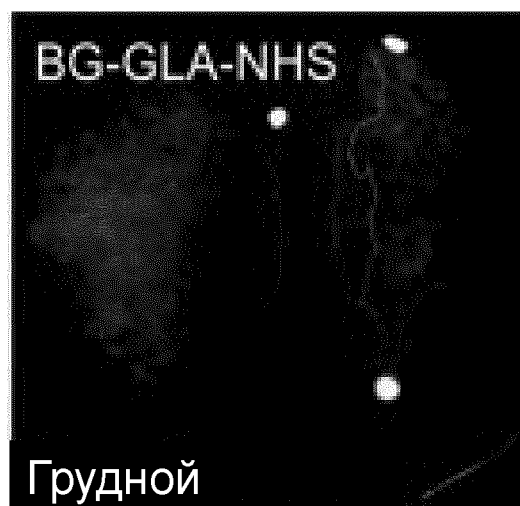
ФИГ. 10b



ФИГ. 10с



ФИГ. 11а



ФИГ. 11б



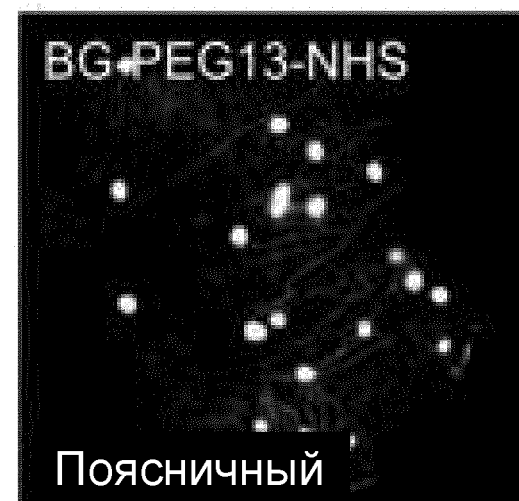
ФИГ. 11с



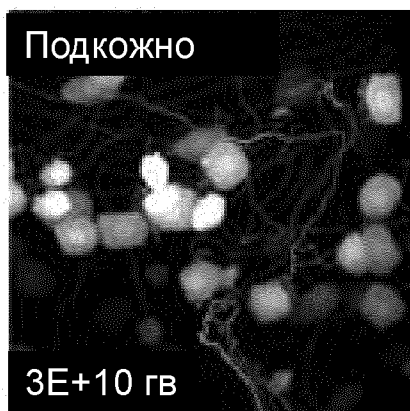
ФИГ. 11d



ФИГ. 11e



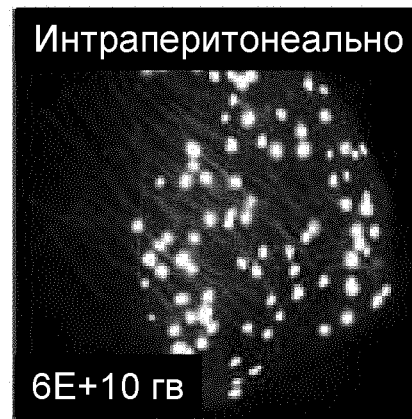
ФИГ. 11f



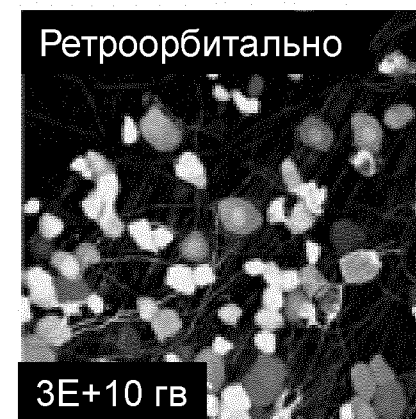
ФИГ. 12а



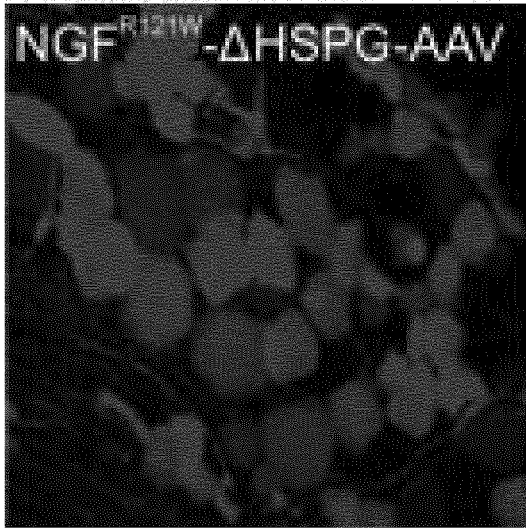
ФИГ. 12b



ФИГ. 12с



ФИГ. 12d



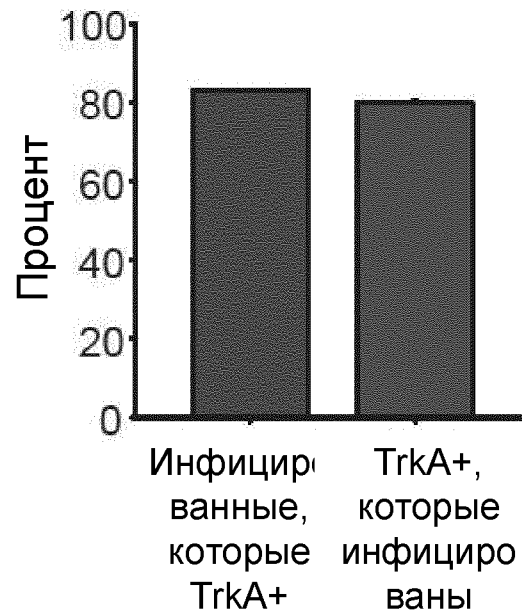
ФИГ. 13а



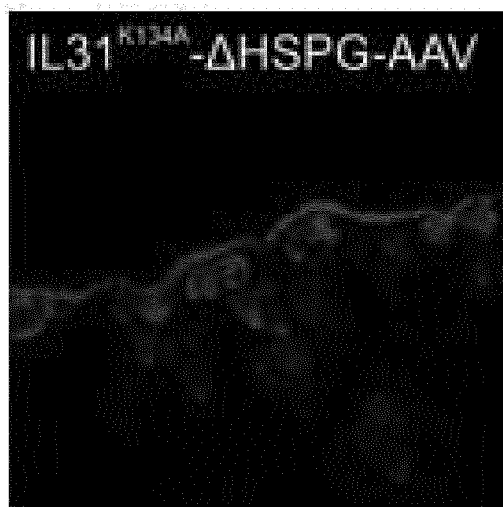
ФИГ. 13b



ФИГ. 13с



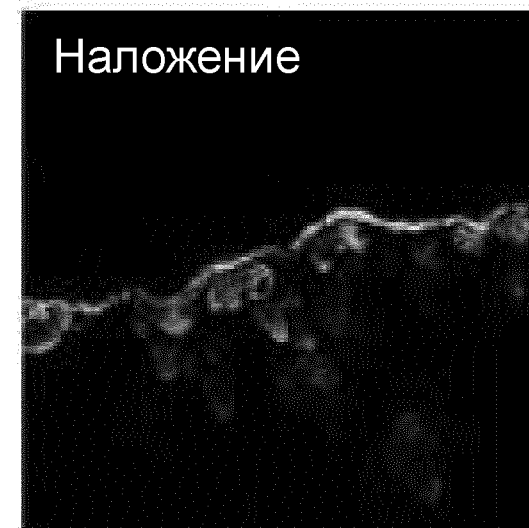
ФИГ. 13d



ФИГ. 14а



ФИГ. 14b



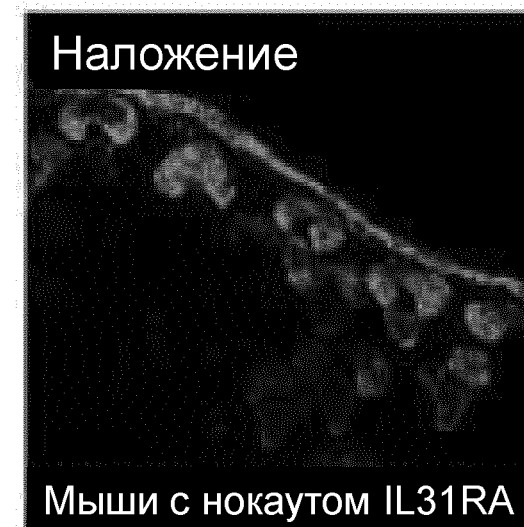
ФИГ. 14с



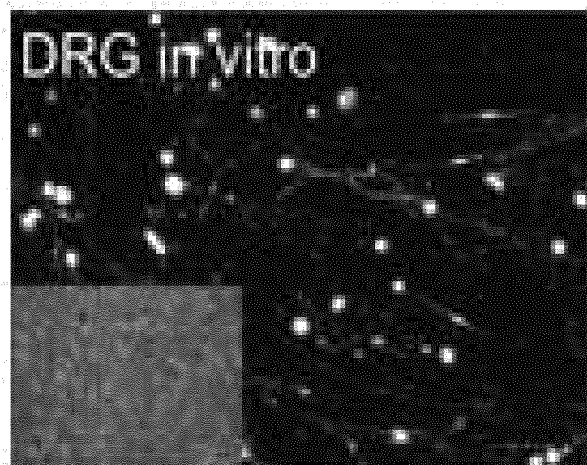
ФИГ. 15a



ФИГ. 15b



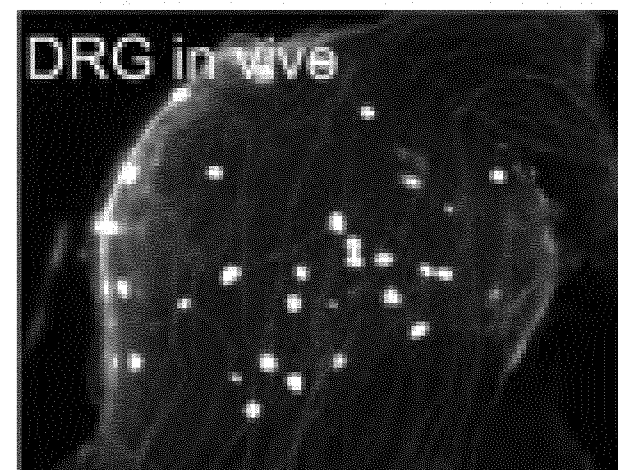
ФИГ. 15c



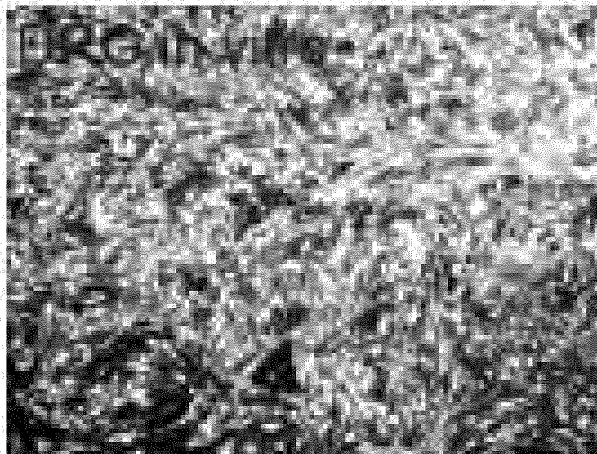
ФИГ. 16а



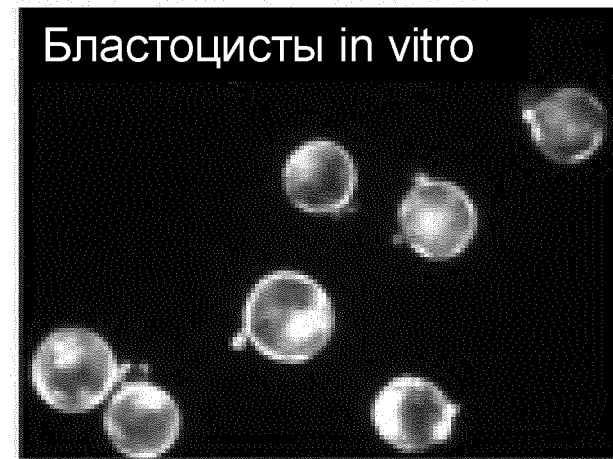
ФИГ. 16b



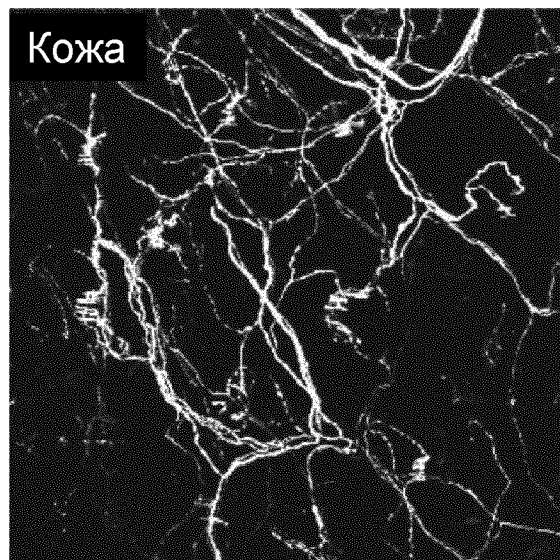
ФИГ. 16с



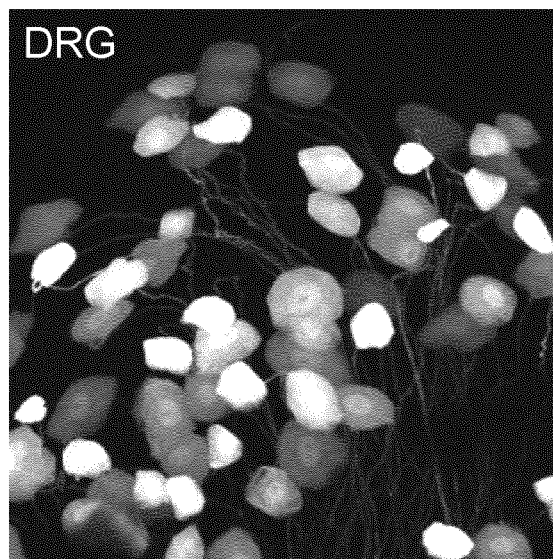
ФИГ. 17а



ФИГ. 17б



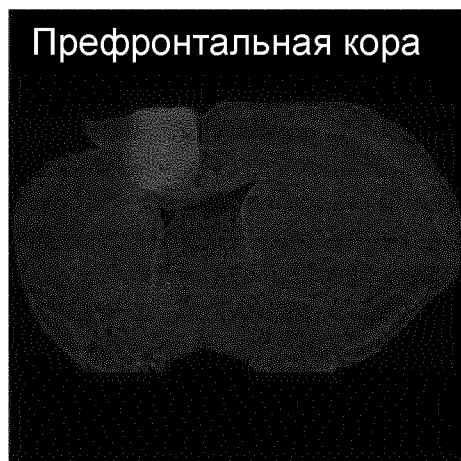
ФИГ. 18а



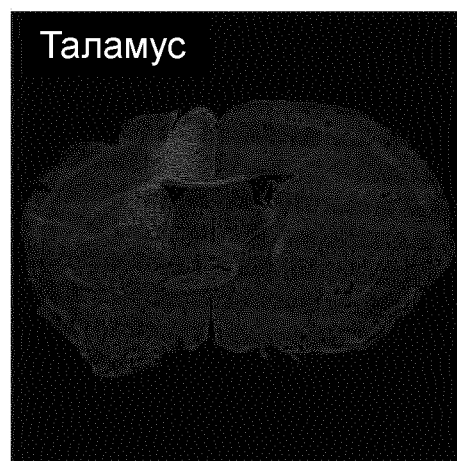
ФИГ. 18b



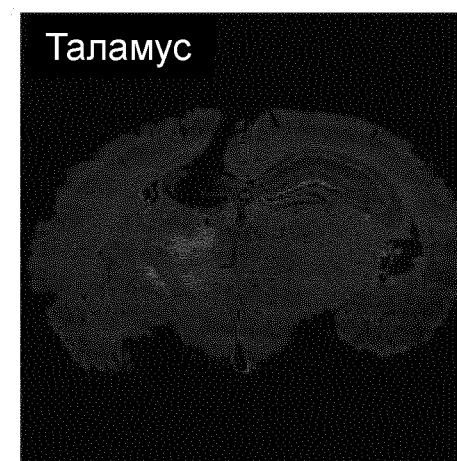
ФИГ. 18с



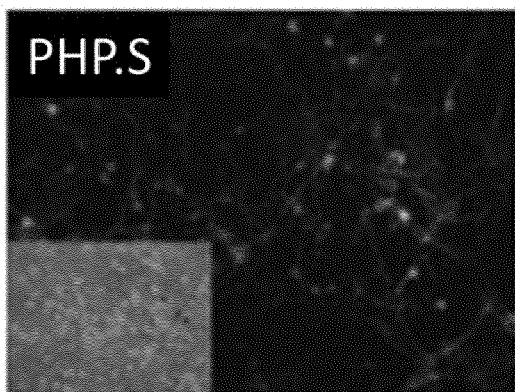
ФИГ. 19а



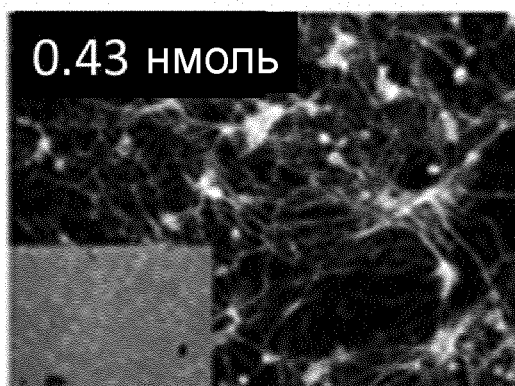
ФИГ. 19b



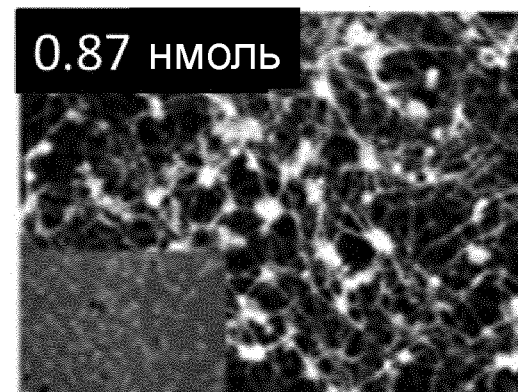
ФИГ. 19с



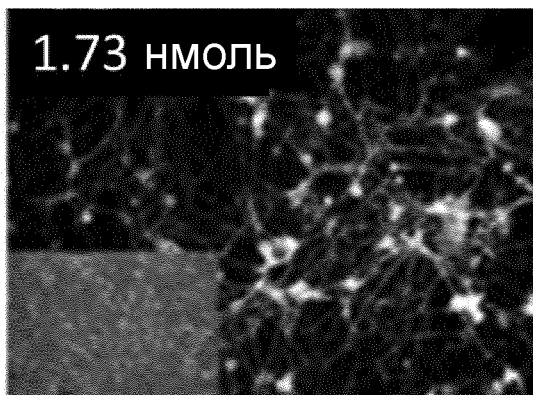
ФИГ. 20a



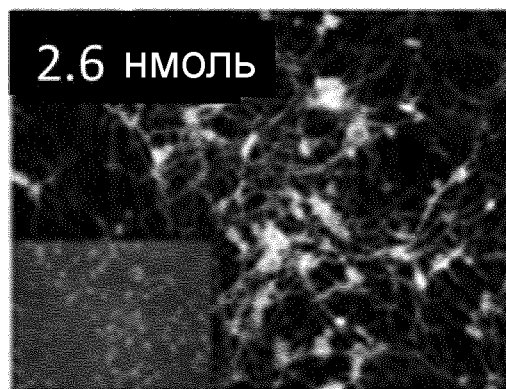
ФИГ. 20b



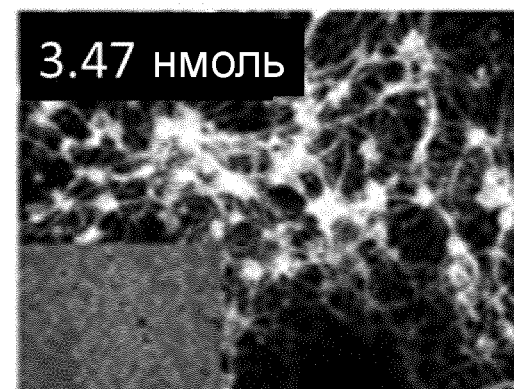
ФИГ. 20c



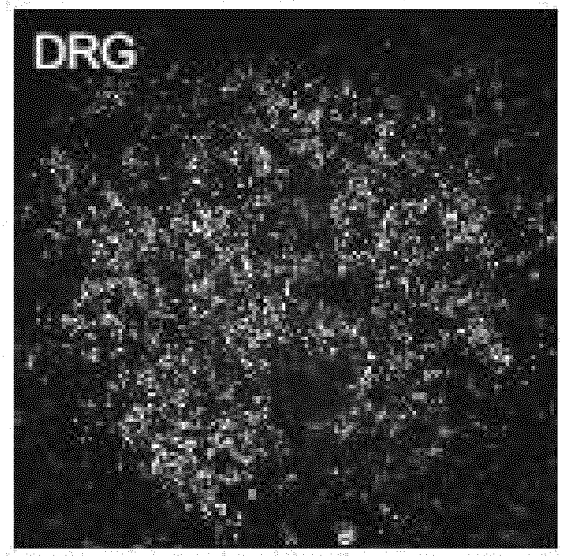
ФИГ. 20d



ФИГ. 20e



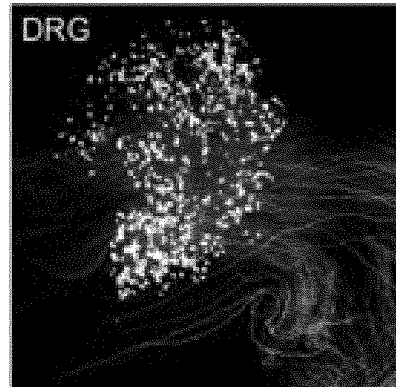
ФИГ. 20f



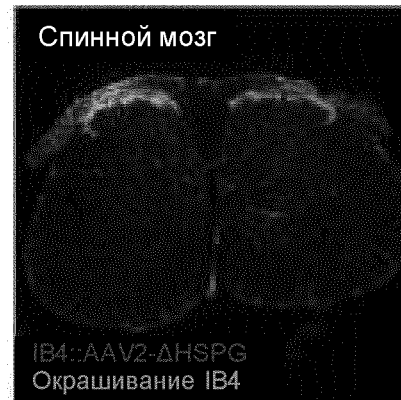
ФИГ. 21



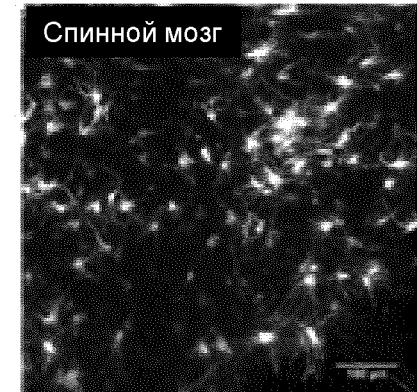
ФИГ. 22а



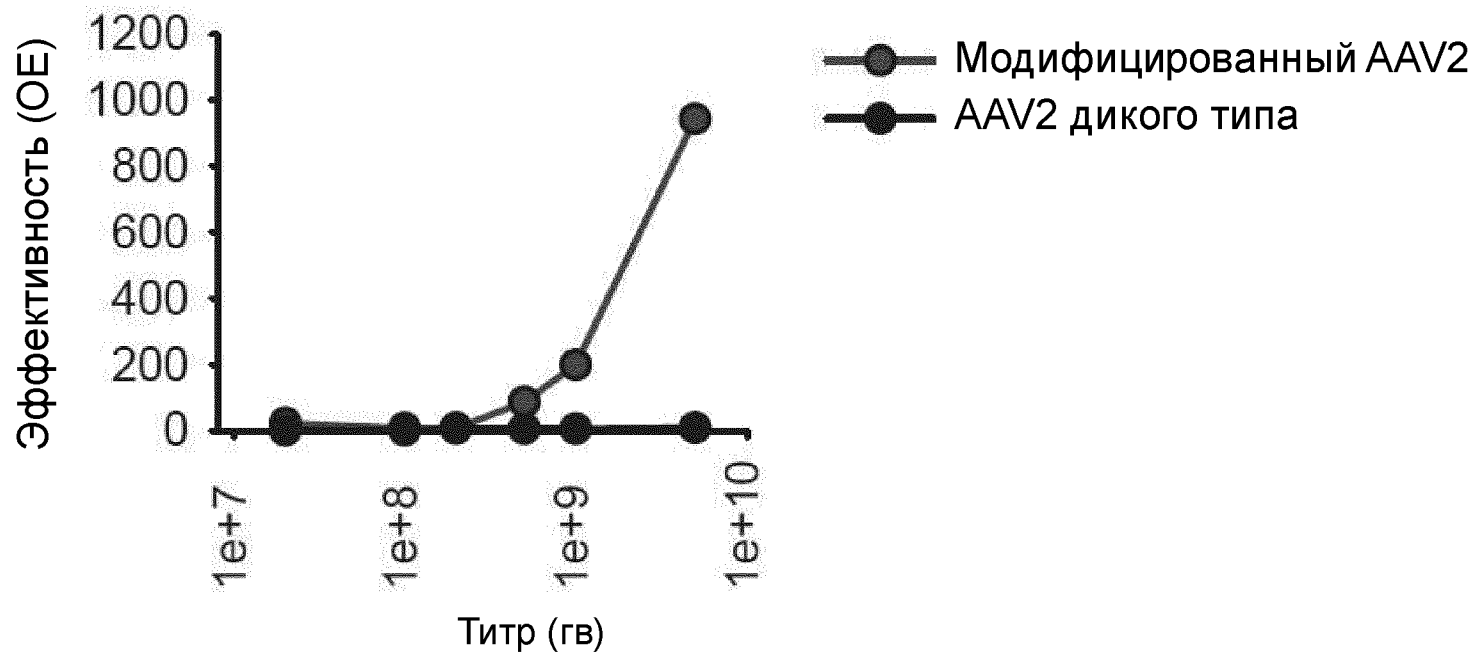
ФИГ. 22b



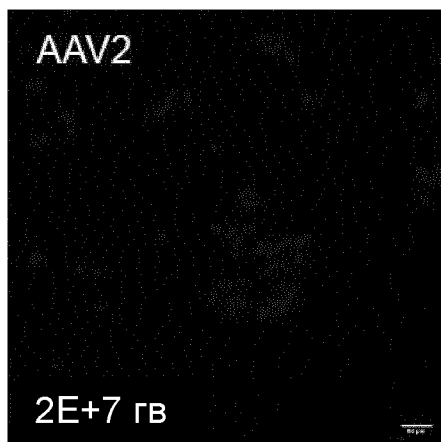
ФИГ. 22c



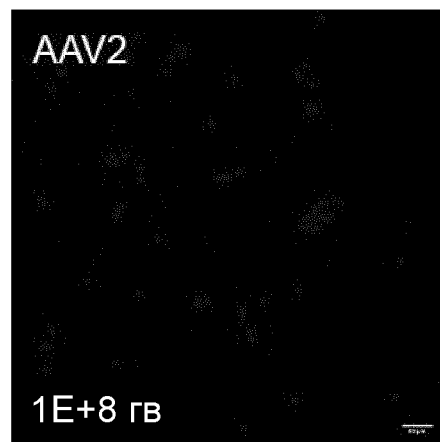
ФИГ. 22d



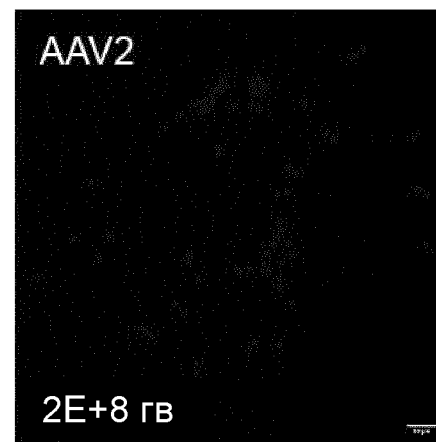
ФИГ. 23



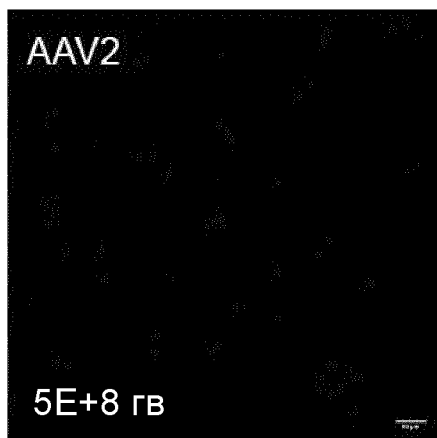
ФИГ. 24a



ФИГ. 24b



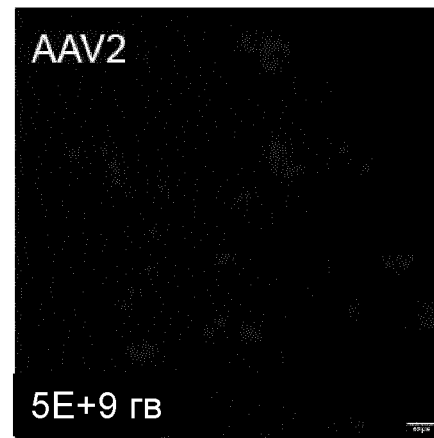
ФИГ. 24c



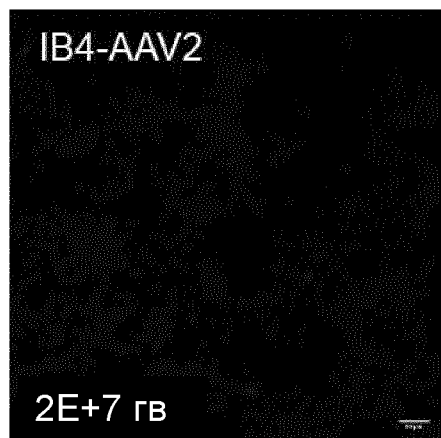
ФИГ. 24d



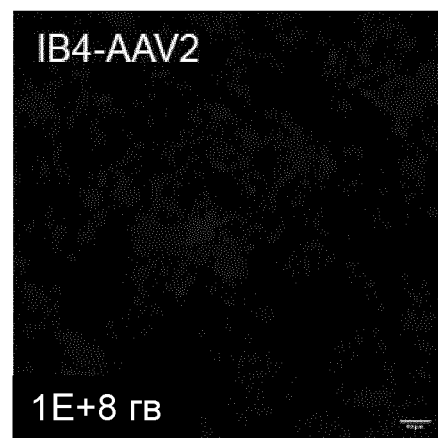
ФИГ. 24e



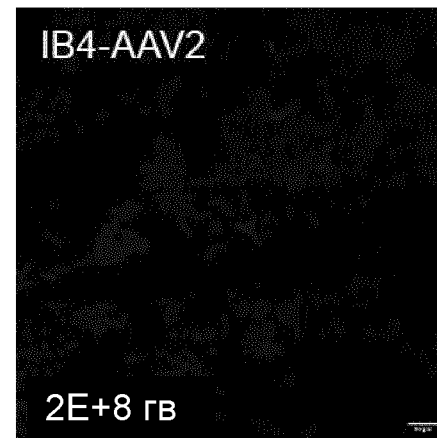
ФИГ. 24f



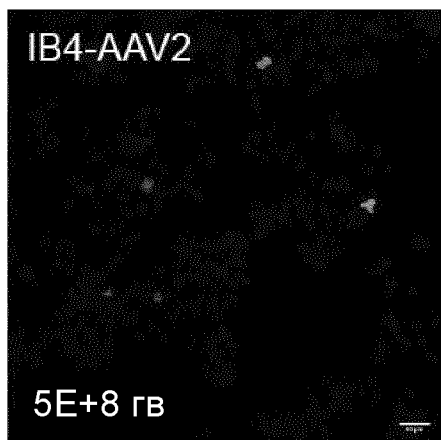
ФИГ. 24g



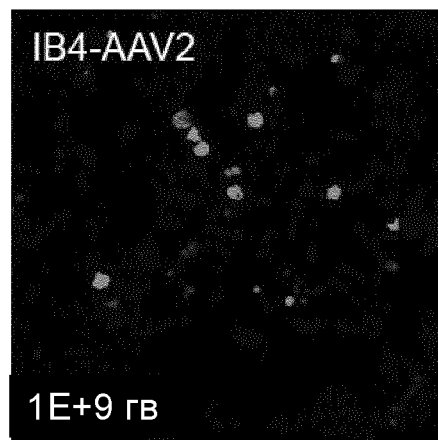
ФИГ. 24h



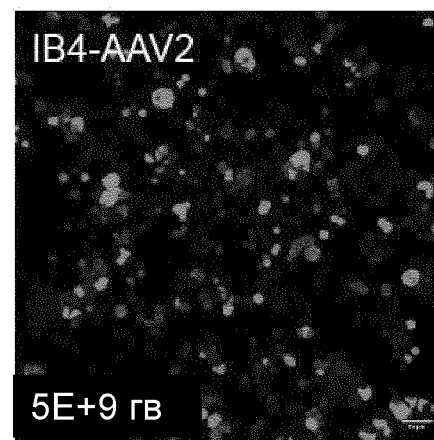
ФИГ. 24i



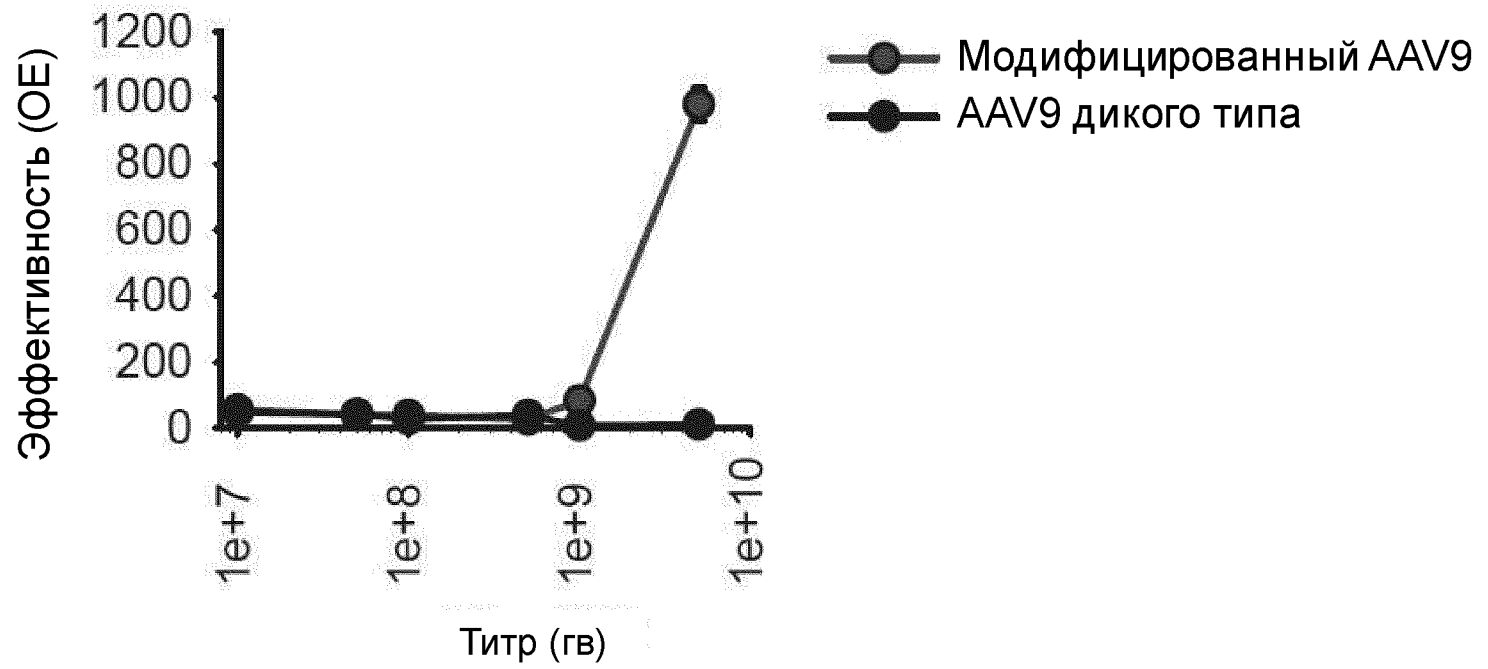
ФИГ. 24j



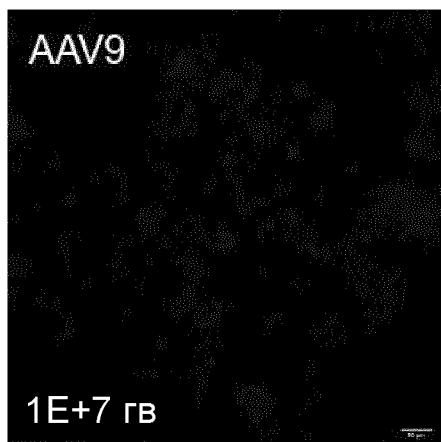
ФИГ. 24k



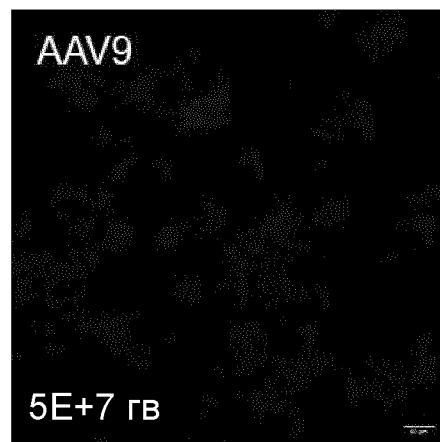
ФИГ. 24l



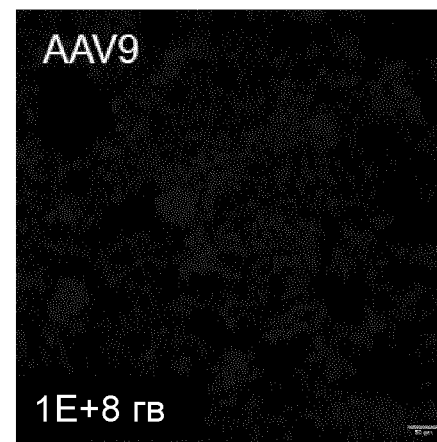
ФИГ. 25



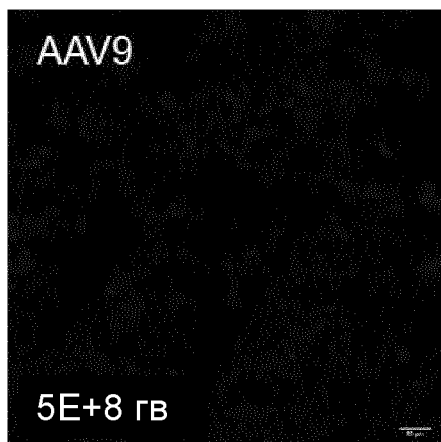
ФИГ. 26a



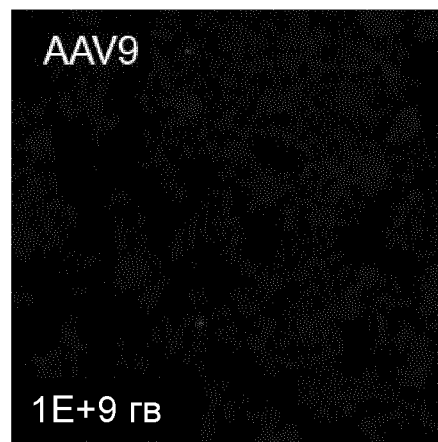
ФИГ. 26b



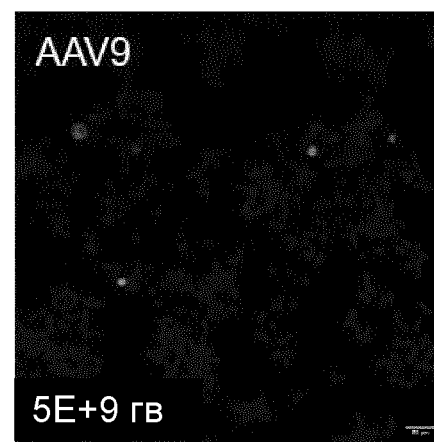
ФИГ. 26c



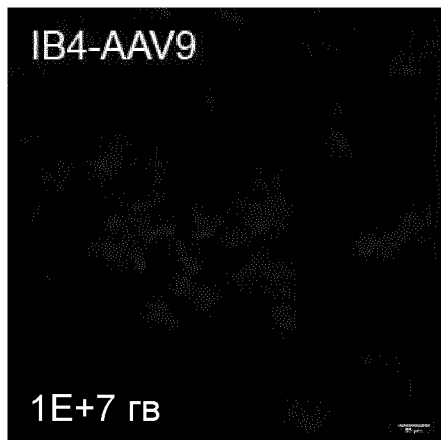
ФИГ. 26d



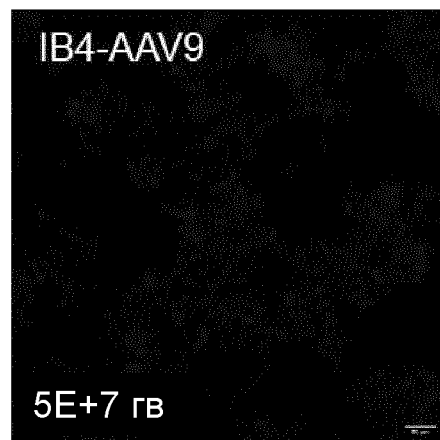
ФИГ. 26e



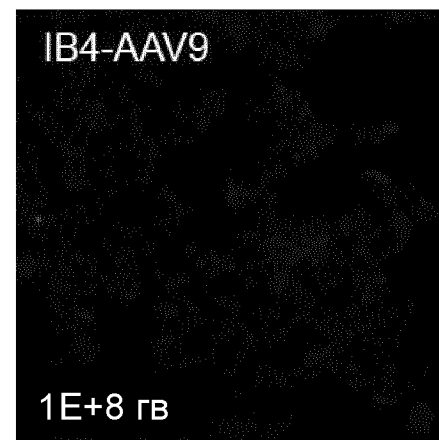
ФИГ. 26f



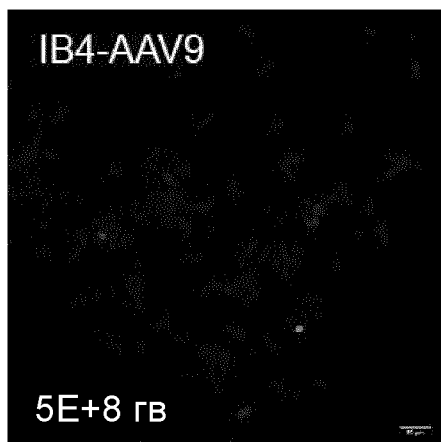
ФИГ. 26g



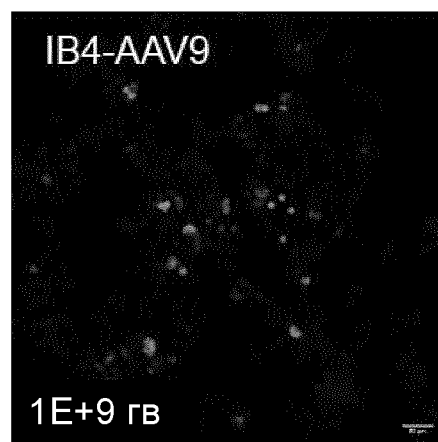
ФИГ. 26h



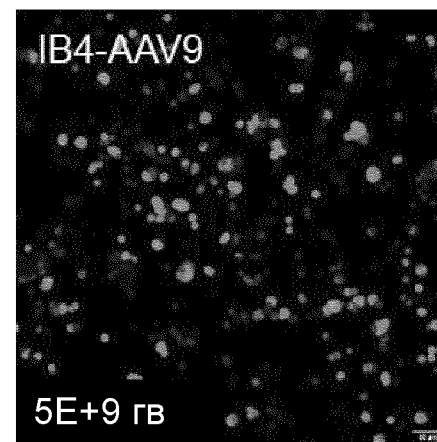
ФИГ. 26i



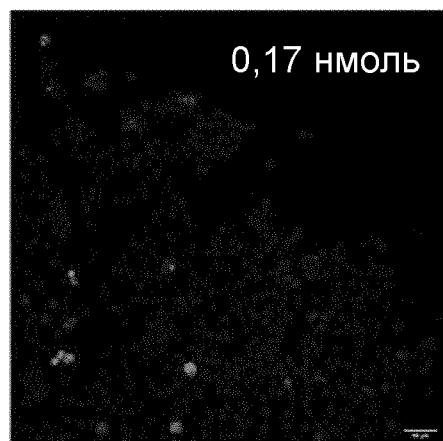
ФИГ. 26j



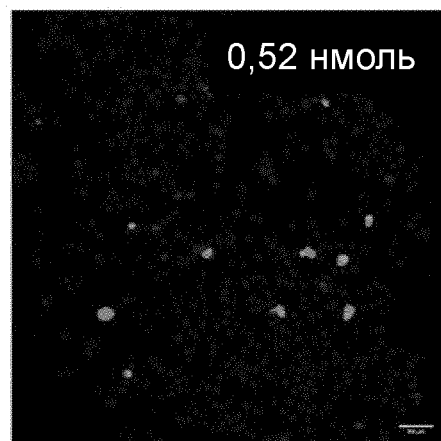
ФИГ. 26k



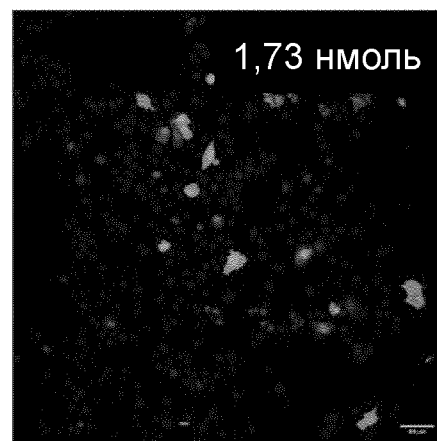
ФИГ. 26l



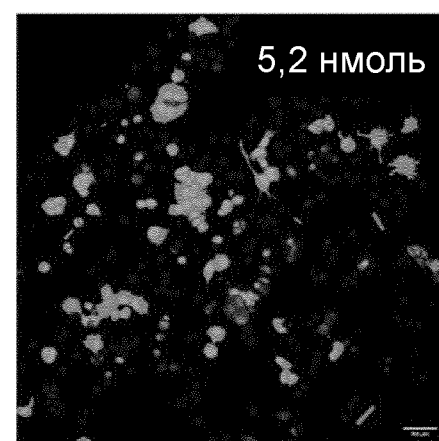
ФИГ. 27a



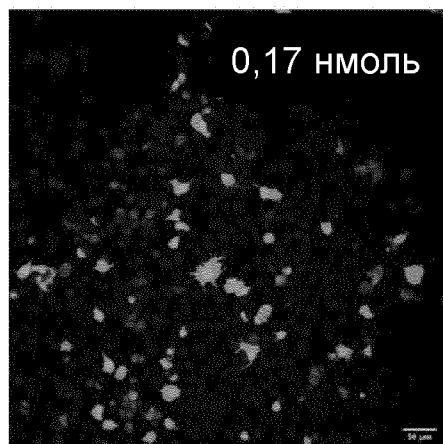
ФИГ. 27b



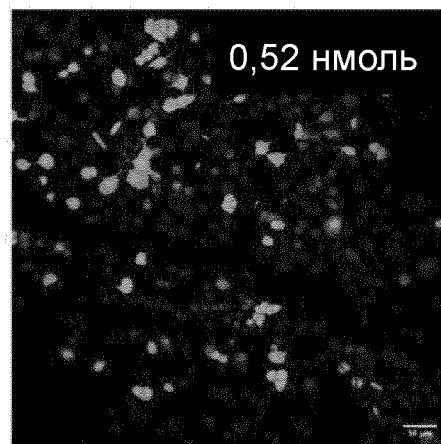
ФИГ. 27c



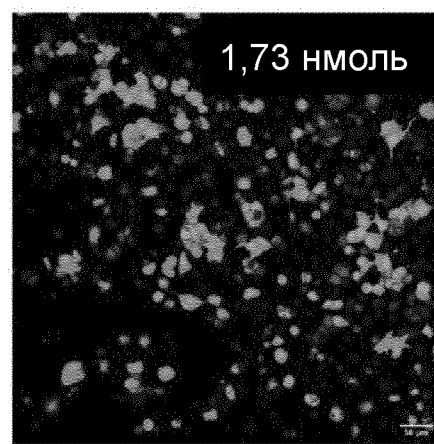
ФИГ. 27d



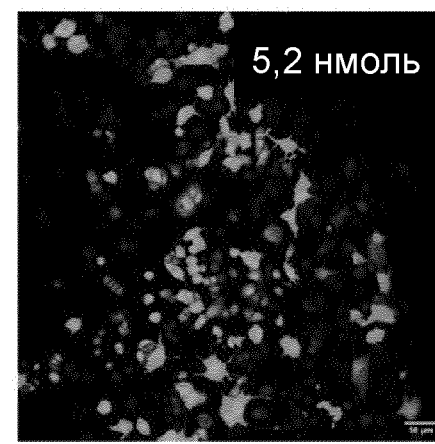
ФИГ. 28a



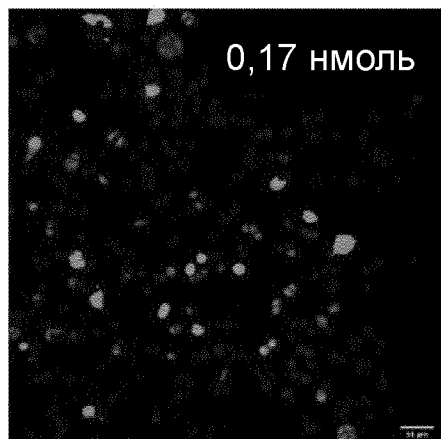
ФИГ. 28b



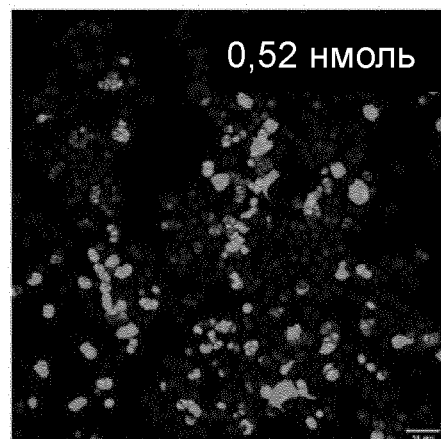
ФИГ. 28c



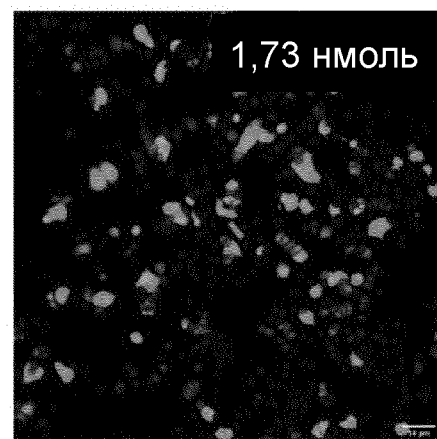
ФИГ. 28d



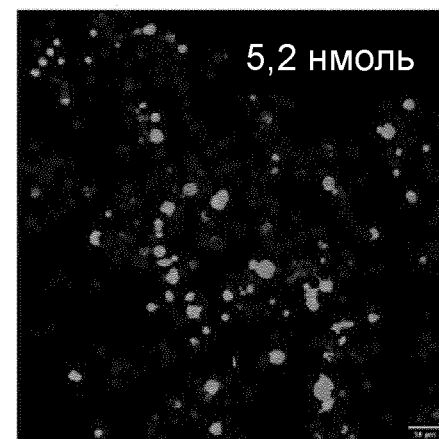
ФИГ. 29a



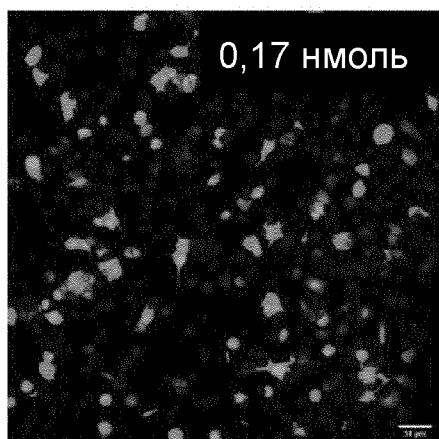
ФИГ. 29b



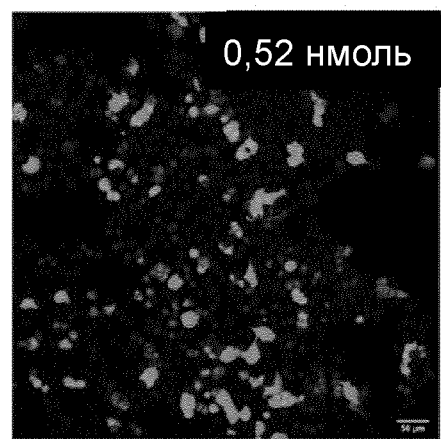
ФИГ. 29c



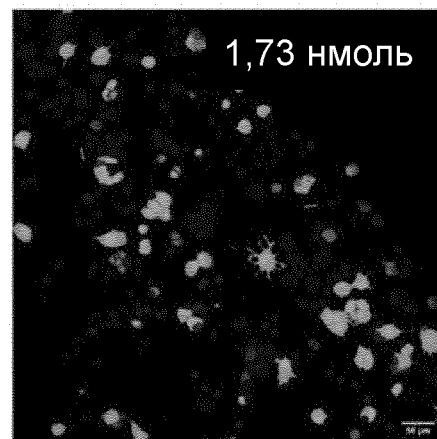
ФИГ. 29d



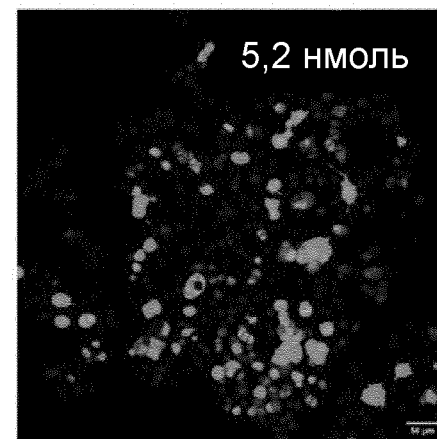
ФИГ. 30a



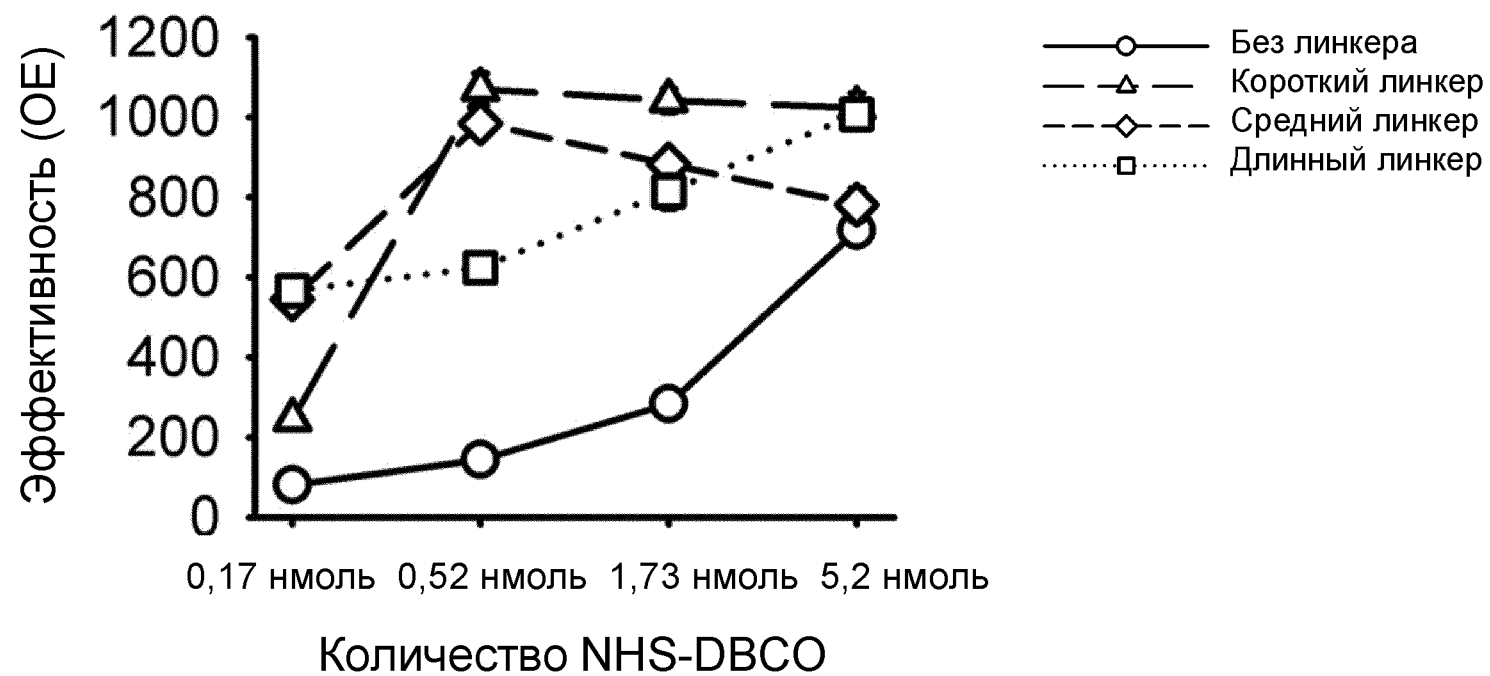
ФИГ. 30b



ФИГ. 30c

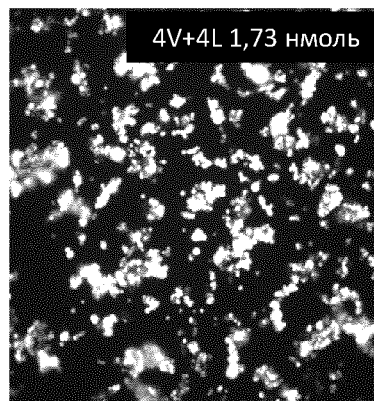


ФИГ. 30d

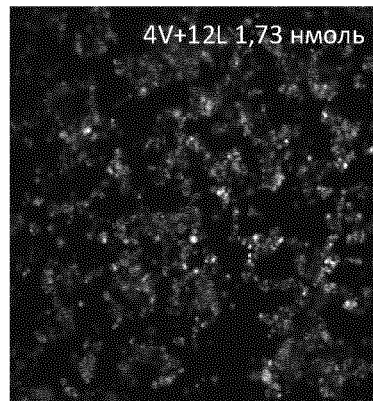


ФИГ. 31

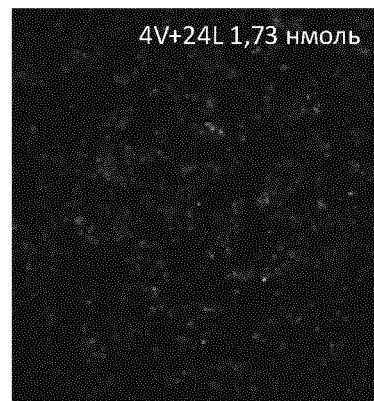
ФИГ. 32a



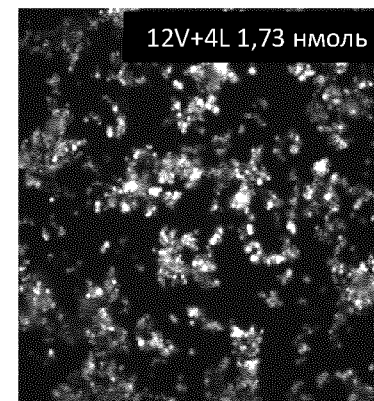
ФИГ. 32b



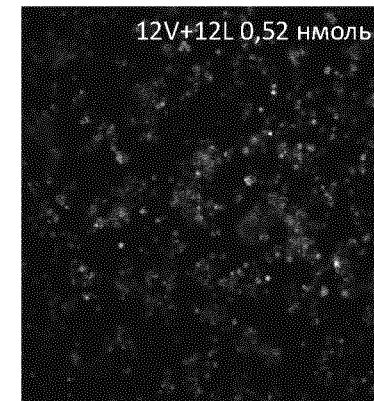
ФИГ. 32c



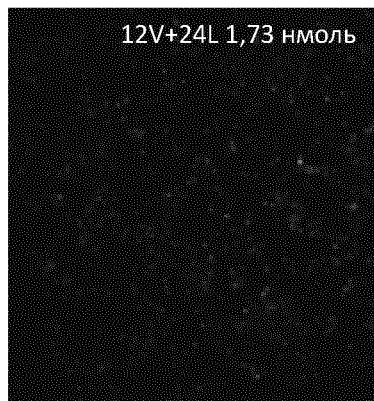
ФИГ. 32d



ФИГ. 32e



12V+24L 1,73 нмоль



ФИГ. 32f

24V+4L 1,73 нмоль



ФИГ. 32g

24V+12L 1,73 нмоль



ФИГ. 32h

24V+24L 1,73 нмоль



ФИГ. 32i

4L+2KV 1,73 нмоль



ФИГ. 32j

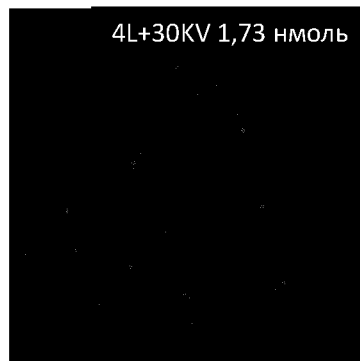
ФИГ. 32k



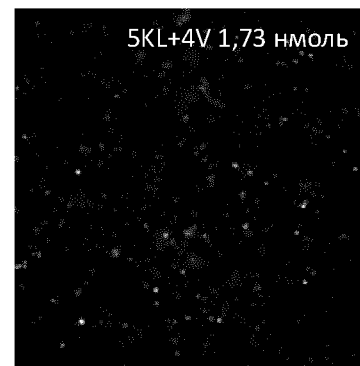
ФИГ. 32l



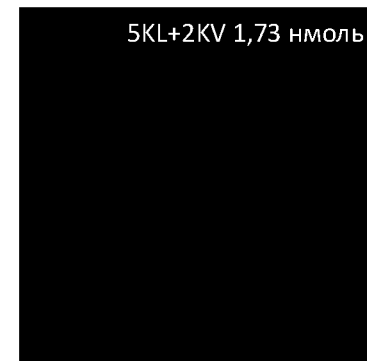
ФИГ. 32m



ФИГ. 32n



ФИГ. 32o



5KL+5KV 1,73 нмоль



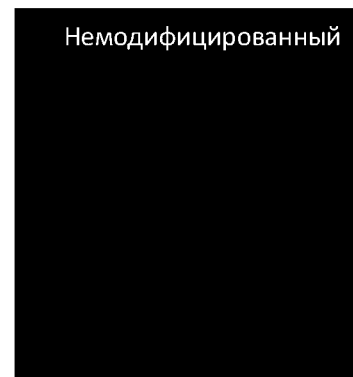
5KL+10KV 1,73 нмоль



5KL+30KV 1,73 нмоль



Немодифицированный

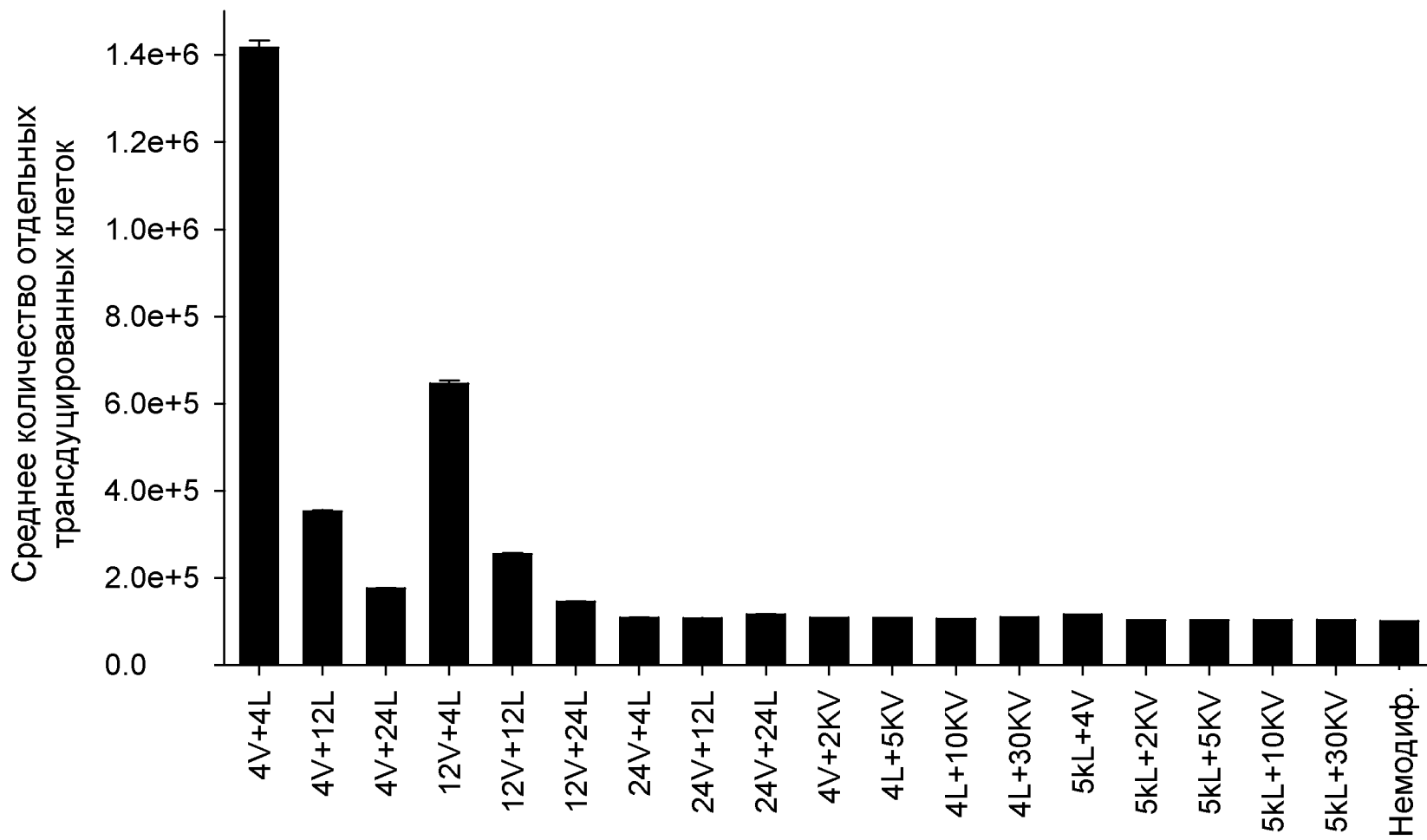


ФИГ. 32p

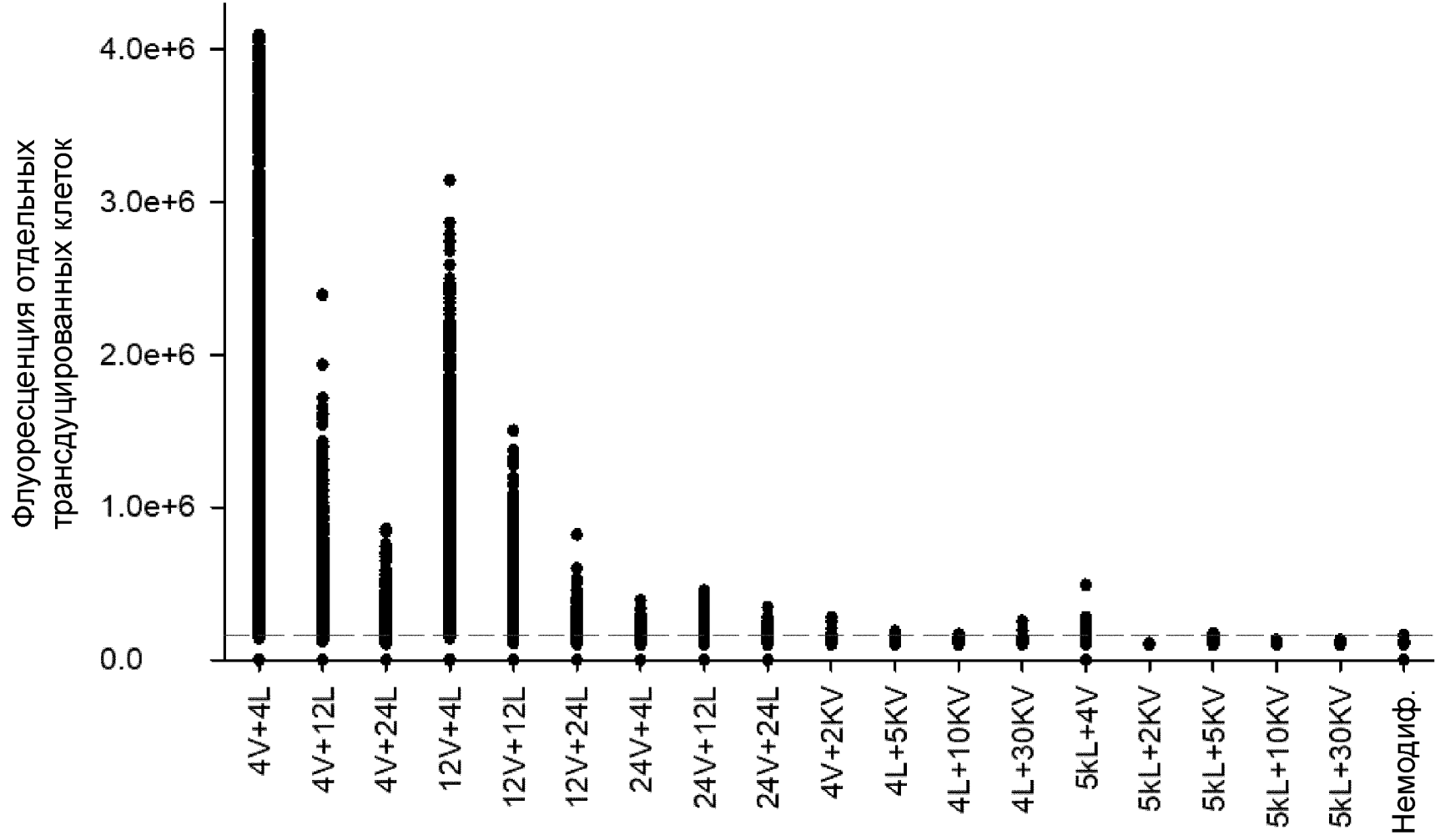
ФИГ. 32q

ФИГ. 32r

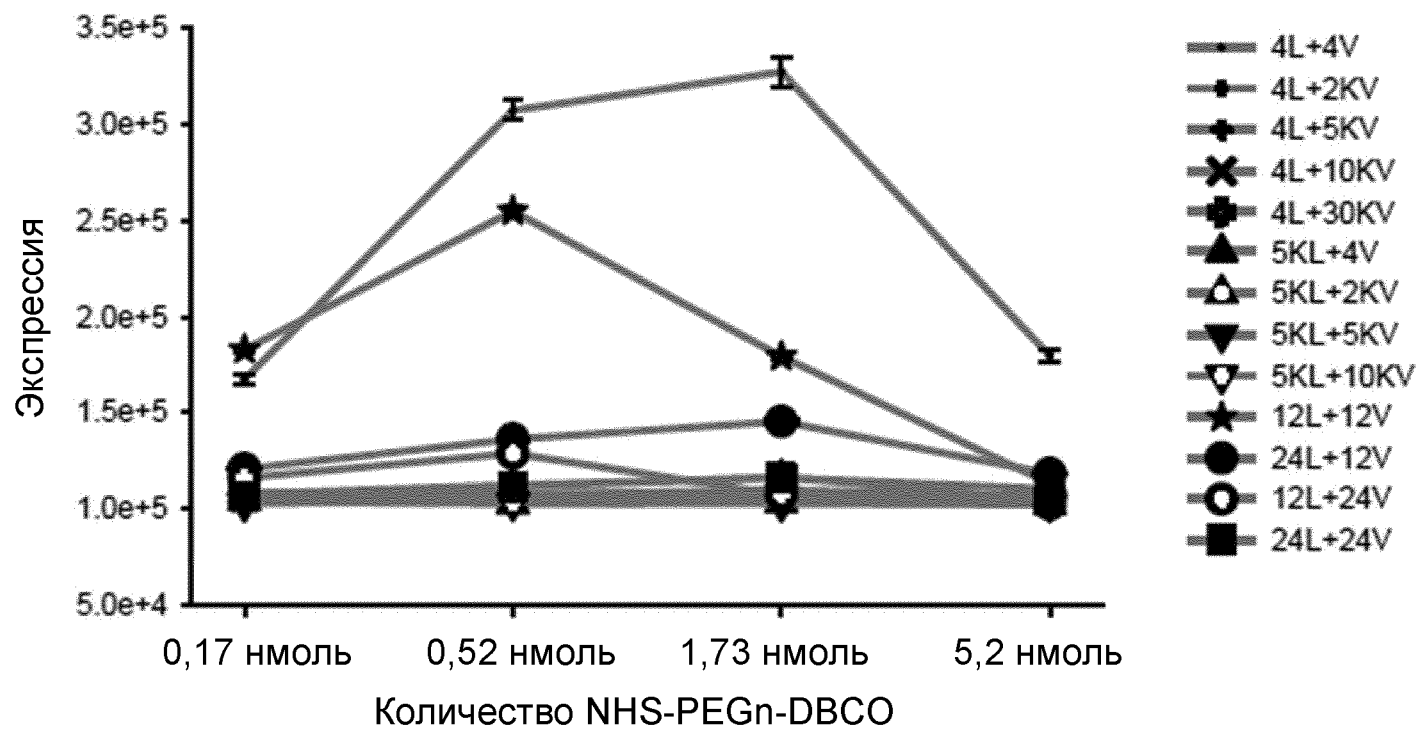
ФИГ. 32s



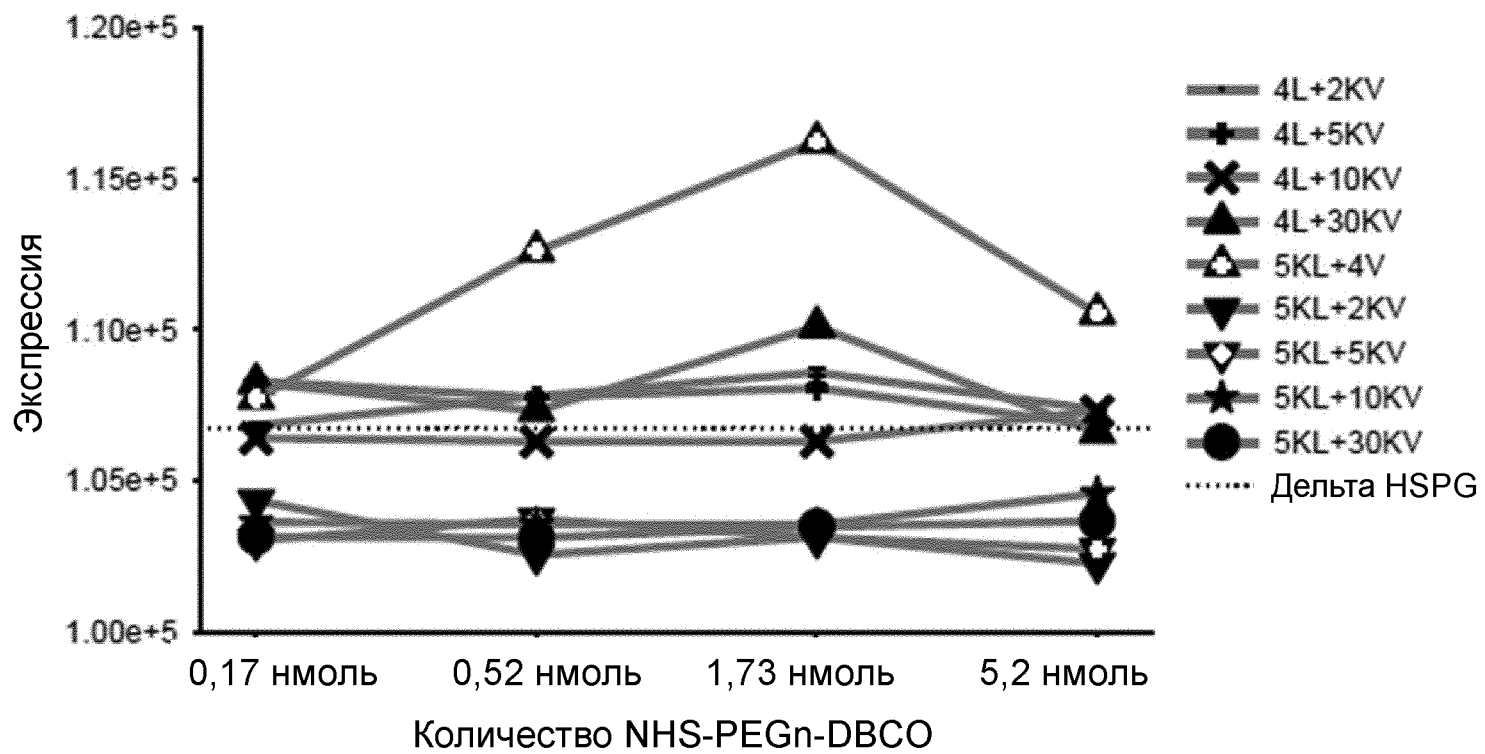
ФИГ. 33



ФИГ. 34



ФИГ. 35

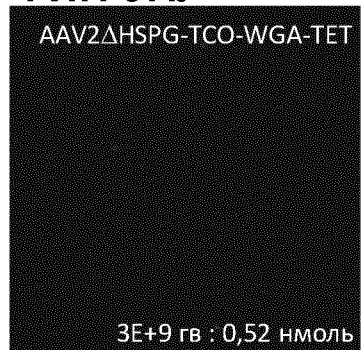


ФИГ. 36

ФИГ. 37a



ФИГ. 37b



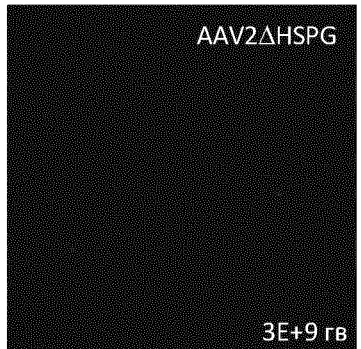
ФИГ. 37c



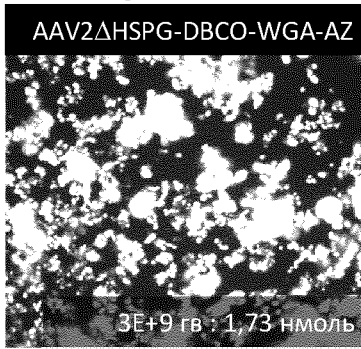
ФИГ. 37d

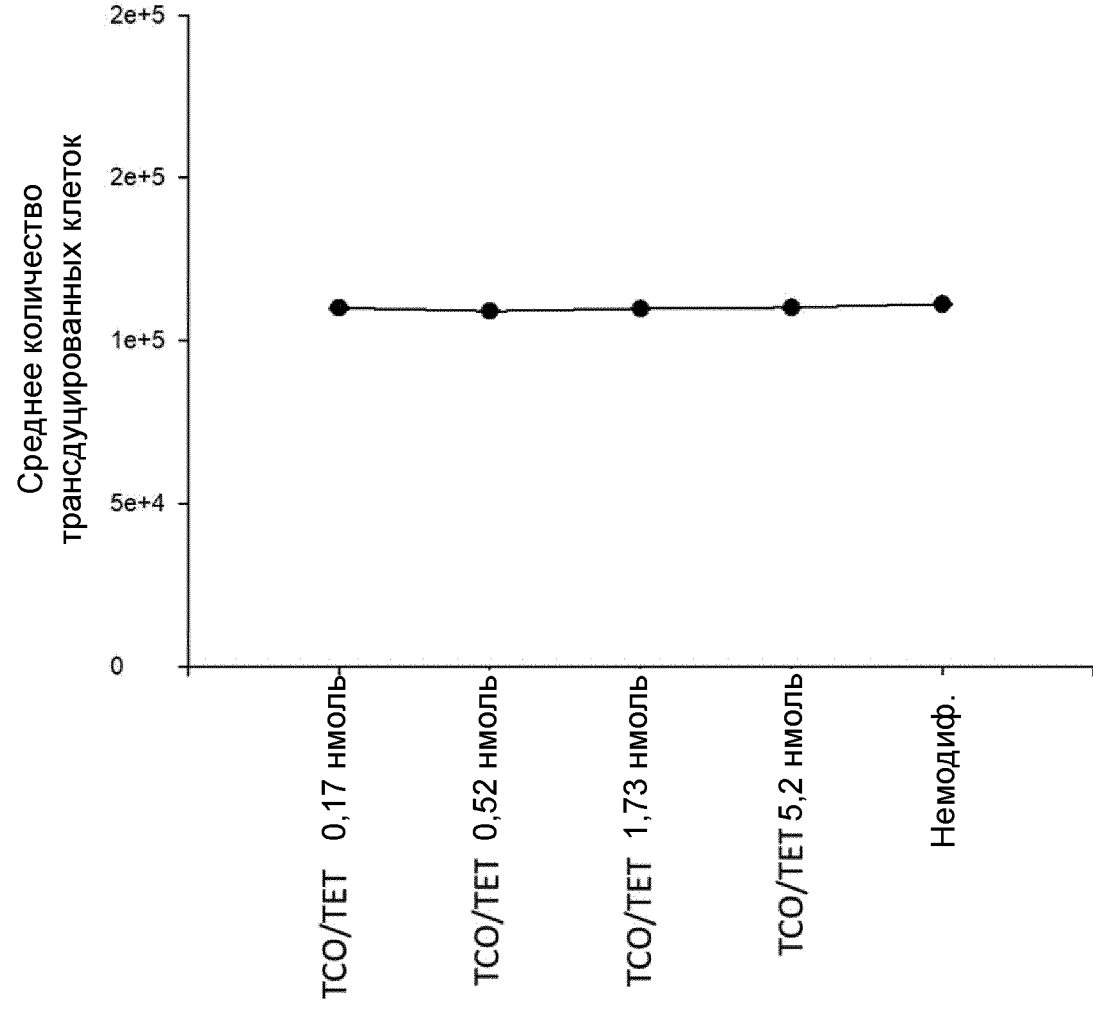


ФИГ. 37e

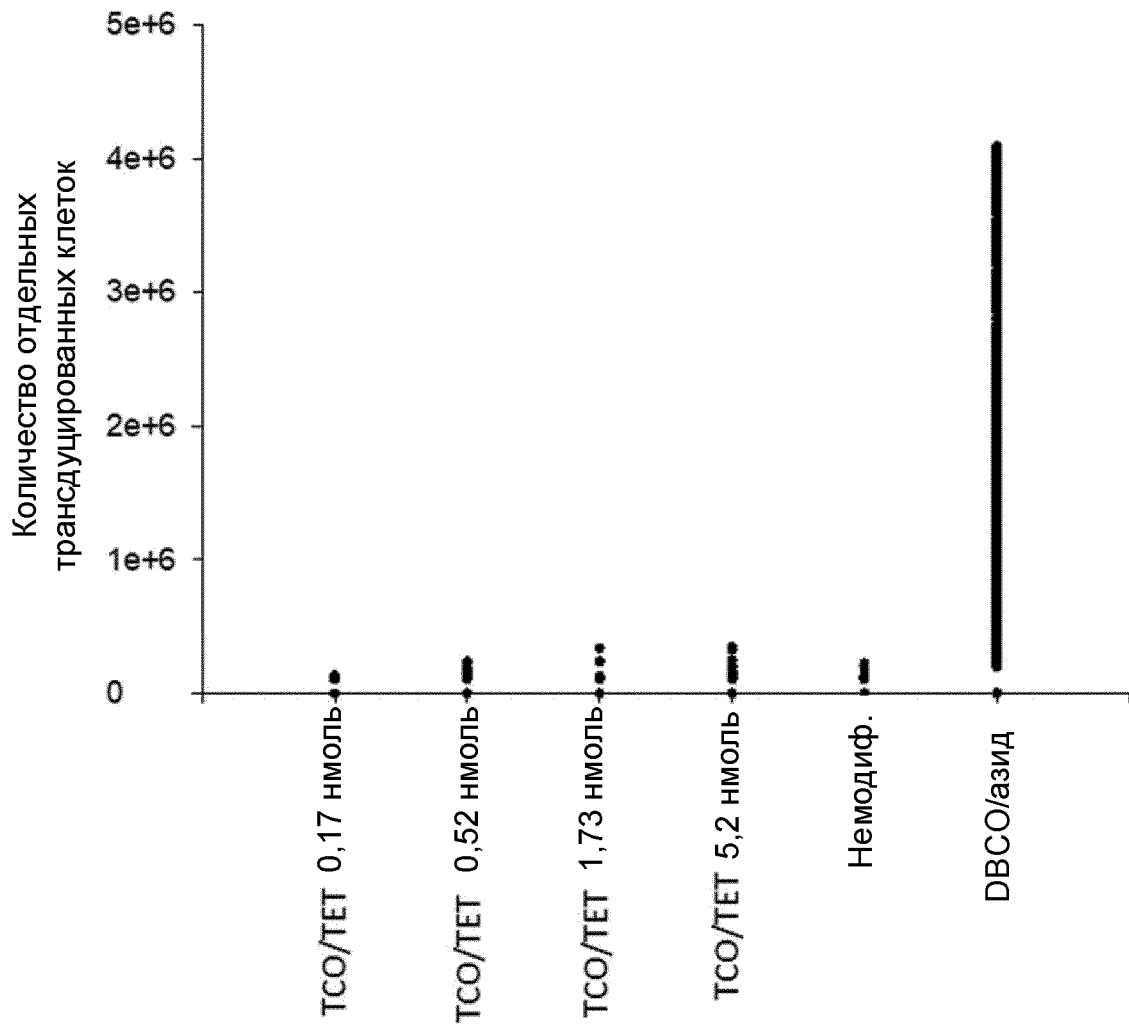


ФИГ. 37f





ФИГ. 38

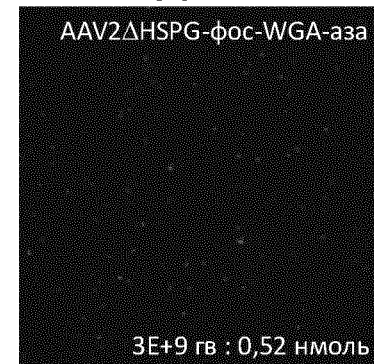


ФИГ. 39

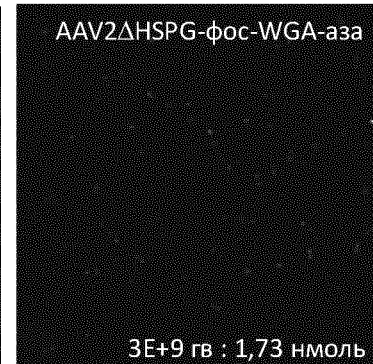
ФИГ. 40а



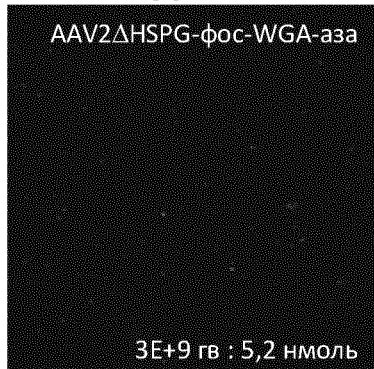
ФИГ. 40б



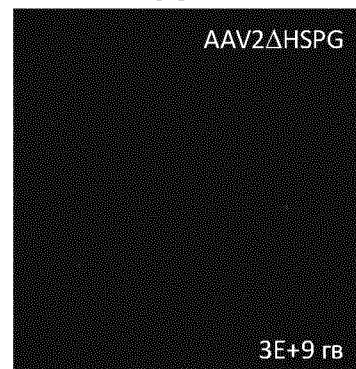
ФИГ. 40с



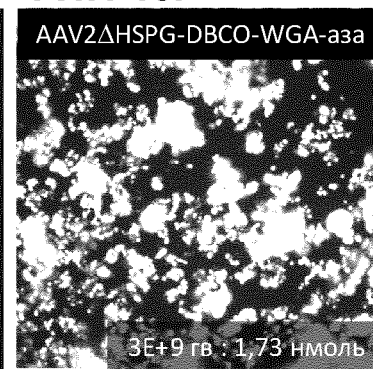
ФИГ. 40д

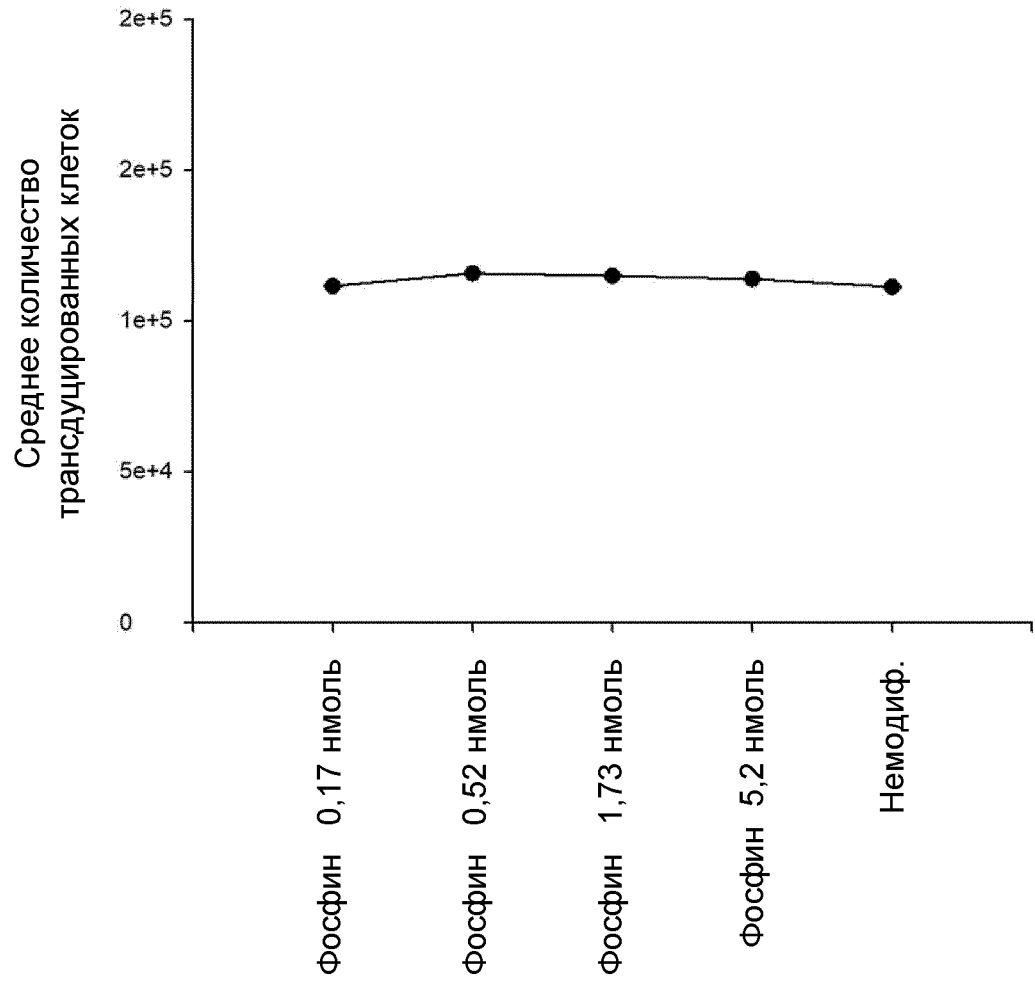


ФИГ. 40е

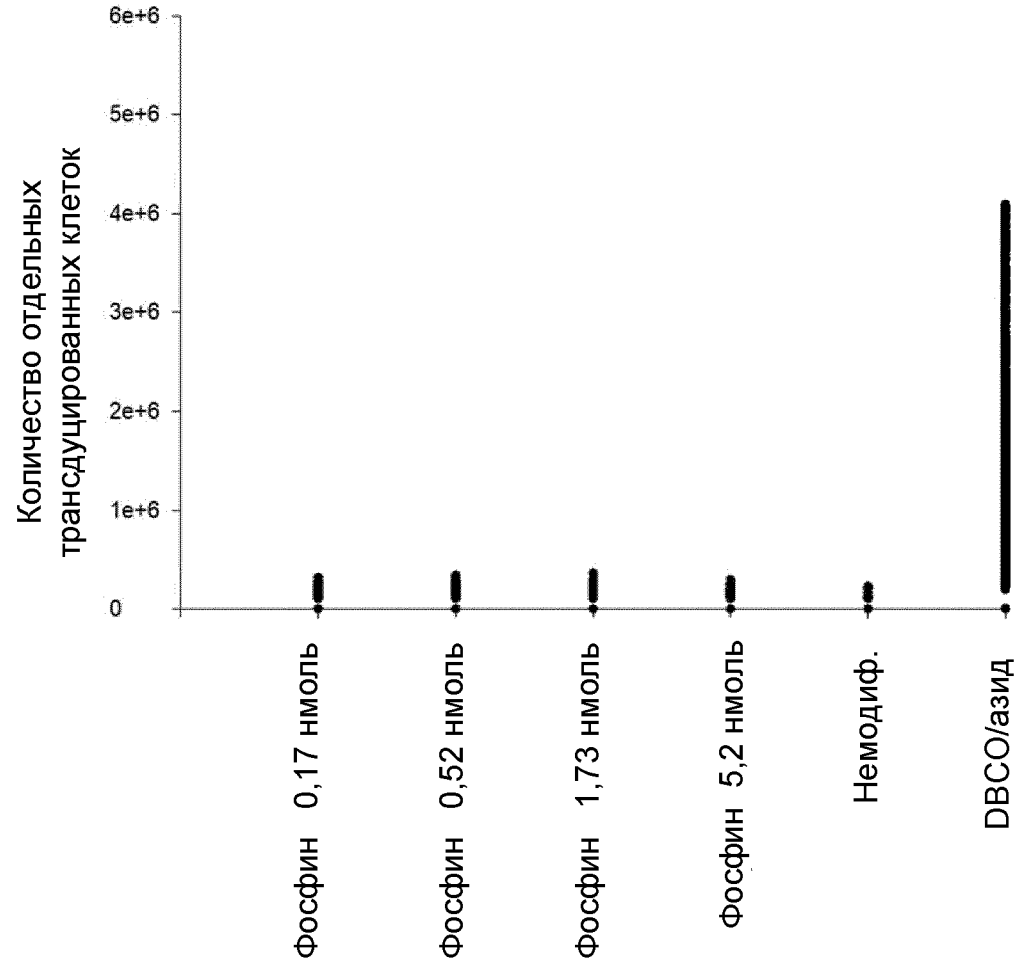


ФИГ. 40ф

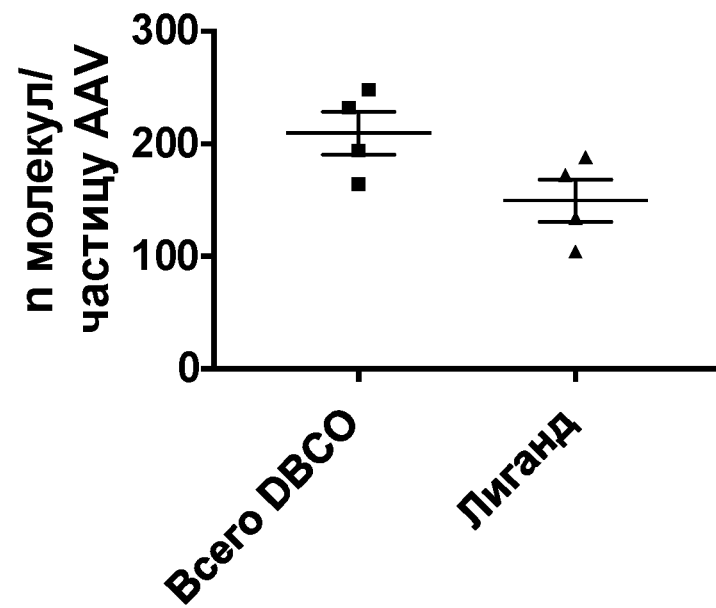




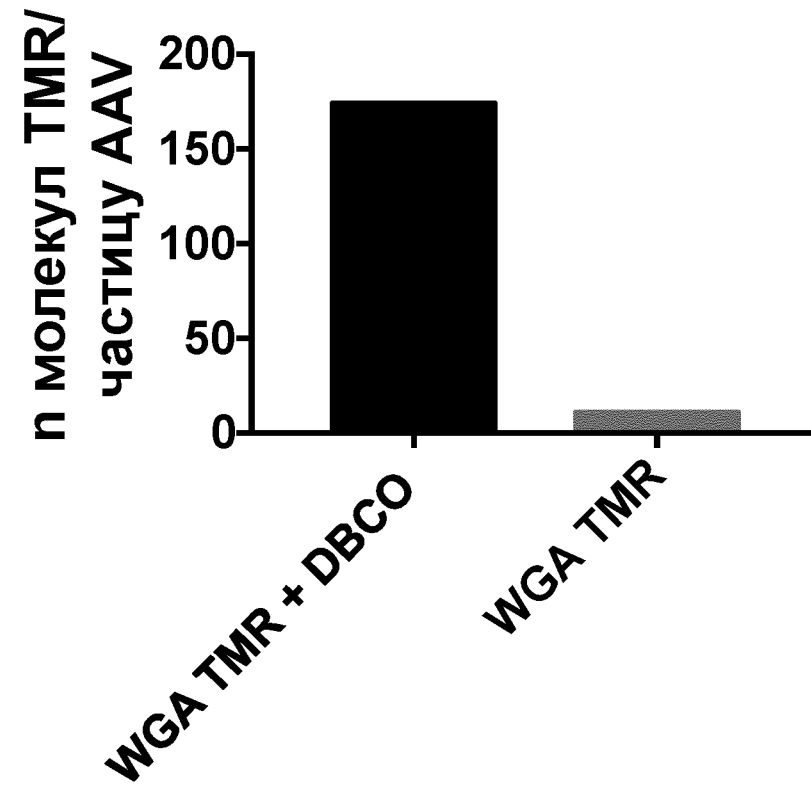
ФИГ. 41



ФИГ. 42

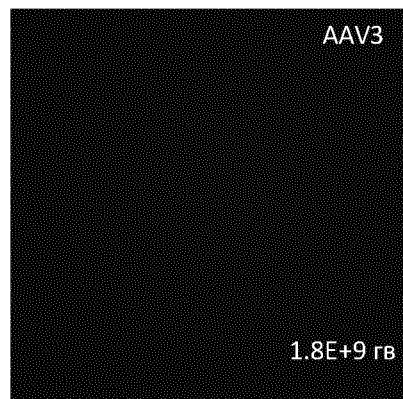


ФИГ. 43

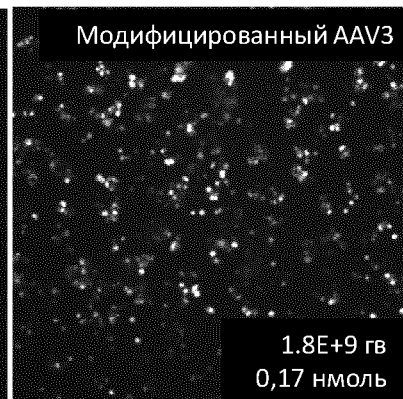


ФИГ. 44

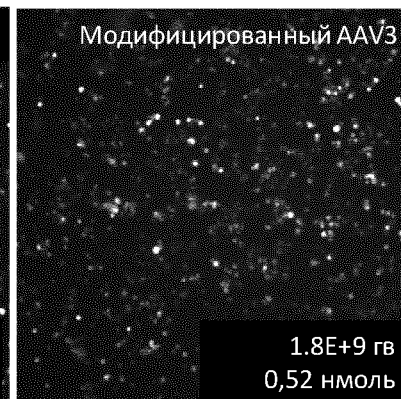
ФИГ. 45a



ФИГ. 45b



ФИГ. 45c

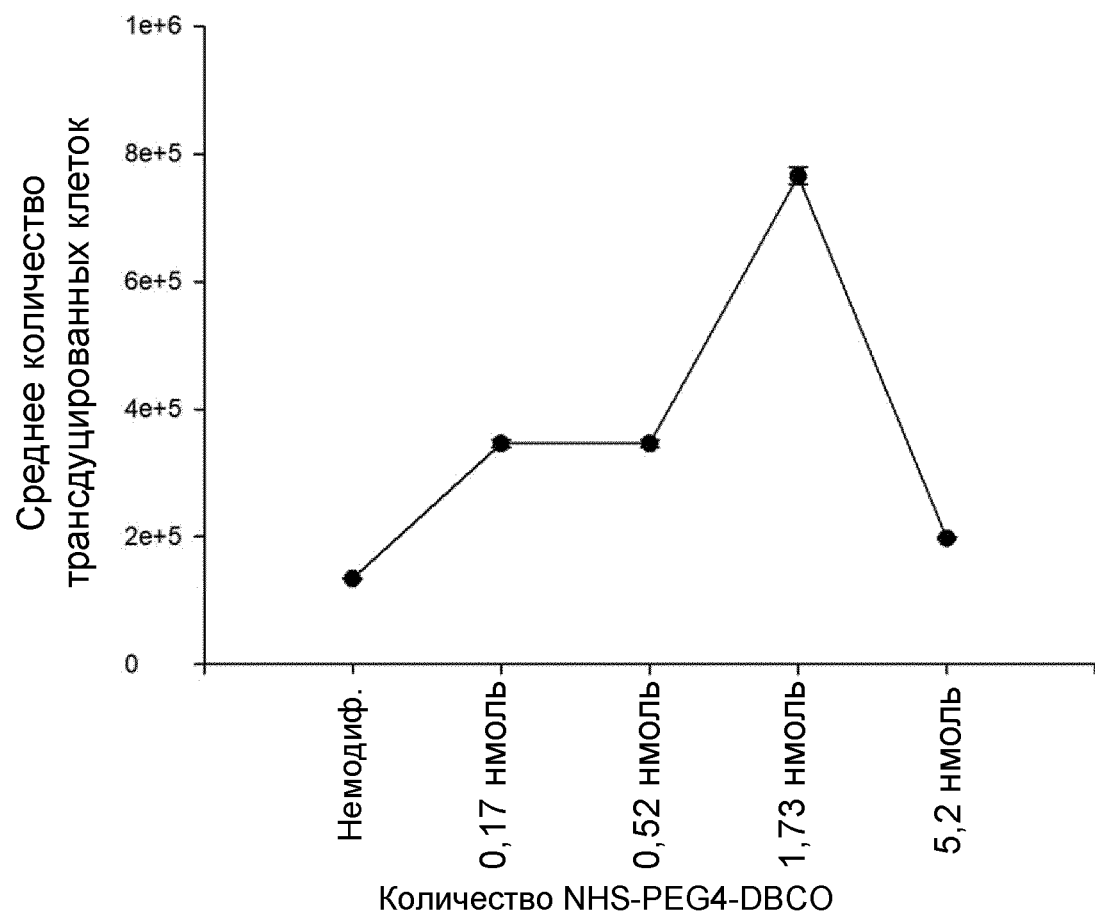


ФИГ. 45d

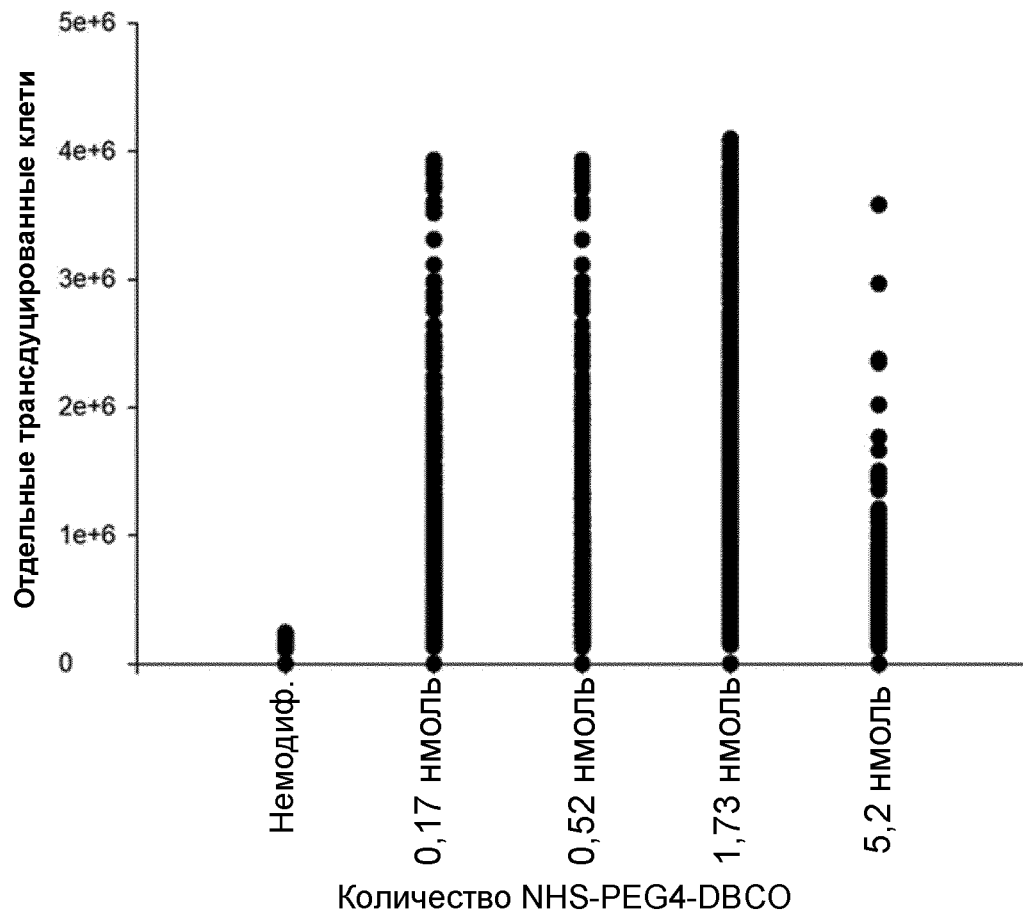


ФИГ. 45e



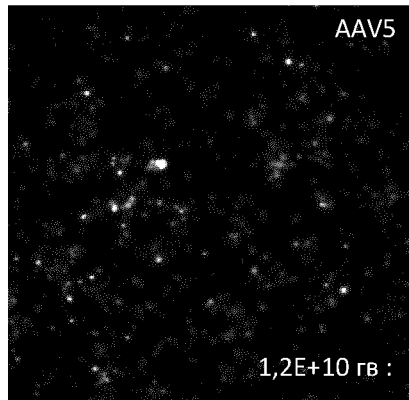


ФИГ. 46

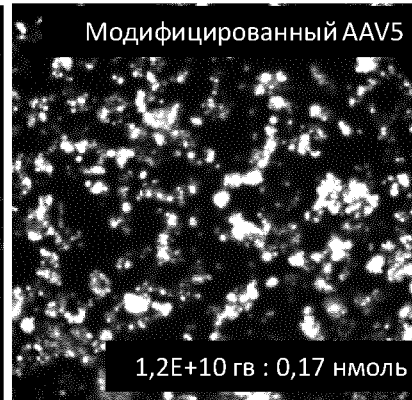


ФИГ. 47

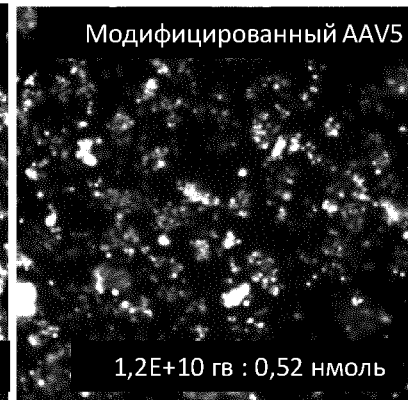
ФИГ. 48a



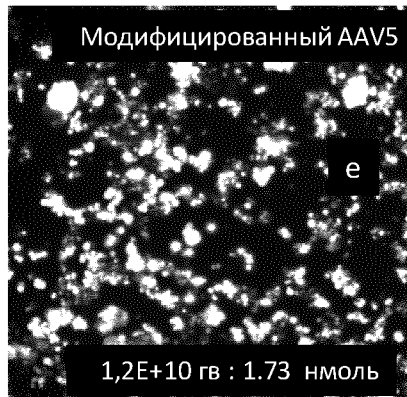
ФИГ. 48b



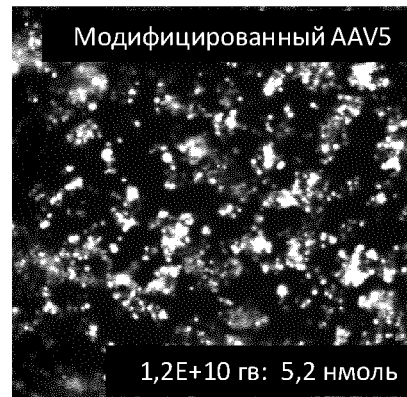
ФИГ. 48c

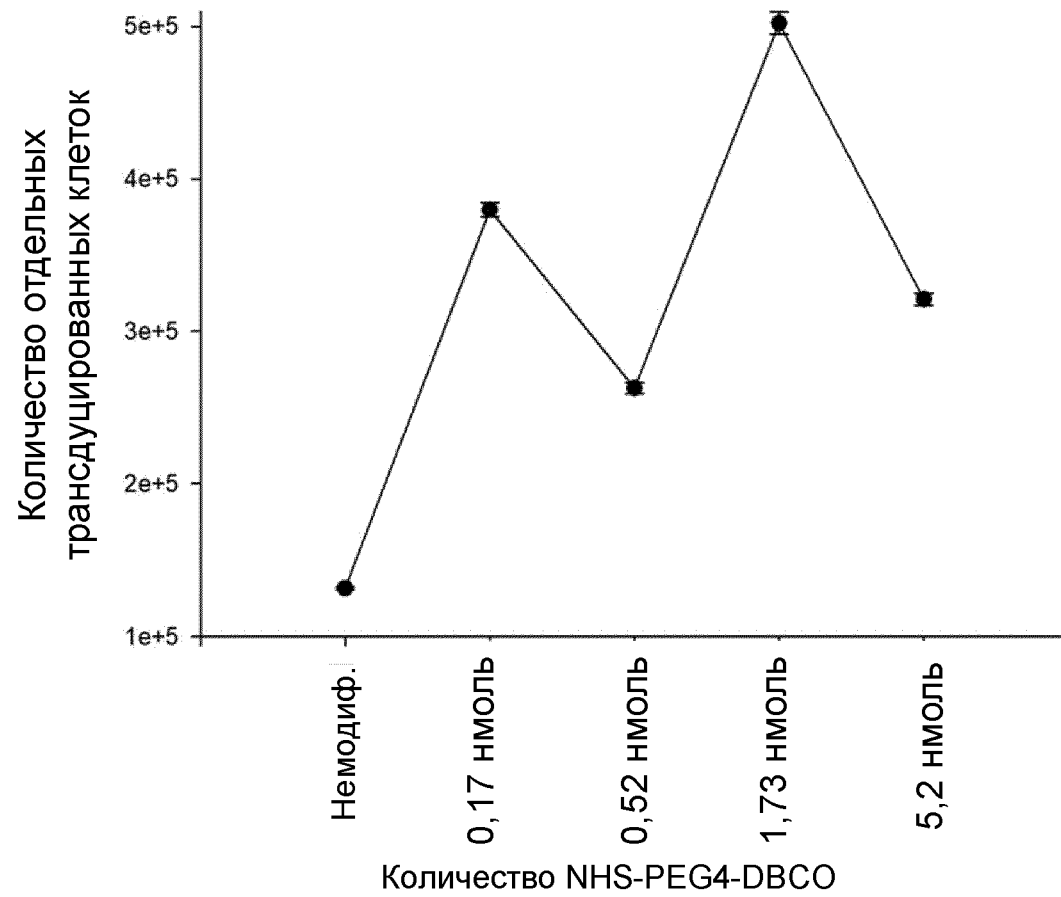


ФИГ. 48d

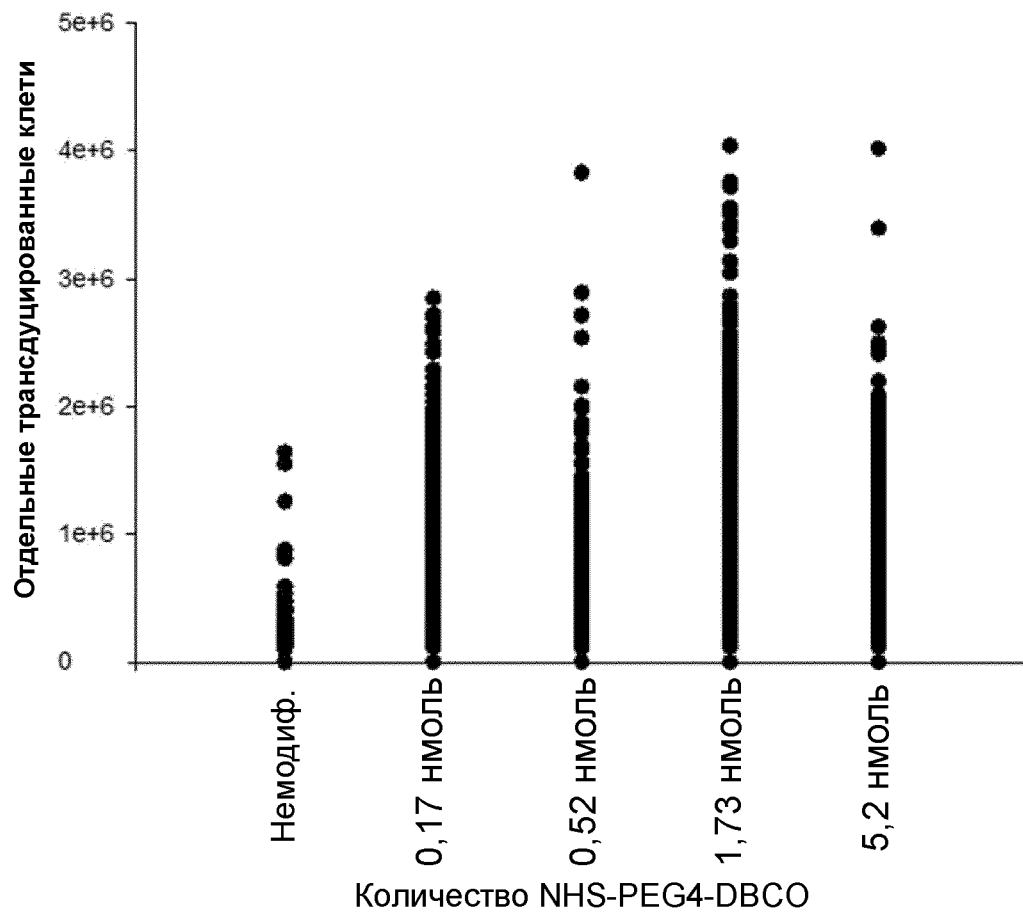


ФИГ. 48e



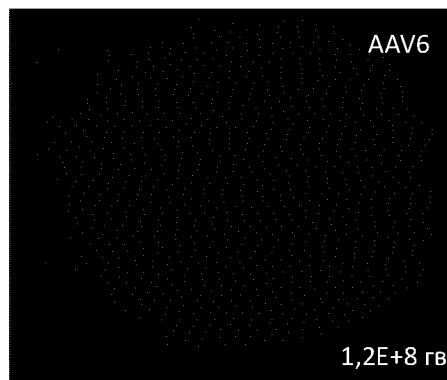


ФИГ. 49



ФИГ. 50

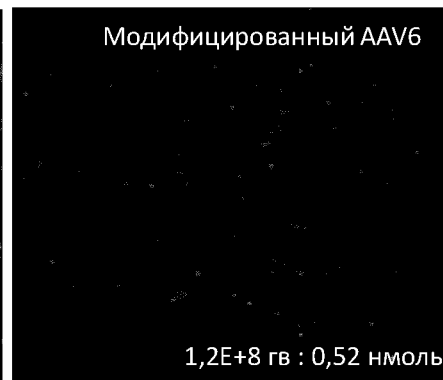
ФИГ. 51a



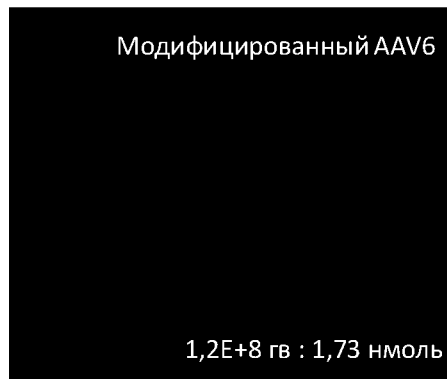
ФИГ. 51b



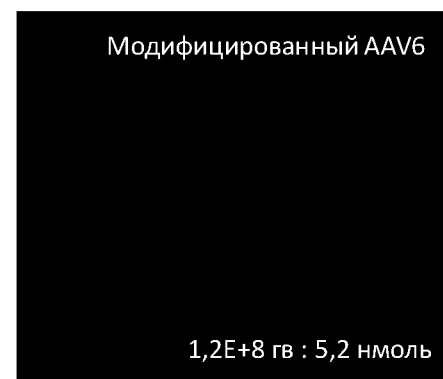
ФИГ. 51c

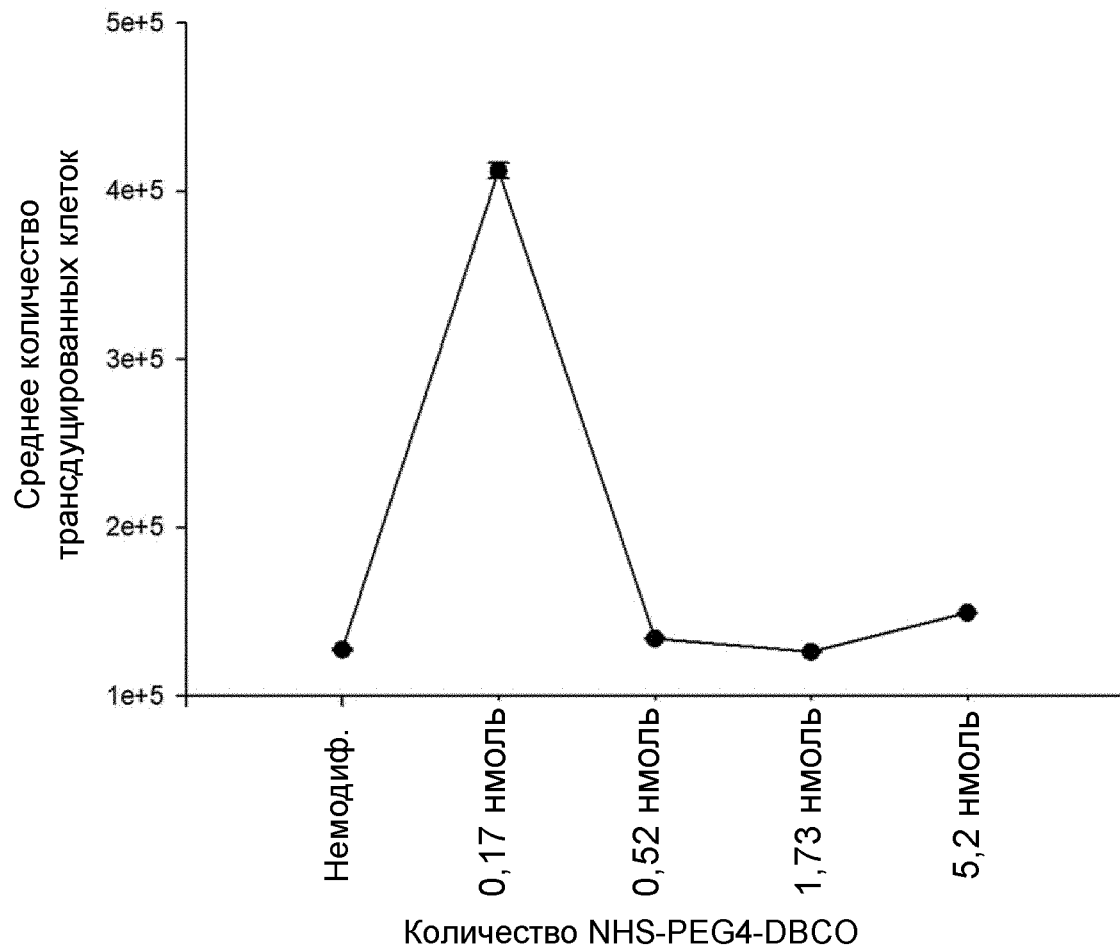


ФИГ. 51d

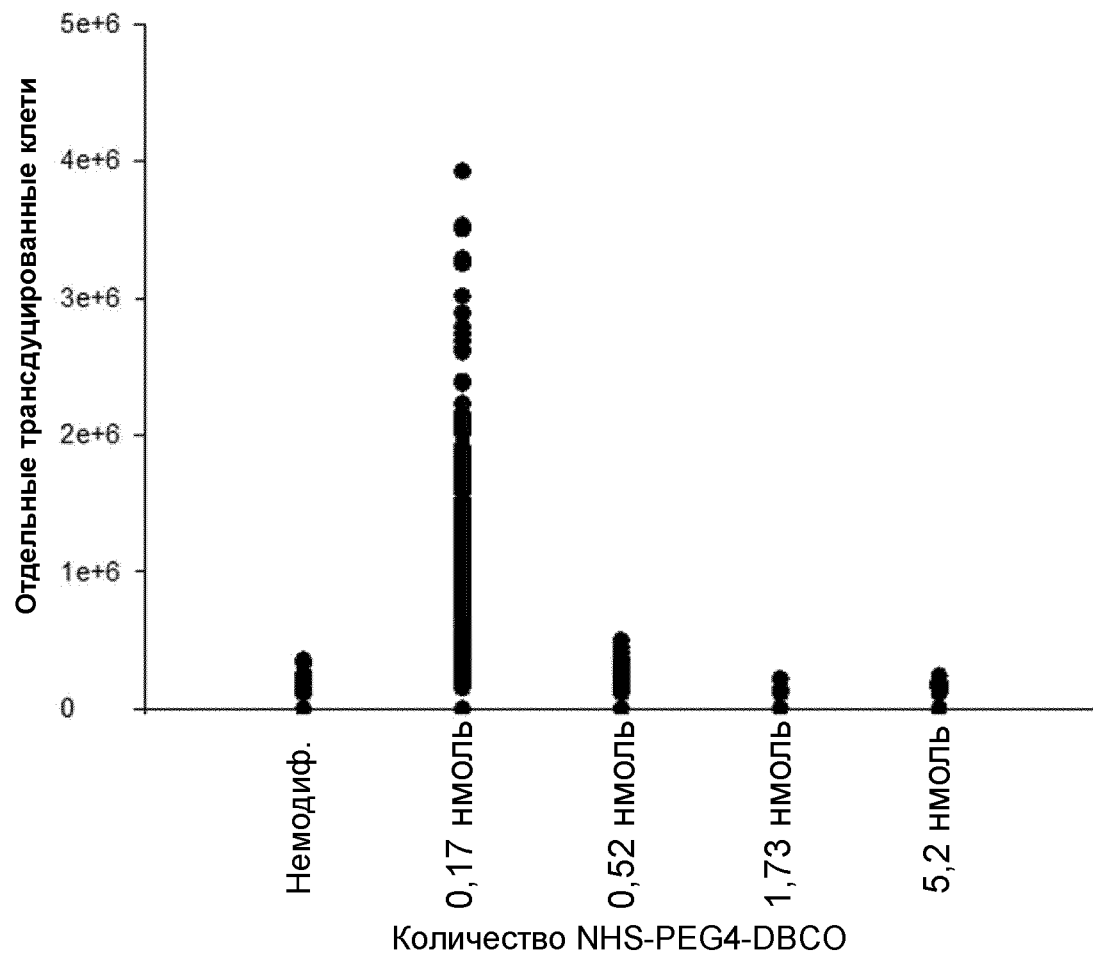


ФИГ. 51e





ФИГ. 52



ФИГ. 53

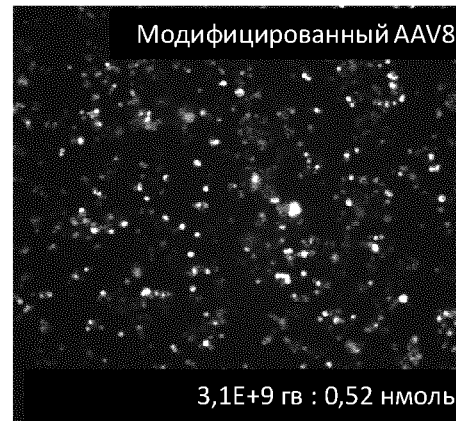
ФИГ. 54a



ФИГ. 54b



ФИГ. 54c

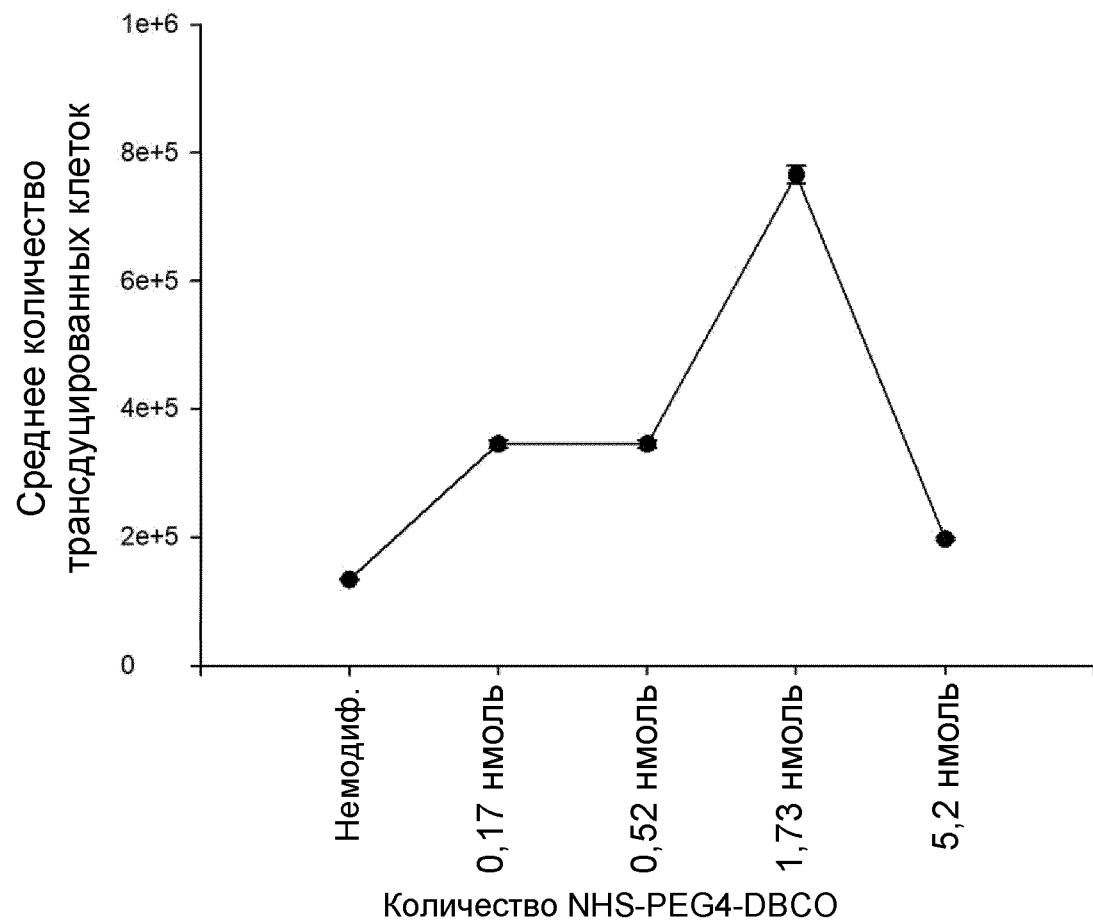


ФИГ. 54d

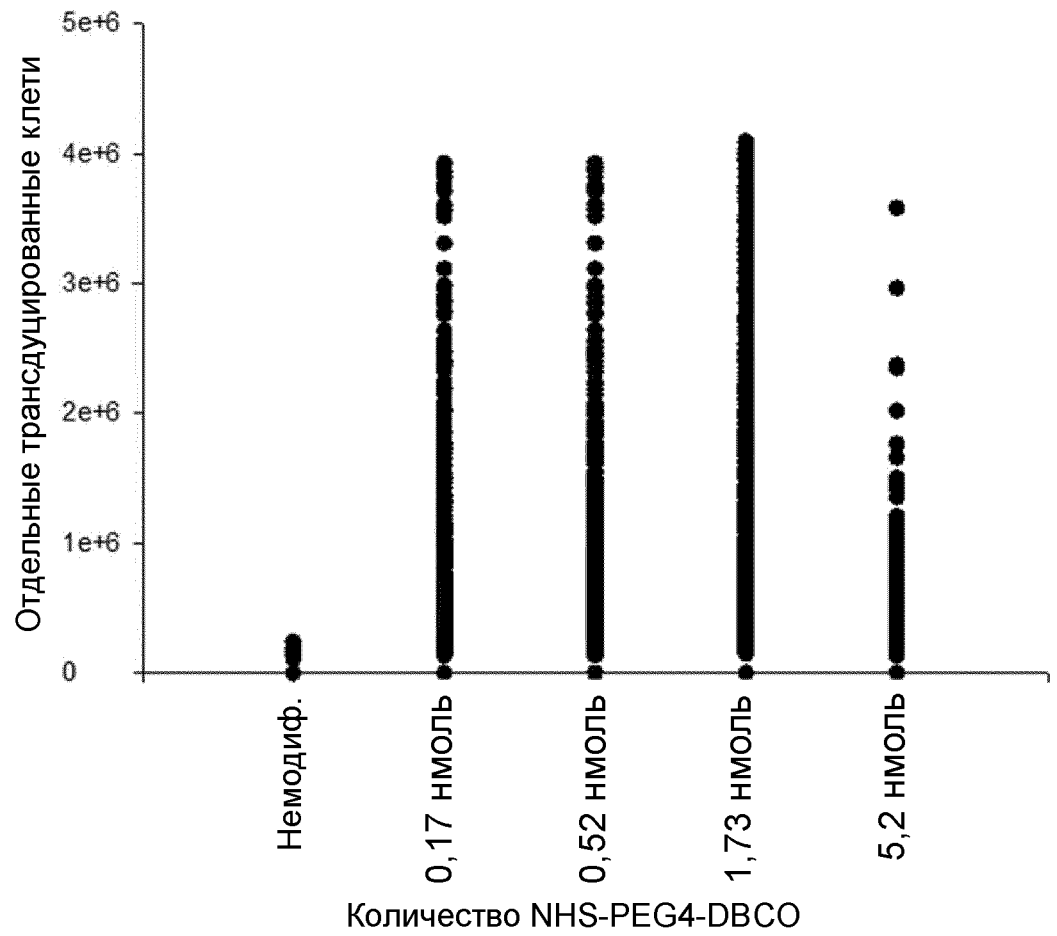


ФИГ. 54e

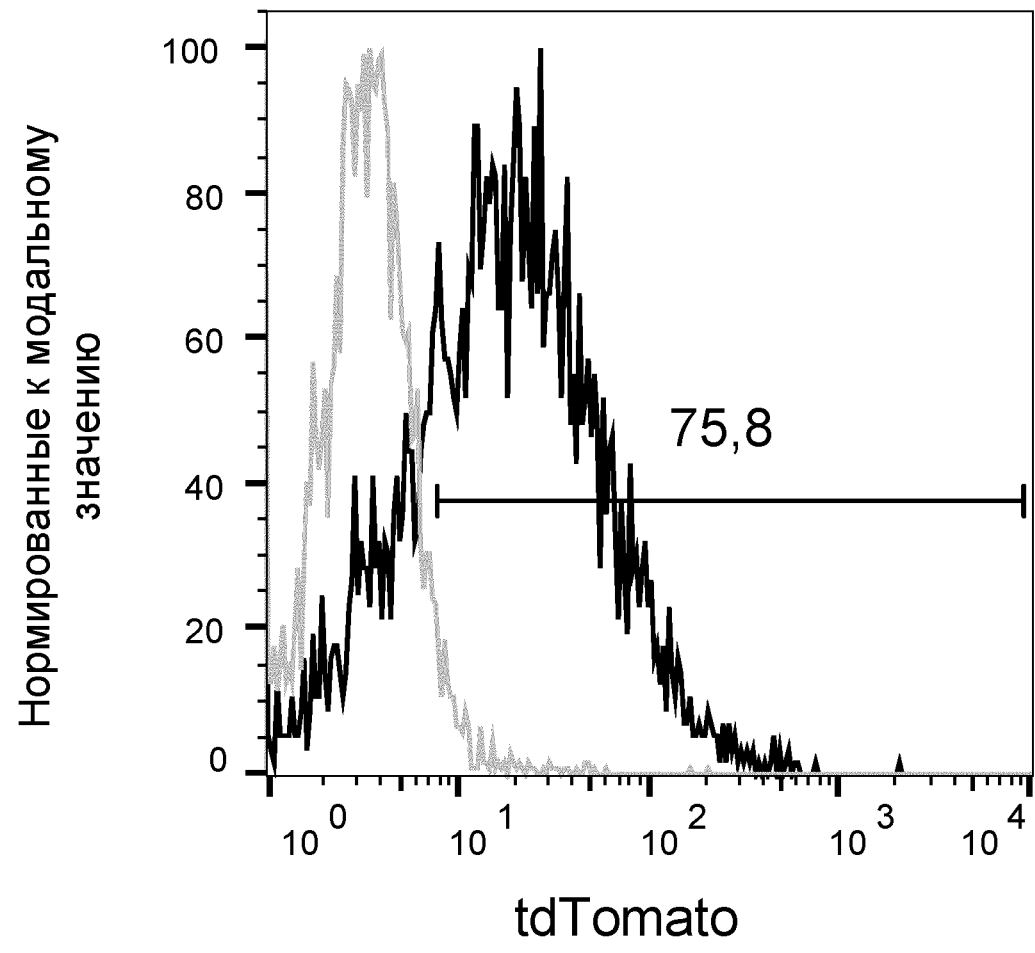




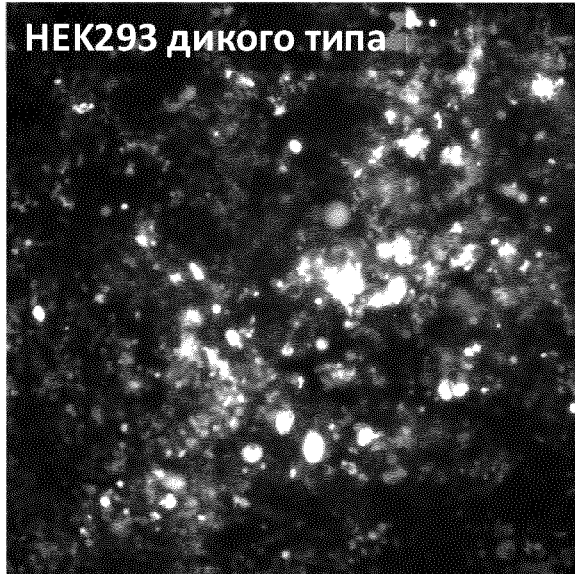
ФИГ. 55



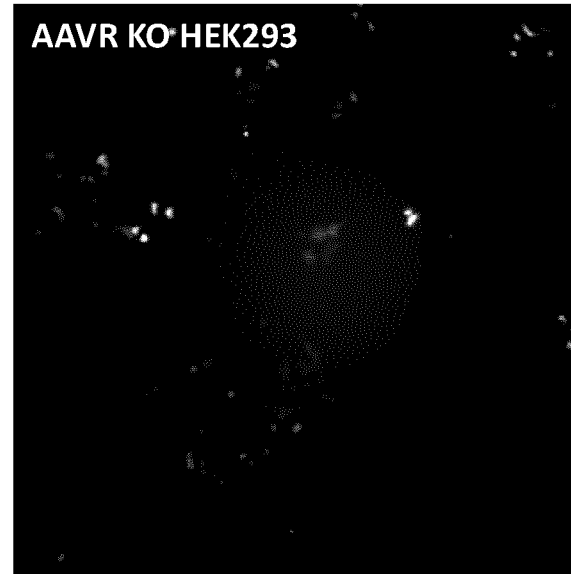
ФИГ. 56



ФИГ. 57



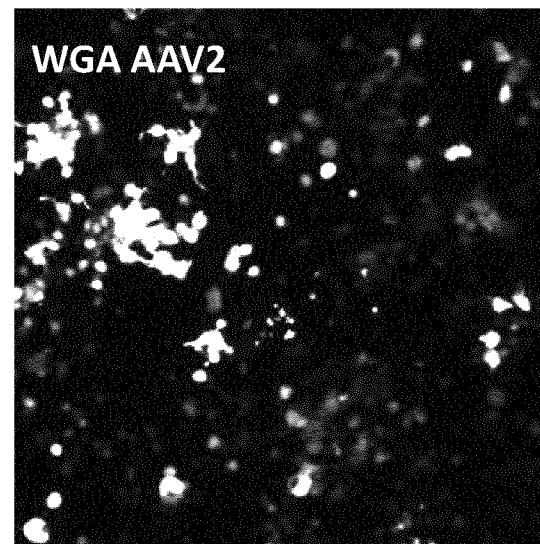
ФИГ. 58а



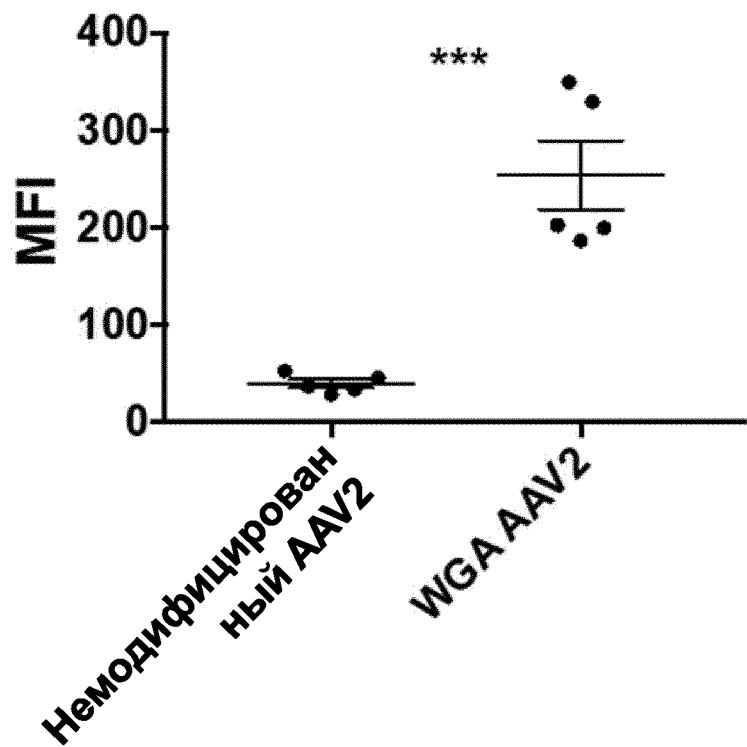
ФИГ. 58b



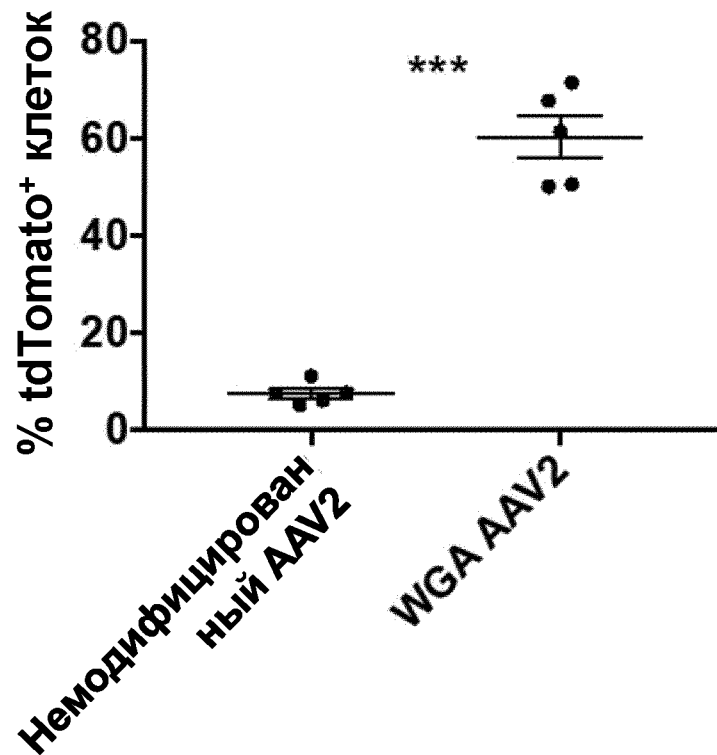
ФИГ. 59a



ФИГ. 59b



ФИГ. 60a



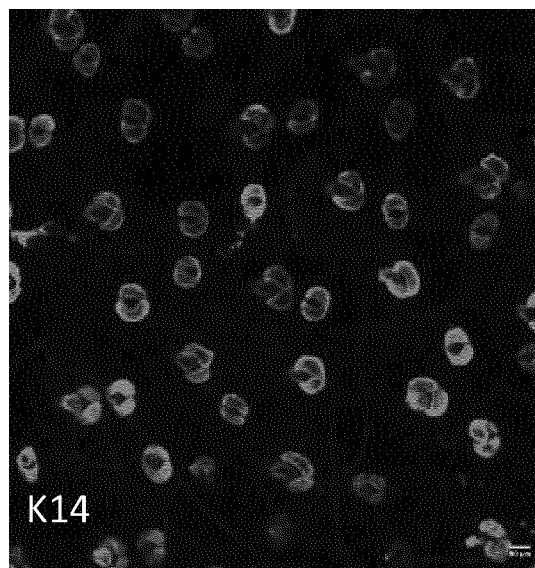
ФИГ. 60b

MVSAIVLYVLLAAAAHSAFAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTG
YIMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNGGTDYNPQFQDRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDVAVYYCARDGYDDGPYTLETWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDIYSFVAWYQQKPKAP
KLLIYNAQTEAQGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYDSPLT
FGGGTKVEIKSSSSSGSSSSGSAALPETGGTMDKDCMKRTTLDSPKLELSG
CEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPLMQATAWLNAYFHQPEA
IEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLLKVVKFGGEVISYQQLAALAGNPAATA
AVKTALSGNPVPILIPCHRVSSTGAVGGYEGGLAVKEWLLAHEGHRGKPKGL
CTHHHHHH*

ФИГ. 61



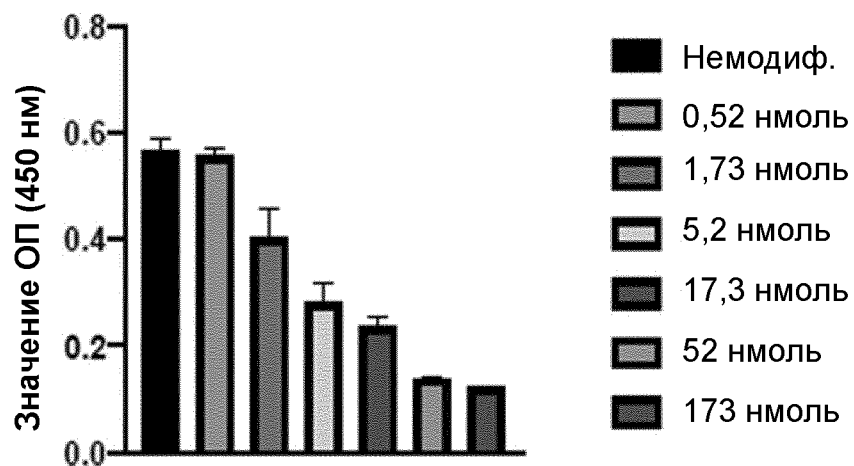
ФИГ. 62a



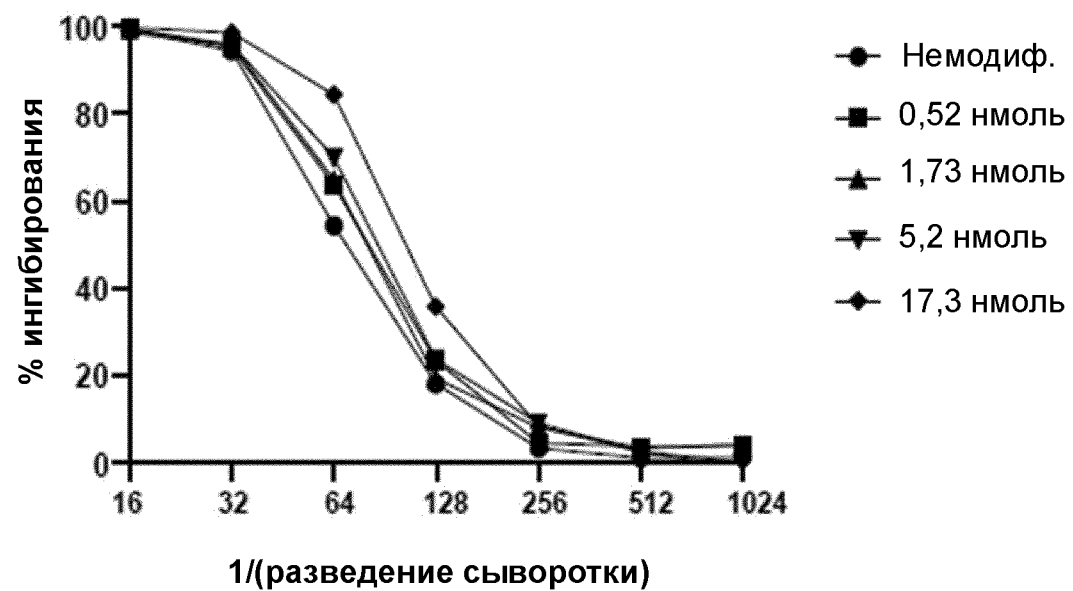
ФИГ. 62b



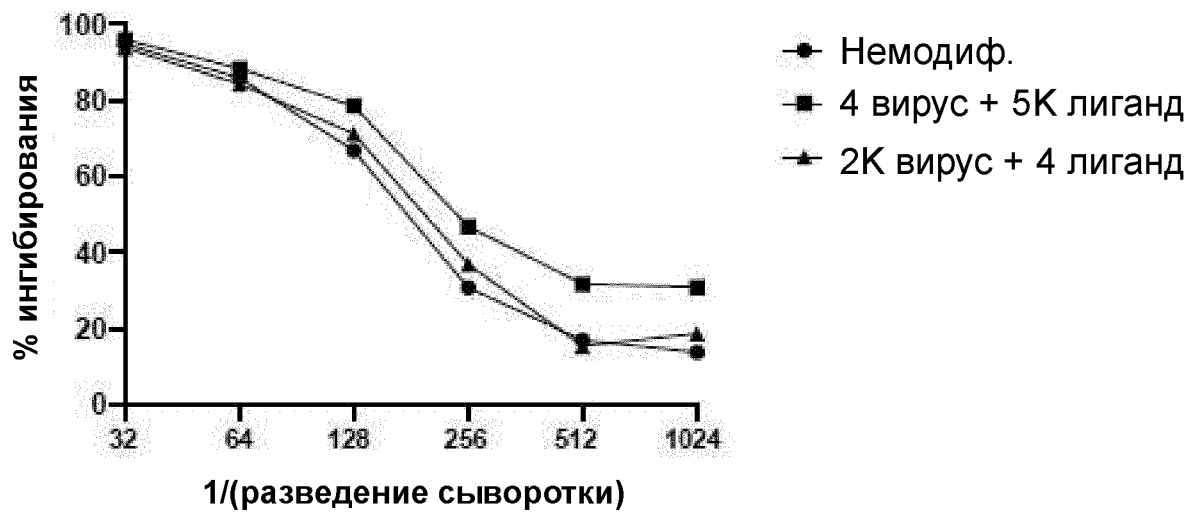
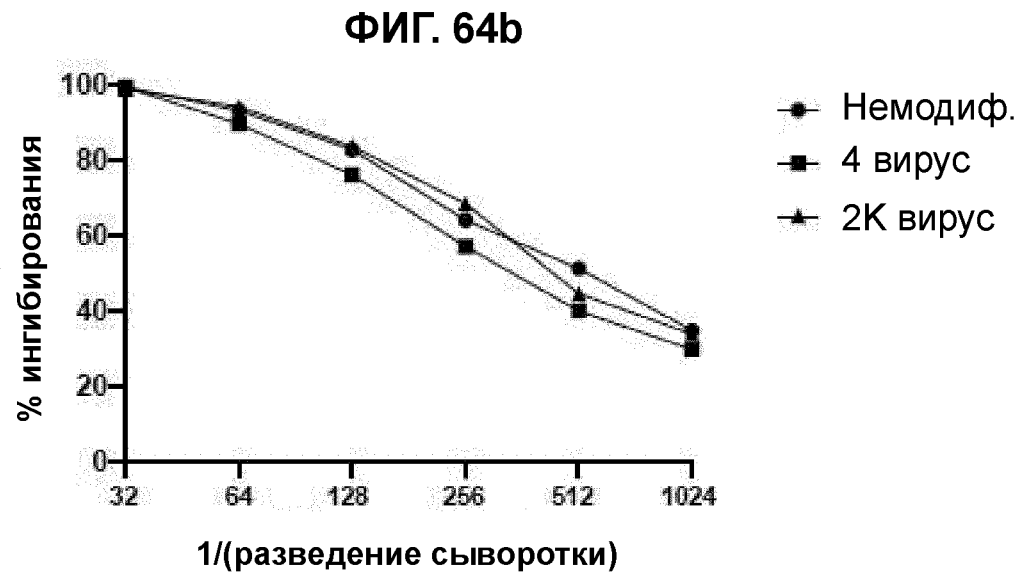
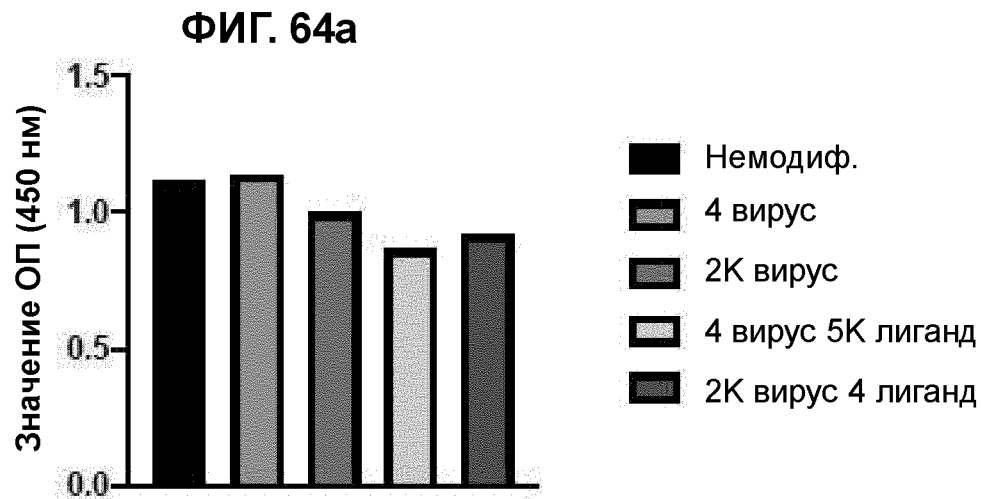
ФИГ. 62c



ФИГ. 63а



ФИГ. 63b



ФИГ. 64c

ФИГ. 65a
Без сыворотки

ФИГ. 65b
1:4

ФИГ. 65c
1:8

ФИГ. 65d
1:16

ФИГ. 65e
1:32

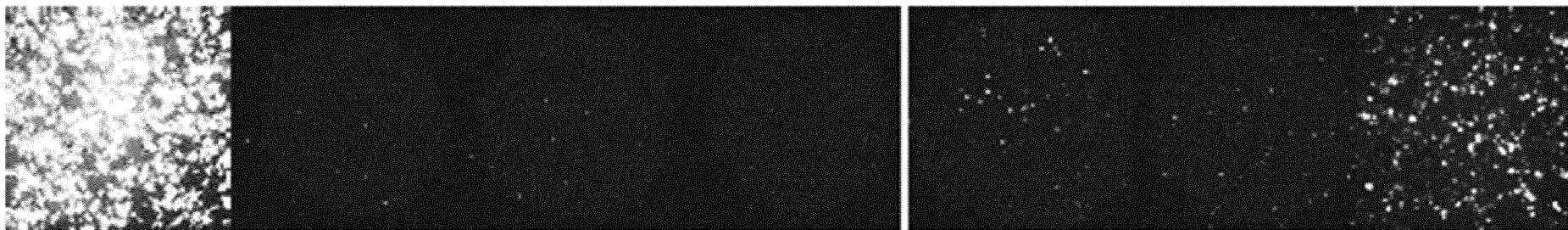
ФИГ. 65f
1:64

ФИГ. 65g
1:128

Немодиф.



WGA-модиф.



ФИГ. 65h

ФИГ. 65i

ФИГ. 65j

ФИГ. 65k

ФИГ. 65l

ФИГ. 65m

ФИГ. 65n

