

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391325 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.12(22) Дата подачи заявки  
2021.11.16(51) Int. Cl. C12N 15/35 (2006.01)  
C07K 14/015 (2006.01)  
C12N 15/864 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)

## (54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ С ПОВЫШЕННЫМ ТРОПИЗМОМ К ПЕЧЕНИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PCT/CN2020/129001

(32) 2020.11.16

(33) CN

(86) PCT/CN2021/130784

(87) WO 2022/100748 2022.05.19

(71) Заявитель:

**БЭЙЦЗИН СОЛОБАЙО  
ДЖИНТЕКНОЛОДЖИ КО., ЛТД.  
(CN)**

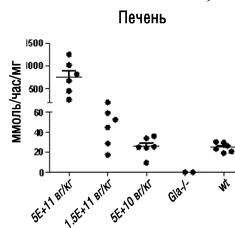
(72) Изобретатель:

**Чжан Тинтин, Ван Чао (CN)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Описаны рекомбинантные аденоассоциированные вирусы. Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы могут содержать капсидный белок с повышенным тропизмом к клеткам печени. Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы также могут обладать меньшей иммуногенностью у человека. Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы могут содержать экспрессионные кластеры, включающие полинуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтическое средство, применимое при генотерапии заболевания печени. Также описано получение систем для упаковки рекомбинантных аденоассоциированных вирусов, способы получения рекомбинантных аденоассоциированных вирусов, фармацевтические композиции, содержащие рекомбинантные аденоассоциированные вирусы, и применение указанных композиций для лечения заболеваний печени, включая болезнь Фабри и гепатит В.



A1

202391325

202391325

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577953EA/032

### РЕКОМБИНАТНЫЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ С ПОВЫШЕННЫМ ТРОПИЗМОМ К ПЕЧЕНИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

#### Список последовательностей

Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII, и который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 6 ноября 2020 г., имеет название 20201106-SEQLIST.TXT и размер 26 кБ.

#### Область техники

[001] Это раскрытие в основном относится к рекомбинантным аденоассоциированным вирусам, содержащим капсидный белок аденоассоциированного вируса с повышенным тропизмом к печени и экспрессионный кластер, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтическое средство, подходящее для генотерапии заболевания печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кодируемое терапевтическое средство содержит альфа-галактозидазу А (GLA/Gla) или короткую шпилечную РНК, нацеленную на геном вируса гепатита В. Это раскрытие также относится к композициям, содержащим эти рекомбинантные аденоассоциированные вирусы, и к применению этих рекомбинантных аденоассоциированных вирусов для лечения пациента, страдающего заболеванием печени, таким как болезнь Фабри или гепатит В.

#### Предпосылки к созданию изобретения

[002] Аденоассоциированные вирусы (AAV) представляют собой небольшие, дефектные по репликации и безоболочечные вирусы, содержащие одноцепочечный линейный геном ДНК. Геном AAV содержит инвертированные концевые повторы (ITR) на концах цепи ДНК, а также открытые рамки считывания (ORF), кодирующие белки репликации (Rep) и капсидные белки (Cap). Было показано, что AAV в целом являются безопасными, но при этом неизвестно, существует ли какая-либо значительная взаимосвязь с патогенезом опухолей или с другими заболеваниями (Guylene (2005) Arch Ophthalmol 123:500-506). Помимо безопасности, AAV обладают и другими свойствами, которые делают их особенно подходящими в качестве векторов для генотерапии, например, такими свойствами как высокая эффективность инфицирования, способность инфицировать хозяев широкого ряда и пролонгированная экспрессия (David (2007) BMC Bio 7:75). Таким образом, AAV широко используются для лечения множества различных заболеваний, таких как рак, заболевания сетчатки, артрит, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), заболевания печени и неврологические заболевания.

[003] Одним из типов заболеваний печени является болезнь Фабри, которая представляет собой редкое генетическое заболевание и относится к категории лизосомных болезней накопления. Это заболевание вызывается мутациями в гене альфа-галактозидазы А (gla). Дефицит GLA приводит к накоплению гликолипидов в кровеносных сосудах и

других тканях и органах, что может приводить к нарушению их функций. Симптомы включают боль, заболевание почек, поражения кожи, усталость, тошноту и невропатию. Лечение этих заболеваний включает заместительную ферментную терапию с использованием рекомбинантной GLA. Гепатит В представляет собой заболевание печени, вызываемое вирусом гепатита В (HBV). Он распространяется в том случае, когда физиологические жидкости, такие как кровь и сперма инфицированного человека, попадают к неинфицированному человеку. Симптомы этого заболевания включают усталость, плохой аппетит, боль в животе, тошноту и желтуху. Цирроз и рак печени встречаются приблизительно у 25% больных хроническим гепатитом В. По оценкам специалистов Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), в 2015 году приблизительно 257 миллионов человек в мире имели хронический гепатит В, и от этого заболевания умерло 887000 человек. Поэтому важно разработать безопасные и эффективные методы лечения таких широко распространенных заболеваний печени. AAV могут быть использованы для доставки терапевтического средства, подходящего для генотерапии заболеваний печени, таких как болезнь Фабри или гепатит В. Лечение гепатита В включает генотерапию, которая может быть проведена с использованием короткой шпилечной РНК (кшРНК), нацеленной на геном вируса гепатита В. При использовании AAV для доставки терапевтического средства для лечения заболевания печени желательно, чтобы AAV обладали повышенным тропизмом к печени.

[004] AAV можно разделить на множество вариантов, называемых серотипами, например, AAV1-AAV12 (Gao et al. (2004) *J Virol* 78: 6381-6388; Mori et al. (2004) *Virology* 330:375-383; Schmidt et al. (2008) *J Virol* 82:1399-1406). Хозяевами AAV обычно являются люди и приматы, при этом, AAV1-6 был выделен у человека. Следовательно, AAV1-6 вызывает ярко выраженный иммунный ответ у человека. AAV7 и AAV8 были выделены из ткани сердца макак-резусов (Gao et al. (2002) *PNAS* 99:11854-11859), тогда как AAV9-12 были выделены у человека и макак. Хотя все серотипы AAV имеют характерную икосаэдрическую структуру, однако различия как в последовательности, так и в топологии поверхности капсидных белков у различных серотипов AAV придают им различную способность связываться с рецепторами клеточной поверхности и тропизм для клеток различных типов (Timpe (2005) *Curr Gene Ther* 5:273-284). Так, например, AAV2 обладает тропизмом к клеткам различных типов, а особенно выраженным тропизмом к нейронам; AAV1 и AAV7 обладают повышенным тропизмом к скелетным мышцам; AAV3 обладает повышенным тропизмом к мегакариоцитам; AAV5 и AAV6 обладают повышенным тропизмом к эпителиальным клеткам дыхательных путей, при этом, хорошо известно, что AAV8 обладает тропизмом к клеткам печени.

[005] Природные AAV имеют ограниченные профили тропизма, при этом эффективности терапевтических средств, содержащих различные капсидные белки AAV, в отношении их соответствующих клеток-мишеней сильно различаются. Кроме того, у человека и других приматов часто вырабатываются нейтрализующие антитела против природных вариантов AAV, что приводит к уменьшению времени полужизни AAV и к

потере эффективности после введения. Таким образом, были проведены тщательные исследования генетически сконструированных капсидов AAV с повышенным тропизмом к клеткам определенных типов и со сниженной иммуногенностью. Сконструированные AAV уже применялись в медицине. Так, например, AAV2.5 содержит химерный капсид, полученный путем добавления пяти аминокислот, ответственных за тропизм к скелетным мышцам, из капсида AAV1 в капсид AAV2. AAV2.5, содержащий ген минидистрофина, использовали для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (Bowles et al. (2012) Mol Ther 20:443-455), при этом, клинические испытания фазы I уже завершены. Безопасность этих сконструированных AAV также была оценена специалистами. Было показано, что AAV2.5 не только обладает повышенным тропизмом к скелетным мышцам, но и является менее иммуногенным по сравнению с природным AAV2.

[006] Потребность в получении генетически сконструированных AAV, обладающих повышенным тропизмом к печени и сниженной иммуногенностью у человека, остается актуальной. Такие AAV представляют собой ценный и усовершенствованный инструмент для доставки терапевтического средства в целях лечения заболевания печени, такого как болезнь Фабри или гепатит В.

#### **Описание сущности изобретения**

[007] В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к рекомбинантному AAV (rAAV). В некоторых вариантах осуществления изобретения, rAAV обладает улучшенными свойствами, такими как высокая эффективность упаковки, повышенные уровни экспрессии генов, пониженная иммуногенность и/или повышенный тропизм к клеткам печени. В этих вариантах осуществления изобретения, rAAV содержит экспрессионный кластер, включающий полинуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтическое средство для лечения заболевания печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое средство представляет собой кшРНК или GLA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание печени представляет собой гепатит В или болезнь Фабри. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему экспрессионные кластеры кшРНК или GLA, такому как плаزمид, содержащая экспрессионный кластер. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение также относится к системе упаковки для продуцирования rAAV согласно изобретению. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к системе плазмид для упаковки rAAV согласно изобретению. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение также относится к клетке, содержащей плазмидную систему для упаковки rAAV согласно изобретению, включая выделенную сконструированную клетку, содержащую упакованный rAAV. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение также относится к способу упаковки rAAV согласно изобретению. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей rAAV. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение также относится к применению композиции, содержащей rAAV согласно изобретению, в целях приготовления лекарственного средства для профилактики и

лечения заболеваний печени, таких как гепатит В и болезнь Фабри, и к применению такой композиции в способе лечения заболеваний печени, таких как гепатит В и болезнь Фабри.

[008] Дополнительные признаки и преимущества раскрытых вариантов осуществления изобретения изложены частично в последующем описании, и частично будут очевидны из описания, или они могут быть изучены на практике исходя из раскрытых вариантов осуществления изобретения. Признаки и преимущества раскрытых вариантов осуществления изобретения будут реализованы и достигнуты с помощью элементов и комбинаций, конкретно указанных в прилагаемой формуле изобретения.

[009] Вышеприведенное общее описание и последующее подробное описание приводятся лишь в качестве примеров и пояснений, которые не ограничивают заявленные раскрытые варианты осуществления изобретения.

[0010] Прилагаемые чертежи являются частью настоящего изобретения. Эти чертежи иллюстрируют несколько вариантов осуществления изобретения и вместе с описанием служат для пояснения принципов раскрытых вариантов осуществления изобретения, изложенных в прилагаемой формуле изобретения.

#### **Краткое описание чертежей**

[0011] Вышеупомянутые и другие цели, особенности и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из нижеследующего описания конкретных вариантов осуществления изобретения, как показано на прилагаемых чертежах. Эти чертежи необязательно выполнены в масштабе или не всегда являются исчерпывающими, а вместо этого, акцент был сделан на иллюстрацию принципов различных вариантов осуществления настоящего изобретения.

[0012] На фиг. 1А-1И показаны карты различных плазмид. В частности, на фиг. 1А-1Д показаны карты различных плазмид, которые содержат различные промоторы и нуклеотидную последовательность, кодирующую Gluc. На фиг. 1Е-1И показаны карты различных плазмид, которые содержат различные промоторы и нуклеотидную последовательность, кодирующую GLA.

[0013] На фиг. 2А-2В показаны карты плазмид, содержащих нуклеотидную последовательность, кодирующую кшРНК, нацеленную на геном HBV.

[0014] На фиг. 3А-3F показаны графики, иллюстрирующие тропизм AAV2/8, AAV2/3В, AAV2/7 и AAV2/9 для различных линий клеток печени.

[0015] На фиг. 4А-4J показаны графики, иллюстрирующие тропизм AAV2/8 и AAV2/X для различных линий клеток печени.

[0016] На фиг. 5А-5J показаны графики, иллюстрирующие тропизм AAV2/8 и AAV2/X для клеток первичного рака печени человека.

[0017] На фиг. 6А-6N показаны флуоресцентные изображения экспрессии EGFP *in vivo* в различных тканях макака, которым вводили вектор AAV2/X-CMV-EGFP, включая ткани сердца (фиг. 6А), легкого (фиг. 6В), печени (фиг. 6С-6G), головного мозга (фиг. 6Н), яичек (фиг. 6I), двуглавых мышц бедра (фиг. 6J), желудка (фиг. 6К), тощей кишки (фиг. 6L), почек (фиг. 6М) и селезенки (фиг. 6N), соответственно.

[0018] На фиг. 7A-7N показаны флуоресцентные изображения экспрессии EGFP *in vivo* в различных тканях макака, которым вводили вектор AAV2/8-CMV-EGFP, включая ткани сердца (фиг. 7A), легкого (фиг. 7B), печени (фиг. 7C-7G), головного мозга (фиг. 7H), яичек (фиг. 7I), двуглавых мышц бедра (фиг. 7J), желудка (фиг. 7K), тощей кишки (фиг. 7L), почек (фиг. 7M) и селезенки (фиг. 7N), соответственно.

[0019] На фиг. 8 представлена диаграмма, иллюстрирующая сравнительные уровни Nab против AAV2/8 или AAV2/X в объединенной сыворотке человека.

[0020] На фиг. 9A-9B схематично показаны экспрессионные кластеры, содержащие различные промоторы и полинуклеотиды, кодирующие различные трансгены.

[0021] На фиг. 10A-10B представлены графики, иллюстрирующие уровни экспрессии Gluc и GLA под контролем различных промоторов. На фиг. 10A показан уровень экспрессии Gluc под контролем промотора DC172, промотора DC190 или промотора CMV. На фиг. 10B показаны уровни экспрессии GLA под контролем промотора DC172 или промотора LP1.

[0022] На фиг. 11 показана схема экспрессионного кластера, содержащего последовательность WPRE.

[0023] На фиг. 12A-12B представлены графики, иллюстрирующие сравнение активности GLA с использованием AAV2/X, содержащего промотор DC172 или промотор LP1, с добавлением и без добавления последовательности WPRE у нормальных мышей.

[0024] На фиг. 13A-13D представлены графики, иллюстрирующие активность GLA в различных органах мышей-моделей, которым вводили AAV2/X или AAV2/8.

[0025] На фиг. 14A-14D представлены графики, иллюстрирующие активность GLA в различных органах мышей-моделей, которым вводили AAV2/X с различной множественностью заражения.

[0026] На фиг. 15A-15B представлены графики, иллюстрирующие уровни поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), сниженные с помощью кшРНК, кодируемой нуклеотидной последовательностью, которая содержится в AAV2/X или AAV2/8.

[0027] На фиг. 16A-16B представлены графики, иллюстрирующие уровни е-антигена вируса гепатита В (HBeAg), сниженные с помощью кшРНК, кодируемой нуклеотидной последовательностью, которая содержится в AAV2/X или AAV2/8.

[0028] На фиг. 17A-17B представлены графики, иллюстрирующие уровни ДНК HBV, сниженные с помощью кшРНК, кодируемой нуклеотидной последовательностью, которая содержится в AAV2/X или AAV2/8.

### **Подробное описание**

[0029] Хотя в настоящей заявке описаны примеры и признаки раскрытых принципов, однако в настоящее изобретение могут быть внесены возможны модификации, адаптации и другие изменения, не выходящие за рамки существа и объема раскрытых вариантов осуществления изобретения. Кроме того, слова «содержащий», «имеющий», «включающий», «включая» и другие подобные формы должны быть

эквивалентными по смыслу и иметь неинклюзивный смысл, заключающийся в том, что элемент или элементы, следующие за любым из этих слов, не рассматриваются как исчерпывающий список таких элементов, или ограничиваются только перечисленными элементами. Следует также отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения существительные в формах единственного числа, могут также относиться и к существительным во множественном числе, если из контекста описания не следует иное. Если это не оговорено особо, то все используемые здесь технические и научные термины имеют свое общепринятое значение, известное специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. Терминология, используемая в описании настоящего изобретения, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не рассматривается как ограничение объема изобретения. Если это не оговорено особо, то стандартные способы, известные специалистам в данной области, могут быть применены для получения рекомбинантных и синтетических полипептидов, манипуляций с последовательностями нуклеиновых кислот, получения трансформированных клеток, создания конструкций rAAV, модифицированных капсидных белков и векторов, экспрессирующих белки AAV Rep и/или Cap, и получения временно и стабильно трансфицированных упаковывающих клеток.

#### **Рекомбинантные AAV**

[0030] В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к рекомбинантному AAV (rAAV). Используемый здесь термин «рекомбинантный AAV» обычно относится к инфекционному, дефектному по репликации вирусу AAV, модифицированному для обеспечения определенных свойств и/или содержащему представляющие интерес терапевтические нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирус может содержать капсид AAV дикого типа и модифицированный геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирус может содержать модифицированный капсид AAV. Термин «геном AAV дикого типа» относится к немодифицированной линейной молекуле одноцепочечной ДНК, содержащей ITR на обоих концах. ITR обеспечивают ориджины репликации вирусного генома. Геном AAV дикого типа может также содержать ORF, кодирующие белки капсида (Cap) и репликации (Rep). Белок Cap представляет собой структурный белок, который образует оболочку, охватывающую геном AAV. Белки Rep представляют собой неструктурные белки, которые играют определенную роль в репликации и упаковке AAV.

[0031] Белок Cap кодируется генами *cap*. Капсидный белок AAV может играть важную роль в определении тропизма вируса. Используемый здесь термин «тропизм» обычно относится к предпочтительному проникновению вируса в клетки или ткани определенных типов и/или к преимущественному взаимодействию с клеточной поверхностью, что облегчает проникновение в клетки или ткани определенных типов. Используемый здесь термин «профиль тропизма» относится к паттерну вирусной трансдукции одной или нескольких клеток-мишеней, тканей и/или органов. Так,

например, некоторые капсиды AAV могут демонстрировать эффективную трансдукцию нейронов, но не ткани сердца. Профиль тропизма AAV может быть изменен путем модификации капсидного белка. Специалистам в данной области известны различные способы модификации капсидов AAV. Так, например, в патенте США № 9186419, капсидные белки AAV с модифицированными профилями тропизма были получены путем «скремблирования» или перетасовки двух или более различных последовательностей капсида AAV, которые объединяют части двух или более последовательностей капсидных белков. rAAV, содержащий скремблированный капсид, называется химерным или мозаичным AAV.

[0032] В некоторых вариантах осуществления изобретения, rAAV согласно изобретению представляют собой мозаичные AAV, содержащие капсидный белок, который обладает повышенным тропизмом к клеткам печени организма по сравнению с соответствующими AAV других серотипов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, организм представляет собой млекопитающее. В конкретном варианте осуществления изобретения, организмом является человек. Как будет очевидно для специалиста в данной области, AAV8 представляет собой серотип с наиболее известным тропизмом к клеткам печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, rAAV, описанный в настоящей заявке, содержит капсидный белок с более высоким тропизмом к клеткам печени по сравнению с соответствующим rAAV, содержащим капсидный белок AAV8. В одном варианте осуществления изобретения, rAAV представляет собой мозаичный AAV, который содержит капсидный белок (AAVX) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. В конкретном варианте осуществления изобретения, rAAV содержит капсидный белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (AAVX) и по меньшей мере один ITR серотипа AAV2, который обозначается как AAV2/X.

[0033] Известно, что AAV вызывают иммунный ответ у человека. В соответствии с раскрытыми здесь вариантами осуществления изобретения, rAAV, содержащий мозаичный капсид, может проявлять пониженную иммуногенность в организме по сравнению с соответствующим rAAV, содержащим капсидный белок другого серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, организм представляет собой млекопитающее. В конкретном варианте осуществления изобретения, организмом является человек. Используемый здесь термин «иммуногенность» обычно относится к силе иммунного ответа, вызванного антигеном. Термин «иммунный ответ» обычно относится к процессу, посредством которого организм распознает и защищается от бактерий, вирусов и других веществ, как живых, так и неживых, которые рассматриваются как чужеродные и вредоносные. Такие вещества обычно называют «антигенами». У человека встречаются два типа иммунных ответов: врожденный иммунный ответ и приобретенный иммунный ответ. Врожденный иммунный ответ является неспецифичным для конкретного антигена, тогда как приобретенные иммунные ответы развиваются после воздействия антигена. Иммунные ответы хозяина во время



введения гAAV могут негативно влиять на долгосрочную экспрессию трансгена у человека, снижать эффективность доставляемого терапевтического средства и/или вызывать нежелательные побочные эффекты. По оценкам специалистов, более 90% населения подвергалось воздействию AAV дикого типа, что может приводить к развитию ранее существовавших иммунных ответов, которые могут ингибировать клиническую эффективность определенных серотипов введенных гAAV. Так, например, приблизительно у 70% населения всего мира встречаются нейтрализующие антитела (NAb) против AAV1 и AAV2 в кровотоке. Как будет очевидно для специалиста в данной области, термин «нейтрализующее антитело» обычно относится к антителу, которое является частью адаптивного иммунного ответа, защищающего клетку от патогена или инфекционной частицы посредством специфического связывания с поверхностными структурами на инфекционной частице, что делает его неспособным взаимодействовать с клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гAAV, описанные в настоящей заявке, обладают сниженной иммуногенностью по сравнению с соответствующими гAAV, содержащими капсидный белок других серотипов. В конкретном варианте осуществления изобретения, гAAV согласно изобретению обладают пониженной иммуногенностью по сравнению с соответствующими гAAV, содержащими капсидный белок AAV8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гAAV содержит капсидный белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 10. В конкретном варианте осуществления изобретения, гAAV представляет собой AAV2/X (содержащий капсид SEQ ID NO: 1 и ITR от AAV2).

[0034] В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение включает гAAV, содержащий экспрессионный кластер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный кластер может включать по меньшей мере часть генома AAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный кластер может содержать по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтическое средство. Термин «экспрессионный кластер» обычно относится к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтическое средство; компоненты, необходимые для экспрессии терапевтического средства; и другие последовательности нуклеиновой кислоты. Терапевтическое средство может быть использовано для лечения состояния или заболевания, включая заболевание печени. Неограничивающими примерами заболевания печени являются болезнь Фабри, гепатит В, гемофилия А, гемофилия В, болезнь Криглера-Найяра, болезнь Вильсона, дефицит ОТС

(дефицит орнитинтранскарбамилазы), болезнь накопления гликогена типа Ia (GSD Ia), цитруллинемия типа I, метилмалоновая ацидемия и другие заболевания. В конкретном варианте осуществления изобретения, заболевание печени представляет собой гепатит В. В другом варианте осуществления изобретения, заболевание печени представляет собой болезнь Фабри.

[0035] Так, например, терапевтическое средство может содержать полипептид, пептид или нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, терапевтический пептид или кшРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое средство представляет собой кшРНК, нацеленную на геном HBV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кшРНК имеет последовательность SEQ ID NO: 3. В альтернативном варианте осуществления изобретения, терапевтическое средство представляет собой GLA, подходящую для лечения болезни Фабри. В некоторых вариантах осуществления изобретения, GLA имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

[0036] РНК-интерференция (РНКи) представляет собой биологический процесс, повсеместно встречающийся в различных организмах, от животных до растений и грибов. РНКи регулирует экспрессию генов в организме посредством регуляции матричной РНК (мРНК). Во время этого процесса, двухцепочечная РНК (дцРНК) разрезается на небольшие фрагменты длиной приблизительно от 20 до 25 нуклеотидов под действием фермента, называемого Dicer. Эти фрагменты, называемые малыми интерферирующими РНК (миРНК), а иногда называемые короткими интерферирующими РНК или РНК сайленсинга, являются двухцепочечными и могут быть загружены в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), белковый комплекс, который включает белки семейства Argonautes. После связывания, одна цепь дцРНК удаляется, что позволяет оставшейся цепи стать доступной для связывания с последовательностями мРНК посредством стандартного спаривания оснований Уотсона-Крика. Это связывание приводит либо к расщеплению и разрушению мРНК-мишени белком Argonaute, либо к рекрутингу других факторов, регулирующих мРНК. Короткая шпилечная РНК (кшРНК) представляет собой искусственную молекулу РНК, которая образует шпилечную структуру, содержащую стеблевую область парных смысловых и антисмысловых цепей, соединенных неспаренными нуклеотидами, образующими петлю. кшРНК также включает две короткие последовательности инвертированных повторов. После проникновения кшРНК в клетку, она раскручивается посредством РНК-геликазы в клетке-хозяине с образованием смысловой цепи РНК и антисмысловой цепи РНК. Антисмысловая цепь РНК связывается с RISC, распознает мРНК и взаимодействует с мРНК, содержащей последовательность, комплементарную антисмысловой цепи. Последующее расщепление и деградация мРНК посредством RISC приводит к подавлению гена-мишени. кшРНК широко используется в исследованиях и в медицине благодаря таким особенностям, как специфичность последовательности генов, эффективность и наследуемость. Обычно

применяются различные методы введения кшРНК в клетки, включая прямую доставку плазмид, а также введение с помощью вирусных или бактериальных векторов. Метод экспрессии кшРНК, опосредованной плазмидой или вирусным вектором *in vivo*, имеет преимущества перед прямым синтезом кшРНК. Последовательность дцРНК, соответствующую кшРНК, клонируют в плазмидный вектор или вирусный вектор, содержащий подходящий промотор, после чего клетку трансфицируют плазмидой или инфицируют вирусом, и желаемая кшРНК транскрибируется под контролем промотора. AAV представляет собой широко используемый вирус для доставки кшРНК. Хотя AAV часто используются в качестве векторов для доставки кшРНК в клетки, однако, различные аспекты доставки кшРНК с использованием векторов AAV все еще нуждаются в оптимизации. Так, например, существует потребность в AAV, обладающем повышенным тропизмом к клеткам печени и/или низкой иммуногенностью у человека. Кроме того, небольшая длина последовательностей кшРНК часто дает низкую эффективность упаковки *in vitro* и низкую экспрессию трансгена в организме-хозяине. Следовательно, необходимо оптимизировать эффективность упаковки и уровни экспрессии трансгена.

[0037] Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, экспрессионный кластер может также включать по меньшей мере одну последовательность наполнителя. Используемый здесь термин «последовательность наполнителя» обычно относится к последовательности нуклеиновой кислоты, отличающейся от по меньшей мере одного полинуклеотида, кодирующего терапевтическое средство и компоненты, необходимые для транскрипции и экспрессии указанного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность наполнителя выбирают так, чтобы длина экспрессионного кластера была близкой длине генома AAV дикого типа. Используемый здесь термин «близкий» имеет значение, эквивалентное термину «по существу аналогичный». В некоторых вариантах осуществления изобретения, длина экспрессионного кластера составляет от приблизительно 3,2 т.п.о. до приблизительно 5,2 т.п.о. В альтернативных вариантах осуществления изобретения, длина экспрессионного кластера составляет от приблизительно 1,6 т.п.о. до приблизительно 2,6 т.п.о. В некоторых вариантах осуществления изобретения, длина экспрессионного кластера может составлять более, чем 5,2 т.п.о. или менее, чем приблизительно 1,6 т.п.о. в зависимости от свойств полинуклеотидной последовательности, кодирующей терапевтическое средство, или от применения гAAV. Так, например, последовательность наполнителя может содержать некодирующую последовательность. Термин «некодирующий» обычно относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая не кодирует белок или другую биологически активную молекулу. Так, например, некодирующая последовательность может представлять собой интрон или регуляторный элемент гена. В конкретных вариантах осуществления изобретения, некодирующая последовательность представляет собой некодирующую последовательность человека. Некодирующая последовательность человека является, но необязательно, инертной или неактивной, то

есть, она не обладает какой-либо функцией или активностью. Неограничивающие примеры некодирующих последовательностей человека включают фрагмент или комбинацию множества фрагментов интронной последовательности человеческого фактора IX, последовательности человеческой космиды С346 или HPRT-интронной последовательности. Так, например, последовательность наполнителя может содержать последовательность HPRT-интрон 2 SEQ ID NO: 4. Последовательность наполнителя может быть расположена выше или ниже по ходу транскрипции по меньшей мере одного полинуклеотида, кодирующего терапевтическое средство. В предпочтительном варианте, по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий терапевтическое средство, расположен выше по ходу транскрипции по меньшей мере одной последовательности наполнителя. Так, например, по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий терапевтическое средство, может кодировать кшРНК и по меньшей мере одну последовательность наполнителя, расположенную ниже кшРНК.

[0038] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, экспрессионный кластер может также содержать промотор, расположенный выше по ходу транскрипции по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательности, кодирующей терапевтическое средство, и по меньшей мере одной последовательности наполнителя, если она присутствует. Как будет очевидно для специалиста в данной области, промотор может представлять собой промотор любого типа, в зависимости от применения, для которого используется гAAV, включая конститутивные и индуцибельные промоторы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II или промотор РНК-полимеразы III. Примеры промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор LP1, промотор AroE/hAAT, промотор DC172, промотор DC190, промотор AroA-I, промотор TBG, промотор LSP1, промотор 7SK, промотор H1, промотор U6 и промотор HDIFN. В конкретном варианте осуществления изобретения, промотор представляет собой промотор H1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9.

[0039] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, экспрессионный кластер может также содержать по меньшей мере один ITR AAV. Как будет очевидно для специалиста в данной области, термин «ITR» относится к последовательностям длиной приблизительно 145 нуклеотидов, которые происходят от концов генома AAV дикого типа. Последовательность ITR может потребоваться для репликации и упаковки AAV. По меньшей мере один ITR гAAV, описанный в настоящей заявке, может происходить от любого серотипа AAV, включая кладотипы AF, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или от любых их гибридных/химерных типов. В конкретном варианте осуществления изобретения, ITR происходит от AAV2.

[0040] В некоторых раскрытых здесь вариантах осуществления изобретения, гAAV содержит экспрессионный кластер, который является одноцепочечным. В альтернативных вариантах осуществления изобретения, гAAV содержит экспрессионный кластер, который

является двухцепочечным или аутокомплементарным (scAAV). Геномы векторов scAAV содержат цепи ДНК, которые внутримолекулярно гибридизуются с образованием двухцепочечной ДНК после удаления оболочки в клетках-мишенях. Из-за отсутствия синтеза второй цепи, scAAV обеспечивают быструю экспрессию в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, rAAV содержит одноцепочечный экспрессионный кластер длиной от приблизительно 3,2 т.п.о. до приблизительно 5,2 т.п.о. В альтернативных вариантах осуществления изобретения, rAAV содержит двухцепочечный экспрессионный кластер длиной от приблизительно 1,6 т.п.о. до приблизительно 2,6 т.п.о. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, экспрессионный кластер дополнительно содержит по меньшей мере одну репортерную последовательность, расположенную ниже последовательности промотора. Примеры репортеров включают люцифразу Gaussia, и флуоресцентные белки, такие как EGFP.

[0041] В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к rAAV, который проявляет повышенную экспрессию терапевтического средства в клетке-хозяине или в организме по сравнению с соответствующим rAAV другого серотипа. Альтернативно или дополнительно, раскрытый здесь rAAV обладает большей эффективностью упаковки по сравнению с соответствующим rAAV другого серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, соответствующий rAAV относится к серотипу AAV8. Способы оценки экспрессии генов известны специалистам в данной области. Примерами таких способов являются, но не ограничиваются ими, количественная полимеразная цепная реакция (кол.ПЦР), Вестерн-блот-анализ, Нозерн-блот-анализ и флуоресцентная микроскопия с использованием репортерного гена.

[0042] В одном варианте осуществления изобретения, rAAV содержит капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, экспрессионный кластер, содержащий два ITR серотипа AAV2, и от 5' до 3', промотор, полинуклеотид, кодирующий кшРНК, и некодирующую человеческую последовательность наполнителя. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кшРНК нацелена на геном вируса гепатита В (HBV). В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, кодирующий кшРНК, содержит последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность наполнителя содержит последовательность SEQ ID NO: 4. В конкретных вариантах осуществления изобретения, промотор содержит последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный кластер содержит последовательность SEQ ID NO: 5. В другом конкретном варианте осуществления изобретения, rAAV содержит капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, экспрессионный кластер, содержащий два ITR серотипа AAV2, и от 5' до 3', промотор и GLA. В другом варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность GLA содержит SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления изобретения, экспрессионный кластер содержит последовательность SEQ ID NO: 6-7.

### **Упаковка вирусов**

[0043] Аспекты настоящего изобретения включают систему плазмид гAAV, клетки, используемые для упаковки гAAV, раскрытых в настоящей заявке, и способы упаковки гAAV, раскрытые в настоящей заявке. Используемые здесь термины «упаковка вируса» и «продуцирование вируса» являются синонимами. Специалистам в данной области известны различные способы получения гAAV. Термин «система упаковки» обычно включает: плазмиду, содержащую экспрессионный кластер, включающий полинуклеотид, кодирующий представляющую интерес молекулу; плазмиду, содержащую полинуклеотиды, кодирующие структурные и неструктурные белки AAV, и другие компоненты, которые способствуют продуцированию гAAV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, упаковывающая система содержит вирус-помощник. гAAV являются дефектными по репликации вирусами, то есть, у них отсутствует способность к самостоятельной репликации. Вирусы-помощники обеспечивают репликацию гAAV посредством компонентов, которые облегчают репликацию гAAV. Примеры вариантов вирусов-помощников включают, но не ограничиваются ими, аденовирус (Ad) и вирус простого герпеса (HSV). Так, например, плазмиды, содержащие полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес ген, гены AAV гер и AAV сар, могут быть трансфицированы в клетки, уже содержащие Ad. Затем клетки поддерживают для обеспечения продуцирования гAAV перед сбором гAAV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, упаковывающая система может содержать двухплазмидную упаковывающую систему AAV. Так, например, экспрессионный кластер может быть клонирован в одну плазмиду, а гены AAV гер, сар и гены вируса-помощника могут быть клонированы во вторую плазмиду. Используемый здесь термин «ген вируса-помощника» относится ко всем последовательностям ДНК вирусов-помощников, которые необходимы для продуцирования AAV. Плазмиды трансфицировали в клетки, подходящие для продуцирования гAAV. В альтернативных вариантах осуществления изобретения, упаковывающая система может содержать трехплазмидную упаковывающую систему AAV. Так, например, экспрессионный кластер может быть клонирован в первую плазмиду, гены гер и сар AAV могут быть клонированы во вторую плазмиду, а гены вируса-помощника могут быть клонированы в третью плазмиду. Три плазмиды трансфицируют в систему клеточной экспрессии для продуцирования гAAV. В других вариантах осуществления изобретения также рассматривается упаковывающая система, содержащая бакуловирус. Бакуловирусы представляют собой патогены, поражающие насекомых и других членистоногих. Так, например, гены экспрессионного кластера, AAV гер и AAV сар могут быть клонированы в бакуловирусные плазмиды. Эти плазмиды затем трансфицируют в клетки насекомых, такие как клетки Sf9, в которых продуцируется бакуловирус. Затем бакуловирус используют для заражения клеток насекомых, таких как клетки Sf9, в которых продуцируются гAAV. Система упаковки бакуловирусов обладает многими преимуществами, включая простоту масштабирования продуцирования и способность клеток насекомых расти в среде без сыворотки.

[0044] Аспекты настоящего изобретения включают клетку, содержащую упаковывающую плазмидную систему AAV, описанную в настоящей заявке. Как будет очевидно для специалиста в данной области, упаковывающая плазмидная система AAV может быть использована для трансфекции любой клеточной системы, подходящей для продуцирования гAAV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки включают клетки бактерий, клетки млекопитающих, клетки дрожжей или клетки насекомых. Клетки могут быть суспензионными клетками или прикрепленными клетками. Примеры подходящих клеток включают, но не ограничиваются ими, клетку *Escherichia coli*, клетку HEK293, клетку HEK293T, клетку HEK293A, клетку HEK293S, клетку HEK293FT, клетку HEK293F, клетку HEK293H, клетку HeLa, клетку SF9, клетку SF21, клетку SF900 и клетку ВНК.

[0045] Раскрытые здесь варианты также включают способ получения гAAV, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот способ может включать введение упаковывающей плазмидной системы в клетки, подходящие для продуцирования гAAV, культивирование клеток в подходящих условиях, сбор полученных гAAV и, необязательно, очистку гAAV. Способы очистки гAAV известны специалистам в данной области. Так, например, гAAV могут быть очищены с помощью хроматографии. Используемый здесь термин «хроматография» относится к любому из методов, известных специалистам в данной области, для селективного выделения одного или нескольких элементов из смеси. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию и эксклюзионную хроматографию, известную специалистам в данной области.

[0046] Аспекты настоящего изобретения также включают выделенную сконструированную клетку, содержащую раскрытый здесь гAAV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированная клетка представляет собой клетку млекопитающего. В одном из вариантов осуществления изобретения, сконструированная клетка представляет собой клетку человека.

#### **Композиции и лечение заболеваний**

[0047] Аспекты настоящего изобретения включают композиции, содержащие гAAV, раскрытые в настоящей заявке. Используемые здесь термины «композиция» и «препарат» являются синонимами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция представляет собой терапевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция, содержащая гAAV, может дополнительно содержать одно или несколько дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция, содержащая гAAV, может дополнительно содержать один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей и/или разбавителей. Хотя описание представленных здесь композиций относится в основном к композициям, подходящим для введения человеку, однако, специалисту в данной области должно быть понятно, что такие композиции обычно

подходят для введения любому другому животному. Составы согласно изобретению могут включать, но не ограничиваются ими, физиологический раствор, липосомы, липидные наночастицы, полимеры, пептиды, белки, клетки, инфицированные гAAV, и их комбинации.

[0048] Раскрытые здесь композиции могут быть приготовлены с применением любого способа, известного специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции согласно изобретению представляют собой водные составы (то есть, составы, содержащие воду). В некоторых вариантах осуществления изобретения, составы согласно изобретению содержат воду, дезинфицированную воду или воду для инъекций (WFI). В некоторых вариантах осуществления изобретения, гAAV могут быть приготовлены в PBS. В некоторых вариантах осуществления изобретения, составы гAAV могут содержать буферную систему. Примеры буферных систем включают, но не ограничиваются ими, буферы, содержащие фосфат, Трис и/или гистидин.

[0049] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, раскрытая здесь композиция может содержать один или несколько наполнителей и/или разбавителей. Как будет очевидно для специалистов в данной области, присутствие наполнителей и/или разбавителей может давать определенные преимущества, включая (1) повышенную стабильность; (2) усиление клеточной трансфекции или трансдукции; (3) замедленное или отсроченное высвобождение терапевтического средства, кодируемого трансгеном; (4) изменение биораспределения (например, нацеливание вируса на ткани или клетки определенных типов); (5) повышенную трансляцию белка, кодируемого трансгеном; (6) измененный профиль высвобождения белка, кодируемого трансгеном, и/или (7) регулируемую экспрессию трансгена согласно изобретению. Используемые здесь наполнители включают, но не ограничиваются ими, любые и/или все растворители, дисперсионные среды или другие жидкие носители, добавки для диспергирования или суспендирования, поверхностно-активные вещества, вещества, придающие изотоничность, загустители или эмульгаторы, консерванты и т.п., в зависимости от конкретной желаемой лекарственной формы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция может содержать поверхностно-активное вещество, включая анионные, цвиттерионные или неионные поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества могут стимулировать регуляцию силы сдвига в суспензионных культурах.

[0050] Аспекты настоящего изобретения также включают композиции, содержащие различные концентрации гAAV, которые могут быть оптимизированы в соответствии со свойствами состава и его применением. Так, например, концентрация частиц гAAV может составлять от приблизительно  $1 \times 10^6$  ВГ (векторных геномов)/мл до приблизительно  $1 \times 10^{18}$  ВГ/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения, препарат может содержать частицы гAAV в концентрации приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,



$9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  
 $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  
 $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $2,1 \times 10^{11}$ ,  $2,2 \times 10^{11}$ ,  $2,3 \times 10^{11}$ ,  $2,4 \times 10^{11}$ ,  $2,5 \times 10^{11}$ ,  
 $2,6 \times 10^{11}$ ,  $2,7 \times 10^{11}$ ,  $2,8 \times 10^{11}$ ,  $2,9 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $7,1 \times 10^{11}$ ,  
 $7,2 \times 10^{11}$ ,  $7,3 \times 10^{11}$ ,  $7,4 \times 10^{11}$ ,  $7,5 \times 10^{11}$ ,  $7,6 \times 10^{11}$ ,  $7,7 \times 10^{11}$ ,  $7,8 \times 10^{11}$ ,  $7,9 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  
 $1 \times 10^{12}$ ,  $1,1 \times 10^{12}$ ,  $1,2 \times 10^{12}$ ,  $1,3 \times 10^{12}$ ,  $1,4 \times 10^{12}$ ,  $1,5 \times 10^{12}$ ,  $1,6 \times 10^{12}$ ,  $1,7 \times 10^{12}$ ,  $1,8 \times 10^{12}$ ,  
 $1,9 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $2,1 \times 10^{12}$ ,  $2,2 \times 10^{12}$ ,  $2,3 \times 10^{12}$ ,  $2,4 \times 10^{12}$ ,  $2,5 \times 10^{12}$ ,  $2,6 \times 10^{12}$ ,  $2,7 \times 10^{12}$ ,  $2,8 \times 10^{12}$ ,  
 $2,9 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $4,1 \times 10^{12}$ ,  $4,2 \times 10^{12}$ ,  $4,3 \times 10^{12}$ ,  $4,4 \times 10^{12}$ ,  $4,5 \times 10^{12}$ ,  $4,6 \times 10^{12}$ ,  $4,7 \times 10^{12}$ ,  
 $4,8 \times 10^{12}$ ,  $4,9 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $7,1 \times 10^{12}$ ,  $7,2 \times 10^{12}$ ,  $7,3 \times 10^{12}$ ,  $7,4 \times 10^{12}$ ,  $7,5 \times 10^{12}$ ,  
 $7,6 \times 10^{12}$ ,  $7,7 \times 10^{12}$ ,  $7,8 \times 10^{12}$ ,  $7,9 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $8,1 \times 10^{12}$ ,  $8,2 \times 10^{12}$ ,  $8,3 \times 10^{12}$ ,  $8,4 \times 10^{12}$ ,  $8,5 \times 10^{12}$ ,  
 $8,6 \times 10^{12}$ ,  $8,7 \times 10^{12}$ ,  $8,8 \times 10^{12}$ ,  $8,9 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1,1 \times 10^{13}$ ,  $1,2 \times 10^{13}$ ,  $1,3 \times 10^{13}$ ,  $1,4 \times 10^{13}$ ,  
 $1,5 \times 10^{13}$ ,  $1,6 \times 10^{13}$ ,  $1,7 \times 10^{13}$ ,  $1,8 \times 10^{13}$ ,  $1,9 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $2,1 \times 10^{13}$ ,  $2,2 \times 10^{13}$ ,  $2,3 \times 10^{13}$ ,  $2,4 \times 10^{13}$ ,  
 $2,5 \times 10^{13}$ ,  $2,6 \times 10^{13}$ ,  $2,7 \times 10^{13}$ ,  $2,8 \times 10^{13}$ ,  $2,9 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $3,1 \times 10^{13}$ ,  $3,2 \times 10^{13}$ ,  $3,3 \times 10^{13}$ ,  $3,4 \times 10^{13}$ ,  
 $3,5 \times 10^{13}$ ,  $3,6 \times 10^{13}$ ,  $3,7 \times 10^{13}$ ,  $3,8 \times 10^{13}$ ,  $3,9 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $6,7 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  
 $8 \times 10^{13}$ ,  $9 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ ,  $9 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  
 $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$ ,  $9 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $2 \times 10^{16}$ ,  $3 \times 10^{16}$ ,  $4 \times 10^{16}$ ,  
 $5 \times 10^{16}$ ,  $6 \times 10^{16}$ ,  $7 \times 10^{16}$ ,  $8 \times 10^{16}$ ,  $9 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$ ,  $2 \times 10^{17}$ ,  $3 \times 10^{17}$ ,  $4 \times 10^{17}$ ,  $5 \times 10^{17}$ ,  $6 \times 10^{17}$ ,  $7 \times 10^{17}$ ,  
 $8 \times 10^{17}$ ,  $9 \times 10^{17}$  или  $1 \times 10^{18}$  ВГ/мл.

[0051] В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация гAAV в композиции может составлять от приблизительно  $1 \times 10^6$  ВГ/мл до приблизительно  $1 \times 10^{18}$  общего ВГ/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения, доставка может включать введние композиции в концентрации приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1,1 \times 10^{12}$ ,  $1,2 \times 10^{12}$ ,  $1,3 \times 10^{12}$ ,  $1,4 \times 10^{12}$ ,  $1,5 \times 10^{12}$ ,  $1,6 \times 10^{12}$ ,  $1,7 \times 10^{12}$ ,  $1,8 \times 10^{12}$ ,  $1,9 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $2,1 \times 10^{12}$ ,  $2,2 \times 10^{12}$ ,  $2,3 \times 10^{12}$ ,  $2,4 \times 10^{12}$ ,  $2,5 \times 10^{12}$ ,  $2,6 \times 10^{12}$ ,  $2,7 \times 10^{12}$ ,  $2,8 \times 10^{12}$ ,  $2,9 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $3,1 \times 10^{12}$ ,  $3,2 \times 10^{12}$ ,  $3,3 \times 10^{12}$ ,  $3,4 \times 10^{12}$ ,  $3,5 \times 10^{12}$ ,  $3,6 \times 10^{12}$ ,  $3,7 \times 10^{12}$ ,  $3,8 \times 10^{12}$ ,  $3,9 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $4,1 \times 10^{12}$ ,  $4,2 \times 10^{12}$ ,  $4,3 \times 10^{12}$ ,  $4,4 \times 10^{12}$ ,  $4,5 \times 10^{12}$ ,  $4,6 \times 10^{12}$ ,  $4,7 \times 10^{12}$ ,  $4,8 \times 10^{12}$ ,  $4,9 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $2,1 \times 10^{13}$ ,  $2,2 \times 10^{13}$ ,  $2,3 \times 10^{13}$ ,  $2,4 \times 10^{13}$ ,  $2,5 \times 10^{13}$ ,  $2,6 \times 10^{13}$ ,  $2,7 \times 10^{13}$ ,  $2,8 \times 10^{13}$ ,  $2,9 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $6,7 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ ,  $9 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ ,  $9 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$ ,  $9 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $2 \times 10^{16}$ ,  $3 \times 10^{16}$ ,  $4 \times 10^{16}$ ,  $5 \times 10^{16}$ ,  $6 \times 10^{16}$ ,  $7 \times 10^{16}$ ,  $8 \times 10^{16}$ ,  $9 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$ ,  $2 \times 10^{17}$ ,  $3 \times 10^{17}$ ,  $4 \times 10^{17}$ ,  $5 \times 10^{17}$ ,  $6 \times 10^{17}$ ,  $7 \times 10^{17}$ ,  $8 \times 10^{17}$ ,  $9 \times 10^{17}$  или  $1 \times 10^{18}$  общего ВГ/мл.

[0052] Другими аспектами, рассматриваемыми в настоящей заявке, являются общая доза гAAV в композиции, например, во флаконе с готовым продуктом для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция может содержать общую дозу гAAV от приблизительно  $1 \times 10^6$  ВГ до приблизительно  $1 \times 10^{18}$  ВГ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, препарат может содержать общую дозу гAAV приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $2,1 \times 10^{11}$ ,  $2,2 \times 10^{11}$ ,  $2,3 \times 10^{11}$ ,  $2,4 \times 10^{11}$ ,  $2,5 \times 10^{11}$ ,  $2,6 \times 10^{11}$ ,  $2,7 \times 10^{11}$ ,  $2,8 \times 10^{11}$ ,  $2,9 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $7,1 \times 10^{11}$ ,  $7,2 \times 10^{11}$ ,  $7,3 \times 10^{11}$ ,  $7,4 \times 10^{11}$ ,  $7,5 \times 10^{11}$ ,  $7,6 \times 10^{11}$ ,  $7,7 \times 10^{11}$ ,  $7,8 \times 10^{11}$ ,  $7,9 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1,1 \times 10^{12}$ ,  $1,2 \times 10^{12}$ ,  $1,3 \times 10^{12}$ ,  $1,4 \times 10^{12}$ ,  $1,5 \times 10^{12}$ ,  $1,6 \times 10^{12}$ ,  $1,7 \times 10^{12}$ ,  $1,8 \times 10^{12}$ ,  $1,9 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $2,1 \times 10^{12}$ ,  $2,2 \times 10^{12}$ ,  $2,3 \times 10^{12}$ ,  $2,4 \times 10^{12}$ ,  $2,5 \times 10^{12}$ ,  $2,6 \times 10^{12}$ ,  $2,7 \times 10^{12}$ ,  $2,8 \times 10^{12}$ ,  $2,9 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $4,1 \times 10^{12}$ ,  $4,2 \times 10^{12}$ ,  $4,3 \times 10^{12}$ ,  $4,4 \times 10^{12}$ ,  $4,5 \times 10^{12}$ ,  $4,6 \times 10^{12}$ ,  $4,7 \times 10^{12}$ ,  $4,8 \times 10^{12}$ ,  $4,9 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $7,1 \times 10^{12}$ ,  $7,2 \times 10^{12}$ ,  $7,3 \times 10^{12}$ ,  $7,4 \times 10^{12}$ ,  $7,5 \times 10^{12}$ ,  $7,6 \times 10^{12}$ ,  $7,7 \times 10^{12}$ ,  $7,8 \times 10^{12}$ ,  $7,9 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $8,1 \times 10^{12}$ ,  $8,2 \times 10^{12}$ ,  $8,3 \times 10^{12}$ ,  $8,4 \times 10^{12}$ ,  $8,5 \times 10^{12}$ ,  $8,6 \times 10^{12}$ ,  $8,7 \times 10^{12}$ ,  $8,8 \times 10^{12}$ ,  $8,9 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1,1 \times 10^{13}$ ,  $1,2 \times 10^{13}$ ,  $1,3 \times 10^{13}$ ,  $1,4 \times 10^{13}$ ,  $1,5 \times 10^{13}$ ,  $1,6 \times 10^{13}$ ,  $1,7 \times 10^{13}$ ,  $1,8 \times 10^{13}$ ,  $1,9 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $2,1 \times 10^{13}$ ,  $2,2 \times 10^{13}$ ,  $2,3 \times 10^{13}$ ,  $2,4 \times 10^{13}$ ,  $2,5 \times 10^{13}$ ,  $2,6 \times 10^{13}$ ,  $2,7 \times 10^{13}$ ,  $2,8 \times 10^{13}$ ,  $2,9 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $3,1 \times 10^{13}$ ,  $3,2 \times 10^{13}$ ,  $3,3 \times 10^{13}$ ,  $3,4 \times 10^{13}$ ,  $3,5 \times 10^{13}$ ,  $3,6 \times 10^{13}$ ,  $3,7 \times 10^{13}$ ,  $3,8 \times 10^{13}$ ,  $3,9 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $6,7 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ ,  $9 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ ,  $9 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$ ,  $9 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $2 \times 10^{16}$ ,  $3 \times 10^{16}$ ,  $4 \times 10^{16}$ ,  $5 \times 10^{16}$ ,  $6 \times 10^{16}$ ,  $7 \times 10^{16}$ ,  $8 \times 10^{16}$ ,  $9 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$ ,  $2 \times 10^{17}$ ,  $3 \times 10^{17}$ ,  $4 \times 10^{17}$ ,  $5 \times 10^{17}$ ,  $6 \times 10^{17}$ ,  $7 \times 10^{17}$ ,  $8 \times 10^{17}$ ,  $9 \times 10^{17}$  или  $1 \times 10^{18}$  ВГ.

[0053] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения рассматриваются способы лечения заболевания у пациента, нуждающегося в этом, где указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества гAAV или композиции, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы включают генотерапию. Используемый здесь термин «генотерапия» обычно относится к доставке терапевтических нуклеиновых кислот в клетки индивидуума для лечения заболевания. В других вариантах осуществления изобретения также рассматривается применение гAAV или композиции, раскрытых в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания у пациента. Используемый здесь термин «пациент» может относиться к индивидууму с заболеванием или другим патологическим состоянием. Пациентом может быть человек или любое другое животное. В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание представляет собой заболевание печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание печени представляет собой гепатит В или болезнь Фабри.

[0054] Так, например, гAAV согласно изобретению может содержать экспрессионный кластер, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую кшРНК, подходящую для лечения гепатита В, или GLA, подходящую для лечения болезни Фабри. В некоторых вариантах осуществления изобретения, введение гAAV, содержащего GLA, приводит к повышенному уровню экспрессии GLA в ткани по сравнению с соответствующим гAAV, содержащим капсидный белок AAV8. В других

вариантах осуществления изобретения, введение гAAV, содержащего кшРНК, подходящего для лечения гепатита В, приводит к повышенному ингибированию поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), е-антигена гепатита В (HBeAg) и/или ДНК HBV по сравнению с соответствующим гAAV, содержащим капсидный белок AAV8. Используемый здесь термин «соответствующий гAAV» относится к гAAV, который отличается от представляющего интерес гAAV только капсидным белком.

[0055] гAAV или композиции, раскрытые в настоящей заявке, могут быть введены любым способом, известным специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гAAV или композиция могут быть введены внутривенно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гAAV или композиция могут быть введены посредством инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гAAV или композиция могут быть введены путем парентеральной инъекции. Другие способы введения включают, но не ограничиваются ими, подкожную, внутривенную, внутривенную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию. В конкретном варианте осуществления изобретения, гAAV или композицию вводят посредством внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гAAV или композиция могут быть введены в виде однократной дозы. В альтернативных вариантах осуществления изобретения, гAAV или композиция могут быть введены в виде дробных доз.

[0056] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, способы лечения заболевания у пациента могут включать введение второго активного агента в дополнение к гAAV или композициям, раскрытым в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одновременно с ними может быть введен второй активный агент. В альтернативных вариантах осуществления изобретения, второй активный агент может быть введен последовательно. Так, например, способ лечения пациента с гепатитом В может включать введение ламивудина и/или энтекавира в дополнение к введению фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1: Конструирование плазмиды**

#### **Конструирование плазмид pSC-DC172-Gluc, pSC-DC190-Gluc и pSC-CMV-Gluc**

[0057] Три фрагмента последовательности, содержащие последовательность промотора DC172 (SEQ ID NO: 20), последовательность промотора DC190 (SEQ ID NO: 22), последовательность промотора CMV соответственно, каждый из которых фланкирован рестрикционными сайтами XhoI и NotI, были синтезированы и расщеплены рестриктирующими ферментами XhoI и NotI по отдельности. Последовательность люциферазы Gaussia (Gluc), которая фланкирована рестрикционными сайтами NotI и XbaI, была синтезирована и расщеплена рестриктирующими ферментами NotI и XbaI. Плазмиду pSC-CMV-EGFP (фиг. 1A) расщепляли рестриктирующими ферментами XhoI и XbaI и лигировали с расщепленными фрагментами DC172 и Gluc с получением плазмиды pSC-DC172-Gluc (фиг. 1B). Плазмиду pSC-CMV-EGFP (фиг. 1A) расщепляли

рестриктирующими ферментами XhoI и XbaI и лигировали с расщепленными фрагментами DC190 и Gluc с получением плазмиды pSC-DC190-Gluc (фиг. 1C). pSC-CMV-EGFP (фиг. 1A) расщепляли рестриктирующими ферментами XhoI и XbaI и лигировали с расщепленным фрагментом CMV и Gluc с получением плазмиды pSC-CMV-Gluc (фиг. 1D). Эти плазмиды использовали для получения аутокомплементарных AAV (scAAV).

Конструирование плазмид pSNAV2.0-DC172-GLA, pSNAV2.0-DC172-GLA-wpre, pSNAV2.0-LP1-GLA и pSNAV2.0-LP1-GLA-wpre

[0058] Три фрагмента последовательности, содержащие промотор LP1 (SEQ ID NO: 21) с фланкирующими рестрикционными сайтами XhoI и NotI, альфа-галактозидазу (GLA, GeneBank NM\_000169.2) с фланкирующими рестрикционными сайтами NotI и SalI и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE/wpre, SEQ ID NO: 8) с фланкирующими рестрикционными сайтами SalI, соответственно, синтезировали с последующим расщеплением соответствующими рестриктирующими ферментами. pSNAV2.0-EGFP (фиг. 1E) расщепляли XhoI и SalI и лигировали с фрагментами DC172, расщепленными XhoI и NotI, и фрагментами GLA, расщепленными NotI и SalI, с получением плазмиды pSNAV2.0-DC172-GLA (фиг. 1F). pSNAV2.0-DC172-GLA расщепляли SalI и лигировали с расщепленным фрагментом WPRE с получением плазмиды pSNAV2.0-DC172-GLA-wpre (фиг. 1G). pSNAV2.0-EGFP расщепляли XhoI и SalI и лигировали с фрагментами LP1, расщепленными XhoI и NotI, и фрагментами GLA, расщепленными NotI и SalI, с получением плазмиды pSNAV2.0-LP1-GLA (фиг. 1H). pSNAV2.0-LP1-GLA расщепляли SalI и лигировали с расщепленным фрагментом WPRE с получением плазмиды pSNAV2.0-LP1-GLA-wpre (фиг. 1I). Эти плазмиды использовали для получения одноцепочечных AAV (ssAAV).

Конструирование плазмиды pSC-H1-кшPHK-интрон 2

[0059] pSC-CMV-EGFP, челночный вектор для продуцирования аутокомплементарных AAV, был сконструирован так, чтобы он сохранял ITR от AAV2. Этот вектор расщепляли рестриктирующими ферментами BglII и XhoI и лигировали с последовательностями ДНК, содержащими промотор H1 (SEQ ID NO: 9) и полинуклеотидную последовательность, кодирующую кшPHK, нацеленную на HBV (SEQ ID NO: 3), расщепленную рестриктирующими ферментами BglII и XhoI, для замены фрагмента CMV-EGFP в векторе с получением новой плазмиды pSC-H1-кшPHK (фиг. 2A). Интрон 2, происходящий от HPRT-интрона (положения 1846-3487 GenBank: M26434.1), был синтезирован, расщеплен рестриктирующими ферментами BglII и HindIII и встроен в вектор pSC-H1-кшPHK, расщепленный рестриктирующими ферментами BglII и HindIII, с получением плазмиды pSC-H1-кшPHK-интрон 2 (фиг. 2B).

**Пример 2: Продуцирование вируса и оценка титра вируса**

[0060] Рекомбинантные AAV, используемые в экспериментах, продуцировали в клетках HEK293 (полученных из ATCC) с помощью известной трехплазмидной системы упаковки с применением стандартных методов (Xiao et al., Production of high-titer

recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J. Virol. 72(3): 2224 (1998)). Подходящие количества образцов очищенного вируса добавляли в реакционный раствор для расщепления, описанный в Таблице 1, инкубировали 30 минут при 37°C и дополнительно инкубировали 10 минут при 75°C для дезактивации ДНКазы I. Расщепленный AAV разводили и анализировали с помощью количественной ПЦР, как показано в Таблице 2.

**Таблица 1:** Расщепление образца AAV ДНКазой I

Образец AAV	5 мкл
10×буфер ДНКазы I	5 мкл
ДНКазы I	1 мкл
Вода без РНКазы	39 мкл
Всего	50 мкл

**Таблица 2:** Протокол кол.ПЦР

Реакционная смесь		Протокол кол.ПЦР	
Образец	5 мкл	50°C, 2 мин.	1 цикл
Прямой праймер (10 мкМ)	0,5 мкл	95°C, 10 мин.	
Обратный праймер (10 мкМ)	0,5 мкл	95°C, 15 сек.	40 циклов
Праймер для зонда (10 мкМ)	0,5 мкл	60°C, 30 сек.	
ПЦР-смесь Taqman (2 × )	10 мкл	37°C, 1 сек.	1 цикл
ddH <sub>2</sub> O	3,5 мкл		

[0061] Праймеры, используемые в кол.ПЦР, показаны в Таблице 3. Титры вируса, оцененные с помощью количественной ПЦР, показаны в Таблице 4.

**Таблица 3:** Праймеры, используемые для кол.ПЦР

Прямой праймер Gluc	CGAGAACAACGAAGACTTCAACA (SEQ ID NO: 11)
Обратный праймер Gluc	CGCGGTCAGCATCGAGAT (SEQ ID NO: 12)
Праймер для зонда Gluc	CCGTGGCCAGCAACTTCGCG (SEQ ID NO: 13)
Прямой праймер GLA	CTGCCAGGAAGAGCCAGATT (SEQ ID NO: 14)
Обратный праймер GLA	GTA CTCATAACCTGCATCCTTCCA (SEQ ID NO: 15)
Праймер для зонда GLA	TGCATCAGTGAGAAGC (SEQ ID NO: 16)
Прямой праймер H1	ATCAACCCGCTCCAAGGAAT (SEQ ID NO: 17)
Обратный праймер H1	AACACATAGCGACATGCAAATATTG (SEQ ID NO: 18)
Праймер для зонда H1	CCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCC (SEQ ID NO: 19)

**Таблица 4:** Титры вируса, оцененные с помощью кол.ПЦР

Плазмида	Вирусный вектор	Титр (ВГ/мл)
pSC-DC172-Gluc	scAAV2/X-DC172-Gluc	1,98E+10
pSC-DC190-Gluc	scAAV2/X-DC190-Gluc	5,71E+10
pSC-CMV-Gluc	scAAV2/X-CMV-Gluc	2,72E+10
pSNAV2.0-DC172-GLA	ssAAV2/X-DC172-GLA	1,82E+11
pSNAV2.0-DC172-GLA-wpre	ssAAV2/X-DC172-GLA-WPRE	2,1E+11
pSNAV2.0-LP1-GLA	ssAAV2/X-LP1-GLA	1,57E+11
	ssAAV2/8-LP1-GLA	2,61E+11
pSNAV2.0-LP1-GLA-wpre	ssAAV2/X-LP1-GLA-WPRE	1,6E+11
pSC-H1-кшРНК-интрон 2	scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2	5,50E+12
	scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2	1,12E+12
pSC-CMV-EGFP	scAAV2/8-CMV-EGFP	3,15E+11
	scAAV2/X-CMV-EGFP	2,87E+11
	scAAV2/3B-CMV-EGFP	1,15E+12
	scAAV2/7-CMV-EGFP	5,64E+12
	scAAV2/9-CMV-EGFP	3,87E+12
	scAAV2/2-CMV-EGFP	6,87E+11

### **Пример 3: Выбор вектора AAV**

#### 3.1 Сравнение тропизма AAV2/8, AAV2/3B, AAV2/7 и AAV2/9 для различных клеточных линий печени in vitro

[0062] Шесть различных линий клеток печени (HepG2, Huh-7, 7402, 7721, Huh-6 и L-02) инфицировали scAAV2/8-CMV-EGFP, scAAV2/3B-CMV-EGFP, scAAV2/7-CMV-EGFP или scAAV2/9-CMV-EGFP соответственно, и эффективность заражения анализировали и сравнивали с помощью проточной цитометрии. Как показано на фиг. 3А-фиг. 3F, при различных MOI, AAV2/3B давал такую же эффективность инфицирования HepG2, как и AAV2/8. При различных MOI, AAV2/3B давал более высокую эффективность инфицирования клеточных линий Huh-7, чем AAV2/8. Для оставшихся четырех клеточных линий при различных MOI, эффективность инфицирования вирусом AAV2/8 была выше, чем для вируса AAV2/3B.

#### 3.2 Сравнение тропизма AAV2/8 и AAV2/X для различных клеточных линий печени in vitro

[0063] Согласно экспериментам Примера 3.1, AAV2/8 обладал наибольшим тропизмом к клеткам печени. AAVX представляет собой рекомбинантный AAV с капсидом, полученным с применением технологии перестановки ДНК. Затем сравнивали тропизм AAV2/8 и AAV2/X к клеткам печени. Пять линий клеток печени (Huh-6, 7402, Huh-7, HepG2 и 7721) инфицировали scAAV2/8-CMV-EGFP или scAAV2/X-CMV-EGFP, соответственно, и эффективность инфицирования анализировали и сравнивали с помощью

проточной цитометрии. Такое сравнение включает сравнение различий MOI, необходимых для двух различных AAV для достижения одинаковой эффективности инфицирования в одной и той же клеточной линии.

[0064] В нескольких линиях клеток печени, эффективность инфицирования конструкцией scAAV2/X-CMV-EGFP была значительно выше, чем конструкцией scAAV2/8-CMV-EGFP. Для достижения такой же эффективности инфицирования в клетках Huh-6, необходимо, чтобы MOI AAV2/8-CMV-EGFP была приблизительно в три раза больше, чем для AAV2/X-CMV-EGFP. Для достижения такой же эффективности инфицирования в клетках 7402, необходимо, чтобы MOI AAV2/8-CMV-EGFP была приблизительно в 10 раз больше, чем для AAV2/X-CMV-EGFP. Для достижения такой же эффективности инфицирования в клетках Huh-7, необходимо, чтобы MOI AAV2/8-CMV-EGFP была приблизительно в 100-300 раз больше, чем для AAV2/X-CMV-EGFP. Для достижения такой же эффективности инфицирования в клетках HepG2, необходимо, чтобы MOI AAV2/8-CMV-EGFP была приблизительно в 30-100 раз больше, чем для AAV2/X-CMV-EGFP. Для достижения такой же эффективности инфицирования в клетках 7721, необходимо, чтобы MOI AAV2/8-CMV-EGFP была приблизительно в 30-100 раз больше, чем для AAV2/X-CMV-EGFP. Результаты показаны на фиг. 4A-4J. Эти результаты постоянно демонстрировали значительно более высокую эффективность инфицирования вирусом AAV2/X по сравнению с вирусом AAV2/8 и продемонстрировали более высокий тропизм AAV2/X по сравнению с AAV2/8 в различных клеточных линиях печени.

### 3.3 Сравнение тропизма AAV2/8 и AAV2/X к первичным клеткам печени человека

[0065] Тропизм AAV2/8 и AAV2/X к первичным клеткам печени, полученным от пациентов с человеческим HBV, дополнительно оценивали с помощью анализов на инфицирование. Были выделены первичные клетки печени у пяти пациентов с раком печени (HCC307N1, HCC061A2, HCC213F1, HCC893D1, HCC554A4, как показано в Таблице 5). Затем клетки культивировали и инфицировали scAAV2/8-CMV-EGFP или scAAV2/X-CMV-EGFP. MOI 5000, 15000, 50000, 150000 или 500000 scAAV2/8-CMV-EGFP или scAAV2/X-CMV-EGFP использовали для клеток HCC307N1; MOI 5000, 15000, 50000, 150000 или 500000 AAV2/8-CMV-EGFP использовали для клеток HCC061A2, MOI 500, 1500, 5000, 15000 или 50000 AAV2/X-CMV-EGFP использовали для клеток HCC061A2; а MOI 500, 1500, 5000, 15000, 50000, 150000 или 500000 для AAV2/8-CMV-EGFP или AAV2/X-CMV-EGFP использовали для трех остальных клеточных линий. Через сорок восемь часов после инфицирования, изображения инфицированных клеток детектировали с помощью флуоресцентного микроскопа, а процентное содержание GFP-позитивных клеток и интенсивность флуоресценции определяли с помощью проточной цитометрии.

[0066] На фиг. 5A-5J показано, что при одних и тех же условиях MOI, заражение scAAV2/X-CMV-EGFP приводило к более высокому проценту GFP-позитивных клеток и к большей интенсивности флуоресценции GFP по сравнению с заражением конструкцией scAAV2/8-CMV-EGFP. Эти результаты, полученные для первичных клеток печени и

согласующиеся с экспериментами с использованием линий клеток печени, показали, что AAV2/X обладает более высоким тропизмом к клеткам печени по сравнению с тропизмом AAV2/8 в первичных клетках печени.

**Таблица 5** : Клинические параметры обследуемых пациентов

ID пациента	Клинические параметры пациента							Интергация HBV в геноме
	Пол	Возраст	Показан ия	Стадия	Наличие HBsAg	Наличие HBeAg	Концентрация ДНК HBV	
HCC307 N1	муж	34	HCC*	I	+	-	2850	+
HCC061 A2	муж	56	HCC	I	+	+	168000	+
HCC213 F1	муж	40	HCC	IVa	+	+	2510000	+
HCC893 D1	муж	47	HCC	II	+	+	Ниже предела детектирования	+
HCC554 A4	муж	51	HCC	II	+	-	1340	+

\* означает гепатоцеллюлярную карциному.

### 3.4 Сравнение тропизма AAV2/8 и AAV2/X у макак *in vivo*

[0067] Шесть макак (три самца и три самки) были разделены на две группы, каждая из которых содержала по три животных. scAAV2/8-CMV-EGFP однократно вводили одной группе животных путем внутривенной инъекции в дозе  $1E+12$  ВГ/кг, а scAAV2/X-CMV-EGFP однократно вводили другой группе животных путем внутривенной инъекции в дозе  $1E+12$  ВГ/кг. Животных подвергали эвтаназии через семь дней после введения, и ткани сердца, легкого, печени, головного мозга, яичек, яичника, двуглавой мышцы бедра, желудка, тощей кишки, почки и селезенки собирали и анализировали на экспрессию GFP с помощью флуоресцентной микроскопии.

[0068] Экспрессия GFP была хорошо видна в тканях печени тестируемых животных. Результаты представлены на фиг. 6А-6N и 7А-7N и в Таблице 6. Количество GFP-позитивных клеток, оцененных в поле зрения микроскопа, для тканей печени трех животных, которым вводили scAAV2/8-CMV-EGFP, составило  $15,00 \pm 4,47$ ,  $8,20 \pm 2,39$  и  $8,00 \pm 5,83$ , соответственно. Количество GFP-позитивных клеток, оцененных в поле зрения микроскопа, для тканей печени трех животных, которым вводили scAAV2/X-CMV-EGFP, составило  $123,40 \pm 8,02$ ,  $79,80 \pm 23,06$  и  $54,40 \pm 28,01$ , соответственно. Уровни



экспрессии GFP в различных тканях печени одного и того же животного существенно не отличались. Эти результаты показали, что количество GFP-позитивных клеток у макак, которым вводили scAAV2/X-CMV-EGFP, было статистически значимо выше, чем у макак, которым вводили scAAV2/8-CMV-EGFP. Результаты экспериментов, описанных выше, *in vitro* и *in vivo* полностью продемонстрировали, что AAV2/X обладает более высоким тропизмом к печени по сравнению с AAV2/8 как *in vitro*, так и *in vivo*.

**Таблица 6:** Флуоресцентная микроскопия для оценки экспрессии GFP

Группа	ID животного	Печень					Среднее	SD
		1	2	3	4	5		
scAAV2/8- CMV- EGFP	1~1	21	13	9	17	15	15,00	4,47
	1~2	12	9	6	7	7	8,20	2,39
	1~3	18	8	6	4	4	8,00	5,83
scAAV2/X -CMV -EGFP	2~1	113	131	126	130	117	123,40	8,02
	2~2	63	83	100	50	103	79,80	23,06
	2~3	98	61	29	53	31	54,40	28,01

**Пример 4: Сравнение уровней нейтрализующих антител (Nab) против различных серотипов AAV в сыворотке**

4.1 Сравнение уровней Nab против AAV2/8, AAV2/3B и AAV2/2 в сыворотке человека

[0069] В этом эксперименте применяли метод, в котором использовали фиксированную множественность заражения вирусом и серийно разведенную сыворотку. MOI вирусом составляла 10000. Серийно разведенные сыворотку и вирус смешивали в соотношении 1:1 и инкубировали при 37°C в течение одного часа. Клетки HepG2 культивировали в 24-луночных планшетах в течение 24 часов, а затем инфицировали аденовирусом Ad5. Через два часа, вирус-содержащую среду удаляли и клетки промывали DPBS. Затем к клеткам добавляли разведенную смесь сыворотки и вируса или только вирус (с такой же MOI) и инкубировали в течение 48 часов. После инкубирования, клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Уровни Nab вычисляли путем взятия обратной величины разведения сыворотки, выбранной из серийных разведений, которые достигали эффективности инфицирования клеток, равной 50% от эффективности инфицирования клеток, достигаемой с помощью rAAV без сыворотки (Lochrie MA et al. (2006) *Virology* 353: 68-82; Mori S et al. (2006) *Jpn J Infect Dis* 59: 285-293).

[0070] Результаты представлены в Таблице 7. В Таблице 7 показаны результаты для Nab, выделенного из человеческой сыворотки. Среди сывороток, взятых у 13 человек, уровни Nab против AAV2/8 были самыми низкими. Уровни Nab против AAV2/3B были приблизительно в 10 раз выше, чем уровни Nab против AAV2/8. В 11 образцах, уровни Nab против AAV2/2 были такими же как уровни Nab против AAV2/3B или ниже. В двух образцах, уровни Nab против AAV2/2 превышали уровни Nab против AAV2/3B.

Результаты показали, что уровни Nab против AAV2/8 были существенно ниже (более чем в 10 раз ниже, чем для AAV2/3B). Эти результаты продемонстрировали, что AAV2/8 превосходит AAV2/3B в качестве вектора для генотерапии, а AAV2/8 является менее иммуногенным для человека по сравнению с другими серотипами AAV, такими как AAV2/3B или AAV2/2.

**Таблица 7:** Nab в сыворотке индивидуумов

Образцы	AAV2/2	AAV2/3B	AAV2/8
№1	40-80	80-160	<8
№2	>160	>160	8-16
№3	40-80	80	8-16
№4	10-20	20-40	<2
№5	>160	80-160	8-16
№6	<10	10-20	<2
№7	20-40	80-160	4-8
№8	>160	>160	32
№9	10-20	40-80	4-8
№10	40-80	40-80	4-8
№11	80-160	80-160	8-16
№12	40-80	40-80	2-4
№13	>160	40-80	2-4

#### 4.2 Сравнение уровней Nab против AAV2/8 и AAV2/X в сыворотке макака

[0071] Сыворотку 12 макака использовали для определения уровней Nab против AAV2/X и AAV2/8 в соответствии с протоколом, описанным выше. MOI вирусом составляла 2000. Серийно разведенную сыворотку макака и scAAV2/X-CMV-EGFP или scAAV2/8-CMV-EGFP смешивали в соотношении 1:1 и инкубировали при 37°C в течение одного часа. Линию клеток 7402 культивировали в 24-луночных планшетах. Затем к клеткам добавляли разведенную смесь сыворотки макака и вируса или только вирус (с той же множественностью заражения) и инкубировали в течение 48 часов. После инкубирования, клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии.

[0072] Образцы сыворотки разводили в 4 серии с диапазоном разведения от 5 до 100 раз. Количество Nab ниже 5 считается отрицательным. Двенадцать образцов были пронумерованы отдельно от 1# до 12#. Результаты представлены в Таблице 8. Образцы 1#, 2# и 4# не показали Nabs против любого из серотипов AAV. Образец 7# демонстрировал относительно низкие уровни Nab против обоих серотипов. Образцы 3# и 12# показали более высокие уровни Nab против scAAV2/8 и отрицательный результат на Nab против scAAV2/X. Образцы 5#, 6#, 8#, 9#, 10# и 11# продемонстрировали значительно более низкие уровни Nab против scAAV2/X по сравнению с Nab против scAAV2/8. Эти

результаты показали, что уровни Nab против AAV2/X были ниже, чем уровни Nab против AAV2/8 у макака. Эти результаты продемонстрировали, что AAV2/X обладает более низкой иммуногенностью и может быть использован в качестве превосходных векторов для доставки генов.

**Таблица 8:** Уровни Nab против AAV2/X и AAV2/8 в сыворотке макака

Образец №	Nab против AAV2/X	Nab против AAV2/8
1#	<5	<5
2#	<5	<5
3#	≤5	>100
4#	<5	<5
5#	10-50	>100
6#	10-50	>100
7#	10	10
8#	10-50	>100
9#	50-100	>100
10#	50-100	>100
11#	50-100	>100
12#	<5	10-50

#### 4.3 Сравнение уровней Nab против AAV2/8 и AAV2/X в сыворотке человека

[0073] В этих экспериментах, уровни Nab против AAV2/8 и AAV2/X в сыворотке здоровых людей исследовали и сравнивали после инфицирования клеток гAAV с фиксированной множественностью заражения. Уровни Nab вычисляли путем взятия обратной величины фактора разведения сыворотки, выбранной из серийных разведений, которые достигали эффективности инфицирования клеток, равной 50% от эффективности инфицирования клеток, достигаемой с помощью гAAV без сыворотки. Сыворотку от 20 человек последовательно разводили и анализировали на наличие Nab против AAV2/X и AAV2/8 в соответствии с протоколом, описанным выше. Линию клеток 7402 культивировали в 24-луночных планшетах. Образцы сыворотки человека серийно разводили. scAAV2/8-CMV-EGFP или scAAV2/X-CMV-EGFP с MOI 2000 добавляли к серийно разведенной сыворотке в соотношении 1:1 и инкубировали при 37°C в течение часа. Затем смесь scAAV2/8-CMV-EGFP или scAAV2/X-CMV-EGFP с MOI 2000 добавляли к культивируемым клеткам и инкубировали в течение 48 часов, после чего клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии.

[0074] Результаты показаны на фиг. 8 и в Таблице 9. Результаты показали, что в девяти образцах сыворотки (2#, 5#, 6#, 7#, 9#, 15#, 16#, 17#, 20#) наблюдались более высокие уровни Nab против AAV2/8 по сравнению с Nab против AAV2/X. В четырех образцах сыворотки (4#, 13#, 14#, 18#) наблюдались более высокие уровни Nab против AAV2/X по сравнению с Nab против AAV2/8. В трех образцах (1#, 3#, 8#), уровни Nab

против AAV2/8 были аналогичны уровням Nab против AAV2/X. Четыре образца сыворотки (10#, 11#, 12#, 19#) были отрицательными как для Nab против AAV2/X, так и для Nab против AAV2/8. В этих экспериментах по заражению *in vitro* сравнивали количество Nabs против AAV2/8 и AAV2/X у человека из 20 произвольно выбранных образцов, и результаты были представлены как репрезентативные для еще большей группы.

[0075] Эти результаты подтверждают, что AAV2/X обладает повышенным тропизмом к клеткам печени и более низкой иммуногенностью у человека по сравнению с AAV2/8, что делает его более подходящим для использования в целях доставки терапевтического средства.

**Таблица 9:** Уровни Nab против AAV2/X и AAV2/8 в сыворотке человека

Образец	Nab против AAV2/X	Nab против AAV2/8
1#	300-400	300-400
2#	200-300	400
3#	50	40-50
4#	>30	20-30
5#	100-200	400
6#	200	400
7#	40-80	200
8#	20-40	20-40
9#	50-100	100-150
10#	<5	<5
11#	<5	<5
12#	<5	<5
13#	20-30	10-20
14#	5-10	<5
15#	200-300	>400
16#	20-40	>40
17#	<50	100-200
18#	300-400	50
19#	<5	<5
20#	200-300	>400

### **Пример 5: Фармакологические эксперименты**

#### **Пример 5.1: AAV2/X для лечения болезни Фабри**

##### Выбор промотора

[0076] 129 нормальных мышей разделяли на четыре группы по три животных в

каждой группе, включая три группы введения и одну группу негативного контроля. Животным в каждой группе введения внутривенно вводили дозу  $3E+10$  ВГ/животное scAAV2/X-CMV-Gluc, scAAV2/X-DC172-Gluc или scAAV2/X-DC190-Gluc, соответственно (фиг. 9А). Группе негативного контроля вводили PBS. Пробы крови брали с помощью зажима для хвоста через одну, две, три и четыре недели после введения и анализировали на экспрессию Gluc в соответствии с инструкциями производителя (например, с использованием набора для анализа на люциферазу Gaussia от GaiNing BioPharmaceuticals).

[0077] Результаты указывали на отсутствие экспрессии Gluc у контрольных животных с PBS. Каждая экспериментальный результат показал, что гAAV, содержащий промотор DC172, давал самый высокий уровень экспрессии Gluc после заражения нормальных мышей, а за ним следует гAAV, содержащий промотор DC190 или промотор CMV (фиг. 10А).

[0078] Затем промотор DC172 использовали для конструирования pSNAV2.0-DC172-GLA, а промотор LP1 использовали для конструирования pSNAV2.0-LP1-GLA (фиг. 9В), а затем получали рекомбинантный ssAAV2/X-DC172-GLA или ssAAV2/X-LP1-GLA. Рекомбинантный ssAAV2/X-DC172-GLA, ssAAV2/X-LP1-GLA или PBS вводили трем группам нормальных мышей, соответственно, согласно протоколу, описанному выше. Тестируемая доза составляла  $1E+15$  ВГ/животное. Кровь брали с помощью зажима для хвоста через две, три, четыре, пять, шесть, семь и восемь недель после инъекции и анализировали на активность GLA методом флуоресценции субстрата. В частности, 10 мкл сыворотки каждой пробы крови добавляли в 96-луночные флуоресцентные планшеты, после чего добавляли 40 мкл субстрата (5 mM 4-метилумбеллиферон- $\alpha$ -D-галактозида (ACROS, 337162500) и 100 mM N-ацетил-D-галактозамина (Sigma, A2795) и тщательно перемешивали. Смесь инкубировали в темноте при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение часа и добавляли 0,3 M глицина-NaOH для прекращения реакции. 4-MU (Sigma, M1381) с различными молярными концентрациями использовали в качестве стандарта для расчета уровня экспрессии по степени флуоресценции. Результаты показали, что уровень экспрессии GLA, индуцируемой гAAV, содержащим промотор LP1, был выше, чем уровень экспрессии, индуцируемой гAAV, содержащим промотор DC172, у нормальных мышей в каждый момент времени. Результаты показаны на фиг. 10В. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что промотор LP1 был выбран в качестве промотора, используемого на следующей стадии тестирования.

Анализ на экспрессию генов с использованием посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка

[0079] Было исследовано влияние элементов регуляции экспрессии, таких как WPRE. ssAAV2/X-DC172-GLA, ssAAV2/X-DC172-GLA-wpre, ssAAV2/X-LP1-GLA или ssAAV2/X-LP1-GLA-wpre (фиг. 11) вводили четырем группам нормальных мышей, соответственно. В каждой экспериментальной группе имелось по три животных, которым вводили тестируемые векторы гAAV в дозе  $3E+10$  ВГ/животное путем инъекции в

хвостовую вену. Другой группе из трех мышей вводили PBS в качестве негативного контроля. Через одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь и восемь недель после введения, у мышей брали кровь с помощью зажима для хвоста и оценивали активность GLA.

[0080] Результаты показали, что добавление WPRE к ssAAV2/X-DC172-GLA и ssAAV2/X-LP1-GLA повышает уровень экспрессии экзогенного гена в обоих случаях. Уровни экспрессии GLA под действием ssAAV2/X-DC172-GLA-wpre или ssAAV2/X-LP1-GLA-wpre только в 1,5-2 превышает уровень экспрессии, достигаемой с использованием вирусных векторов без WPRE. Эти результаты были показаны на фиг.12А - фиг.12В.

Оценка ферментативной активности в различных тканях мышей, инфицированных AAV2/X-LP1-GLA и AAV2/8-LP1-GLA

[0081] Была протестирована взаимосвязь между различными вводимыми гAAV и уровнями экспрессии GLA. Мышей с моделью дефицита GLA (Ohshima T. et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2540-2544) разделяли на две группы введения, которым вводили 1E+10 ВГ/животное ssAAV2/X-LP1-GLA или ssAAV2/8-LP1-GLA. Каждая группа содержала шесть животных, включая трех мышей-самцов и трех мышей-самок. В этих экспериментах использовали две группы контрольных животных, включая мышей дикого типа и мышей с моделью пустого вируса (Gla/-). Животных умерщвляли через семь дней после инъекции в хвостовую вену, и сыворотку, ткани печени, ткани сердца и ткани почек собирали с применением известных методов, гомогенизировали и центрифугировали в течение 30 минут при 4°C. Супернатант собирали и снова центрифугировали в течение 10 минут при 4°C. После последнего раунда центрифугирования собирали супернатант и оценивали концентрацию белка с помощью анализа с использованием ВСА. Активность GLA также оценивали методом флуоресценции субстрата.

[0082] Результаты показали, что ферментативная активность GLA в сыворотке, и в тканях печени, почек и сердца животных с моделью, инфицированной ssAAV2/X-LP1-GLA или ssAAV2/8-LP1-GLA, была выше, чем активность фермента GLA в этих тканях контрольных мышей дикого типа. Кроме того, ферментативная активность GLA во всех протестированных тканях животного-модели, инфицированного ssAAV2/X-LP1-GLA, была выше, чем активность GLA во всех протестированных тканях животного-модели, инфицированного ssAAV2/8-LP1-GLA. После системного введения гAAV, ферментативная активность GLA в сыворотке и в ткани печени была значительно выше, чем активность GLA в сердце и почках. Таким образом, хотя относительно низкие дозы гAAV достигали почек и сердца посредством кровообращения, однако, ферментативная активность GLA была все же выше, чем у животных дикого типа. Эти результаты продемонстрировали, что ssAAV2/X-LP1-GLA обеспечивает превосходные фармакологические эффекты по сравнению с ssAAV2/8-LP1-GLA. Результаты показаны на фиг. 13А - 13D.

Анализ влияния титра вируса AAV2/X на активность GLA в различных тканях

[0083] Была протестирована взаимосвязь между дозами вводимого гAAV и

ферментативной активностью GLA. Мышей с моделью дефицита GLA разделяли на три группы, которым вводили различные дозы ssAAV2/X-LP1-GLA, включая  $5E+11$  ВГ/кг,  $1,5E+11$  ВГ/кг и  $5E+10$  ВГ/кг (приблизительно 20 г/мышь). Каждая группа содержала шесть животных, включая трех мышей-самцов и трех мышей-самок. В этих экспериментах использовали две группы контрольных животных, которые включали мышей дикого типа и мышей с моделью пустого вируса (Gla<sup>-/-</sup>). Животных умерщвляли через семь дней после инъекции в хвостовую вену, и сыворотку, ткани печени, ткани сердца и ткани почек собирали с применением известных методов. Ткани гомогенизировали как описано выше и оценивали концентрацию белка с помощью анализа с использованием ВСА. Активность GLA в сыворотке и в тканях оценивали методом флуоресценции субстрата.

[0084] Результаты показали, что в сыворотке, более высокие вирусные титры давали прогрессивно более высокую ферментативную активность GLA, при этом, даже самый низкий титр (то есть,  $5E+10$  ВГ/кг) давал более высокие уровни ферментативной активности GLA, чем у контрольных животных дикого типа. В печени, ферментативная активность GLA также увеличивалась с более высокими титрами вируса, при этом, самый низкий титр (то есть,  $5E+10$  ВГ/кг) давал сопоставимые уровни ферментативной активности GLA наряду с контрольными животными дикого типа. В почках, самые низкие и средние вирусные титры давали очень низкий уровень ферментативной активности GLA, но самый высокий титр (то есть,  $5E+11$  ВГ/кг) давал более высокий уровень ферментативной активности GLA по сравнению с контрольными животными дикого типа. В сердце, уровень ферментативной активности GLA повышался с увеличением титра вируса, при этом, средний титр вируса составлял  $1,5E+11$  ВГ/кг, что давало активность фермента, сравнимую с активностью у контрольных животных дикого типа. Результаты показали, что если доза вируса ниже  $1,5E+11$  ВГ/кг, то количество вирусов, достигающих почек при системном введении, является относительно низким, а поэтому уровень ферментативной активности экспрессии GLA в почках при введении такой дозы был ниже, чем уровень экспрессии у мышей дикого типа. Результаты показаны на фиг. 14A - фиг. 14D.

[0085] Поражение почек является отличительным признаком болезни Фабри и в основном вызывается накоплением глоботриаозилцерамида (Gb3). Электронную микроскопию использовали для визуализации ультраструктуры почечной паренхимы мышей. У необработанных мышей с моделью болезни Фабри, подоциты формировали слияние отростков лап и аккумуляцию Gb3, фильтрационные щели образовывали мультивезикулярные тельца и впоследствии разлагались, а щелевые диафрагмы образовывали комплекс. Эти изменения потенциально могут перерасти в протеинурию и гломерулосклероз. Было замечено, что накопление липидов уменьшалось во всей почечной паренхиме, что возвращало почечную структуру в нормальное состояние (данные не представлены) у мышей-моделей при введении ssAAV2/X-LP1-GLA в значительно высокой дозе (то есть,  $5E+11$  ВГ/кг). Ультраструктура почек обработанных мышей-

моделей показала уменьшенное количество лизосом, уменьшенный размер лизосом или меньшую плотность лизосомы, что указывает на то, что уровень дозы  $5E+11$  ВГ/кг rAAV может уменьшать накопление Gb3 и предотвращать накопление Gb3 в будущем у мышей-моделей.

**Пример 5.2: AAV2/X для лечения гепатита В**

Анализ *in vitro* на подавление ДНК HBV HBeAg, HBsAg и HBV с помощью scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2 или scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2

[0086] scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2 и scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2 использовали для инфицирования клеток HepG2.2.15 с повышенной множественностью заражения (MOI). Уровни HBV HBeAg, HBV HBsAg и ДНК HBV в образцах оценивали с помощью диагностического набора для HBV HBeAg (Beijing Wantai Biopharmaceuticals Ltd. Co.), диагностического набора для HBV HBsAg (Beijing Wantai Biopharmaceuticals Ltd. Co.) и набора для количественного определения нуклеотидов HBV (QIAGEN), соответственно. 1 мкг/мл ламивудина (LAM) использовали в качестве позитивного контроля в экспериментах. scAAV2/X-H1-NC-интрон 2 (X-NC) и scAAV2/8-H1-NC-интрон 2 (8-NC) использовали в качестве негативного контроля. Последовательность NC представляет собой последовательность, которая не является родственной HBV и не подавляет HBV при экспрессии в виде кшРНК. Эта последовательность также не является родственной геному человека и не оказывает РНК-интерферирующего влияния на экспрессию генов человека при экспрессии в виде кшРНК. Образец брали каждый день в течение девяти дней и анализировали на уровни HBeAg, HbsAg и ДНК HBV.

[0087] Результаты показали, что уровни HBsAg начинали снижаться через один день после инфицирования и достигали самого низкого уровня на 3-й день. Этот низкий уровень сохранялся до 9-го дня. Когда MOI scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2 превышала  $6E+2$ , то достигалось максимальное подавление уровней HBsAg. MOI scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2, равная  $6E+2$ , давала уровни HbsAg, которые приближались к нулю. Когда MOI scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2 превышала  $2E+4$ , то достигалось наибольшее подавление HBsAg. MOI scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2, равная  $2E+4$ , давала уровни HbsAg, которые приближались к нулю. Результаты также показали, что, если два rAAV оказывали аналогичное ингибирующее действие на экспрессию HBsAg, то используемая MOI scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2 была в 30 раз выше, чем используемая MOI scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2. Для сравнения, ламивудин не приводил к значительному подавлению HBsAg. Результаты представлены на фиг. 15А-15В и в Таблицах 10 и 11.



Таблица 10: Уровень HBsAg, обнаруженный в клетках HepG2.2.15, инфицированных scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2

MOI	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Пустой вирус	1	1.0000002	0.9999999	0.9999999	1.0000001	1	0.9999999	1.0000001	1	1
2.00E+02	1	0.521621	0.3576298	0.1755682	0.1189527	0.0964428	0.0858919	0.0733121	0.0979604	0.1109952
6.00E+02	1	0.2366812	0.0523309	0.0157304	0.0130259	0.0153813	0.0034897	0.0048057	0.0020927	-0.005433
2.00E+03	1	0.2427343	0.0142725	-0.00363	-0.012689	0.0078108	-0.003822	-0.001266	-0.000645	-0.044393
6.00E+03	1	0.2458644	0.0063115	-0.0088	0.0016126	0.010292	-0.002255	-0.005722	0.0006226	-0.063891
2.00E+04	1	0.2036345	0.0064395	-0.001919	-0.00706	0.0006203	-0.002075	-0.003616	-0.003526	-0.057936
X-NC	1	0.3831356	1.0730603	1.1635283	1.5671136	1.3258573	1.1517432	0.8699033	0.8283765	0.5483941
Ламивудин	1	0.7085067	1.0694985	0.8838135	0.8548879	0.9836865	1.1276321	1.284051	1.3238793	0.7174657

**Таблица 11:** Уровень НВsAg, обнаруженный в клетках HepG2.2.15, инфицированных scAAV2/8-Н1-кшРНК-интрон 2

MOI	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Пустой вирус	1 3	1.000000	1	0.999999 8	1.000000 1	1	0.999999 9	0.999999 9	1.000000 1	1.000000 4
6.00E+03	1	0.935851	0.429898 2	0.309870 7	0.168288 1	0.186823 7	0.125872 5	0.143787 2	0.134082 1	0.195407
2.00E+04	1	1.082430 4	0.264584 6	0.131142 7	0.088679 4	0.053598 8	0.043627	0.038901 2	0.049212 5	0.231487 3
6.00E+04	1	0.956979 8	0.132572 1	0.036731	0.025431 2	0.017527 9	0.006264 2	0.003189 2	0.003606 8	0.044003 5
2.00E+05	1	0.960493	0.057368	0.016251 5	0.011286	0.027343 5	0.018584 3	0.000842 3	- 0.001134	- 0.014502
5.00E+05	1	0.651403 3	0.055495 3	0.009740 7	0.008158 7	0.016790 3	0.004499 7	- 0.001557	- 0.002518	0.033556 8
8-NC	1	0.986609 4	2.130056	1.463950 6	1.444614 4	1.729402 6	0.977585 8	0.778418 8	0.662328 7	0.561447 9
Ламивудин	1	0.708506 7	1.069498 5	0.883813 5	0.854887 9	0.983686 5	1.127632 1	1.284051	1.323879 3	0.717465 7

[0088] Уровни НВsAg также снижались через один день после инфицирования. scAAV2/X-Н1-кшРНК-интрон 2 давал наибольшую супрессию НВsAg на 2-й день, а scAAV2/8-Н1-кшРНК-интрон 2 давал наибольшую супрессию НВsAg на 3-й день. Уровни НВsAg приближались к нулю, когда множественность заражения scAAV2/X-Н1-кшРНК-

интрон 2 составляла  $2E+4$ , и поддерживались на этом низком уровне с 3-го по 9-й день. Уровни HBeAg приближались к нулю, когда MOI scAAV2/8-N1-кшРНК-интрон 2 составляла  $5E+5$ , и поддерживались на этом низком уровне с 4-го по 9-й день. Результаты также показали, что, если два серотипа rAAV оказывали аналогичное ингибирующее действие на уровни экспрессии HBsAg, то используемая MOI scAAV2/8-N1-кшРНК-интрон 2 была в 25 раз выше, чем используемая MOI scAAV2/X-N1-кшРНК-интрон 2. Для сравнения, ламивудин не приводил к значительному подавлению HBeAg. Результаты представлены на фиг. 16А-16В и в Таблицах 12 и 13.

**Таблица 12:** Уровень HBeAg, обнаруженный в клетках HepG2.2.15, инфицированных scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2

MOI	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Пустой вирус	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2.00E+02	1	0.708415	0.238058	0.266593	0.57955	0.213115	0.577746	0.29089	0.292462	0.187972
6.00E+02	1	0.590939	0.211792	0.17377	0.481344	0.138781	0.448326	0.18771	0.1975	0.119562
2.00E+03	1	0.547653	0.166036	0.184826	0.443778	0.118746	0.337692	0.141368	0.148291	0.12779
6.00E+03	1	0.397325	0.109776	0.161181	0.274969	0.112709	0.259084	0.688945	0.150601	0.082363
2.00E+04	1	0.416802	0.107129	0.221975	0.180972	0.121418	0.161434	0.126361	0.129586	0.118465
X-NC	1	0.990185	0.786727	1.919656	1.284661	0.898263	0.924574	0.958366	1.207279	1.130845
Ламивудин	1	1.322533	0.715966	0.96118	1.034525	1.915765	0.997944	1.148177	0.936208	0.563239

**Таблица 13:** Уровень НВеAg, обнаруженный в клетках HepG2.2.15, инфицированных scAAV2/8-Н1-кшРНК-интрон 2

MOI	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Пустой вирус	1	1	1	1.0000001	1.00000001	1.00000002	0.99999998	1.00000001	0.99999999	0.99999999
6.00E+03	1	0.9494641	0.4051664	0.6434651	0.4094359	0.5816686	0.7935469	1.1154798	0.8677254	0.6895081
2.00E+04	1	0.842982	0.4279938	0.4159068	0.4529442	0.3644979	0.5411713	0.6977691	0.7031804	0.5292912
6.00E+04	1	0.7417004	0.5446002	0.3174941	0.3003117	0.2389039	0.693772	0.4262907	0.266949	0.2942628
2.00E+05	1	0.6582259	0.4171171	0.2520517	0.1842672	0.1308529	0.6955081	0.4840955	0.289064	0.3336083
5.00E+05	1	0.7161095	0.3615699	0.1441351	0.1234292	0.1376073	0.4767613	0.3484958	0.2032049	0.3513105
8-NC	1	0.6060134	0.8743558	2.2492778	1.2054464	0.8716624	0.8328438	0.6841938	0.9237801	1.2154254
Ламивудин	1	1.322533	0.7159665	0.9611801	1.0345255	1.9157645	0.9979437	1.1481768	0.936208	0.5632389

[0089] Результаты оценки ДНК НВV показали, что уровни ДНК в клетках, инфицированных scAAV2/X-Н1-кшРНК-интрон 2 или scAAV2/8-Н1-кшРНК-интрон 2,

начинали снижаться через день после заражения и достигали самых низких уровней на 5-й день. Низкие уровни ДНК HBV в клетках, инфицированных любым из серотипов rAAV, сохранялись с 6-го по 9-й день. Когда MOI scAAV2/X-N1-кшРНК-интрон 2 превышала  $2E+3$ , то наблюдался самый низкий уровень ДНК HBV. MOI scAAV2/X-N1-кшРНК-интрон 2, равное  $2E+3$ , давала уровень ДНК HBV, который приближался к нулю. Когда MOI scAAV2/8-N1-кшРНК-интрон 2 превышала  $2E+5$ , то наблюдался самый низкий уровень ДНК HBV. MOI scAAV2/8-N1-кшРНК-интрон 2, равная  $2E+5$ , давала уровень ДНК HBV, который приближался к нулю. Результаты также показали, что, когда два rAAV оказывали аналогичное ингибирующее действие на уровень ДНК HBV, то MOI используемого scAAV2/8-N1-кшРНК-интрон 2 в 100 раз превышала MOI используемого scAAV2/X-N1-кшРНК-интрон 2. Результаты представлены на фиг. 17А-17В и в Таблицах 14 и 15.

Таблица 14: Уровень ДНК HBV, обнаруженный в клетках HepG2.2.15, инфицированных scAAV2/X-N1-кшРНК-интрон 2

MOI	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Пустой вирус	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2.00E+02	1	0.794513	0.663432	0.468956	0.3379	0.330579	0.231245	0.272403	0.239277	0.286585
6.00E+02	1	0.819469	0.631767	0.337065	0.158961	0.141736	0.044295	0.066288	0.060849	0.071196
2.00E+03	1	1.224779	0.609806	0.316933	0.134332	0.074008	0.019746	0.036691	0.014739	0.019588
6.00E+03	1	0.601239	0.533708	0.290499	0.054281	0.050785	0.009635	0.015888	0.0132	0.012375
2.00E+04	1	0.904425	0.556691	0.406397	0.082021	0.061901	0.049344	0.013058	0.013099	0.022201
X-NC	1	1.176235	0.685708	1.274876	0.670012	0.964083	0.989423	1.77193	0.844433	1.987109
Ламивудин	1	0.679706	0.358002	0.356965	0.19066	0.057353	0.023413	0.040011	0.021042	0.006153

**Таблица 15:** Уровень ДНК HBV, обнаруженный в клетках HepG2.2.15, инфицированных scAAV2/8-Н1-кшРНК-интрон 2

MOI	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Пустой вирус	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6.00E+03	1	0.96669	0.588617	0.736503	0.701146	0.571008	0.546019	0.300387	0.349741	0.449937
2.00E+04	1	0.797307	0.717914	0.474617	0.345577	0.248471	0.139504	0.147744	0.156662	0.29975
6.00E+04	1	0.833451	0.559206	0.396374	0.205407	0.118913	0.077663	0.085174	0.067765	0.130038
2.00E+05	1	1.600283	0.440604	0.401289	0.101469	0.086546	0.129679	0.050967	0.032087	0.066583
5.00E+05	1	2.92275	0.493125	0.323529	0.060153	0.090849	0.126887	0.048088	0.03094	0.044869
8-NC	1	3.205607	0.532377	1.074627	0.45851	1.635161	1.491346	1.791737	0.764108	2.43163
Ламивудин	1	0.679706	0.358002	0.356965	0.19066	0.057353	0.023413	0.040011	0.021042	0.006153

*Анализ на эффективность кшРНК in vivo с использованием аутокомплементарных AAV2/8 и AAV2/X*

[0090] scAAV2/X-Н1-кшРНК-интрон 2 и scAAV2/8-Н1-кшРНК-интрон 2 вводили



мышам, трансгенным по HBV (Beijing Vitalstar Biotechnology Co., Ltd, B6-Tg HBV/Vst; C57BL/6-HBV), путем внутривенной инъекции, соответственно. Epriver® (ламивудин) и Baraclude® (энтекавир) использовали в качестве контроля. Экспериментальные группы показаны в Таблице 16. Кровь брали на дни 0, 7, 14, 21, 28, 35, 56, 84, 112, 140, 168, 196, 224 и 252, а затем центрифугировали и определяли уровень HBsAg, HBeAg и ДНК HBV.

**Таблица 16.** Введение scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2 и scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2 мышам, трансгенным по HBV

Группа	Вводимое терапевтическое средство	Доза	Число HBV-трансгенных мышей (n)
1	DPBS	0,2 мл/животное	6
2	Ламивудин	150 мг/кг	6
3	Энтекавир	3,2 мг/кг	6
4	scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2	$3 \times 10^{10}$ ВГ/животное	6
5	scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2	$3 \times 10^{10}$ ВГ/животное	6

[0091] Результаты показали, что подавление HBsAg было выше у животных, которым вводили scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2 или scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2, чем у контрольных животных (Таблица 17). Кроме того, снижение HBsAg у животных, которым вводили scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2, было в 5-6 раз выше, чем у животных, которым вводили scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2 (Таблица 17).

[0092] Как дополнительно показано в Таблице 18, scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2 и ламивудин оказывали аналогичное влияние на уровни ДНК HBV, а подавление ДНК HBV у животных, которым вводили scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2, было в 70 раз выше, чем у животных, которым вводили scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2.

[0093] В большинстве случаев, уровни HBeAg были ниже 1 у животных, которым вводили scAAV2/8-H1-кшРНК-интрон 2, при этом, более чем у 50% животных не детектировались какие-либо уровни HBeAg (поэтому, статистический анализ этих данных не проводили). Введение scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2 приводило к снижению уровней HBeAg через семь дней после инъекции. Так, например, на 56-й день, введение scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2 приводило к снижению HBeAg до  $17,4 \pm 3,6$  PEIU/мл (как показано в Таблице 19), тогда как у животных, которым вводили DPBS, не наблюдалось изменений уровней HBeAg (129,0 PEIU/мл по сравнению с 133,9 PEIU/мл на D0). Введение scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2 также приводило к снижению уровней HBsAg, HBeAg и ДНК HBV в печени на 96%, 68% и 91,6%, соответственно, по сравнению с контролем на конечный момент времени (Таблица 20).

**Таблица 17:** Сравнение уровней HBsAg для групп, которым вводили scAAV2/8-Н1-кшРНК2-интрон 2 и scAAV2/Х-Н1-кшРНК2-интрон 2

Группа	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D56	D84	D112	D140	D168	D196	D224	D252
DPBS	1	1.04	0.87	1.06	0.84	1.09	0.78	0.91	0.44	0.79	0.6	0.61	0.47	0.33
LAM	1	1	0.98	1.01	0.96	1.23	0.84	0.88	0.5	0.98	1.1	0.82	0.76	0.46
ETV	1	1.52	1.51	1.08	1.55	1.8	1.21	1.18	0.43	1.04	1.23	1.48	1.16	0.72
scAAV2/8-Н1-кшРНК2-интрон 2	1	0.1	0.04	0.01	0.07	0.09	0.08	0.07	0.04	0.13	0.12	0.13	0.1	0.06
scAAV2/Х-Н1-кшРНК2-интрон 2	1	0.17	0.02	0.01	0.009	0.011	0.01	0.012	0.014	0.014	0.016	0.02	0.019	0.013

**Таблица 18:** Сравнение уровней ДНК HBV для групп, которым вводили scAAV2/8-Н1-кшРНК2-интрон 2 и scAAV2/Х-Н1-кшРНК2-интрон 2

Группа	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D56	D84	D112	D140	D168	D196	D224	D252
DPBS	1	3.96	1.13	0.85	2.85	2	1.28	1.39	6.92	1.87	1.74	3.58	3.03	6.66
LAM	1	1.3	0.69	0.49	0.87	0.72	0.97	0.43	1.64	0.92	0.63	0.18	0.12	0.23
ETV	1	5.7	8.68	0.66	1.24	1.08	1.17	1.1	2.24	1.91	1.79	2.17	2.48	1.42
scAAV2/8-Н1-кшРНК2-интрон 2	1	1.1	1.17	1.54	1.58	0.8	0.65	0.76	1.6	0.39	1.39	1.02	0.63	2.72
scAAV2/Х-Н1-кшРНК2-интрон 2	1	0.29	0.038	0.04	0.013	0.018	0.017	0.022	0.025	0.01	0.012	0.012	0.01	0.01

**Таблица 19:** Уровни HBeAg у животных, которым вводили scAAV2/X-H1-кшРНК2-интрон 2

Группа	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D56	D84	D112	D140	D168	D196	D224	D252
DPBS	133.9	135.6	89.3	89.9	71.3	50.5	129	103.5	135.3	172.3	120.7	155.6	123.6	137.9
ETV	130.7	138.6	92.1	66.5	78.3	48.2	131.4	105.1	133.8	178.5	125.9	150.5	123.5	155.1
scAAV2/X-H1-кшРНК2-интрон 2	145.3	37.7	7.6	5.8	4.7	5.3	17.4	14.3	17	28.5	17.5	20.9	18.6	21.9

**Таблица 20:** Уровни HBsAg, HBeAg и ДНК HBV в ткани печени на конечный момент времени

Группа	HBsAg (IU/г ткани печени)	HBeAg (PEIU/г ткани печени)	ДНК (IU/г ткани печени)
DPBS	7219,8	809,2	618683999
scAAV2/X-H1-кшРНК-интрон 2	324,5	255,6	52118219

**Последовательности**

SEQ ID NO: 1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKY  
 LGPFNGLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS  
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAK  
 KRLNFGQTGDSESVDPDPQPLGEPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASG  
 NWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFD  
 FNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTVQV  
 FSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQ  
 MLRTGNNTFSYTFEEVPHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDL  
 LFSRGSPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINP  
 GTAMASHKDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFG  
 TVAVNLQSSSTD PATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLM  
 GGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN  
 PEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

SEQ ID NO: 2

MQLRNPELHLGCALALRFLALVSWDIPGARALDNLARTPTMGWLHWERFMC  
 NLDCQEEDSCISEKLFMEMAELMVSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAPQRDSEGRLQAD  
 PQRFPHGIRQLANYVHSKGLKLG IYADVGNKTCAGFPGSFGYYDIDAQTFADWGV DLL  
 KFDGCYCD SLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPQKPNYTEIRQYCNH  
 WRNFADIDDSWKSISILDWTSFNQERIVDVAGPGGWNDPDMLVIGNFGLSWNQV TQ  
 MALWAIMAAPLFMSNDRHISPQAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVW  
 ERPLSGLAWAVAMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYEW  
 TSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL

SEQ ID NO: 3

gugugcacuucgcuuacccuucagagaggugaagcgaagugcacac

SEQ ID NO: 4

gttcggctttacgtcacgcgagggcggcagggaggacggaatggcggggttgggggtgggtccctcctcgggggagccctg  
 ggaaaagaggactgcgtgtgggaagagaaggtggaaatggcgttttggttgacatgtgccgcctgcgagcgtgctgcggggaggggcc

gagggcagattcgggaatgatggcgggggtgggggcttctcgggagaggccctccctggaagttgggggtgcgatgt  
gaggttctcggggcacctctggaggggacctggcacggaagcgcaccacctgggagggcgtgtggggaccaggtttgcctttagtttg  
cacacactgtagttcatctttatggagatgctcatggcctcattgaagccccactacagctctgtagcggtlaacatgcgtatttgacacag  
aaggaactagggaaaaggcattaggtcattcaagccgaaattcacatgtgctagaatccagattccatgctgaccgatgccccaggatata  
gaaaatgagaatctggtccttacctcaagaacattttaaccgtaacagcctctggtatcttagctccaccctcactggtttttctgtttgtga  
accggccaagctgctggcctccctcctcaaccgttctgatcatgcttgcataaaatagtcaaaaccccgccagttaaatatgctttagcctgctt  
tattatgattatgtttgtttggcaatgacctggttacctgttttctcccactaaaactttttaaggcaggaatcaccgccgtaactctagca  
cttagcacagtactggcttgaagaggtcctcgaatgatggtttgtgaatgaatacattaaataaataaccactgaacctaaagaaagaagcg  
attctatttcatattaggcattgtaatgacttaaggtaaagagcagtgctattaacggagtgtaactgggaatccagctgtttgggctattfacta  
gttgtgtggctgtgggcaacttacctcctctgggcttaagtcattttatgtatctgaggtgctggctacctctggagttattgagaggatt  
ataagacagctctatgtaatcagcaacccttgcattggccccggggggaacagtaataatagccatcatgtttacttcatagtcctaatt  
agcttcaaaacagccctgtagcaatggtatgattattaccattttacagatgaggaaccttgaagcctcagagaggctaacagacatacct  
aggctacacagttattaagagaaggagctctgtctcgaacctagctctctctctcagtaataaccagttaaaaataggctacaaataggta  
ctcaaaaaatggtagtggctgtttttattcagttgctgaggaaaaatgttatttttcatcttaaacatcaacttacttaattctgccaattc  
ttttttgagacagggctcactctgtcacctaggatggagtgagtggcacaatcactgctcactgcagcctcacttcccgggctcgggtg  
atttccccaggctcagggatttcccacttcagcctcccaagtagc

SEQ ID NO: 5

gaacgctgacgtcatcaaccgctccaaggaatcgcgggccagtgctactaggcgggaacaccagcgcgctgcgcct  
ggcaggaagatggctgtgagggacaggggagtgcgccctgcaatatttgcattgctcgtatgttctgggaaatcaccataaacgtgaaa  
tgtctttggatttgggaatcttataagttctgtatgagaccacagatctgtgtgcaacttcgcttaccttcaagagaggtgaagcgaagtgcaca  
cttttttaagcttctggctttacgtcacgcgagggcggcagggaggacggaatggcggggtttgggggtgggtccctcctcgggggagcc  
ctgggaaaagaggactgcgtgtgggaagagaaggtggaatggcgttttgggtgacatgtgccgctgcgagcgtgctcggggaggg  
gccgagggcagattcgggaatgatggcgcgggggtgggggctgtggggcttctcgggagaggccctccctggaagttgggggtgcgat  
ggtgaggttctcggggcacctctggaggggctcggcacggaaagcgcaccacctgggagggcgtgtggggaccaggtttgcctttagtt  
ttgcacacactgtagttcatctttatggagatgctcatggcctcattgaagccccactacagctctgtagcggtlaacatgcgtatttgacaca  
cgaaggaactagggaaaaggcattaggtcattcaagccgaaattcacatgtgctagaatccagattccatgctgaccgatgccccaggata  
tagaaaatgagaatctggtccttacctcaagaacattttaaccgtaacagcctctggtatcttagctccaccctcactggtttttctgtttgtt  
gaaccggccaagctgctggcctccctcctcaaccgttctgatcatgcttgcataaaatagtcaaaaccccgccagttaaatatgctttagcctg  
ctttattatgattatgtttgtttggcaatgacctggttacctgttttctcccactaaaactttttaaggcaggaatcaccgccgtaactctag  
cacttagcacagtacttggcttgaagaggtcctcgaatgatggtttgtgaatgaatacattaaataaataaccactgaacctaaagaaagaag  
cgattctatttcatattaggcattgtaatgacttaaggtaaagagcagtgctattaacggagtgtaactgggaatccagctgtttgggctatttct  
tagttgtgtggctgtgggcaacttacctcctctgggcttaagtcattttatgtatctgaggtgctggctacctctggagttattgagagg  
attataagacagctctatgtaatcagcaacccttgcattggccccggggggaacagtaataatagccatcatgtttacttcatagtccta  
attagcttcaaaacagccctgtagcaatggtatgattattaccattttacagatgaggaaccttgaagcctcagagaggctaacagacatac  
cctaggtcatacagttattaagagaaggagctctgtctcgaacctagctctctctctcagtaataaccagttaaaaataggctacaaatag  
gtactcaaaaaatggtagtggctgtttttattcagttgctgaggaaaaatgttatttttcatcttaaacatcaacttacttaattctgccaat  
ttctttttttgagacagggctcactctgtcacctaggatggagtgagtggcacaatcactgctcactgcagcctcacttcccgggctcgg  
gtgatttccccaggctcagggatttcccacttcagcctcccaagtagc

SEQ ID NO: 6

gaattggagatcggctacttcgcgaatgcgtcgagttattttaaaaagcagtcaaaagtccaagtggcccttggcagcatttactc

tctctgttctctggttaataatctcaggagcacaacattcctggaggcaggagaagaaatcaacatcctggacttatcctctgggcctctcc  
ccacccccaggagaggtgtgcaactgtaatttttaaaaagcagtcaaaagccaagtgcccttggcagcatttactctctctgttctctg  
gtaataatctcaggagcacaacattcctggaggcaggagaagaaatcaacatcctggacttatcctctgggcctctccccacccccagga  
gaggctgtgcaactggatccaggcctgaggctggcaaaattgaacctcctcctgctctgagcagcctggggggcagactaagcagagg  
gctgtgcagaccacataaagagcctactgtgtgccaggcacttcacccgaggcacttcacaagcatgcttgggaatgaaactccaactct  
ttgggatgcaggtgaaacagttcctgggtcagagaggtgaagcggcctgctgaggcagcacagctcttctttacagatgtgcttccccact  
ctaccctgtctcagggccccccatgccagcctgacggttgtgtctgctcagtcagctcattttccatcgggaccatcaagagggtgttgg  
gtctaaggctgactgggtaactttggatgagcggctctccgctctgagcctgttctcctcctgtcaaatgggctctaaccactctgatctcc  
cagggcggcagtaagtctcagatcaggcattttgggggtgactcagtaaatggtagatcttctaccagtggaacagccactaaggattctg  
cagtgagagcagagggccagctaagtggfactctcccagagactgtctgactcacgccacccccctccacttggacacaggacgctgtgg  
ttctgagccaggtaaatgactcctttcgtaagtgcagtggaagctgtacactgccaggcaaagcgtccgggcagcgtaggcggggcg  
actcagatcccagccagtggacttagccccctgttctcctccgataactgggggtgaccttggtaataatccaccagcagcctccccgttgc  
cctctggatccactgcttaatacggacgaggacagggcctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagtgaatcgcg  
ccgcatatgccacatgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttgccttctgcccctgttctgggacatc  
cctggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgctaccatgggctggtgactgggagcgttcatgtgcaaccttgactgc  
caggaagagccagattcctgcatcagtgagaagctctcagatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaaggatgcaggtatg  
agfacctctgcallgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcaggcagaccctcagcgttctcctatgggattc  
gccagctagctaallatgttcacagcaaaggactgaagctagggtttatgcagatgttggaaataaaacctgcgcaggttccctgggagtt  
ttggatactacgacattgatgccagaccttctgactggggagtagatctgctaaaatttgatgggttactgtgacagtttggaaaattgg  
cagatgggtataagcacatgtccttggccctgaataggactggcagaagcattgtgactcctgtgagtgccctttatgtggcccttcaa  
aagcccaattatacagaaatccgacgactgcaatcactggcgaatfttctgacattgatgattcctgaaaagtataaagatcttgg  
actggacatctttaaaccaggagagaattgtgatgttctggaccaggggggtggaatgaccagatatgttagtgattggcaactttggcct  
cagctggaatcagcaagtaactcagatggccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatactccgacacatcagccctcaa  
gccccaaagtctcctcaggataaggacgtaattgcatcaatcaggacccccctgggcaagcaagggtaccagcttagacaggagacaac  
tttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcctgggctgtagctatgataaaccggcaggagattggtggacctcgtcttataccatc  
gcagttgcttccctgggtaaaaggagtgccctgtaatcctgctgcttcatcacacagctcctcctgtgaaaaggaagctagggttctatgaat  
ggacttcaaggttaagaagtcacataatcccacaggcactgtttgctcagctagaaaatacaatgcagatgcaftaaaagacttactttaa

SEQ ID NO: 7

ccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctccctgctgaccttggagctggggcagag  
gtcagagacctctctgggcccattgccacctcaacatccactcagcccccttggaaattcgggtggagaggagcagaggttctcctggcgtgg  
tttaggtagtgtgagaggggaatgactcctttcgtaagtgcagtggaagctgtacactgccaggcaaagcgtccgggcagcgtaggcg  
ggcgactcagatcccagccagtggacttagccccctgttctcctccgataactgggggtgaccttggtaataatccaccagcagcctccccg  
ttgccccctctggatccactgcttaatacggacgaggacagggcctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagtgaatc  
cggactctaaggtaaatataaaattttaagtataatgtttaaactactgattctaattgttctctcttttagattccaaccttggaaactgaatc  
tagaccaccggccgcacatgccacatgcagctgaggaaccagaactacatctgggctgcgcgcttgcgcttgccttctggccctcg  
tttctgggacatccccgggctagagcactggacaatggattggcaaggacgctaccatgggctggtgactgggagcgttcatgtg  
caaccttgactgccaggaaagagccagattcctgcatcagtgagaagctctcagatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaag  
gatgcaggttatgactcctgcallgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcaggcagaccctcagcgttt  
cctcatgggattcggcagctagctaallatgttcacagcaaaggactgaagctagggtttatgcagatgttggaaataaaacctgcgcagggc  
ttccctgggagtttggatactacgacattgatgccagaccttctgactggggagtagatctgctaaaatttgatgggttactgtgacagt

ttggaaaatttggcagatggttataagcacatgtccttggccctgaataggactggcagaagcattgtgtactcctgtgagtggcctctttat  
gtggccctttcaaaagcccaattatacagaaatccgacagctactgcaatcactggcgaaatitgtgacattgatgattcctggaaaagtata  
aagagtatcttggactggacatcttfaaccaggagagaattgtgatgttgctggaccaggggttggatgaccagatatgttagtgattg  
gcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatggccctctgggctatcatggctgctcctttatcatgtctaatgacctccgacac  
atcagccctcaagccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccttgggcaagcaagggtaccagcttagac  
agggagacaactttgaagtgtgggaacgacctctcagccttagcctgggctgtagctatgataaaccggcaggagattgggtggacctg  
ctcttataccatcgcagttgcttccctgggtaagaggtggcctgtaatcctgctgcttcatcacacagctcctcctgtgaaaaggaagta  
gggttctatgaatggactcaaggttaagaagtcacataaatcccacaggcactgttttcttcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaa  
agacttacttta

SEQ ID NO: 8

gtcgacaccggttagtaatgatcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctcct  
ttacgctatgtggatacgtgctttaatgctttgtatcatgctattgcttcccgataggctttcatttctcctcctgtataaatcctgggtgctgtc  
tttatgaggagtgtggcccgttgcaggcaactggcgtgggtgactgtgttctgacgcaacccccactggttggggcattgccacca  
cctgtcagctccttccgggacttctgcttccccctcctattgccacggcggaactcagccgctgcttcccgtgctggacagggg  
ctcggctgttgggactgacaattccgtgggtgtgctggggaagctgacgtccttccatggctgctcctgttggccacctggattctg  
cgggacgtccttctgctacgtccttccggccctcaatccagcggaccttcttcccggcctgctgcccgtctgcccgtcttccgcgt  
tcgcttccctcagacgagtcggatcctccttggggccctc

SEQ ID NO: 9

Gaacgtgacgtcatcaaccgctccaaggaatcgccggcccagtgctactaggcgggaacaccagcgcgctgcccct  
ggcaggaagatggctgtgaggacaggggagtggcgccctgcaatattgcatgctgctatgttctgggaaatcaccataaacgtgaaa  
tgtcttggatttgggaatcttataagttctgtatgagaccac

SEQ ID NO: 10

atggctgccgatggttattctccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggacttgaacctggag  
ccccgaagccaaageccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctgtgcttctggctacaagtacctggaccttcaacgg  
actcgacaagggggagcccgtcaacgcggcggacgcagcggccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaacggggtg  
acaatccgtacctgcgtataaccacgccgacccgagttcaggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgag  
cagcttccaggccaagaagcggggtctgaacctctcggctggttgggaaggcgttaagacggctcctgaaagaaacgtccggtag  
agcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggcatcggcaagacagccagcagcccgtaaaaagagactcaatttggctcagact  
ggcgactcagagtcagttccagacctcaacctctcgggagaaccaccagcagccccacaagtttgggatctaatacaatgcttcaggcg  
gtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcggcagcggagtgggtaatgctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggc  
gacagagtcaccaccagcaccgaacatgggcttggccacctataacaaccctctacaagcaaatctccagtgcttcaacgggg  
gccagcaacgacaaccactactcggctacagcaccctgggggtatttggattcaacagattccactgccattctcaccacgtgactgg  
cagcactcatcaacaacaattggggattccggcccaagagactcaactcaagcttcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatg  
atggcgtcacgaccatcgtataaacctaccagcacggttcaagtctctcggactcggagtaccagttgccgtacgtcctcggctctg  
accagggctgcctc  
actc  
cacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcagcagaccagctacacctgtattacctgaacagaactcagaatc  
agtcgggaagtgccaaaacaaggactgtgttttagccgtgggtctccagctggcatgctgttcagcccaaaaactggctacctggacc  
tgttaccggcagcagcgcgttctaaaacaaaacagacaacaacagcaactttacctggactggtgcttcaaatataacctcaatgg  
gcgtgaatccatcatcaacctggcactgctatggcctcacaaaagacgacaagacaagttcttccatgagcgggtcatgatttgg



aaaggagagcgccggagcttcaaacactgcattggacaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatcaaagccactaacccccgtggcca  
 ccgaaagatttgggactgtggcagtcfaatctccagagcagcagcacagaccctgcaccggagatgtcatgttatgggagccttacctgg  
 aatgggtgtggcaagacagagacgtatacctgcagggtcctatttgggcaaaatctcacacggatggacaactttaccctgtcctctcat  
 gggcggtcttggacttaagcaccgcctcctcagatcctcatcaaaaaacgcctgttctcgcgaatcctccggcagagtttccggctacaaa  
 gtttcttcattcatcaccagttatccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaacgctggaat  
 cccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctccaacgttgattttactgtggacaacaatggactttatactgagcctcgcctccattgg  
 caccctgtacctaccctgccccctgtaa

SEQ ID NO: 20

gaattggagatcggtacttcgcgaatgcgtcgagttatTTTTAAAAAGCAGTCAAAGTCCAAGTGGCCCTGGCAGCATTFACT  
 TCTCTGTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAAACATCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCTGGACTTACTCTCTGGCCTCTCC  
 CCACCCCCAGGAGAGGCTGTGCAACTGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAGTCCAAGTGGCCCTGGCAGCATTACTCTCTGTTGCTCTG  
 GTTAATAATCTCAGGAGCACAAAACATCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCTGGACTTACTCTCTGGCCTCTCCCCACCCCCAGGA  
 GAGGCTGTGCAACTGGATCCAGGCTGAGGCTGGTCAAAATGAACCTCTCTGCTGTGAGCAGCCTGGGGGGCAGACTAAGCAGAGG  
 GCTGTGCAGACCCACATAAAGAGCCTACTGTGTCCAGGCACTCACCCGAGGCACTTACAAGCATGCTGGGAATGAACTCCAACCT  
 TTGGGATGCAGGTGAAACAGTTCTGGTTCAGAGAGGTGAAGCGGCTGCTGAGGAGCACAGCTCTCTTTACAGATGTCTTCCCCACT  
 CTACCTGTCTCAGGCCCCCATGCCAGCTGACGGTGTGTCTGCTCAGTCAATGCTCCATTTTCCATCGGGACCATCAAGAGGTTTGT  
 GCTAAGGCTGACTGGTAACCTTGGATGAGCGTCTCTCCGCTGTGAGCCTGTTCTCATCTGCAAAATGGGCTCTAACCCACTCTGATCTCC  
 CAGGGCGGCAGTAAGTCTCAGCATCAGGCATTTGGGGTGACTCAGTAAATGGTAGATCTGTCTACCAGTGAACAGCCACTAAGGATCTG  
 CAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCCCCCCTCCACTTGGACACAGGACGCTGTGG  
 TTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCTTTCGGTAAGTGCAGTGAAGCTGTACTGCCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCG  
 ACTCAGATCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCGTGTTGCTCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATCCACCAGCAGCTCCCCGTGCC  
 CCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACTGGGACAGTGAATC

SEQ ID NO: 21

ccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctccctgctgacctggagctggggcagag  
 gtcagagacctctctgggccatgccacctccaacatccactgacccttggaaattcgggtggagaggagcagaggttgcctggcgtgg  
 tttaggtagtgtgagaggggaatgactccttccgtaagtgcagtgaagctgtactgcccaggcaaagcgtccgggcagcgtagggc  
 ggcgactcagatcccagccagtggaacttagccccgttctcctccgataactgggggtgaccttggtaatatccaccagcagctccccg  
 ttccccctctggatccactgcttaaatagcagcagggacagggccctgtctctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagtgaatc  
 cggactctaaggtaaatataaaatTTAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATGTTTCTCTTTTAGATTCCAACCTTGGAACTG

SEQ ID NO: 22

Gtacctcgcgaatgcactacgatgcgagaactgtgctcctccctgttctctctttgtccctctgtcctacttagactaatatttg  
 ccttgggtactgcaaacaggaaatgggggagggattcgaacggcttgcggacactagcagatgcgagaacttgcctccccgttctct  
 gctctttgtccctctgtcctacttagactaatatttgccttgggtactgcaaacaggaaatgggggagggattcgaacggcttgcggacact  
 agtgtgtgcagcgtgagfacttgtgtgtaattttcattatctataggtaaaagcacacttggaaatagcaatagatgcaatttgggacttaact  
 ctttcagtatgtctatttctaagcaagattttagtttggtagtaactactaaactgagaactaaattgcaaacaccaagaactaaatgttca  
 agtgggaaattacagttaaataccatggtaatgaataaaagggtacaatcgtttaaactcttatgtaaaattgataagatgtttacacaacttta  
 atacattgacaaggcttgggagaaaacagttccagatggtaaatatacacaagggatttagtcaacaatttttggcaagaatattatgaatt  
 ttgtaatcggttggcagccaatgaaatacaagatgagtctagttaataatctacaatttggttaaagaagtatattagtctaatccctccg  
 tttgtcctagcttttctcttctgtaac

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий:

(a) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и

(b) экспрессионный кластер, содержащий полинуклеотидную последовательность, где полинуклеотидная последовательность кодирует терапевтическое средство, пригодное для использования в генотерапии заболевания печени.

2. rAAV по п.1, где терапевтическое средство, кодируемое полинуклеотидной последовательностью, представляет собой альфа- галактозидазу А (GLA) или кшРНК, нацеленные на геном вируса гепатита В (HBV).

3. rAAV по п.1 или 2, где экспрессионный кластер дополнительно содержит промотор и/или человеческую некодирующую последовательность наполнителя, где промотор расположен выше полинуклеотидной последовательности, а человеческая некодирующая последовательность наполнителя расположена ниже полинуклеотидной последовательности.

4. rAAV по п.3, где промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II или промотор РНК-полимеразы III.

5. rAAV по п.3 или 4, где промотор представляет собой промотор LP1, промотор AroE/hAAT, промотор DC172, промотор DC190, промотор AroA-I, промотор TBG, промотор LSP1, промотор 7SK, промотор H1, промотор U6 или промотор HD-IFN.

6. rAAV по любому из пп. 3-5, где промотор представляет собой:

(i) промотор LP1 или DC172 для полинуклеотидной последовательности, кодирующей GLA, или

(ii) промотор H1 для полинуклеотидной последовательности, кодирующей кшРНК.

7. rAAV по любому из пп. 1-6, где экспрессионный кластер дополнительно содержит первый инвертированный концевой повтор (ITR) AAV и второй ITR AAV.

8. rAAV по п.7, где первый и/или второй ITR представляют собой серотип/происходят от серотипа AAV кладотипов AF, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или от любых гибридных/химерных типов.

9. rAAV по п.7 или 8, где первый и/или второй ITR представляют собой серотип/происходят от серотипа AAV2.

10. rAAV по любому из пп. 2-9, где:

(i) GLA содержит SEQ ID NO: 2, или

(ii) полинуклеотидная последовательность, кодирующая кшРНК, содержит SEQ ID NO: 3.

11. rAAV по любому из пп. 3-10, где человеческая некодирующая последовательность наполнителя представляет собой последовательность интрона человеческого фактора IX, последовательность космиды C346 человека, последовательность HPRT-интрона или их комбинации.

12. rAAV по п.11, где человеческая некодирующая последовательность

наполнителя представляет собой последовательность HPRT-интрон, содержащую SEQ ID NO: 4.

13. rAAV по п. 1, где экспрессионный кластер содержит SEQ ID NO: 5.

14. rAAV по п. 1, где экспрессионный кластер содержит SEQ ID NO: 6 или 7.

15. rAAV по п.13 или 14, где экспрессионный кластер дополнительно содержит SEQ ID NO: 8.

16. Композиция, содержащая rAAV по любому из пп. 1-15.

17. Композиция по п.16, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент и/или разбавитель.

18. Способ лечения заболевания печени у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества rAAV по любому из пп. 1-15 или композиции по п.16 или 17.

19. Способ по п.18, где заболевание печени представляет собой болезнь Фабри или гепатит В.

20. Способ по п.18 или 19, где rAAV или композицию вводят внутривенно.

21. Способ по любому из пп. 18-20, дополнительно включающий введение второго терапевтического средства.

22. Способ по любому из пп. 18-21, где введение rAAV или композиции приводит:

(i) к повышению уровня экспрессии GLA в ткани печени по сравнению с соответствующим rAAV, содержащим капсидный белок серотипа AAV2/8; или

(ii) к повышению уровня ингибирования поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), е-антигена гепатита В (HBeAg) или ДНК HBV по сравнению с соответствующим rAAV, содержащим капсидный белок серотипа AAV2/8.

23. Способ по любому из пп. 18-22, где терапевтически эффективное количество rAAV составляет от приблизительно  $1 \times 10^6$  ВГ до приблизительно  $1 \times 10^{18}$  ВГ.

24. Применение rAAV по любому из пп. 1-15 или композиции по п.16 или 17 в получении лекарственного средства для лечения заболевания печени у пациента, нуждающегося в этом.

25. Применение по п.24, где заболевание печени представляет собой болезнь Фабри или гепатит В.

26. Применение по п.24 или 25, где rAAV или композиция являются подходящими для внутривенного введения.

27. Применение по любому из пп. 24-26, где введение rAAV или композиции приводит:

(i) к повышению уровня экспрессии GLA в ткани печени по сравнению с соответствующим rAAV, содержащим капсидный белок серотипа AAV2/8; или

(ii) к повышению уровня ингибирования поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), е-антигена гепатита В (HBeAg) или ДНК HBV по сравнению с соответствующим rAAV, содержащим капсидный белок серотипа AAV2/8.

28. Применение по любому из пп. 24-27, где терапевтически эффективное

количество гAAV составляет от приблизительно  $1 \times 10^6$  ВГ до приблизительно  $1 \times 10^{18}$  ВГ.

29. гAAV по любому из пп. 1-15 или композиция по п.16 или 17 для применения в лечении заболевания печени у пациента, нуждающегося в этом.

30. гAAV или композиция для применения по п.29, где заболевание печени представляет собой болезнь Фабри или гепатит В.

31. гAAV или композиция для применения по п.29 или 30, где гAAV или композиция являются подходящими для внутривенного введения или внутривенного вливания.

32. гAAV или композиция для применения по любому из пп. 29-31, где введение гAAV или композиции приводит:

(i) к повышению уровня экспрессии GLA в ткани печени по сравнению с соответствующим гAAV, содержащим капсидный белок серотипа AAV2/8; или

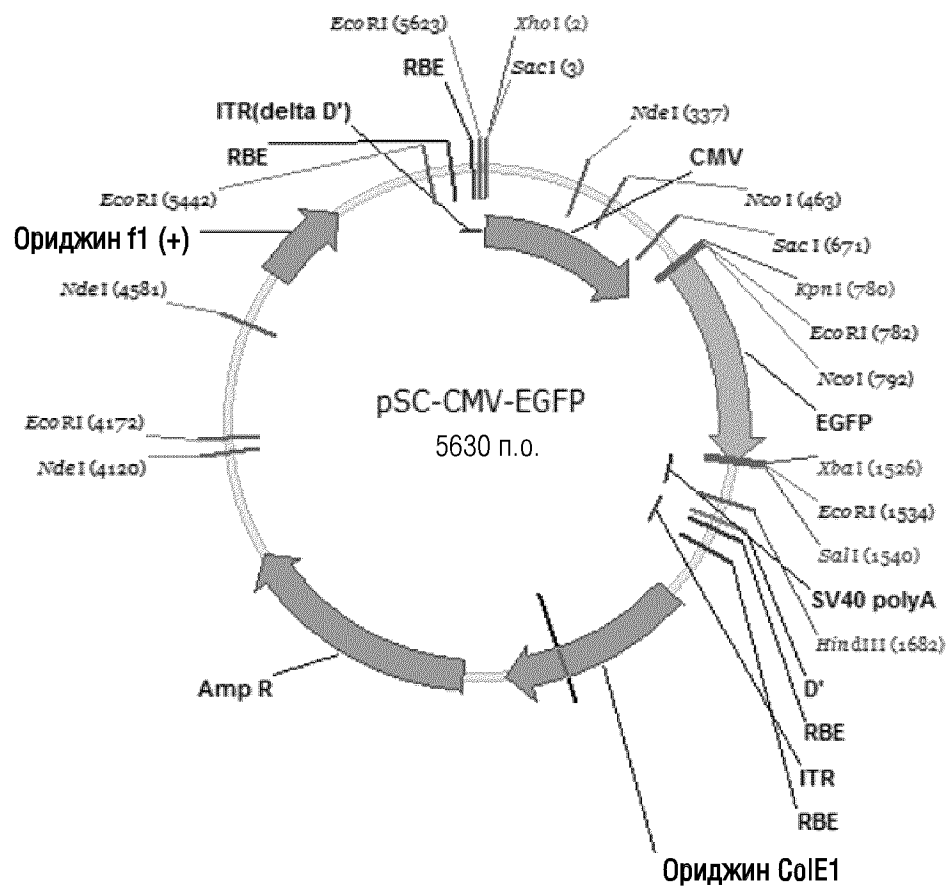
(ii) к повышению уровня ингибирования поверхностного антигена гепатита В (HBsAg), е-антигена гепатита В (HBeAg) или ДНК HBV по сравнению с соответствующим гAAV, содержащим капсидный белок серотипа AAV2/8.

33. Композиция для применения по любому из пп. 29-32, где терапевтически эффективное количество гAAV составляет от приблизительно  $1 \times 10^6$  ВГ до приблизительно  $1 \times 10^{18}$  ВГ.

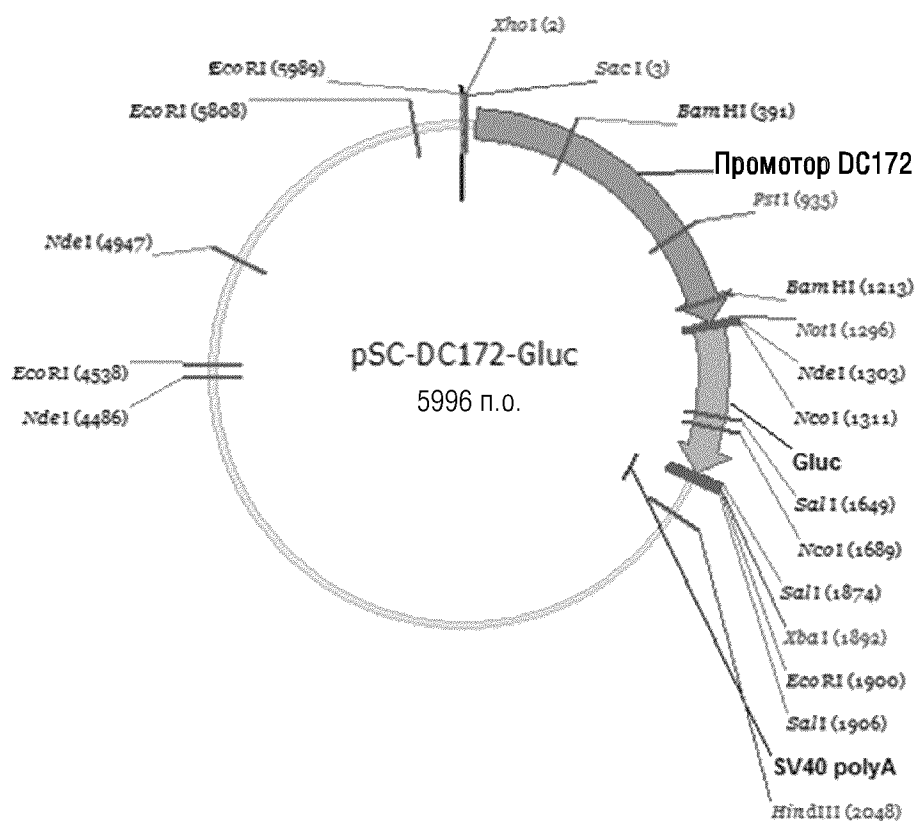
По доверенности

1/17

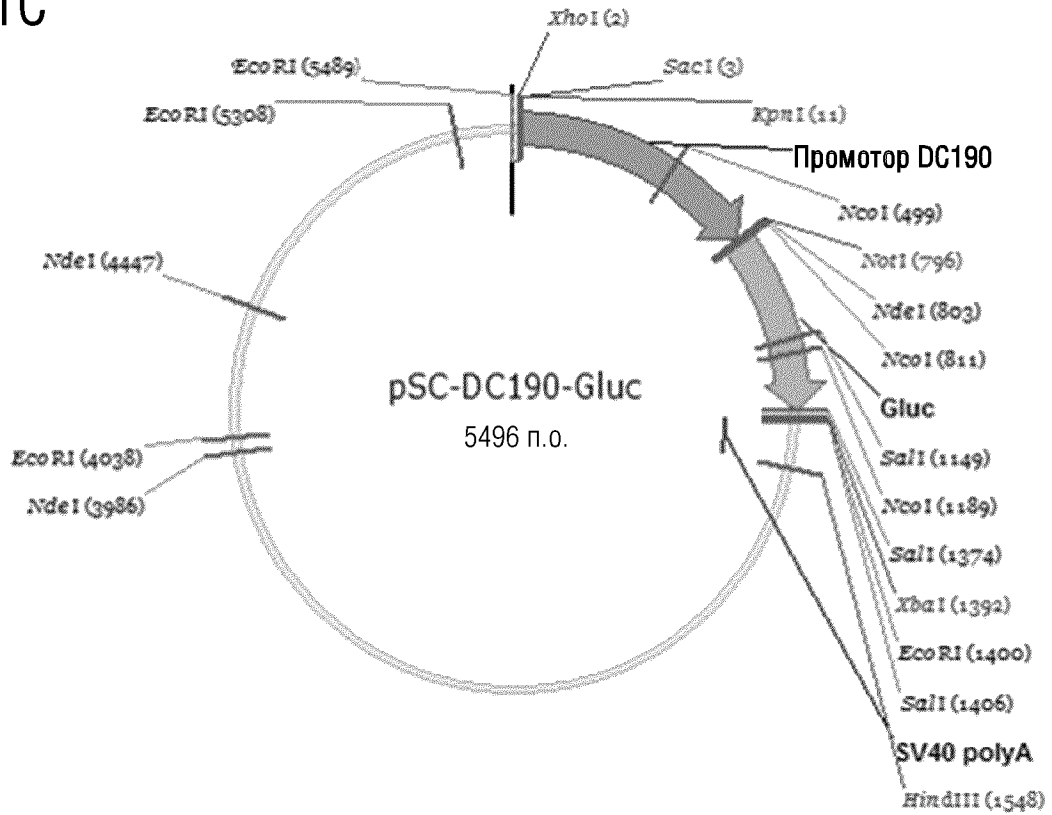
ФИГ.1А



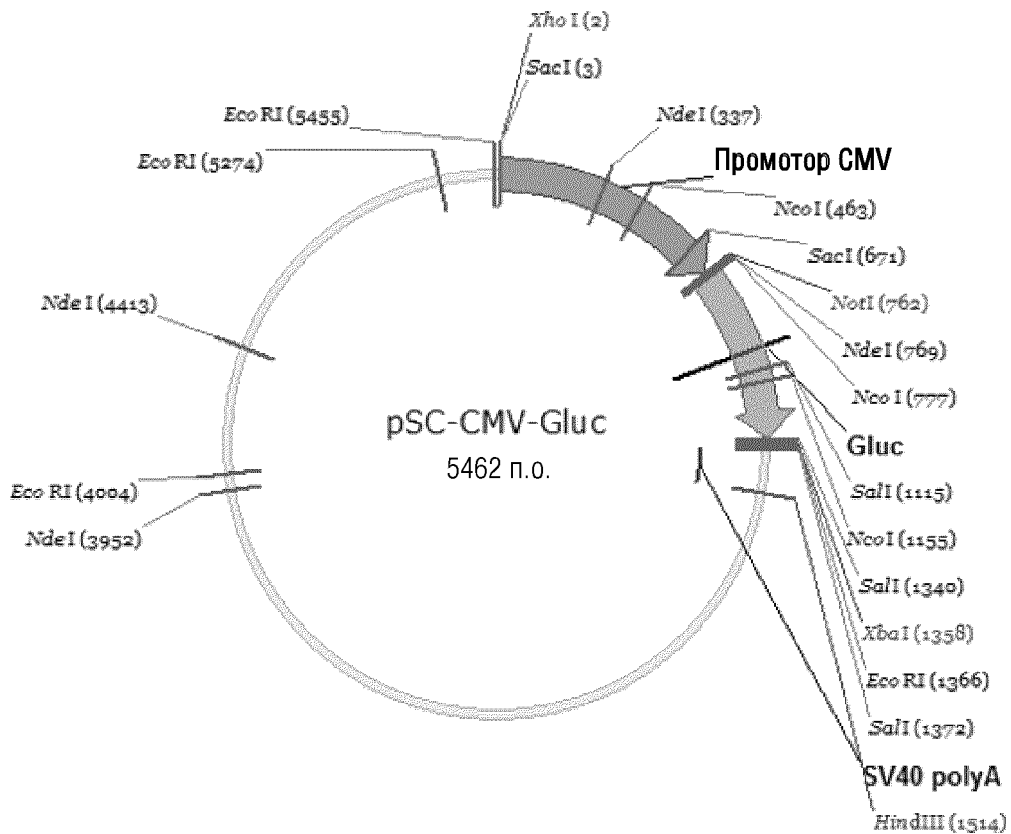
ФИГ.1В



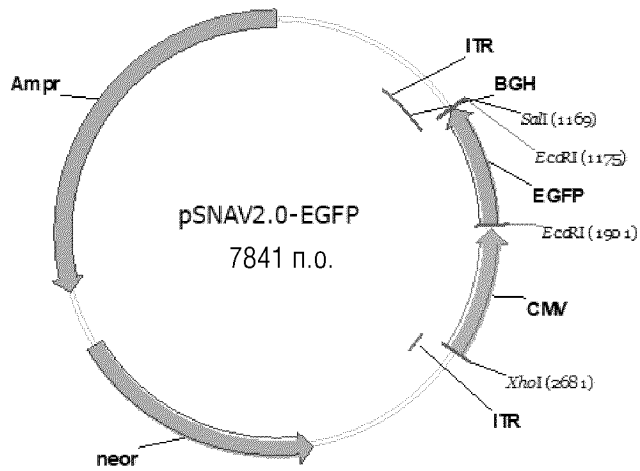
ФИГ.1С



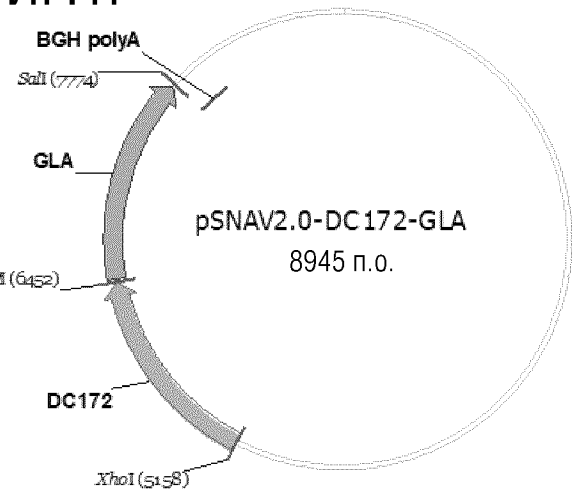
ФИГ.1D



ФИГ.1Е



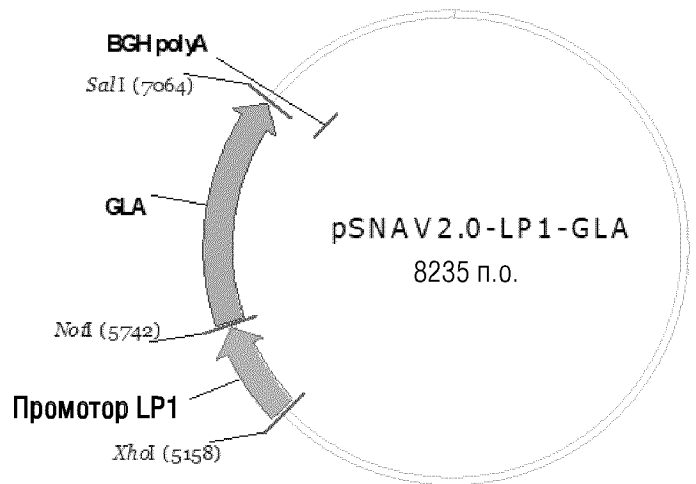
ФИГ.1F



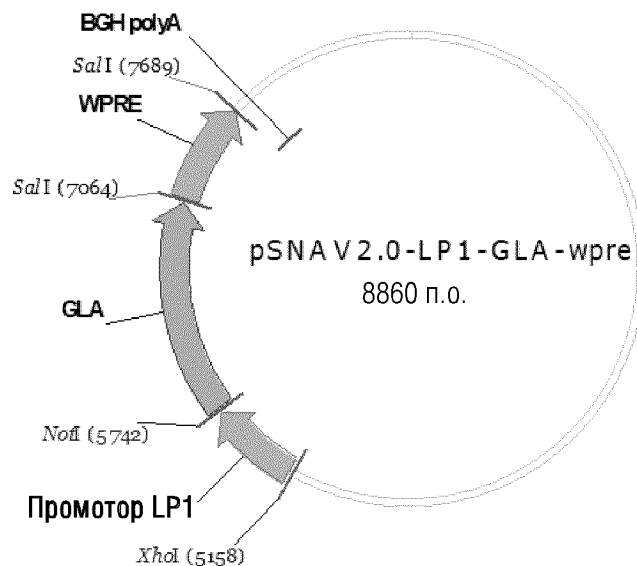
ФИГ.1G



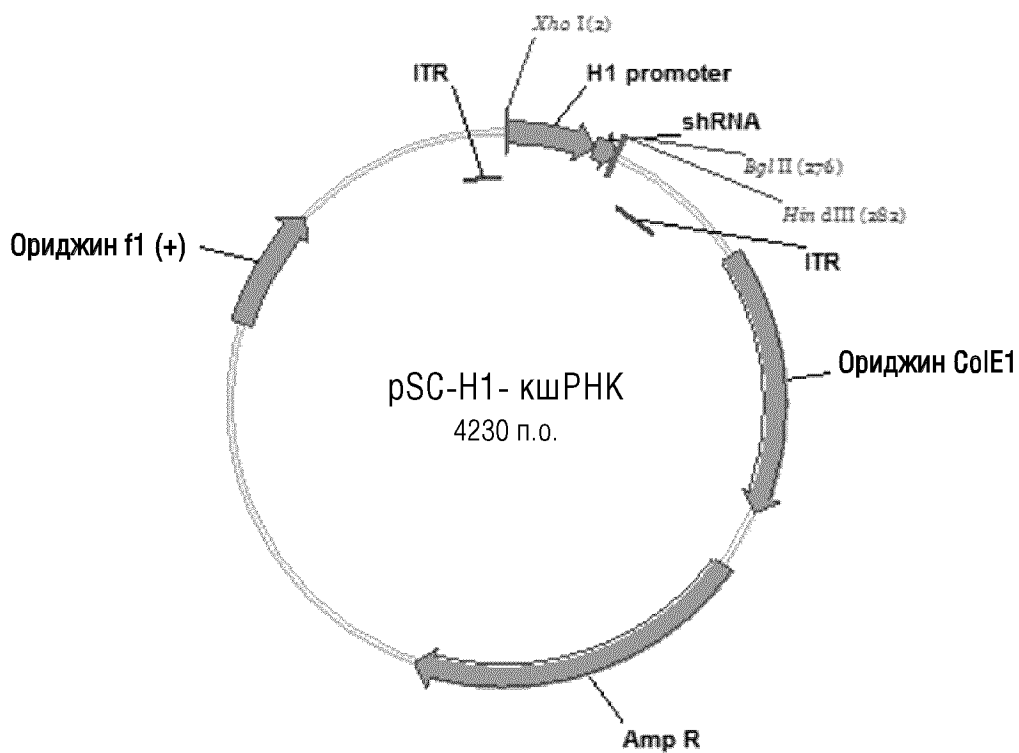
ФИГ.1H



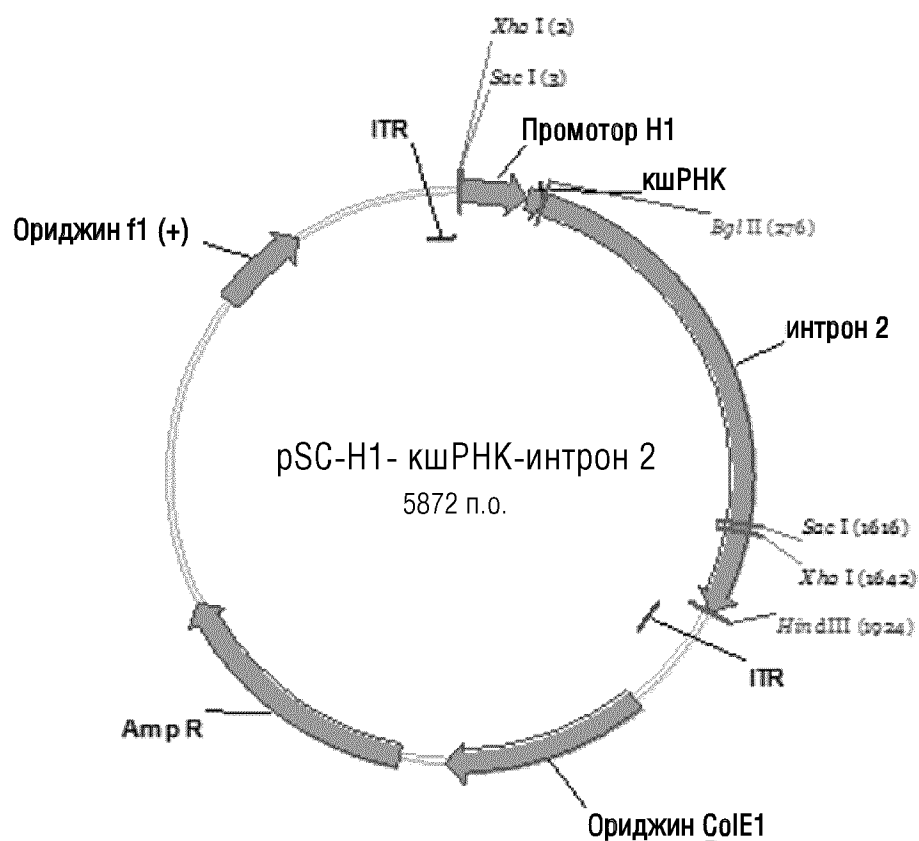
ФИГ.1I



ФИГ.2А

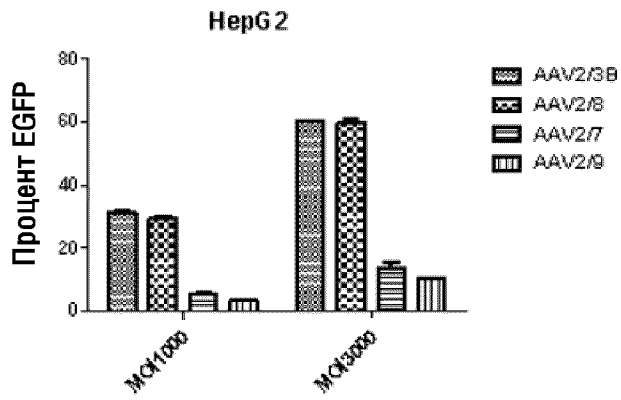


ФИГ.2В

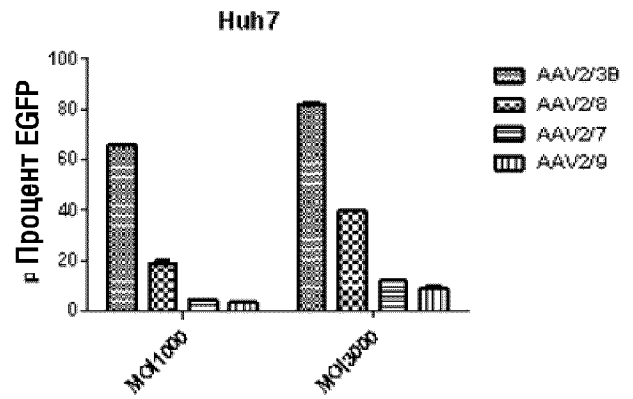




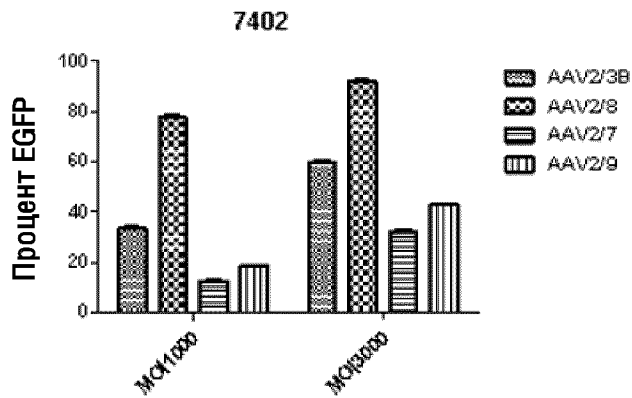
ФИГ.3А



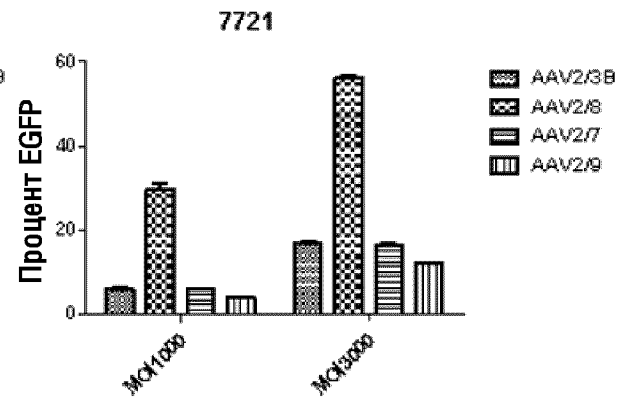
ФИГ.3В



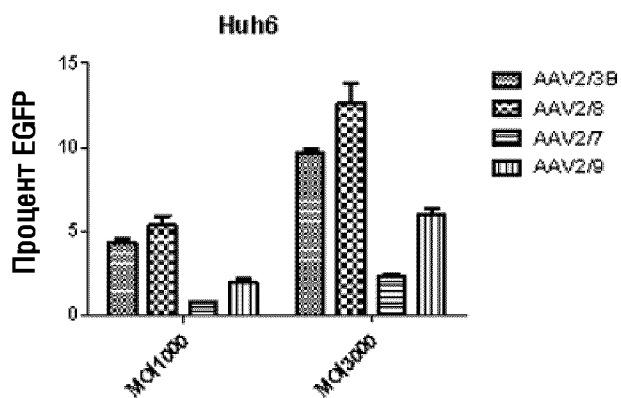
ФИГ.3С



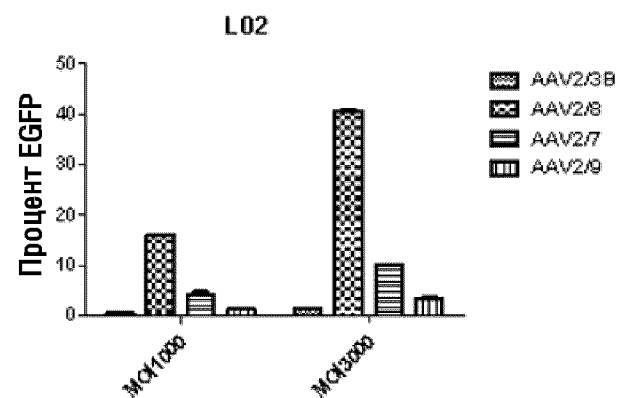
ФИГ.3D



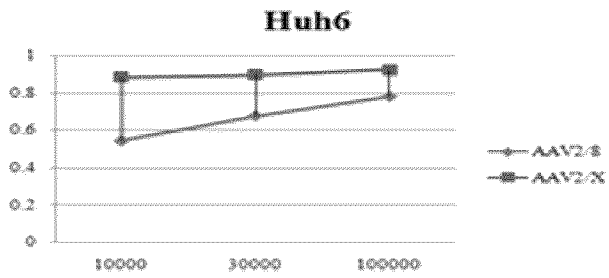
ФИГ.3Е



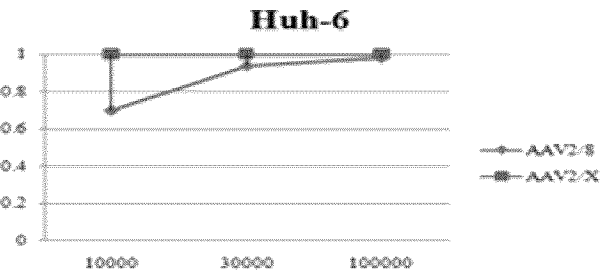
ФИГ.3F



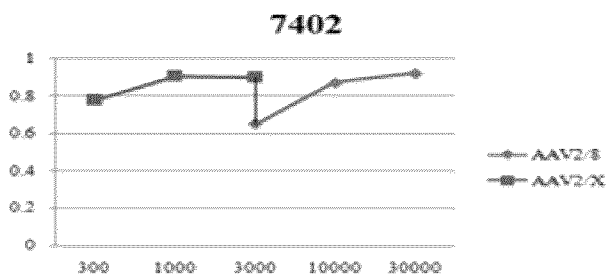
ФИГ.4А



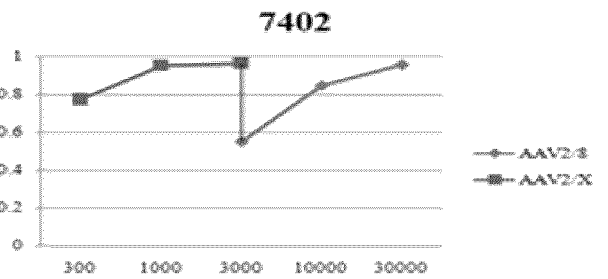
ФИГ.4В



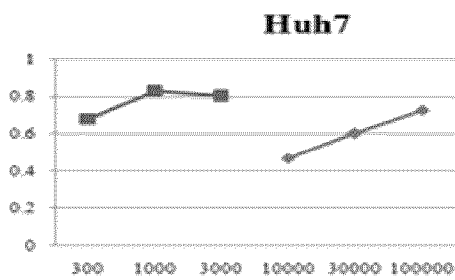
ФИГ.4С



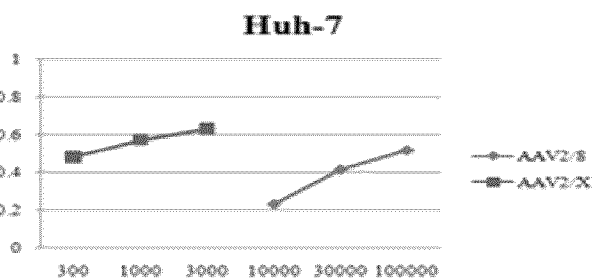
ФИГ.4D



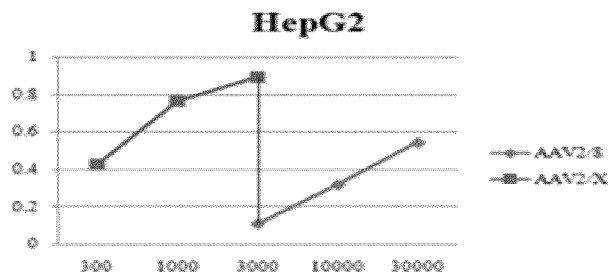
ФИГ.4Е



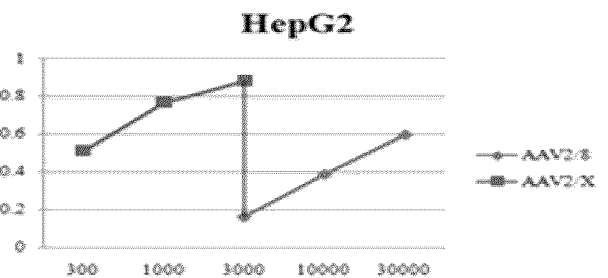
ФИГ.4F



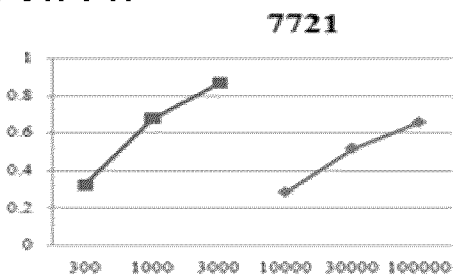
ФИГ.4G



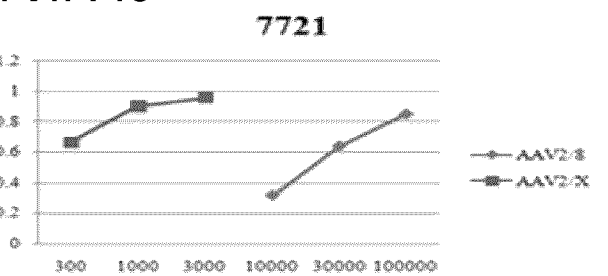
ФИГ.4H



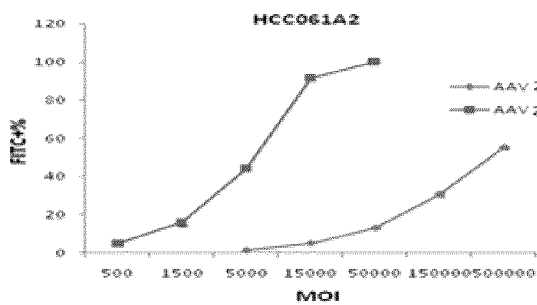
ФИГ.4I



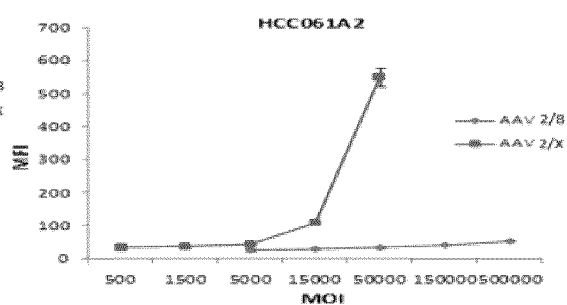
ФИГ.4J



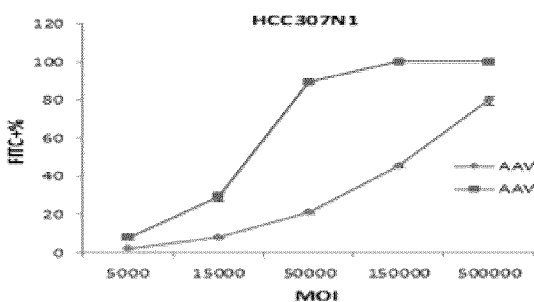
ФИГ.5А



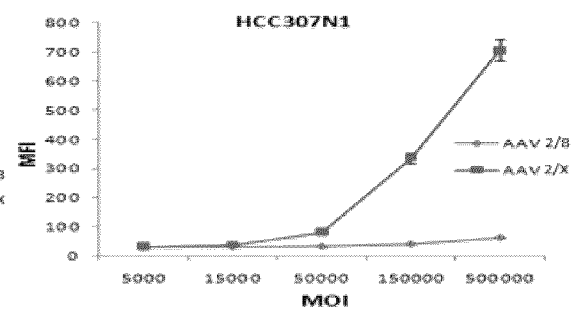
ФИГ.5В



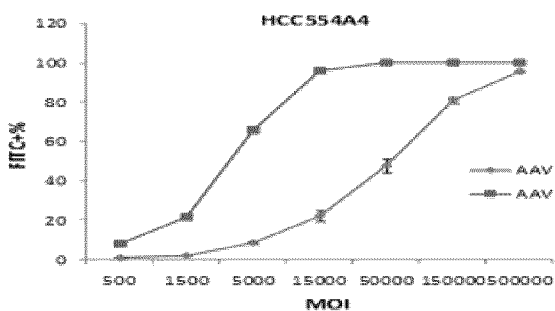
ФИГ.5С



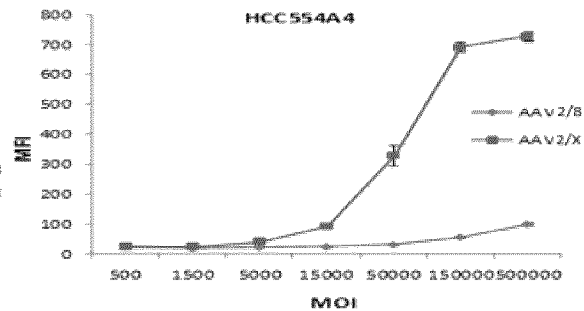
ФИГ.5D



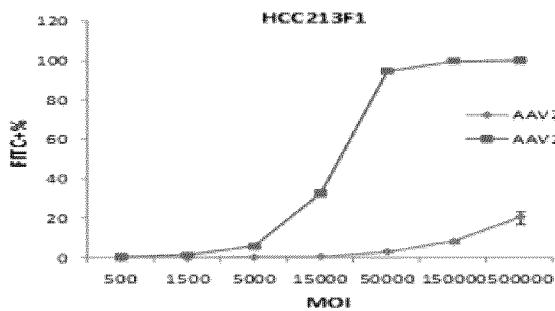
ФИГ.5Е



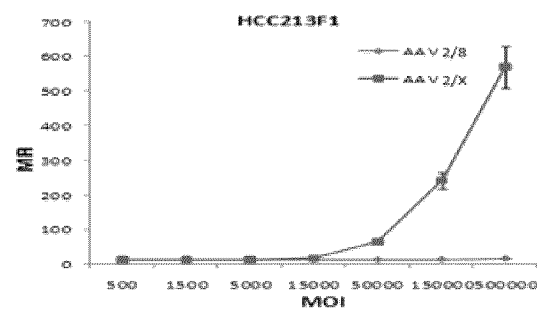
ФИГ.5F



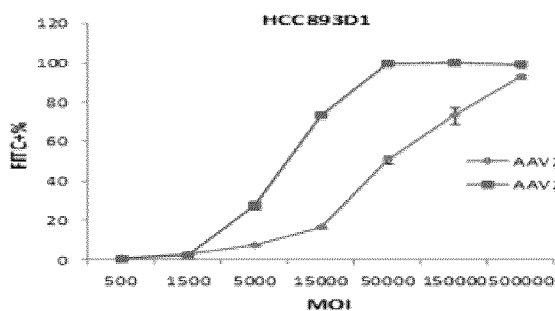
ФИГ.5G



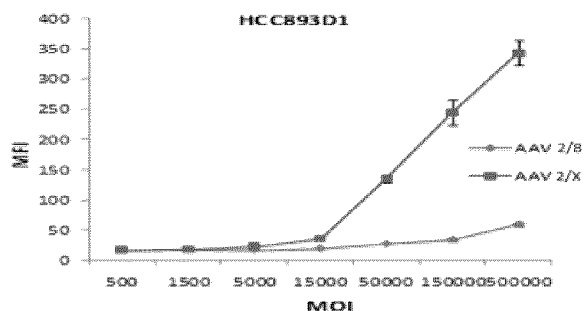
ФИГ.5H



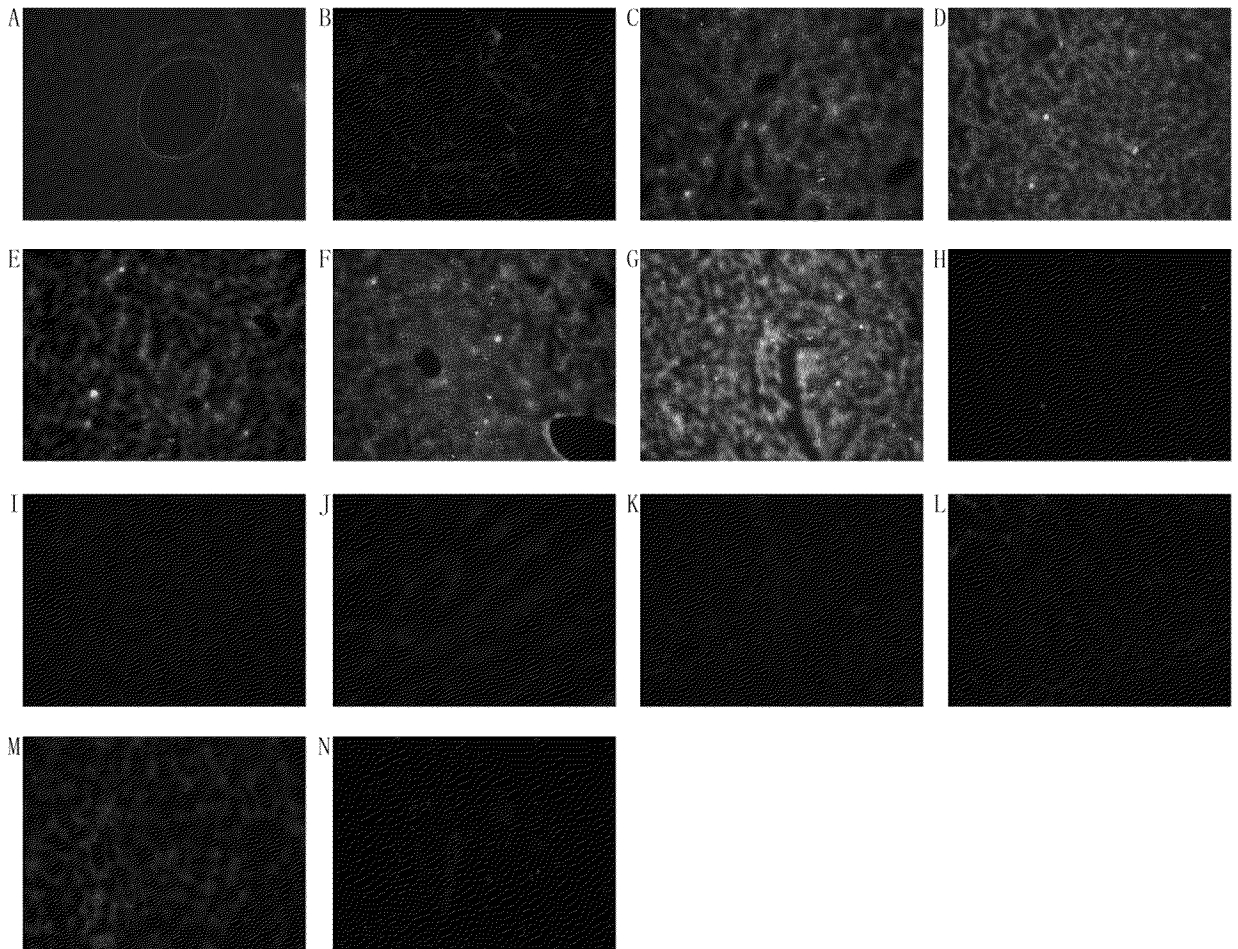
ФИГ.5I



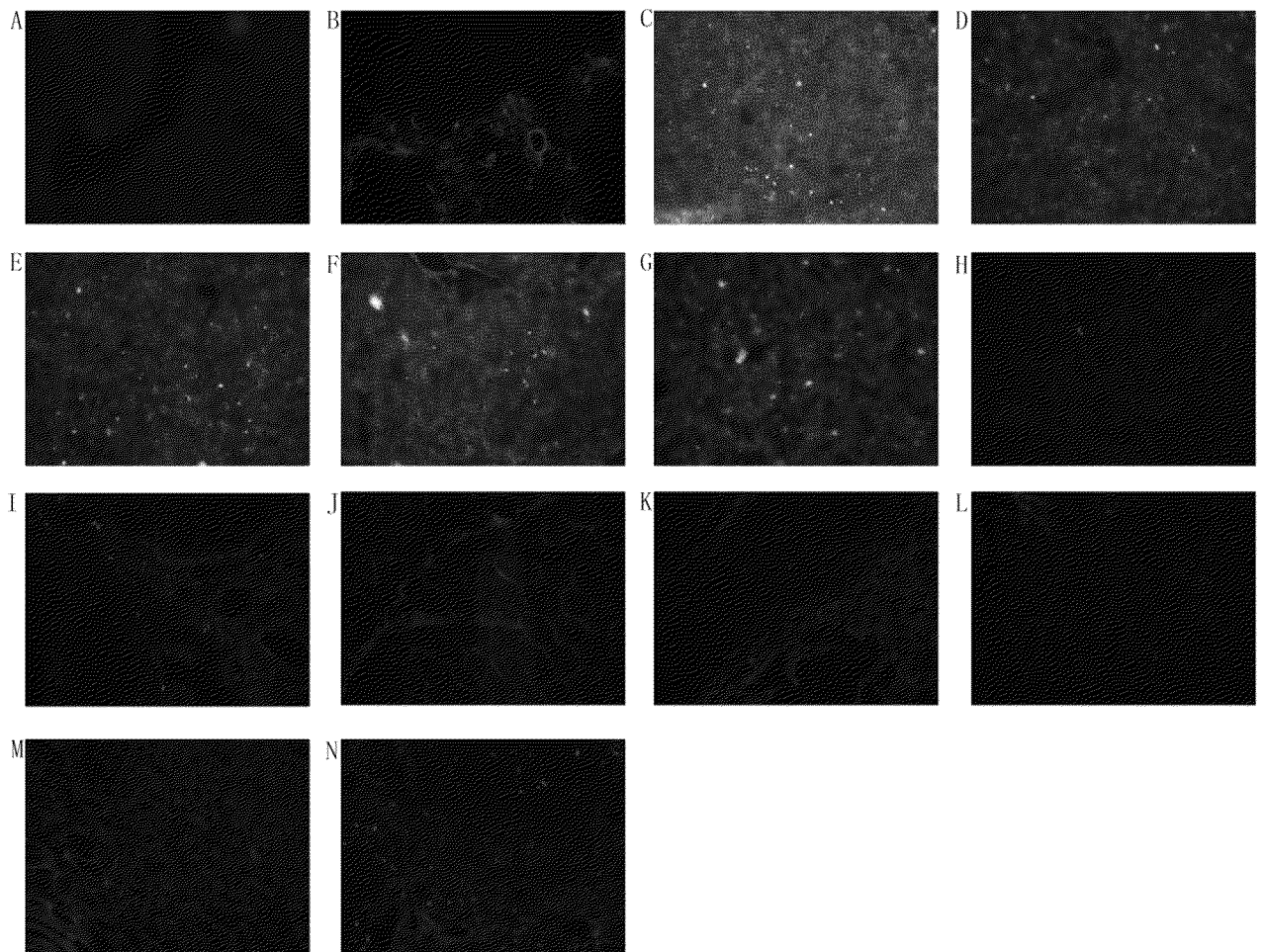
ФИГ.5J



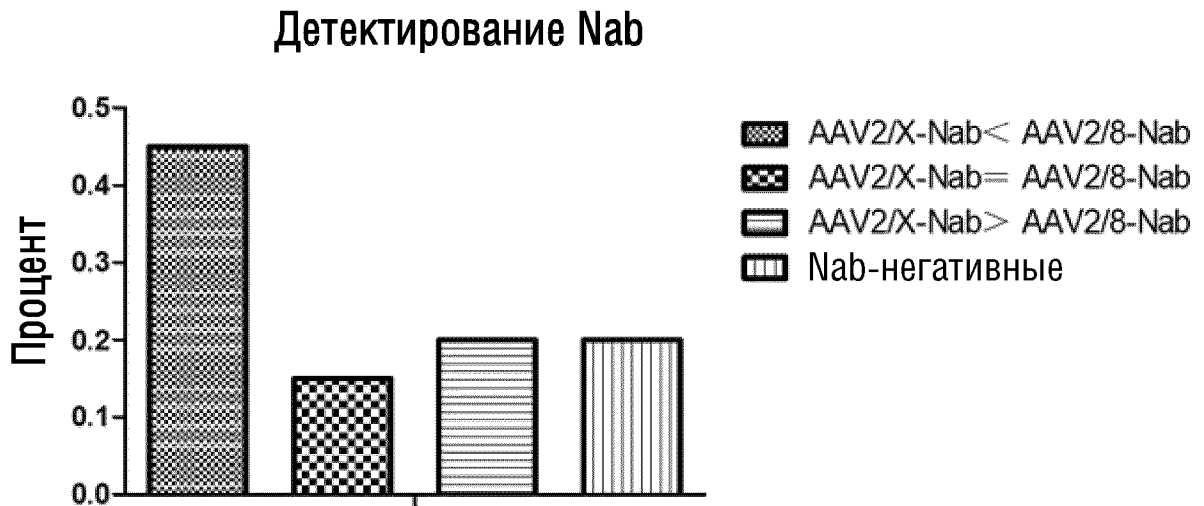
ФИГ.6



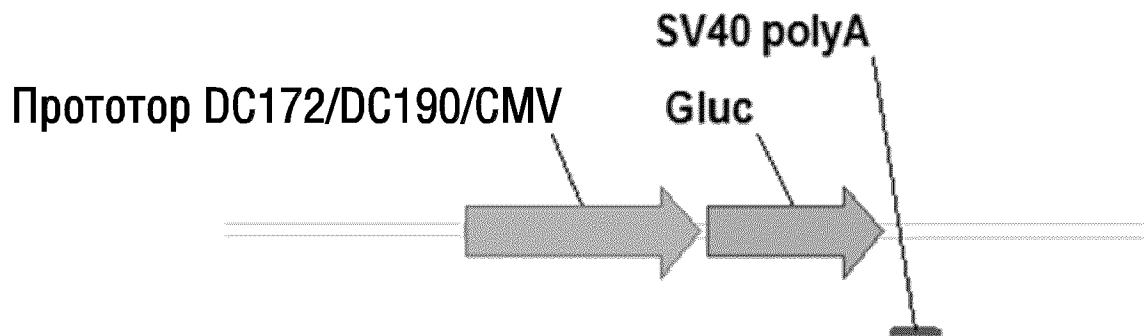
ФИГ.7



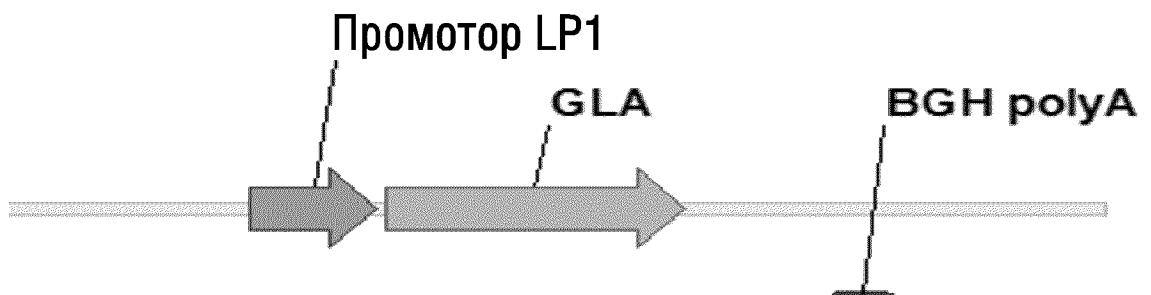
ФИГ.8



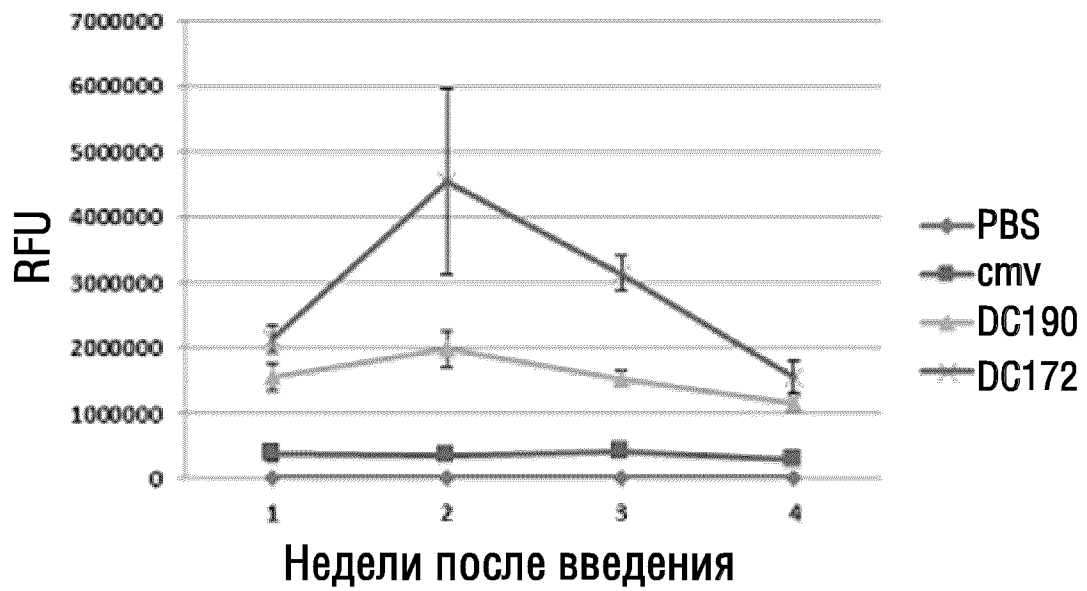
ФИГ.9А



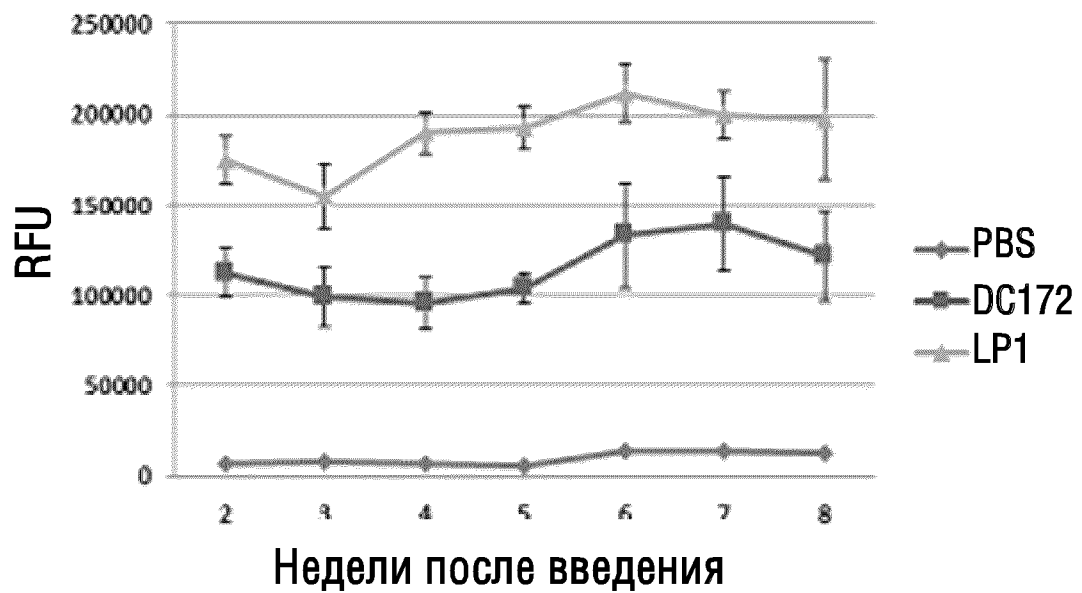
ФИГ.9В



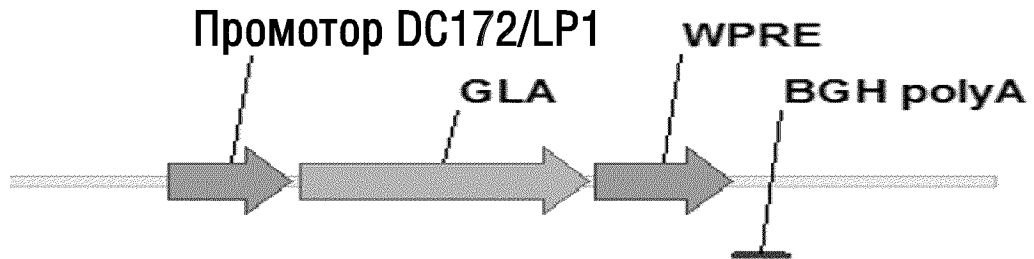
ФИГ.10А



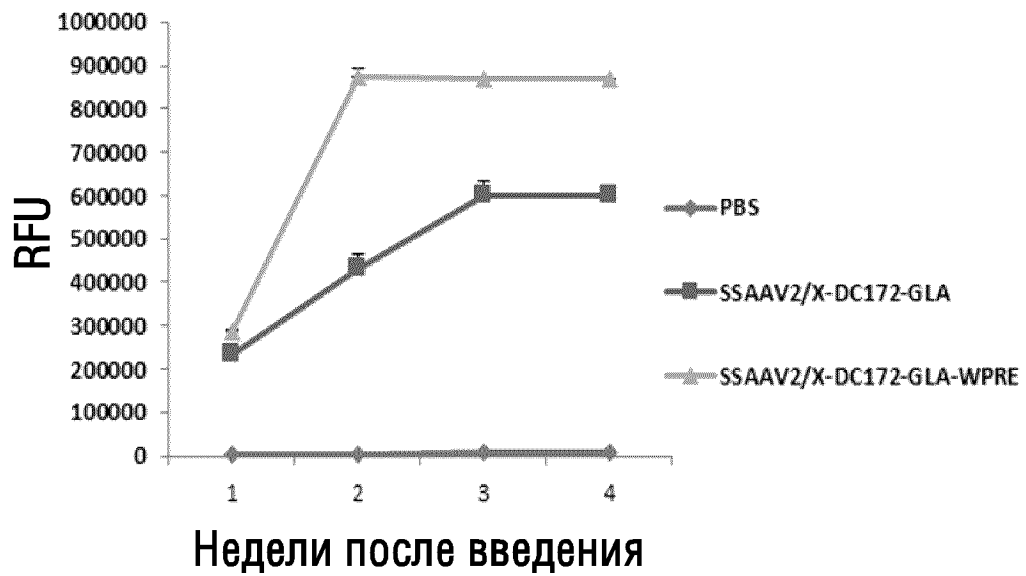
ФИГ.10В



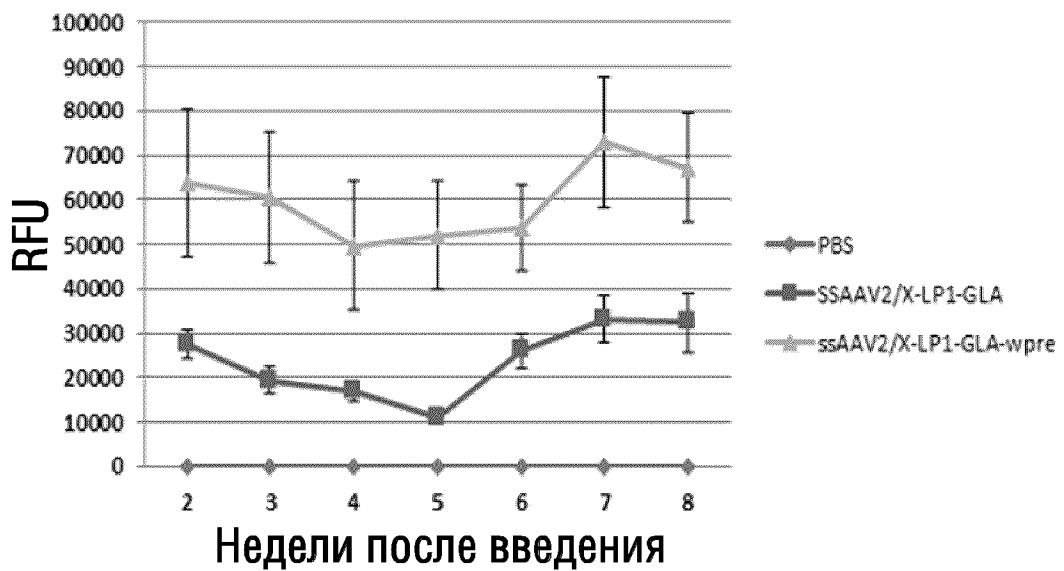
ФИГ.11



ФИГ.12А

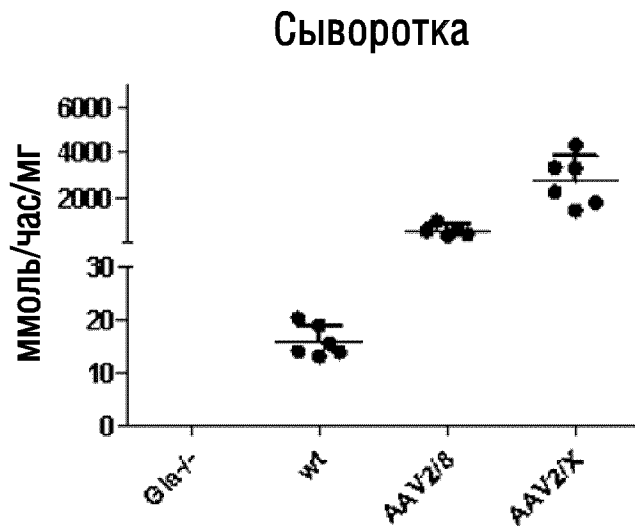


ФИГ.12В

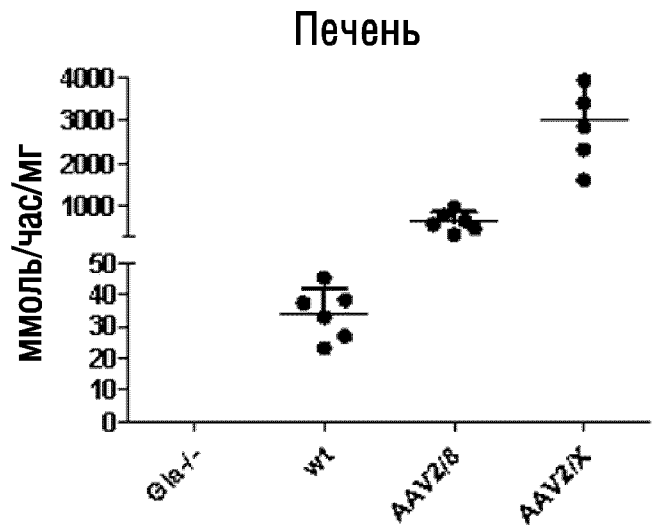




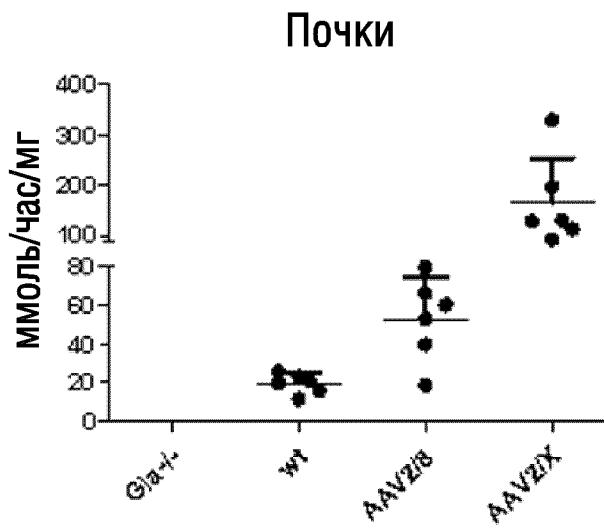
ФИГ.13А



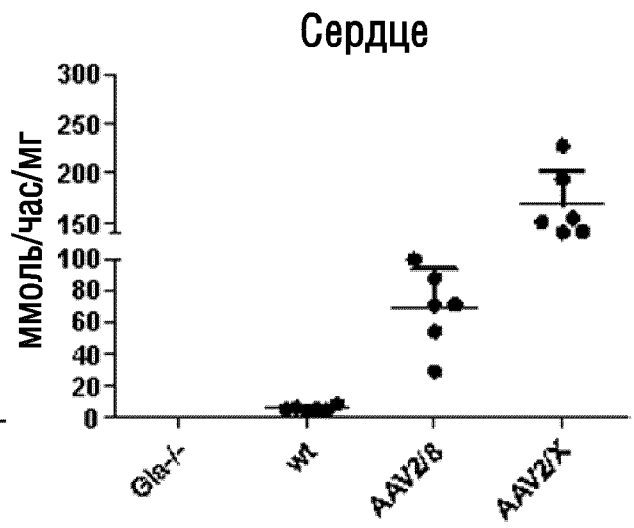
ФИГ.13В



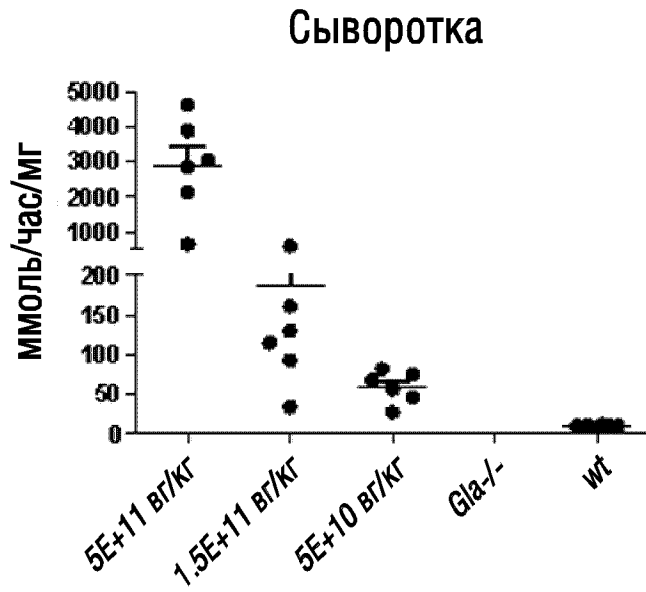
ФИГ.13С



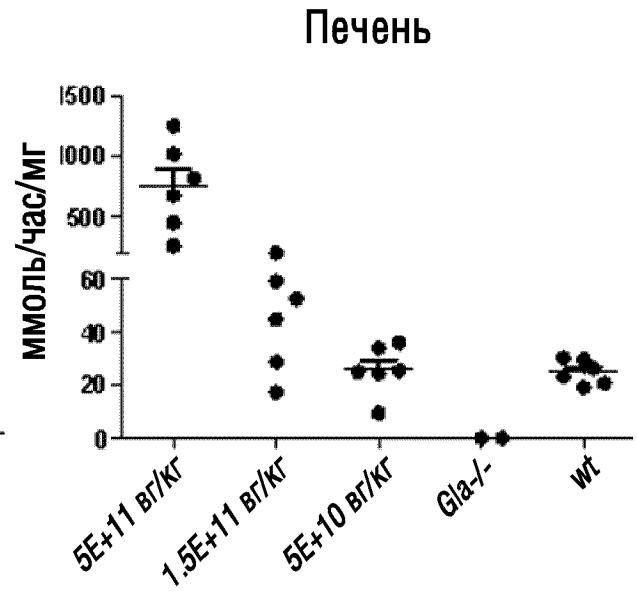
ФИГ.13D



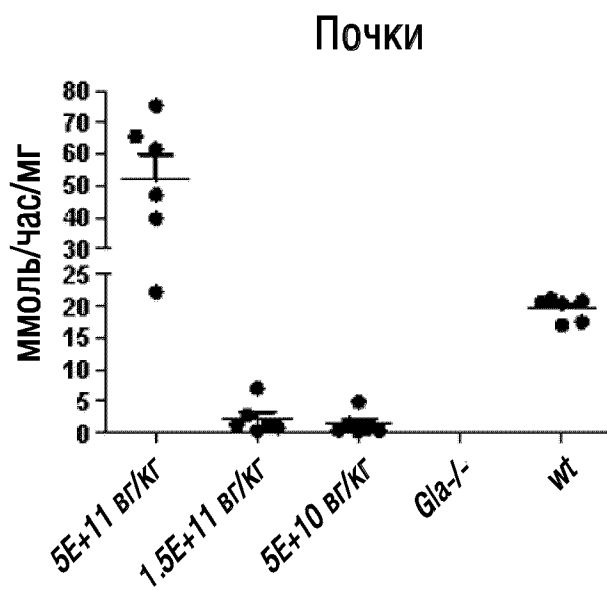
ФИГ.14А



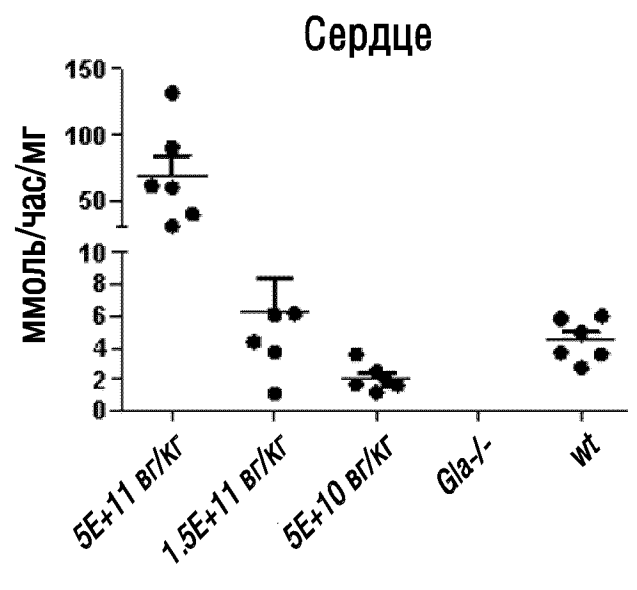
ФИГ.14В



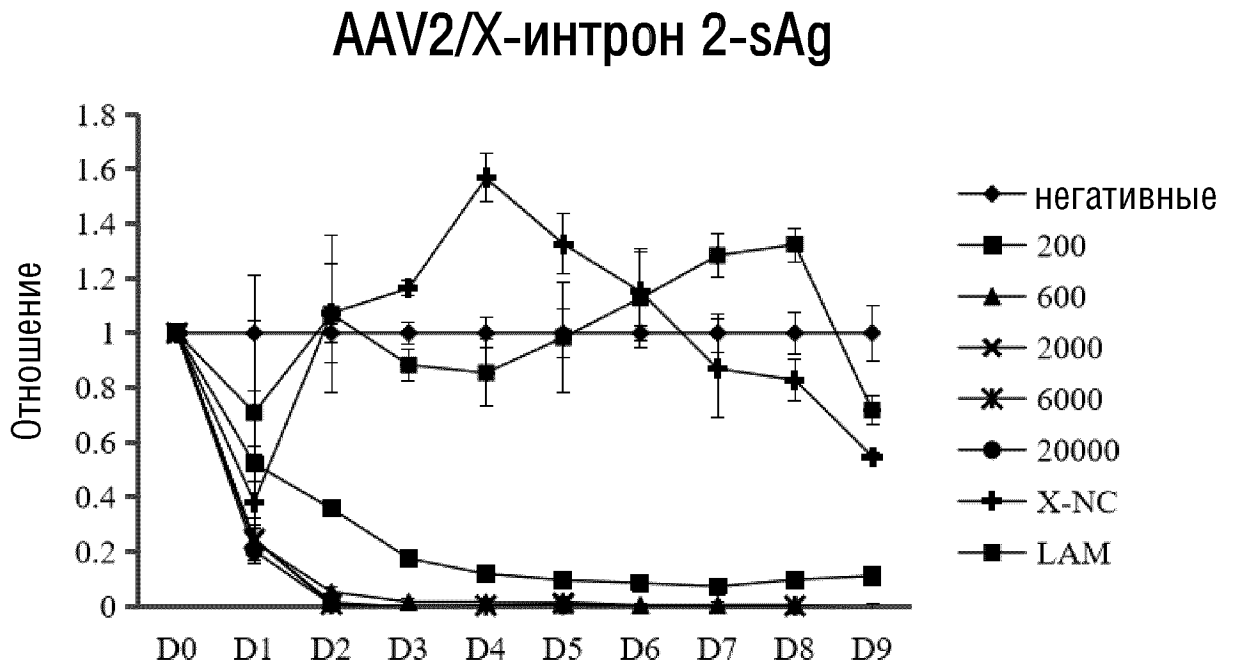
ФИГ.14С



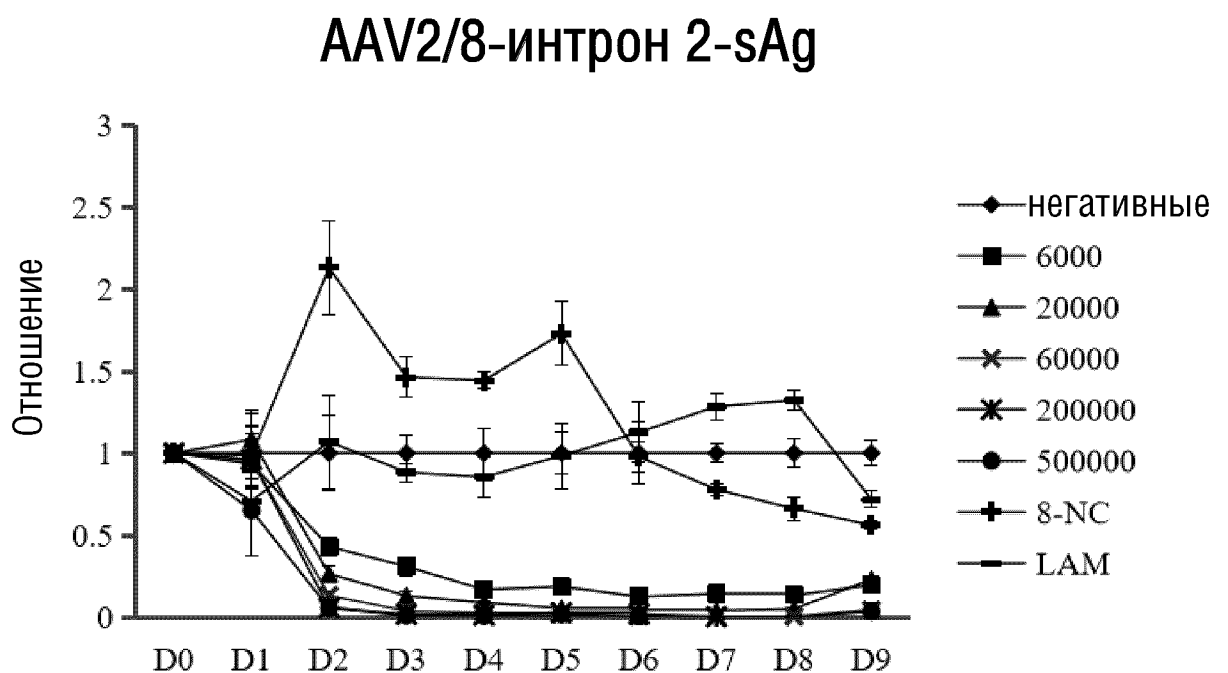
ФИГ.14D



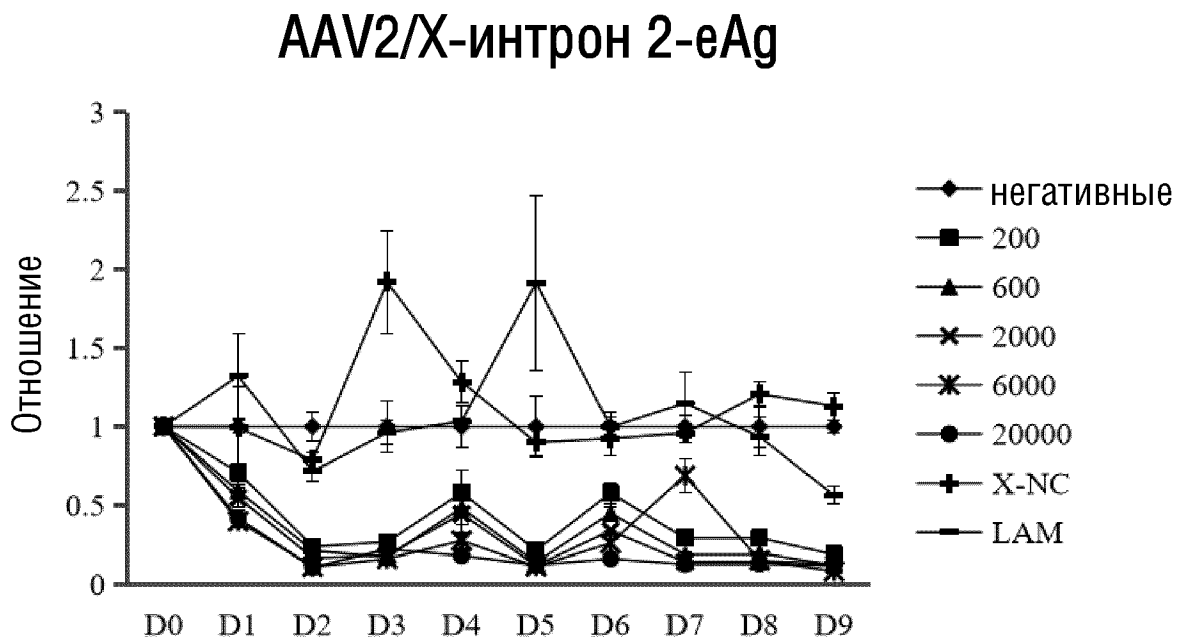
ФИГ.15А



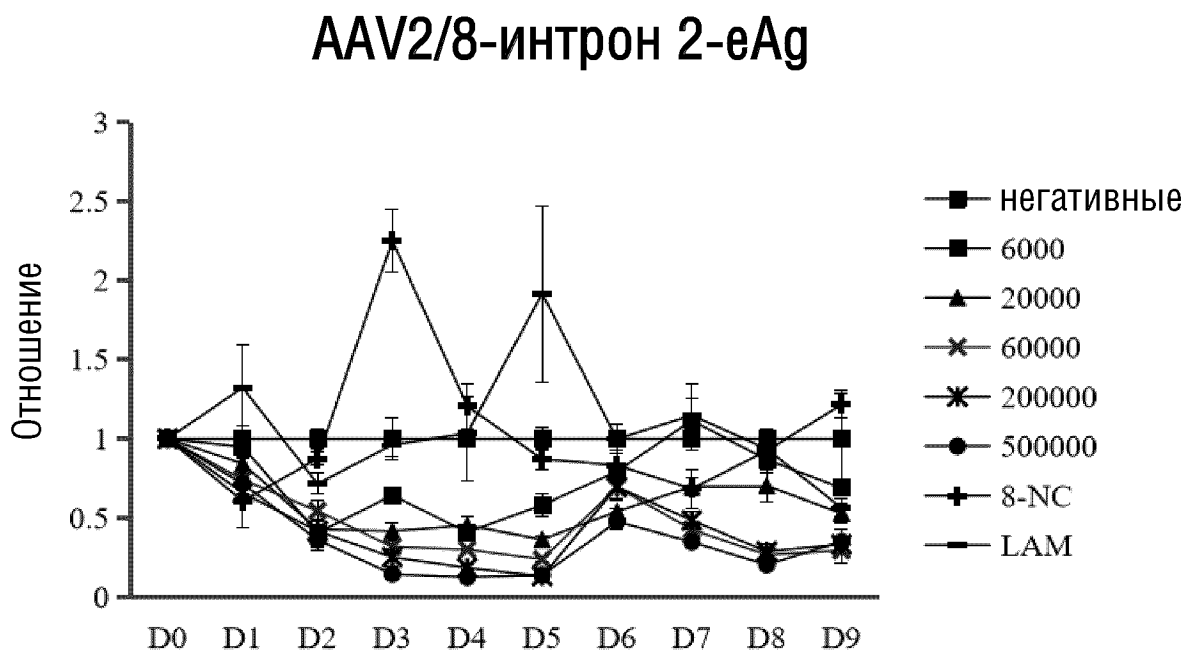
ФИГ.15В



ФИГ.16А

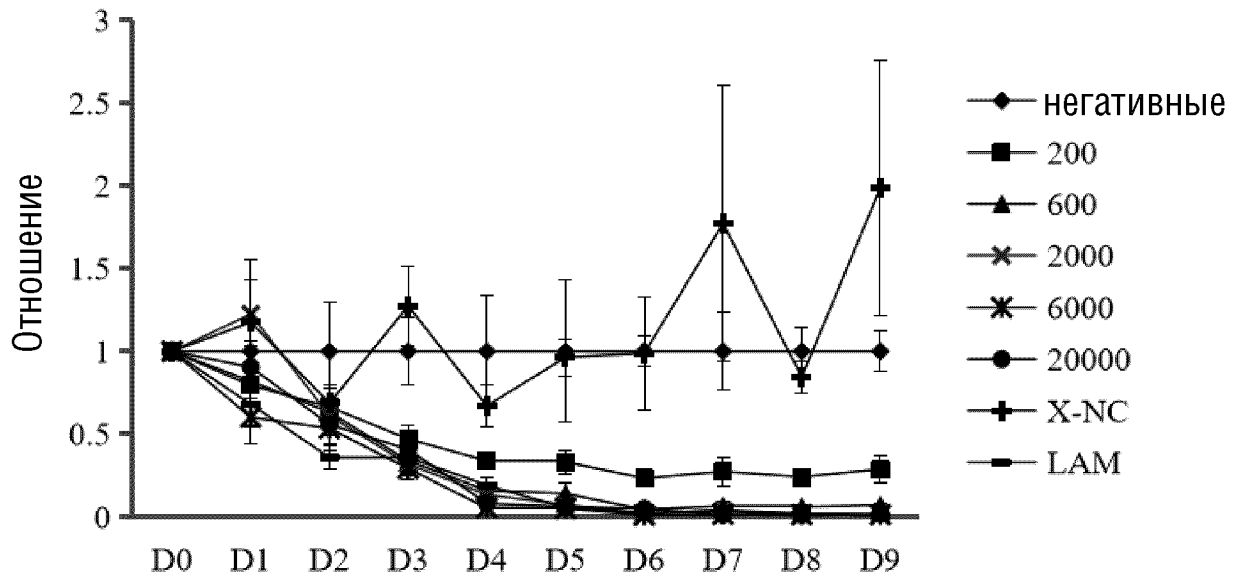


ФИГ.16В



ФИГ.17А

## AAV2/X-интрон 2-ДНК



ФИГ.17В

## AAV2/8-интрон 2-ДНК

