

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391857** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.12.29**

(51) Int. Cl. *C12N 15/861* (2006.01)  
*C07K 14/005* (2006.01)  
*C07K 14/015* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.10.13**

---

(54) **РАЗРАБОТКА КАПСИДОВ AAV**

---

(31) **62/408,022; 62/417,756; 62/486,642**

(32) **2016.10.13; 2016.11.04; 2017.04.18**

(33) **US**

(62) **201990955; 2017.10.13**

(71) Заявитель:  
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
МАССАЧУСЕТТС (US)**

(72) Изобретатель:

**Гао Гуанпин, Сюй Гуанчао, Тай  
Филлип (US), Вей Юйцюань (CN), Люо  
Ли (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.  
(RU)**

---

(57) В соответствии с некоторыми аспектами настоящее изобретение относится к рекомбинантным аденоассоциированным вирусам, характеризующимся способностями нацеливаться на различные ткани. В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к способам переноса генов с помощью рекомбинантных аденоассоциированных вирусов. В соответствии с некоторыми аспектами настоящее изобретение относится к выделенным капсидным белкам AAV и выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим их.

---

**A2**

**202391857**

**202391857**

**A2**

## РАЗРАБОТКА КАПСИДОВ AAV

### ОПИСАНИЕ

5

#### **Связанные заявки**

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет согласно § 119(e) Раздела 35 Кодекса США в соответствии с датой подачи предварительных заявок США с серийными номерами USSN № 62/486642, поданной 18 апреля 2017 года, под названием «Разработка капсидов AAV», № 62/417756, поданной 4 ноября 2016 года, под названием «Разработка капсидов AAV» и № 62/408022, поданной 13 октября 2016 года, под названием «Разработка капсидов AAV», полное содержание каждой заявки включено в данный документ посредством ссылки.

#### **Область настоящего раскрытия**

Настоящее раскрытие в соответствии с некоторыми аспектами относится к выделенным нуклеиновым кислотам, композициям и наборам для идентификации аденоассоциированных вирусов в клетках. В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрены новые AAV и способы их применения, а также связанные с ними наборы.

#### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы AAV (rAAV) способны управлять стабильной и длительной экспрессией трансгенов в целевых тканях без видимой токсичности и иммуногенности для хозяина. Таким образом, rAAV представляют собой перспективные системы доставки для длительной терапевтической экспрессии генов. В то же время низкая эффективность трансдукции и ограниченные тканевые тропизмы со стороны доступных в настоящее время векторов на основе rAAV могут ограничивать их применение в качестве целесообразных и эффективных видов терапии. Кроме этого, надежный переход к клиническому применению основных терапевтических серотипов AAV, происходящих из не принадлежащих человеку тканей, представляет собой проблему. Соответственно, остается потребность в новых векторах на основе AAV для доставки генов.

#### **Краткое описание настоящего изобретения**

Настоящее раскрытие в соответствии с некоторыми аспектами относится к новым AAV для применений в области генной терапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления AAV, описанные в данном документе, содержат аминокислотные вариации в одном или нескольких капсидных белках, которые придают новые или усиленные свойства в отношении тканевых тропизмов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в данном документе были идентифицированы и раскрыты варианты AAV2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) и AAV8, которые обладают пригодными свойствами целенаправленного воздействия на ткани. Например, предусмотрены варианты AAV8, которые пригодны для трансдукции клеток, таких как гепатоциты человека (например, присутствующие в ткани печени), клетки центральной нервной системы (клетки ЦНС) и др. Предусмотрены варианты AAV2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) и AAV8, которые в соответствии с некоторыми вариантами осуществления пригодны для целенаправленного воздействия на клетки ткани глаза (например, глаз), желудочно-кишечного тракта, дыхательной системы, ткани молочной железы, ткани поджелудочной железы, ткани мочевыводящих путей, ткани матки, ткани, ассоциированной с определенными видами рака (например, рака молочной железы, рака предстательной железы и др.) и других тканей. В некоторых вариантах осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, целенаправленно воздействуют на ткань, отличную от ткани, на которую происходит целенаправленное воздействие соответствующими AAV дикого типа.

В настоящем раскрытии в соответствии с некоторыми аспектами предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1-409, 435-868 и 1726-1988, который кодирует капсидный белок AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрен фрагмент выделенной нуклеиновой кислоты. В соответствии с определенными вариантами осуществления фрагмент выделенной нуклеиновой кислоты не кодирует пептид, который является идентичным последовательности любой из SEQ ID NO: 869, 870 или 871.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 410-434, 876-1718 и 1989-2251. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеиновая кислота кодирует капсидный белок AAV или его вариант, и/или белок, активирующий сборку (AAP) AAV, или его вариант. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления AAP находится в другой открытой рамке считывания нуклеиновой кислоты, чем капсидный белок AAV. В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления AAV представляет собой AAV AAV2 (AAV-2) или его вариант.

В настоящем раскрытии в соответствии с некоторыми аспектами предусмотрен выделенный капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1-409, 435-868 и 1726-1988. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный капсидный белок AAV содержит последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 1-409, 837-852 или 1726-1814, при этом аминокислота последовательности, которая не является идентичной соответствующей аминокислоте последовательности, изложенной в виде SEQ ID NO: 869, замещена консервативной заменой.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрены гибридные капсидные белки AAV2/3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный капсидный белок AAV содержит последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 435-628 и 1815-1988, при этом аминокислота последовательности, которая не является идентичной соответствующей аминокислоте последовательности, изложенной в виде SEQ ID NO: 869 или 870, замещена консервативной заменой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенный капсидный белок AAV содержит последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 629-836 или 853-868, при этом аминокислота последовательности, которая не является идентичной соответствующей аминокислоте последовательности, изложенной в виде SEQ ID NO: 871, замещена консервативной заменой.

В соответствии с определенными аспектами настоящего раскрытия предусмотрена композиция, которая содержит любой из вышеизложенных капсидных белков AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрена композиция из одного или нескольких выделенных капсидных белков AAV по настоящему раскрытию и физиологически совместимого носителя.

В соответствии с определенными аспектами настоящего раскрытия предусмотрен рекомбинантный AAV (rAAV), который содержит любой из вышеизложенных капсидных белков AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрена композиция, содержащая rAAV. В соответствии с определенными вариантами осуществления композиция, содержащая rAAV, дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Также предусмотрен рекомбинантный AAV, при

этом рекомбинантный AAV содержит один или несколько выделенных капсидных белков AAV по настоящему раскрытию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия предусмотрена клетка-хозяин, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 410-434, 876-1718 и 1989-2251, которая функционально связана с промотором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрена композиция, содержащая клетку-хозяина и стерильную среду для культивирования клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрена композиция, содержащая клетку-хозяина и криоконсервант.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящего раскрытия предусмотрен способ доставки трансгена субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает введение любого из вышеизложенных гAAV субъекту, при этом гAAV содержит по меньшей мере один трансген и при этом гAAV инфицирует клетки целевой ткани субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекта выбирают из мыши, крысы, кролика, собаки, кошки, овцы, свиньи и отличного от человека примата. В соответствии с одним вариантом осуществления субъект представляет собой человека.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по меньшей мере один трансген представляет собой ген, кодирующий белок. В соответствии с определенными вариантами осуществления по меньшей мере один трансген кодирует малую интерферирующую нуклеиновую кислоту. В соответствии с определенными вариантами осуществления малая интерферирующая нуклеиновая кислота представляет собой miRNA. В соответствии с определенными вариантами осуществления малая интерферирующая нуклеиновая кислота представляет собой «губку» miRNA или РНК TuD, которая ингибирует активность по меньшей мере одной miRNA у субъекта. В соответствии с определенными вариантами осуществления miRNA экспрессируется в клетке целевой ткани. В соответствии с определенными вариантами осуществления целевая ткань представляет собой ткань печени, центральной нервной системы (ЦНС), глаза, желудочно-кишечного тракта, дыхательной системы, молочной железы, поджелудочной железы, мочевыводящих путей или матки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген экспрессирует транскрипт, который содержит по меньшей мере один сайт связывания с miRNA, при этом miRNA ингибирует активность трансгена в ткани, отличной от целевой ткани, в результате гибридизации со связывающим сайтом.

В соответствии с определенными вариантами осуществления гAAV вводят субъекту внутривенно, трансдермально, интраокулярно, интратекально, интрацеребрально, перорально, внутримышечно, подкожно, интраназально или путем ингаляции.

5 В соответствии с некоторыми аспектами настоящего раскрытия предусмотрен способ получения соматической трансгенной животной модели. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает введение любого из вышеизложенных гAAV отличному от человека животному, при этом гAAV содержит по меньшей мере один трансген и при этом гAAV инфицирует клетки целевой ткани отличного от человека животного.

10 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген представляет собой по меньшей мере один ген, кодирующий белок. В соответствии с определенными вариантами осуществления трансген кодирует по меньшей мере одну малую интерферирующую нуклеиновую кислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген кодирует по меньшей мере одну репортерную молекулу. В соответствии с определенными вариантами осуществления малая интерферирующая нуклеиновая кислота представляет собой miRNA. В соответствии с определенными вариантами осуществления малая интерферирующая нуклеиновая кислота представляет собой «губку» miRNA или РНК TuD, которая ингибирует активность по меньшей мере одной miRNA у животного. В соответствии с определенными вариантами осуществления miRNA экспрессируется в клетке целевой ткани. В соответствии с определенными вариантами осуществления целевая ткань представляет собой ткань печени, центральной нервной системы (ЦНС), глаза, желудочно-кишечного тракта, дыхательной системы, молочной железы, поджелудочной железы, мочевыводящих путей или матки.

25 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген экспрессирует транскрипт, который содержит по меньшей мере один сайт связывания с miRNA, при этом miRNA ингибирует активность трансгена в ткани, отличной от целевой ткани, в результате гибридизации со связывающим сайтом.

30 В соответствии с некоторыми аспектами настоящего раскрытия предусмотрены способы получения соматической трансгенной животной модели, которые предусматривают введение любого из вышеизложенных гAAV отличному от человека животному, при этом гAAV содержит по меньшей мере один трансген, при этом трансген экспрессирует транскрипт, который содержит по меньшей мере один сайт связывания miRNA, при этом miRNA ингибирует активность трансгена в ткани, отличной от целевой ткани, в результате гибридизации с сайтом связывания транскрипта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген содержит тканеспецифичный промотор или индуцибельный промотор. В соответствии с определенными вариантами осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой печень-специфичный промотор гена глобулина сыворотки крови, связывающего тироксин (TBG), промотор гена инсулина, промотор гена глюкагона, промотор гена соматостатина, промотор гена муцина-2, промотор гена панкреатического полипептида (PPY), промотор гена синапсина-1 (Syn), промотор гена ретиношизина, промотор гена K12, промотор гена CC10, промотор гена белка сурфактанта С (SP-C), промотор гена PRC1, промотор гена RRM2, промотор гена уроплакина 2 (UPII) или промотор гена лактоферрина.

В соответствии с определенными вариантами осуществления rAAV вводят животному внутривенно, трансдермально, интраокулярно, интратекально, перорально, внутримышечно, подкожно, интраназально или путем ингаляции. В соответствии с некоторыми аспектами настоящего раскрытия предусмотрена соматическая трансгенная животная модель, которую получают в результате любого из вышеизложенных способов.

В соответствии с другими аспектами настоящего раскрытия предусмотрен набор для получения rAAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления набор содержит контейнер, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность из любой SEQ ID NO: 410-434, 876-1718 и 1989-2251. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления набор содержит контейнер, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, имеющий последовательность из любой SEQ ID NO: 1-409, 435-868 или 1726-1988. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления набор дополнительно содержит инструкции для получения rAAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления набор дополнительно содержит по меньшей мере один контейнер, содержащий рекомбинантный вектор AAV, при этом рекомбинантный вектор AAV содержит трансген.

В соответствии с другими аспектами настоящего раскрытия предусмотрен набор, содержащий рекомбинантный AAV, имеющий любой из вышеизложенных капсидных белков AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления контейнер набора представляет собой шприц.

В соответствии с другими аспектами настоящего раскрытия относится к применению векторов на основе AAV в виде средств, например, для доставки генов, терапевтических, профилактических и исследовательских целей, а также разработки соматических трансгенных животных моделей.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к серотипам AAV, которые продемонстрировали тропизм в отношении других тканей/клеток, и которые могут достигать стабильного сматического переноса генов в животные ткани при уровнях, аналогичных таковым аденовирусных векторов (например, вплоть до 100% *in vivo* тканевой трансдукции в зависимости от целевой ткани и дозы векторов) в отсутствие связанной с векторами токсичности. В соответствии с другими аспектами настоящее раскрытие относится к серотипам AAV, имеющим специфические способности целенаправленно воздействовать на ткани печени, центральной нервной системы (ЦНС), глаза, желудочно-кишечного тракта, дыхательной системы, молочной железы, поджелудочной железы, мочевыводящих путей или матки. Эти ткани ассоциированы с широким спектром заболеваний человека, в том числе неврологических, метаболических, диабетических заболеваний, заболеваний глаз, дыхательной системы, желудочно-кишечного тракта, мочевыводящих путей и репродуктивной системы, а также определенных видов рака.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV содержит по меньшей мере один трансген. Трансген может быть таковым, который вызывает патологическое состояние. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген кодирует белок, который приводит к лечению патологического состояния.

В соответствии с другим аспектом новые AAV по настоящему раскрытию могут быть использованы для доставки трансгена субъекту. Способ осуществляют в результате введения гAAV по настоящему раскрытию субъекту, при этом гAAV содержит по меньшей мере один трансген. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV целенаправленно воздействует на предварительно определенную ткань субъекта.

В соответствии с другим аспектом AAV по настоящему раскрытию могут быть использованы в способе получения соматической трансгенной животной модели. Способ осуществляют в результате введения гAAV по настоящему раскрытию животному, при этом гAAV содержит по меньшей мере один трансген, при этом трансген вызывает патологическое состояние и при этом гAAV целенаправленно воздействует на предварительно определенную ткань животного.

Трансген может экспрессировать ряд генов, в том числе гены, включающие в себя гены, связанные с раком, проапоптозные гены и гены, связанные с апоптозом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген экспрессирует малую интерферирующую нуклеиновую кислоту, способную ингибировать экспрессию гена, связанного с раком. В соответствии с другими вариантами осуществления трансген экспрессирует малую интерферирующую нуклеиновую кислоту, способную ингибировать

экспрессию гена, связанного с апоптозом. Малая интерферирующая нуклеиновая кислота в соответствии с другими вариантами осуществления представляет собой miRNA или shRNA. В соответствии с другими вариантами осуществления трансген экспрессирует токсин, при этом токсин представляет собой DTA. В соответствии с другими вариантами осуществления трансген экспрессирует репортерный ген, который необязательно представляет собой репортерный фермент, такой как бета-галактозидаза или флуоресцентный белок, такой как GFP или люцифераза.

Трансген может экспрессировать miRNA. В соответствии с другими вариантами осуществления трансген экспрессирует «губку» miRNA, при этом «губка» miRNA ингибирует активность одной или нескольких miRNA у животного. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления miRNA может представлять собой эндогенную miRNA или она может экспрессироваться в клетке ткани печени, центральной нервной системы (ЦНС), глаза, желудочно-кишечного тракта, дыхательной системы, молочной железы, поджелудочной железы, мочевыводящих путей или матки.

гAAV может трансдуцировать много различных типов ткани, таких как нейроны, клетки плоского эпителия, клетки проксимальных или дистальных извитых канальцев почек, glanduloциты слизистых оболочек, эндотелиоциты кровеносных сосудов, эндометриальные клетки, клетки сетчатки или клетки определенных видов рака (например, клетки рака молочной железы, клетки рака предстательной железы и др.).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV вводят в дозе  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{14}$  или  $10^{15}$  геномных копий на субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV вводят в дозе  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  или  $10^{14}$  геномных копий на кг. гAAV может быть введен любым путем. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления он может быть введен внутривенно (например, путем инъекции в воротную вену).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген включает в себя тканеспецифичный промотор, такой как печень-специфичный промотор гена глобулина сыворотки крови, связывающего тироксин (TBG), промотор гена инсулина, промотор гена глюкогона, промотор гена соматостатина, промотор гена муцина-2, промотор гена панкреатического полипептида (PPY), промотор гена синапсина-1 (Syn), промотор гена ретиношизина, промотор гена K12, промотор гена CC10, промотор гена белка сурфактанта С (SP-C), промотор гена PRC1, промотор гена RRM2, промотор гена уроплакина 2 (UPII) или промотор гена лактоферрина.

Соматическая трансгенная животная модель может представлять собой млекопитающее, такое как мышь, крысу, кролика, собаку, кошку, овцу, свинью и отличного от человека примата.

5 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предполагаемое терапевтическое средство может быть введено в соматическую трансгенную животную модель для определения влияния предполагаемого терапевтического средства на патологическое состояние животного.

10 В соответствии с другим аспектом настоящее раскрытие представляет собой соматическую трансгенную модель, получаемую с помощью способов, описанных в данном документе.

В соответствии с другим аспектом настоящего раскрытия предусмотрен набор для получения гAAV, который образует соматическое трансгенное животное, имеющее патологическое состояние в предварительно определенной ткани. Набор содержит по меньшей мере один контейнер, содержащий вектор на основе рекомбинантного AAV, по 15 меньшей мере один контейнер, содержащий компонент для упаковки гAAV и инструкции для конструирования и упаковки рекомбинантного AAV.

Компонент для упаковки гAAV может содержать клетку-хозяина, экспрессирующую по меньшей мере один ген гер и/или по меньшей мере один ген сар. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку 293. В 20 соответствии с другими вариантами осуществления клетка-хозяин экспрессирует по меньшей мере один генный продукт вируса-помощника, который влияет на образование гAAV, содержащего вектор на основе рекомбинантного AAV. По меньшей мере один ген сар может кодировать капсидный белок из серотипа AAV, который целенаправленно воздействует на предварительно определенную ткань.

25 В соответствии с другими вариантами осуществления компонент для упаковки гAAV содержит вирус-помощник, при этом необязательно вирус-помощник представляет собой аденовирус или вирус герпеса.

Вектор на основе гAAV и компоненты в нем могут включать в себя любой из элементов, описанных в данном документе. Например, в соответствии с некоторыми 30 вариантами осуществления вектор на основе гAAV содержит трансген, такой как любой из трансгенов, описанных в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген экспрессирует ингибитор miRNA (например, «губку» miRNA или РНК TuD), при этом ингибитор miRNA ингибирует активность одной или нескольких miRNA у соматического трансгенного животного.

Каждое из ограничений настоящего раскрытия может включать в себя различные варианты осуществления настоящего раскрытия. Таким образом, предполагается, что каждое из ограничений настоящего раскрытия, включающее любой элемент или комбинацию элементов, может быть включено в каждый аспект настоящего раскрытия.

5 Настоящее раскрытие не ограничено в своем применении подробностями конструкции и компоновки компонентов, изложенными в следующем описании, или проиллюстрированными в чертежах. Настоящее раскрытие может быть реализовано в соответствии с другими вариантами осуществления и может быть осуществлено на практике или выполнено различными путями.

10

### Краткое описание чертежей

На Фиг. 1A-1B показаны схемы технологического процесса идентификации вариантов AAV. На Фиг. 1A показана высокопроизводительная детекция новых вариантов AAV в некоторых тканях человека. Провирусные капсидные последовательности амплифицируют с использованием ПЦР с большим количеством циклов, затем с использованием ПЦР с малым количеством циклов, для штрихкодирования библиотек ампликонов для мультиплексного одномолекулярного секвенирования в реальном времени (SMRT). На Фиг. 1B показаны обобщенные результаты потока для биоинформатического анализа секвенируемых данных.

20 На Фиг. 2A-2D показаны данные, относящиеся к детекции *in vivo* трансгенной активности FFLuc при различных введениях некоторых вариантов AAV8. На Фиг. 2A показано, что активность люциферазы различных вариантов AAV8 оценивали на неделе 6 после IV (внутривенной), IM (внутримышечной) или IN (интраназальной) инъекции. На Фиг. 2B-2D показаны данные, относящиеся к оценке активности FFLuc для каждого варианта, B2 (Фиг. 2B), B3 (Фиг. 2C) и B61 (Фиг. 2D), по сравнению с AAV8 (среднее  $\pm$  SD, n = 3, *t*-критерий).

На Фиг. 3A-3B показаны данные, относящиеся к оценке трансгенной активности FFLuc, доставляемой вариантом AAV8 B61, по сравнению с AAV9 на день 21 после неонатальной инъекции. Выявляли активность люциферазы и геномные копии головного мозга (Фиг. 3A) и спинного мозга (Фиг. 3B) (среднее  $\pm$  SD, n = 5, *t*-критерий).

На Фиг. 4A-4B показаны данные, относящиеся к детекции *in vivo* трансгенной активности FFLuc после внутримышечной инъекции (IM) в правую заднюю конечность варианта AAV8 B44 по сравнению с AAV8. На Фиг. 4A показано, что экспрессию люциферазы в целом животном варианта B44 оценивали на неделе 6 после IM инъекции.

35 На Фиг. 4B показана оценка мышц (RTA, передняя большеберцовая мышца правой

конечности; LTA, передняя большеберцовая мышца правой конечности), печени и сердца. Активность люциферезы (левая столбиковая диаграмма) и относительные соотношения (правая столбиковая диаграмма) представлены для B44 по сравнению с AAV8 (среднее  $\pm$  SD, n = 3).

5 На Фиг. 5 показано филогенетическое сравнение вариантов AAV8 (B2, B3, B61) с другими серотипами AAV.

На Фиг. 6А показано схематическое изображение технологического процесса характеристики *in vivo* новых вариантов AAV в результате высокопроизводительного скрининга тропизма.

10 На Фиг. 6В показано схематическое изображение технологического процесса характеристики НРП новых вариантов AAV в результате высокопроизводительного скрининга тропизма.

На Фиг. 7 показана диаграмма рассеяния, на которой отображено распределение различных вариантов капсида AAV2 (всего 409) и вариантов AAV2/3 (всего 194),  
15 содержащих один или несколько вариантов с отличием по одной аминокислоте.

На Фиг. 8 показаны диаграммы векторных конструкций, используемых в мультиплексном скрининге обнаруженных капсидных вариантов. Уникальные штрихкоды из 6 п.о. были клонированы в трансгены и упакованы в кандидатные капсидные варианты.

20 На Фиг. 9 показана схема индексированного трансгена и схема высокопроизводительного секвенирования библиотеки, для оценки профилирования тропизма капсидных вариантов. Индексированная и адаптерная кассета, содержащая штрихкод из 6 п.о. (1° штрихкод) и сайт рестрикции BstEII, могут быть клонированы в векторные конструкции с помощью фланкирования сайтов BsrGI SacI. Целую  
25 необработанную ДНК из тканей, обработанных гAAV, содержащих как геном хозяина, так и векторные геномы, разрезали с помощью фермента BstEII. Образующийся в результате 5'-выступающий конец использовали для специфического лигирования адаптера, содержащего второй штрихкод, который обеспечивает дополнительное мультиплексное секвенирование и оптимизацию; и модификация 5'-биотина, которая может быть  
30 использована для отбора фрагментов, содержащих адаптер, с помощью обогащения магнитными гранулами. Затем обогащенный материал может подвергаться ПЦР-амплификации с помощью праймеров, специфических по отношению к адаптерным и трансгенным последовательностям с получением библиотек для высокопроизводительного секвенирования. SEQ ID NO: 1719-1725 показаны сверху вниз.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой небольшой (~26 нм) дефектный по репликации безоболочечный вирус, который, как правило, зависит от присутствия второго вируса, такого как аденовирус или вирус герпеса, для своего роста в клетках. Известно, что AAV не вызывает заболевания и индуцирует очень слабый иммунный ответ. AAV может инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, и может включать свой геном в геном клетки-хозяина. Эти характеристики делают AAV очень привлекательным кандидатом для создания вирусных векторов для генной терапии. Прототипные векторы AAV на основе серотипа 2 обеспечивали экспериментальную проверку концепции нетоксичного и стабильного переноса генов в мышинных моделях и в моделях крупных животных, однако характеризовались слабой эффективностью переноса во многих основных целевых тканях. Настоящее раскрытие в соответствии с некоторыми аспектами ориентировано на преодоление этого недостатка в результате получения новых AAV, имеющих способности целенаправленно воздействовать на различные ткани с целью генной терапии и научно-исследовательских областей применения.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящего раскрытия предусмотрены новые капсидные белки AAV, которые имеют способности целенаправленно воздействовать на различные ткани. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления капсидный белок AAV выделяют из ткани, на которую AAV, содержащий данный капсидный белок, целенаправленно воздействует. В соответствии с некоторыми аспектами предусмотрены способы доставки трансгена в целевую ткань в организме субъекта. Способы доставки трансгена могут быть использованы для генной терапии (например, для лечения заболевания) или научно-исследовательских (например, для создания соматической трансгенной животной модели) областей применения.

#### *Способы обнаружения AAV*

Значительная часть биологии AAV обусловлена его капсидом. Соответственно, способы обнаружения новых AAV были главным образом направлены на выделение последовательностей ДНК для капсидов AAV. Главным свойством латентного жизненного цикла аденоассоциированного вируса (AAV) является персистенция в форме интегрированных и/или эписомальных геномов в клетке-хозяине. Способы выделения новых AAV включают в себя молекулярное спасение геномов ДНК латентных AAV, спасение латентного провирусного генома инфекционных вирусов из ДНК тканей *in vitro* в присутствии функционального элемента вируса-помощника аденовируса и спасение

кольцевого провирусного генома из ДНК тканей с помощью линейной амплификации по типу катящегося кольца, опосредованной полимеразой изотермального фага Phi-29. Все эти способы выделения извлекают преимущество из латентности геномов провирусной ДНК AAV и направлены на спасение геномной ДНК персистентных вирусов.

5 В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к открытию того, что новые варианты AAV с тропизмами к необходимым тканям могут быть выявлены *in vivo* из тканей субъекта. Не привязываясь к определенной теории, при применении ткани *in vivo* используется природный резервуар геномного разнообразия, наблюдаемого среди вирусных геномных последовательностей, выделенных из  
10 нормальных и опухолевых тканей субъекта. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления *in vivo* ткани выступают в качестве природных инкубаторов вирусного (например, вирусного капсидного белка) разнообразия в результате селективного давления и/или ускользания от иммунологического надзора.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие связано с  
15 обнаружением того, что продукты ПЦР, образующиеся в результате амплификации ДНК AAV (например, ДНК AAV, выделенной или экстрагированной из клетки-хозяина или из ткани субъекта *in vivo*) могут быть подвергнуты высокопроизводительному одномолекулярному секвенированию в реальном времени (SMRT) для идентификации новых вариантов капсидных белков. Используемый в данном документе термин  
20 «одномолекулярное секвенирование в реальном времени (SMRT)» относится к распараллеленному способу одномолекулярного секвенирования в реальном времени, например, описанному Roberts et al. (2013) *Genome Biology* 14:405, doi:10.1186/gb-2013-14-7-405. Не привязываясь к определенной теории, применение секвенирования SMRT устраняет необходимость осуществлять реконструкцию вирусного генома и  
25 прогнозирование химерных организмов на основе выравненных короткочитаемых фрагментов, полученных в результате других стандартных высокопроизводительных методик секвенирования генома.

Геномы эндогенных латентных AAV являются транскрипционно активными в клетках млекопитающих (например, клетках тканей отличных от человека приматов,  
30 таких как печень, селезенка и лимфатические узлы). Не привязываясь к теории, выдвигается гипотеза о том, что для поддержания персистенции AAV в хозяине, могли бы потребоваться низкие уровни транскрипции генов AAV и образующаяся в результате РНК сар могла бы выступать в роли более подходящих и имеющихся в избытке субстратов для извлечения функциональных последовательностей сар для разработки векторов.  
35 Транскрипты генов гер и сар выявляются с переменными частотами с помощью

способов детекции РНК (например, RT-ПЦР). Присутствие транскрипта гена сар и способность создавать кДНК из РНК сар в процессе обратной транскрипции (RT) *in vitro* значительно повышает частоту матриц для спасения на основе ПЦР новых последовательностей сар из тканей и усиливает чувствительность обнаружения новых AAV.

Новые последовательности сар также могут быть идентифицированы при трансфицировании клеток суммарной клеточной ДНК, выделенной из тканей, которые содержат провирусные геномы AAV в очень низком количестве. Клетки можно дополнительно трансфицировать генами, которые способствуют тому, что функциональный элемент вируса-помощника (например, аденовируса) запускает и/или усиливает транскрипцию генов AAV в трансфицированных клетках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления новые последовательности сар по настоящему раскрытию могут быть идентифицированы в результате выделения мРНК сар из трансфицированных клеток, при этом происходит образование кДНК из мРНК (например, с использованием RT-ПЦР) и секвенирование кДНК.

#### *Выделенные капсидные белки и кодирующие их нуклеиновые кислоты*

AAV, выделенные из млекопитающих, особенно из отличных от человека приматов, пригодны для создания векторов для переноса генов для клинических исследований и областей применения генной терапии у человека. Настоящее раскрытие предусматривает в соответствии с некоторыми аспектами новые AAV, которые были обнаружены в различных тканях *in vivo* (например, тканях печени, головного мозга, желудка, дыхательной системы, молочной железы, поджелудочной железы, прямой кишки, предстательной железы, мочеполовой системы и шейки матки) с помощью способов, раскрытых в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ткань(ткани), в которой(которых) обнаружен новый вариант AAV, представляет собой раковую ткань (например, опухоль или раковую клетку). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие белки этих новых AAV, были обнаружены в геномной ДНК вирусов, выделенной из человеческих тканей. Примеры тканей, в которых новые капсидные белки AAV были обнаружены, описаны в Табл. 1. Последовательности нуклеиновых кислот и белков, а также другая информация касательно AAV, изложены в Табл. 3-5 и 8, и в перечне последовательности.

Выделенные нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию, которые кодируют капсидные белки AAV, включают в себя любую нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 410-435, 876-1718 или 1989-

2251, а также любую нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, по сути гомологичную им. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенные нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию включают в себя любую нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, кодирующую полипептид, имеющий последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 1-409, 435-868 и 1726-1988. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие предусматривает выделенную нуклеиновую кислоту, которая по сути гомологична нуклеиновой кислоте, изложенной в любой из SEQ ID NO: 410-435, 876-1718 и 1989-2251, однако которая не кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 869, 870 или 871.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенные капсидные белки AAV по настоящему раскрытию включают в себя любой белок, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 1-409, 837-852 или 1726-1814, а также любой белок, по сути гомологичный им. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие предусматривает выделенный капсидный белок, по сути гомологичный белку, имеющему последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO 1-409, 837-852 или 1726-1814, однако который не имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 869.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенные капсидные белки AAV по настоящему раскрытию включают в себя любой белок, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 435-628 или 1815-1988, а также любой белок, по сути гомологичный им. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие предусматривает выделенный капсидный белок, по сути гомологичный белку, имеющему последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO 435-628 или 1815-1988, однако который не имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 869 или 870.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенные капсидные белки AAV по настоящему раскрытию включают в себя любой белок, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 629-836 или 853-868, а также любой белок, по сути гомологичный им. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие предусматривает выделенный капсидный белок, по сути гомологичный белку, имеющему последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO 629-836 или 853-868, однако который не имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 871.

«Гомология» относится к проценту идентичности между двумя полинуклеотидными или двумя полипептидными фрагментами. Термин «по сути гомологичный» при отсылке на нуклеиновую кислоту или ее фрагмент указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями по отношению к другой нуклеиновой кислоте (или ее комплементарной нити), имеет место идентичность нуклеотидной последовательности от приблизительно 90 до 100% от выравненных последовательностей. При отсылке на полипептид или его фрагмент термин «по сути гомологичный» указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими гэпами, вставками или делециями по отношению к другому полипептиду, имеет место идентичность нуклеотидной последовательности от приблизительно 90 до 100% от выравненных последовательностей. Термин «высококонсервативный» означает по меньшей мере 80% идентичности, предпочтительно 90% идентичности и более предпочтительно свыше 97% идентичности. В некоторых случаях термин высококонсервативный может относиться к 100% идентичности. Идентичность легко определяется специалистом в данной области техники, например, с помощью применения алгоритмов или компьютерных программ, известных специалистам в данной области техники.

Описанные в данном документе выравнивания между последовательностями нуклеиновых кислот или полипептидов осуществляют с помощью любой из ряда находящихся в свободном доступе или коммерчески доступных программ множественного выравнивания последовательностей, таких как «Clustal W», доступных через веб-сервера в интернете. В альтернативном варианте также могут быть использованы средства Vector NTI. Также существует несколько алгоритмов, известных в данной области техники, которые могут быть использованы для измерения идентичности нуклеотидной последовательности, в том числе алгоритмы, содержащиеся в программах, описанных выше. В качестве другого примера полинуклеотидные последовательности можно сравнить с помощью программы BLASTN, которая предусматривает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наибольшего перекрытия между искомой последовательностью и последовательностью поиска. Аналогичные программы доступны для сравнения аминокислотных последовательностей, например, программа «Clustal X», BLASTP. В типичном случае любую из этих программ используют с параметрами по умолчанию, хотя специалист в данной области может изменить эти параметры при необходимости. В альтернативном варианте специалист в данной области может использовать другой алгоритм или компьютерную программу, которая обеспечивает по меньшей мере уровень идентичности или выравнивания, который

обеспечивается указанными алгоритмами и программами. Выравнивания могут быть использованы для идентификации соответствующих аминокислот между двумя белками или пептидами. Термин «соответствующая аминокислота» может представлять собой аминокислоту последовательности белка или пептидной последовательности, которая была выравнена по отношению к аминокислоте другой последовательности белка или пептидной последовательности. Соответствующие аминокислоты могут быть идентичными или неидентичными. Соответствующая аминокислота, которая является неидентичной аминокислотой, может обозначаться как вариантная аминокислоты. В Табл. 6 представлены примеры вариантных аминокислот.

В альтернативном варианте в случае нуклеиновых кислот гомология может быть определена с помощью гибридизации полинуклеотидов в условиях, при которых образуются стабильные дуплексы между гомологичными областями, с последующим перевариванием однонитевой(однонитевыми) специфичной(специфичными) нуклеазой(нуклеазами), и определения размера переваренных фрагментов. Последовательности ДНК, которые являются по сути гомологичными, могут быть идентифицированы с помощью эксперимента с использованием саузерн-гибридизации, например, при жестких условиях, как определено для этой конкретной системы. Определение подходящих условий гибридизации находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

Термин «последовательность нуклеиновой кислоты» относится к последовательности ДНК или РНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления термин нуклеиновая кислота включает в себя последовательности, которые содержат любой из известных аналогов оснований ДНК и РНК, такой как без ограничения 4-ацетилцитозин, 8-гидрокси-N6-метиладенозин, азиридинилцитозин, псевдоизоцитозин, 5-(карбоксихидроксилометил)урацил, 5-фторурацил, 5-бромуррацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, инозин, N6-изопентиладенин, 1-метиладенин, 1-метилпсевдоурацил, 1-метилгуанин, 1-метилюнозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-метиладенин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбонилметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота, оксипутоксозин, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, сложный метиловый эфир урацил-5-

оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин и 2,6-диаминопурин.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белки и нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию являются выделенными. Используемый в данном документе термин «выделенный» обозначает искусственно полученный или образованный. Используемый в данном документе в отношении нуклеиновых кислот термин «выделенный», как правило, обозначает: (i) амплифицированный *in vitro*, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР); (ii) рекомбинантно продуцируемый в результате клонирования; (iii) очищенный, например, в результате расщепления или разделения в геле; или (iv) синтезированный, например, с помощью химического синтеза. Выделенная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая легко доступна для манипуляций в результате методик рекомбинантной ДНК, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, нуклеотидная последовательность, содержащаяся в векторе, в котором 5' и 3' сайты рестрикции известны или для которого праймерные последовательности полимеразной цепной реакции (ПЦР) были раскрыты, считается выделенной, однако последовательность нуклеиновой кислоты, существующая в своем нативном состоянии в своем естественном хозяине, не считается таковой. Выделенная нуклеиновая кислота может быть по сути очищенной, но не должна быть таковой. Например, нуклеиновая кислота, которая выделена в пределах клонирующего или экспрессионного вектора, не является чистой в том отношении, что она может содержать лишь незначительный процент материала в клетке, в которой она находится. Такая нуклеиновая кислота является выделенной, как и термин используется в данном документе, поскольку она легко доступна для манипуляций в результате стандартных методик, известных специалистам в данной области техники. Используемый в данном документе по отношению к белкам или пептидам термин «выделенный», как правило, относится к белку или пептиду, которые были искусственно получены или образованы (например, путем химического синтеза, с помощью технологии рекомбинантной ДНК и т.д.).

Следует понимать, что консервативные аминокислотные замены могут быть выполнены с целью получения функционально эквивалентных вариантов или гомологов капсидных белков. В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие предусматривает изменения последовательностей, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам. Используемый в настоящем документе термин «консервативная аминокислотная замена» относится к аминокислотной замене, которая не изменяет относительный заряд или размерные характеристики белка, в котором

выполнена аминокислотная замена. Можно получить варианты в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в данной области, такими как встречаются в ссылках, которые лежат в основе таких способов, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают в себя замены, выполненные среди аминокислот со следующими группами: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D. Таким образом, можно выполнить консервативные аминокислотные замены в отношении аминокислотной последовательности белков и полипептидов, раскрытых в данном документе.

Примером выделенной нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий собой капсидный белок AAV, является нуклеиновая кислота, имеющая последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 410-434, 876-1718 и 1989-2251. Фрагмент выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующий капсидную последовательность AAV, может быть пригоден для конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей необходимую капсидную последовательность. Фрагменты могут иметь любую подходящую длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фрагмент (участок) выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующий капсидную последовательность AAV, может быть пригоден для конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей необходимую капсидную последовательность. Фрагменты могут иметь любую подходящую длину (например, по меньшей мере 6, по меньшей мере 9, по меньшей мере 18, по меньшей мере 36, по меньшей мере 72, по меньшей мере 144, по меньшей мере 288, по меньшей мере 576, по меньшей мере 1152 или более нуклеотидов в длину). Например, фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующий полипептид первого капсидного белка AAV, может быть использован для конструирования последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую капсидную последовательность AAV, или может быть включен в нее, с целью изменения свойств капсида AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления капсидные белки AAV, которые содержат фрагменты капсидных последовательностей от нескольких серотипов AAV, обозначаются как химерные капсиды AAV. Фрагмент может представлять собой фрагмент, который не кодирует пептид, который является идентичным последовательности любой из SEQ ID NO: 869, 870 или 871. Например, фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующий вариантную аминокислоту (по сравнению с известным серотипом AAV), может быть

использован для конструирования последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей капсидную последовательность AAV, или может быть включен в нее, с целью изменения свойств капсида AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант AAV, может представлять собой от приблизительно 1 до приблизительно 100 аминокислотных вариантов, по сравнению с известным серотипом AAV (например, серотип AAV 2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) или AAV8). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант AAV, может представлять собой от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислотных вариантов, по сравнению с известным серотипом AAV (например, серотип AAV 2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) или AAV8). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант AAV, может представлять собой от приблизительно 10 до приблизительно 30 аминокислотных вариантов, по сравнению с известным серотипом AAV (например, серотип AAV 2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) или AAV8). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант AAV, может представлять собой от приблизительно 1 или 2 или 3 или 4 или 5 или 6 или 7 или 8 или 9 или 10 или 11 или 12 или 13 или 14 или 15 или 16 или 17 или 18 или 19 или 20 аминокислотных вариантов, по сравнению с известным серотипом AAV (например, серотип AAV 2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) или AAV8). Например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант AAV (например, SEQ ID NO: 861) может представлять собой 3 аминокислотных варианта по сравнению с известным серотипом AAV (например, AAV8). Может быть сконструирована рекомбинантная последовательность сар, которая имеет один или более из 3 аминокислотных вариантов, в результате включения фрагментов последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей область, кодирующую вариантную аминокислотную последовательность, в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую известный серотип AAV. Фрагменты могут быть включены с помощью любого подходящего способа, в том числе с помощью сайт-направленного мутагенеза. Таким образом, могут быть созданы новые варианты AAV, имеющие новые свойства.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие предусматривает выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие белки, активирующие сборку (AAP) AAV или их варианты. Используемый в данном документе термин «белок, активирующий сборку» или «AAP» представляет собой белок шаперон, функцией которого является направление вновь синтезированных капсидных белков (например,

белков VP, таких как AAV VP1, VP2 и VP3) к ядрышку клетки, тем самым, способствуя инкапсулированию вирусных геномов. Как правило, AAP кодируется в гене *cap* аденоассоциированного вируса. Например, AAP-2 кодируется в гене *cap* AAV2. Другие примеры AAP включают в себя без ограничения AAP-1, AAP-3, AAP-4, AAP-5, AAP-8, AAP-9, AAP-11 и AAP-12, например, описанные Sonntag et al. *J. Virol.* 2011 Dec. 85(23): 12686-12697. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления AAP транслируется из другой открытой рамки считывания (ORF) гена *cap*, чем капсидный белок (например, VP1, VP2, VP3). Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления капсидный белок (например, AAV2 VP1, VP2, VP3) транслируется из ORF 1 гена *cap*, а AAP (например, AAP-2) транслируется ORF 2 гена *cap*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая AAP, содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 410-434 и 876-1718, или состоит из нее.

#### 15 *Рекомбинантные AAV*

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие предусматривает выделенные AAV. Используемый в данном документе в отношении AAV термин «выделенный» относится к AAV, который был искусственно получен или образован. Выделенные AAV могут быть образованы с помощью рекомбинантных способов. Такие AAV называется в данном документе «рекомбинантные AAV». Рекомбинантные AAV (гAAV) предпочтительно имеют способность целенаправленно специфическим образом воздействовать на ткани, таким образом, трансген гAAV будет доставлен конкретно в одну или несколько заранее определенных тканей. Капсид AAV представляет собой важный элемент в определении этих способностей целенаправленного специфического воздействия на ткани. Таким образом, может быть выбран гAAV, имеющий капсид, подходящий для ткани, на которую предполагается целенаправленно воздействовать. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV содержит капсидный белок, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO 1-409, 435-852, 859-874 или 1726-1988, или белок, по сути гомологичный им.

Способы получения рекомбинантных AAV, имеющих необходимый капсидный белок, хорошо известны в данной области техники. (См., например, патент США № 2003/0138772, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В типичном случае способы предусматривают культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей

капсидный белок AAV (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, имеющий последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO 1-409, 435-868 или 1726-1988) или его фрагмент; функциональный ген *rep*; вектор на основе рекомбинантного AAV, состоящий из инвертированных концевых повторов (ITR) AAV и трансгена; и достаточное количество функциональных элементов вирусов-помощников, для обеспечения упаковки вектора на основе рекомбинантного AAV в капсидные белки AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления капсидные белки представляют собой структурные белки, кодируемые ген *cap* AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления AAV содержат три капсидных белка, вирионные белки 1-3 (называемые VP1, VP2 и VP3), все из которых могут экспрессироваться из одного гена *cap*. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления белки VP1, VP2 и VP3 имеют общую коровую последовательность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулярные массы VP1, VP2 и VP3 соответственно составляют приблизительно 87 кДа, приблизительно 72 кДа и приблизительно 62 кДа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления при трансляции капсидные белки из капсидные белки образуют сферическую 60-мерную белковую оболочку вокруг вирусного генома. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белковая оболочка главным образом состоит из капсидного белка VP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функции капсидных белков заключаются в защите вирусного генома, доставке генома и взаимодействии с хозяином. В соответствии с некоторыми аспектами капсидные белки доставляют вирусный геном в организм хозяина тканеспецифичным образом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления капсидные белки VP1 и/или VP2 могут способствовать тканевому тропизму упакованного AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления тканевый тропизм упакованного AAV определяется капсидным белком VP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления тканевый тропизм AAV усиливается или изменяется в результате мутаций, возникающих в капсидных белках.

В соответствии с некоторыми аспектами, настоящее раскрытие описывает варианты серотипов AAV дикого типа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты имеют измененный тканевой тропизм. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, содержат аминокислотные вариации (например, замену, делецию, вставку) в гене *cap*. Как описано выше, все три капсидные белка транскрибируются из одного гена *cap*. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотная вариация в гене *cap* присутствует во всех трех капсидных белках, кодируемых указанным геном *cap*. В

альтернативном варианте в соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотная вариация может не присутствовать во всех трех капсидных белках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотная вариация происходит только в капсидном белке VP1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотная вариация происходит только в капсидном белке VP2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотная вариация происходит только в капсидном белке VP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариант AAV содержит более одной вариации в гене *cap*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления более одной вариации происходит в одном и том же капсидном белке (например, в VP3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления более одной вариации происходит в разных капсидных белках (например, по меньшей мере одна вариация в VP2 и по меньшей мере одна вариация в VP3).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, представляют собой варианты AAV2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) или AAV8. Известно, что AAV2 эффективно трансдуцирует ткань центральной нервной системы (ЦНС), ткань почек, ткань глаз (например, фоторецепторные клетки и пигментный эпителий сетчатки (RPE)), а также другие ткани человека. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты AAV3, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в ткань ЦНС, ткань почек или ткань глаз. Также известно, что AAV3 эффективно трансдуцирует раковые гепатоциты человека. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV3, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в раковые и нормальные гепатоциты человека. Известно, что AAV8 целенаправленно воздействует на ткань печени, ткань дыхательной системы и глаз. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты AAV8, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в ткань печени, ткань дыхательной системы и глаз.

Следует понимать, что варианты AAV2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) и AAV8, описанные в данном документе, могут содержать одну или несколько вариаций в гене *cap* по сравнению с соответствующим AAV дикого типа. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) и AAV8, описанные в данном документе, могут иметь тканевый тропизм, пригодный для доставки генной терапии в дополнительные типы тканей, на которые не происходит целенаправленного воздействия AAV2, AAV2/3 (например, гибрида AAV2/3) или AAV8 дикого типа. Например, в соответствии с

некоторыми вариантами осуществления варианты AAV8, описанные в данном документе (например, B61; SEQ ID NO: 865), могут быть пригодны для доставки генной терапии в центральную нервную систему (ЦНС). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AV2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) или AAV8, описанные в данном документе, могут быть пригодны для целенаправленного воздействия на клетки почек или клетки печени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV2, AAV2/3 (например, гибрид AAV2/3) или AAV8, описанные в данном документе, могут быть пригодны для целенаправленного воздействия генной терапии на печень, селезенку, сердце и головной мозг.

В соответствии с некоторыми аспектами варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения нарушений, связанных с ЦНС. Используемый в данном документе термин «нарушение, связанное с ЦНС» представляет собой заболевание или патологическое состояние центральной нервной системы. Нарушение, связанное с ЦНС, может поражать спинной мозг (например, миелопатия), головной мозг (например, энцефалопатия) или ткани, окружающие головной мозг и спинной мозг. Нарушение, связанное с ЦНС, может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации. Нарушение, связанное с ЦНС, может представлять собой психологическое состояние или расстройство, например, синдром дефицита внимания с гиперактивностью, расстройство аутистического спектра, расстройство настроения, шизофрению, синдром Ретта и т.д. Нарушение, связанное с ЦНС, может представлять собой аутоиммунное нарушение. Нарушение, связанное с ЦНС, может также представлять собой рак ЦНС, например, рак головного мозга. Нарушение, связанное с ЦНС, которое представляет собой рак, может представлять собой первичный рак ЦНС, например, астроцитому, глиобластомы и т.д., или может представлять собой рак, который метастазировал в ткань ЦНС, например, рак легких, который метастазировал в головной мозг. Дополнительные неограничивающие примеры нарушений, связанных с ЦНС, включают в себя болезнь Паркинсона, лизосомную болезнь накопления, ишемию, нейропатическую боль, амиотрофический боковой склероз (ALS), рассеянный склероз (MS) и болезнь Канавана (CD).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в кардиомиоциты (например, ткань сердца). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения сердечно-сосудистых нарушений. Используемый в данном документе термин «сердечно-сосудистое нарушение» представляет собой заболевание или патологическое

состояние сердечно-сосудистой системы. Сердечно-сосудистое заболевание может поражать сердце, сердечно-сосудистую систему, артерии, вены, кровеносные сосуды и/или капилляры. Сердечно-сосудистое нарушение может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации.

5 Неограничивающие примеры сердечно-сосудистых нарушений включают в себя ревматическую болезнь сердца, порок клапана сердца, гипертензивную болезнь сердца, аневризму, атеросклероз, гипертензию (например, высокое кровяное давление), болезнь периферических артерий (PAD), ишемическую болезнь сердца, стенокардию, коронарное заболевание сердца, заболевание коронарной артерии, инфаркт миокарда, церебральное  
10 сосудистое заболевание, транзиторный ишемический приступ, воспалительное заболевание сердца, кардиомиопатию, заболевание перикарда, врожденное заболевание сердца, сердечную недостаточность, инсульт и миокардит вследствие болезни Шагаса.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, могут целенаправленно воздействовать на легкие и/или ткань  
15 дыхательной системы (например, дыхательную систему). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения легочного заболевания. Используемый в данном документе термин «легочное заболевание» представляет собой заболевание или патологическое состояние дыхательной системы. Легочное заболевание может поражать  
20 легкие или мышцы, участвующие в дыхании. Легочное заболевание может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации. Легочное заболевание может представлять собой рак легких, в том числе без ограничения немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких и карциноидную опухоль легкого. Дополнительные неограничивающие примеры включают в себя острый  
25 бронхит, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), асбестоз, астму, бронхиэктаз, бронхиолит, облитерирующий бронхиолит с организующей пневмонией (BOOP), бронхолегочную дисплазию, биссиноз, хронический бронхит, кокцидиомикоз (кокки), хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), криптогенную организующую пневмонию (COP), кистозный фиброз, эмфизему, хантавирусный легочный синдром,  
30 гистоплазмоз, инфекцию, вызванную метапневмовирусом человека, гиперчувствительный пневмонит, грипп, лимфангиоматоз, мезотелиому, ближневосточный респираторный синдром, нетуберкулезный микобактериоз, коклюш, пневмокониоз (болезнь черных легких), пневмонию, первичную цилиарную дискинезию, первичную легочную гипертензию, легочную артериальную гипертензию, легочный фиброз, заболевание  
35 легочных сосудов, инфекцию, вызванную респираторно-синцитальным вирусом (RSV),

саркоидоз, тяжелый острый респираторный синдром (SARS), силикоз, апноэ во сне, синдром внезапной детской смерти (SIDS) и туберкулез.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты ААV, описанные в данном документе, могут целенаправленно воздействовать на ткань печени.

5 Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты ААV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения заболевания печени. Используемый в данном документе термин «заболевание печени» представляет собой заболевание или патологическое состояние печени. Заболевание печени может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате

10 соматической мутации. Заболевание печени может представлять собой рак печени, в том числе без ограничения гепатоцеллюлярную карциному (HCC), фиброламеллярную карциному, холангиокарциному, ангиосаркому и гепатобластому. Дополнительные неограничивающие примеры заболевания печени включают в себя синдром Алажиля, недостаточность альфа-1 антитрипсина, аутоиммунный гепатит, билиарную атрезию,

15 цирроз, поликистоз печени, жировую болезнь печени, галактоземию, камни в желчном пузыре, синдром Жильбера, гемохроматоз, заболевание печени при беременности, неонатальный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, порфирию, синдром Рейе, саркоидоз, токсический гепатит, болезнь накопления гликогена 1 типа, тирозинемия, вирусный гепатит А, В, С, болезнь Вильсона и

20 шистосоматоз.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты ААV, описанные в данном документе, могут целенаправленно воздействовать на ткань почек.

Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты ААV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения заболевания

25 почек. Используемый в данном документе термин «заболевание почек» представляет собой заболевание или патологическое состояние печени. Заболевание почек может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации. Заболевание почек может представлять собой рак почек, в том числе без ограничения почечно-клеточный рак, светлоклеточный рак почки, папиллярный

30 рак 1 типа, папиллярный рак 2 типа, хромофобный рак, онкоцитарный рак почек, рак собирающих протоков, переходно-клеточный рак почечной лоханки и опухоль Вильмса. Дополнительные неограничивающие примеры заболевания почек включают в себя синдром Абдергальдена-Кауфмана-Линьяка (нефропатический цистиноз), острую почечную недостаточность/острое повреждение почек, острую долевую нефронию,

35 острую фосфатную нефропатию, острый тубулярный некроз, недостаточность

аденинфосфорибозилтрансферазы, аденовирусный нефрит, синдром Альпорта, амилоидоз, ангиомиолипому, анальгетическую нефропатию, антитела к ангиотензину и фокально-сегментарный гломерулосклероз, антифосфолипидный синдром, гломерулонефрит, связанный с терапией анти-ФНО- $\alpha$ , мутации APO1, синдром кажущегося избытка минералокортикоидов, аристолохиевую нефропатию, балканскую эндемическую нефропатию, синдром Бартера, битурию, заболевание почек вследствие  $\beta$ -талассемии, тубулярную нефропатию, полиому ВК, нефропатию C1q, кардиоренальный синдром, нефропатию CFHR5, холестериную эмболию, синдром Черджа-Стросса, хилурию, склерозирующую гломерулопатию, склерозирующую гломерулопатию, связанную с CMV, врожденный нефротическую синдром, коноренальный синдром (синдром Майнцера-Сальдино или заболевания Сальдино-Майцнера), контрастную нефропатию, интоксикацию сульфатом меди, кортикальный некроз, криоглобулинемию, микрокристаллическое острое повреждение почек, приобретенную кистозную болезнь почек, цистинурию, болезнь плотного осадка (MPGN 2 типа), синдром Дента (X-сцепленный рецессивный нефролитиаз), синдром дисбаланса при диализе, диабетическую болезнь почек, несахарный диабет, EAST-синдром, эктопический мочеточник, эдему, болезнь Эрдгейма-Честера, болезнь Фабри, семейную гипокальциурическую гиперкальциемию, синдром Фанкони, синдром Фразера, фибронектиновую гломерулопатию, фибриллярный гломерулонефрит и иммунотактоидную гломерулопатию, синдром Фрейли, фокально-сегментарный гломерулосклероз, очаговый склероз, очаговый гломерулосклероз, синдром Галловой-Мовата, синдром Гительмана, гломерулярную болезнь, гломерулярный тубулярный рефлюкс, глюкозурию, синдром Гудпасчера, гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), гемофагоцитарный синдром, геморрагический цистит, гемосидероз, связанный с пароксизмальной ночной гемоглобинурией и гемолитической анемией, веноокклюзионное поражение печеночных вен, синдром синусоидальной обструкции, заболевание почек, ассоциированное с гепатитом С, гепаторенальный синдром, нефропатию, ассоциированную с ВИЧ (HIVAN), подковообразную почку (почечное слияние), язву Ханнера, гиперальдостеронизм, гиперкальциемию, гиперкалиемию, гипермагниемию, гипернатриемию, гипероксалурию, гиперфосфатемию, гипокальциемию, гипокалиемию, дисфункцию почек, вызванную гипокалиемией, гипомагниемию, гипонатриемию, гипофосфатемию, IgA-нефропатию, IgG4-нефропатию, интерстициальный цистит, синдром болезненного мочевого пузыря, интерстициальный нефрит, синдром Ивемарка, мочекаменную болезнь, нефролитиаз, заболевание почек вследствие лептоспироза, болезнь отложения легких цепей, болезнь отложения

моноклонального иммуноглобулина, синдром Лиддла, синдром Лайтвуда-Олбрайта, липопротеиновую гломерулопатию, литиевую нефротоксичность, мутации LMX1B, вызывающие наследственный FSGS, гематурия в сочетании с поясничной болью, волчанку, системную красную волчанку, волчаночное заболевание почек, волчаночный нефрит, гломерулонефрит, ассоциированный с болезнью Лайма, малярийную нефропатию, злокачественную гипертензию, малакоплакию, меатальный стеноз уретры, медулярно-кистозную болезнь почек, спонгиозную почку, мегауретер, нефротоксичность, обусловленную меламином, мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит, мембранозную нефропатию, мезоамериканскую нефропатию, метаболический ацидоз, 10 метаболический алкалоз, микроскопический полиангиит, молочно-щелочной синдром, болезнь минимальных изменений, поликистоз почек, множественную миелому, миелопролиферативные новообразования и гломерулопатию, синдром ногтей-надколенника, нефрокальциноз, нефрогенный системный фиброз, нефроптоз (блуждающая почка, опущение почки), нефротический синдром, нейрогенный мочево- 15 пузырь, негонококковый нодулярный гломерулосклероз, синдром аорто-мезентериального пинцета, офо-фацио-дигитальный синдром, ортостатическую гипотензию, ортостатическую протеинурию, осмотический диурез, почку Пейджа, сосочковый некроз, папиллоренальный синдром (почечно-коломбный синдром, изолированную гипоплазию почки), перитонеально-почечный синдром, с нарушением задних клапанов уретры, 20 постинфекционный гломерулонефрит, постстрептококковый гломерулонефрит, узелковый полиартериит, поликистозную болезнь почек, с нарушением задних клапанов уретры, преэклампсию, пролиферативный гломерулонефрит с отложениями моноклонального IgG (болезнь Nasr), протеинурию (белок в моче), псевдогиперальдостеронизм, псевдогипоальдостеронизм, легочно-почечный синдром, пиелонефрит (инфекция почек), 25 пионефроз, лучевую нефропатию, синдром возобновленного кормления, рефлюкс-нефропатию, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, почечный абсцесс, перинефральный абсцесс, почечный агенез, аневризм почечных артерий, стеноз почечных артерий, почечно-клеточный рак, кисту почки, почечную гипоурикемию с острой почечной недостаточностью, вызванной физической нагрузкой, инфаркт почки, нефрогенную 30 остеодистрофию, почечноканальцевый ацидоз, синдром переустановки осмостата, ретрокавальный мочеточник, ретроперитонеальный фиброз, рабдомиолиз, рабдомиолиз, связанный с бариатрической операцией, заболевание почек, ассоциированное с ревматоидным артритом, заболевание почек на фоне саркоидоза, соль-теряющий синдром, ренальный и церебральный, иммунокостную дисплазию Шимке, склеродермический 35 почечный криз, синдром поликистозных почек с вовлечением змеевидной части

малоберцовой кости, синдром Экслера, серповидно-клеточную нефропатию, хроническое заболевание почек в связи с воздействием диоксида кремния, заболевание почек после трансплантации гемопоэтических клеток, заболевание почек, связанное с трансплантацией стволовых клеток, болезнь тонкой базальной мембраны, доброкачественную семейную гематурию, тригонит, туберозный склероз, тубулярную дисгенезию, синдром распада опухоли, уремию, уремическую оптическую нейропатию, уретоцеле, разрастание слизистой оболочки уретры, стриктуру уретры, недержание мочи, инфекцию мочевыводящих путей, обструкцию мочевыводящих путей, мочепузырно-кишечный свищ, везикулоуретеральный рефлюкс, болезнь Гиппеля-Линдау, нефропатию, связанную с варфариновым синдромом, грануломатоз Вегенера, грануломатоз с полиангиитом и синдром Вундерлиха.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в ткань глаза (например, ткань или клетки глаза). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения нарушений глаз. Используемый в данном документе термин «нарушение глаз» представляет собой заболевание или патологическое состояние глаза. Заболевание глаз может поражать глаз, склеру, роговицу, переднюю камеру, заднюю камеру, радужку, зрачок, хрусталик, стекловидное тело, сетчатку или зрительный нерв. Нарушение глаз может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации. Неограничивающие примеры заболеваний и нарушений глаз включают в себя без ограничения возрастную дегенерацию желтого пятна, ретинопатию, диабетическую ретинопатию, отек желтого пятна, глаукому, пигментный ретинит и рак глаза.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в ткань пищеварительной системы (например, ткань желудочно-кишечного тракта). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения нарушений желудочно-кишечного тракта. Используемый в данном документе термин «нарушение желудочно-кишечного тракта» представляет собой заболевание или патологическое состояние желудочно-кишечного тракта. Заболевание пищеварительной системы может поражать слизистую оболочку (например, эпителий, собственную пластинку слизистой оболочки, мышечную пластинку слизистой оболочки и т.д.), подслизистую оболочку (например, подслизистое сплетение, кишечное нервное сплетение и т.д.), мышечный слой желудочно-

кишечного тракта, серозную оболочку и/или адвентициальную оболочку, ротовую полость, пищевод, привратник желудка, желудок, двенадцатиперстную кишку, тонкий кишечник, слепую кишку, аппендикс, толстую кишку, заднепроходный канал или прямую кишку. Нарушение желудочно-кишечного тракта может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации. Неограничивающие примеры заболеваний и нарушений желудочно-кишечного тракта включают в себя без ограничения воспалительную болезнь кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, синдром раздраженного кишечника, целиакию, рефлюкс-эзофагит (GERD), ахалазию, дивертикулит, диарею и определенные виды рака (например, рак кишечника, рак желудка, рак толстой кишки, рак прямой кишки и т.д.).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в ткань молочной железы (например, ткань молочной железы). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения нарушений молочной железы. Используемый в данном документе термин «нарушение молочной железы» представляет собой заболевание или патологическое состояние молочной железы. Заболевание молочной железы может поражать фиброзную ткань, жировую ткань, дольки или протоки молочной железы. Нарушение молочной железы может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации. Неограничивающие примеры заболеваний и нарушений молочной железы включают в себя без ограничения мастит, кальциноз молочной железы, жировой некроз, фибroadеному, фиброз и простые кисты, галакторею, гиперплазию и рак молочной железы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в ткань поджелудочной железы (например, ткань поджелудочной железы). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения нарушений поджелудочной железы. Используемый в данном документе термин «нарушение поджелудочной железы» представляет собой заболевание или патологическое состояние поджелудочной железы. Заболевание поджелудочной железы может поражать головку поджелудочной железы, шейку поджелудочной железы, тело поджелудочной железы, хвост поджелудочной железы, панкреатические островки (например, островки Лангерганса), ацинусы или призматический эпителий. Нарушение поджелудочной железы может иметь

генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации. Неограничивающие примеры заболеваний поджелудочной железы включают в себя без ограничения сахарный диабет (например, сахарный диабет 1 типа и сахарный диабет 2 типа), панкреатит (например, острый панкреатит, хронический панкреатит) и рак поджелудочной железы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в ткань мочевыводящих путей (например, ткань мочевыводящих путей, такую как ткань мочевого пузыря). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения нарушений мочевыводящих путей. Используемый в данном документе термин «нарушение мочевыводящих путей» представляет собой заболевание или патологическое состояние мочевыводящих путей. Заболевание мочевыводящих путей может поражать мочевой пузырь, мочеточник, уретру или предстательную железу. Нарушение мочевыводящих путей может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации. Неограничивающие примеры заболеваний и нарушений мочевыводящих путей включают в себя без ограничения инфекции мочевыводящих путей, мочекаменную болезнь, проблемы контроля мочевого пузыря (например, задержку мочеиспускания, недержание мочи и т.д.), цистит и рак мочевого пузыря.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для доставки генной терапии в ткань матки (например, ткань матки). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления варианты AAV, описанные в данном документе, могут быть пригодны для лечения нарушений матки. Используемый в данном документе термин «нарушение матки» представляет собой заболевание или патологическое состояние матки. Заболевание матки может поражать шейку матки, цервикальный канал, тело матки (дно), эндометрий, миометрий или периметрий. Нарушение матки может иметь генетическую природу, унаследованную или приобретенную в результате соматической мутации. Неограничивающие примеры заболеваний и нарушений матки включают в себя без ограничения аденомиоз, эндометриоз, гиперплазию эндометрия, синдром Ашермана и рак эндометрия.

Компоненты, подлежащие культивированию в клетке-хозяине с целью упаковки вектора rAAV в капсид AAV могут быть получены в клетке-хозяине *in trans*. В альтернативном варианте любой один или более из требуемых компонентов (например,

вектор на основе рекомбинантного AAV, последовательности гер, последовательности сар и/или функциональные элементы вирусов-помощников) могут быть получены с помощью стабильной клетки-хозяина, которая была сконструирована таким образом, что содержит один или несколько требуемых компонентов, с помощью способов, известных специалистам в данной области. Более подходящим образом, такая стабильная клетка-хозяин будет содержать необходимый(необходимые) компонент(компоненты) под контролем индуцируемого промотора. В то же время необходимый(необходимые) компонент(компоненты) может находиться под контролем конститутивного промотора. Примеры подходящих индуцируемых и конститутивных промоторов предусмотрены в данном документе, в описании регуляторных элементов, подходящих для применения с трансгеном. В еще одном альтернативном варианте выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный(выбранные) компонент(компоненты) под контролем конститутивного промотора и другого(других) выбранного(выбранных) компонента(компонентов) одного или нескольких индуцируемых промоторов. Например, стабильная клетка-хозяин может происходить из клеток 293 (которые содержат функциональные элементы E1 под контролем конститутивного промотора), однако которые содержат белки гер и/или сар под контролем индуцируемых промоторов. Еще одни стабильные клетки могут быть получены специалистом в данной области техники.

Вектор на основе рекомбинантного AAV, последовательности гер, последовательности сар и функциональные элементы вирусов-помощников, требуемые для получения rAAV по настоящему раскрытию, могут быть доставлены в упаковывающую клетку-хозяина с помощью любого подходящего генетического элемента (вектора). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одну нуклеиновую кислоту, кодирующую все три капсидных белка (например, VP1, VP2 и VP3), доставляют в упаковывающую клетку-хозяина в одном векторе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие капсидные белки, доставляют в упаковывающую клетку с помощью двух векторов; при этом первый вектор содержит первую нуклеиновую кислоту, кодирующую два капсидных белка (например, VP1 и VP2), а второй вектор содержит вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую один капсидный белок (например, VP3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления три вектора, каждый из которых содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую отличающийся друг от друга капсидный белок, доставляют в упаковывающую клетку-хозяина. Выбранный генетический элемент может быть доставлен с помощью любого подходящего способа, в том числе способов, описанных в данном документе. Способы, используемые для конструирования любого варианта

осуществления по данному раскрытию, известны специалистам в области манипуляции с нуклеиновыми кислотами и включают в себя методики генетической инженерии, рекомбинантной инженерии и синтеза. См., например, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Аналогичным образом, способы получения вирионов rAAV хорошо известны и выбор подходящего способа не ограничивается настоящим раскрытием. См., например, K. Fisher et al, *J. Virol.*, 70:520-532 (1993) и патент США № 5478745.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рекомбинантные AAV могут быть получены с помощью способа тройной трансфекции (подробно описанного в патенте США № 6001650). В типичном случае рекомбинантные AAV получают в результате трансфекции клетки-хозяина вектором на основе рекомбинантного AAV (содержащего трансген), подлежащим упаковке в частицы AAV, вектором на основе функциональных элементов вирусов-помощников AAV и вектором на основе вспомогательных функциональных элементов. Вектор на основе функциональных элементов вирусов-помощников AAV кодирует последовательности «функциональных элементов вирусов-помощников AAV» (например, гер и сар), которые функционируют *in trans* для репликации и инкапсуляции эффективных AAV. Предпочтительно вектор на основе функциональных элементов вирусов-помощников AAV поддерживает образование эффективных векторов AAV без образования каких-либо подлежащих определению вирионов AAV дикого типа (например, вирионов AAV, содержащих функциональные гены гер и сар). Неограничивающие примеры векторов, подходящих для применения в соответствии с настоящим раскрытием, включают в себя вектор rHLP19, описанный в патенте США № 6001650, и вектор rРербсар6, описанный в патенте США № 6156303, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Вектор на основе вспомогательных функциональных элементов кодирует нуклеотидные последовательности для вирусных и/или клеточных функциональных элементов, не происходящих из AAV, от которых зависит репликация AAV (например, «вспомогательных функциональных элементов»). Вспомогательные функциональные элементы включают в себя такие функциональные элементы, требуемые для репликации AAV, в том числе без ограничения фрагменты, участвующие в активации транскрипции генов AAV, специфичного для развития стадии сплайсинга мРНК AAV, репликации ДНК AAV, синтеза продуктов экспрессии сар и сборки капсида AAV. Вспомогательные функциональные элементы на основе вирусов могут происходить из любого из известных вирусов-помощников, такого как аденовирус, вирус герпеса (отличный от вируса простого герпеса 1 типа) и вирус осповакцины.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие предусматривает трансфицированные клетки-хозяева. Термин «трансфекция» используется для обозначения захвата чужеродной ДНК клеткой, и клетку «трансфицировали», если экзогенную ДНК ввели внутрь клетки (например, через клеточную мембрану). Несколько методик трансфекции являются общеизвестными в данной области техники. См., например, Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, и Chu et al. (1981) *Gene* 13:197. Такие методики могут быть использованы для введения одной или нескольких экзогенных нуклеиновых кислот, таких как вектор интеграции нуклеотидов и другие молекулы нуклеиновых кислот, в подходящие клетки-хозяева.

Термин «клетка-хозяин» относится к любой клетке, которая содержит или способна содержать вещество, представляющее интерес. Часто клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Клетка-хозяин может быть использована в качестве реципиента конструкции вируса-помощника AAV, минигенной плазмиды AAV, вектора на основе вспомогательных функциональных элементов или других транспортных ДНК, ассоциированных с образованием рекомбинантных AAV. Термин включает в себя потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, «клетка-хозяин», используемая в данном документе, может обозначать клетку, которая была трансфицирована последовательностью экзогенной ДНК. Понятно, что потомство одной исходной клетки не обязательно может быть полностью идентичным по морфологии или содержанию геномной или общей ДНК исходному родителю, в результате природной, случайной или намеренной мутации.

Используемый в данном документе термин «клеточная линия» относится к популяции клеток, способных к непрерывному или продолжительному росту и делению *in vitro*. Часто клеточные линии представляют собой популяции-клоны, происходящие из одной клетки-предшественника. Дополнительно известно в данной области техники, что спонтанные или индуцированные изменения могут возникать в кариотипе во время хранения или переноса таких популяций-клонов. Таким образом, клетки, происходящие из обозначенной клеточной линии, не обязательно могут быть в точности идентичными предковым клеткам или культурам, и обозначаемая клеточная линия включает в себя такие варианты.

Используемый в данном документе термин «рекомбинантная клетка» относится к клетке, в которую был введен сегмент экзогенной ДНК, такой как сегмент ДНК, который

приводит к транскрипции биологически активного полипептида или продуцированию биологически активной нуклеиновой кислоты, такой как РНК.

Клетки также могут быть трансфицированы вектором (например, вектором на основе вируса-помощника), который предоставляет функциональные элементы вирусом-помощников AAV. Вектор, предоставляющий функциональные элементы вирусом-помощников, может предоставлять функциональные элементы аденовируса, в том числе, E1a, E1b, E2a и E4ORF6. Последовательности гена аденовируса, предоставляющие эти функциональные элементы, могут быть получены из любого известного серотипа аденовируса, такого как серотипы 2, 3, 4, 7, 12 и 40, и дополнительно включать любой из идентифицированных в настоящее время человеческих типов, известных в данной области техники. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы предусматривают трансфекции клетки вектором, экспрессирующим один или несколько генов, необходимых для репликации AAV, транскрипции генов AAV и/или упаковки AAV.

Используемый в данном документе термин «вектор» включает в себя любой генетический элемент, такой как плазида, фаг, транспозон, космида, хромосома, искусственная хромосома, вирус, вирион и т.д., который способен к репликации при ассоциации с соответствующими контрольными элементами, и который переносит последовательности генов между клетками. Таким образом, термин включает в себя средства клонирования и экспрессии, а также вирусные векторы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предполагается, что пригодные векторы представляют собой векторы, в которых сегмент нуклеиновой кислоты, подлежащей транскрипции (например, последовательность нуклеиновой кислоты), расположен под транскрипционным контролем промотора. Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки, или введенным синтетическим аппаратом, который требуется для инициации специфичной транскрипции гена. Фразы «функционально расположенный», «под контролем» или «под транскрипционным контролем» означают, что промотор находится в соответствующем положении по отношению к нуклеиновой кислоте с целью контроля инициации РНК-полимеразы и экспрессии гена. Термин «экспрессионный вектор или конструкция» означают тип генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность, в которой часть или вся нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность, способна к транскрипции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессия включает в себя транскрипцию нуклеиновой кислоты, например, с целью образования биологически активного полипептидного продукта или

ингибирующей РНК (например, shRNA, miRNA, ингибитора miRNA) из транскрибируемого гена.

В некоторых случаях выделенный капсидный ген может быть использован для конструирования и упаковки рекомбинантных AAV с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, для определения функциональных характеристик, ассоциированных с капсидным белком, кодируемым геном. Например, выделенные капсидные гены могут быть использованы для конструирования и упаковки рекомбинантного AAV (rAAV), содержащего репортерный ген (например, β-галактозидазы, GFP, люциферазы и т.д.). Затем rAAV может быть доставлен в организм животного (например, мышь), а свойства целенаправленного воздействия на ткань нового выделенного капсидного гена могут быть определены в результате исследования экспрессии репортерного гена в различных тканях (например, сердце, печени, почках) животного. Другие способы характеристики новых выделенных капсидных генов раскрыты в данном документе, а другие также хорошо известны в данной области техники.

Вышеизложенные способы упаковки рекомбинантных векторов в необходимые капсиды AAV для получения rAAV по настоящему раскрытию не подразумевают ограничения и другие подходящие способы будут очевидны специалисту в данной области.

### ***Векторы на основе рекомбинантных AAV***

«Векторы на основе рекомбинантных AAV (rAAV)» по настоящему раскрытию в типичном случае состоят из, как минимум, трансгена и его регуляторных последовательностей, а также 5' и 3' концевых инвертированных повторов AAV (ITR). Именно такой вектор на основе рекомбинантного AAV упаковывается в капсидный белок и доставляется в выбранную целевую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную векторным последовательностям, которая кодирует полипептид, белок, функциональную молекулу РНК (например, miRNA, ингибитор miRNA) или другой генный продукт, представляющий интерес. Последовательность, кодирующая нуклеиновую кислоту, функционально связана с регуляторными компонентами таким образом, чтобы обеспечивать транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию трансгена в клетке целевой ткани.

Последовательности AAV вектора в типичном случае содержат действующие в cis-положении 5' и 3' концевые инвертированные повторы (см., например, В. J. Carter, в

"Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)).

Последовательности ITR составляют приблизительно 145 п.о. в длину. Предпочтительно по сути целые последовательности, кодирующие ITR, используются в молекуле, хотя некоторая степень незначительной модификации этих последовательностей допустима.

5 Способность модифицировать эти последовательности ITR находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. (См., например, источники, такие как Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al., J Virol., 70:520 532 (1996)). Пример такой молекулы, используемой в настоящем раскрытии, представляет собой «действующая в

10 цис-положении» плаزمид, содержащая трансген, в которой выбранная последовательность трансгена и ассоциированные регуляторные элементы фланкированы последовательностями 5' и 3' ITR AAV. Последовательности ITR AAV могут быть получены из любого известного AAV, в том числе идентифицированных в настоящее время типов AAV млекопитающих.

15 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие предусматривает самокомплементарный вектор AAV. Используемый в данном документе термин «самокомплементарный вектор AAV» (scAAV) относится к вектору, содержащему двунитевой векторный геном, образованный в отсутствие сайта концевой репликации (TR) из одного из ITR AAV. Отсутствие TR предупреждает инициацию репликации на

20 конце вектора, где TR не присутствует. В целом векторы scAAV образуют геномы с односторонними инвертированными повторами с TR дикого типа (wt) AAV на каждом конце и мутантным TR (mTR) в середине.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV по настоящему раскрытию представляют собой псевдотипированные гAAV. Псевдотипирование

25 представляет собой процесс получения вирусов или вирусных векторов в комбинации с чужеродными вирусными оболочечными белками. Результат представляет собой псевдотипированную вирусную частицу. С помощью этого способа чужеродные вирусные оболочечные белки могут быть использованы для изменения тропизма хозяина или повышения/снижения стабильности вирусных частиц. В соответствии с некоторыми

30 аспектами псевдотипированный гAAV содержит нуклеиновую кислоту от двух или более различных AAV, в которых нуклеиновая кислота от одного AAV кодирует капсидный белок, а нуклеиновая кислота по меньшей мере одного другого AAV кодирует другие вирусные белки и/или вирусный геном. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления псевдотипированный гAAV относится к AAV, содержащему

35 инвертированный концевой повтор (ITR) одного серотипа AAV и капсидный белок

другого серотипа AAV. Например, псевдотипированный вектор AAV, содержащий ITR серотипа X, инкапсулированный с белками Y, будет сконструирован обозначен как AAVX/Y (например, AAV2/1 имеет ITR AAV2 и капсиду AAV1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления псевдотипированные rAAV могут быть пригодны для комбинирования способностей целенаправленно специфическим образом воздействовать на ткани капсидного белка от одного серотипа AAV с вирусной ДНК от другого серотипа AAV, тем самым, обеспечивая целевую доставку трансгена в целевую ткань.

В дополнение к основным элементам, определенным выше для вектора на основе рекомбинантного AAV, вектор также включает с себя необходимые контрольные элементы, которые функционально связаны таким образом, чтобы обеспечивать его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированной вирусом, полученным в соответствии с настоящим раскрытием. Используемый в данном документе термин «функционально связанные» последовательности включает в себя последовательности контроля экспрессии, которые прилегают к гену, представляющему интерес, и последовательности контроля экспрессии, которые функционируют в транс-положении и на расстоянии от гена, представляющего интерес.

Последовательности контроля экспрессии представляют собой последовательности инициации транскрипции, терминации, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процесинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (polyA); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые усиливают эффективность трансляции (например, консенсусную последовательность Козак); последовательности, которые усиливают стабильность белка; и при необходимости последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. Значительное количество последовательностей контроля экспрессии, в том числе промоторы, которые являются нативными, конститутивными, индуцируемыми и тканеспецифичными, известны в данной области техники и могут быть использованы.

Используемые в данном документе последовательности нуклеиновой кислоты (например, кодирующая последовательность) и регуляторные последовательности считаются «функционально» связанными, если они ковалентно связаны таким образом, что подчиняют экспрессию или транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты влиянию или контролю регуляторных последовательностей. Если необходимо, чтобы последовательности нуклеиновой кислоты транслировались в функциональный белок, то

две последовательности ДНК считаются функционально связанными, если индукция промотора в 5' регуляторных последовательностях приводит к транскрипции кодируемой последовательности и если природа связи между последовательностями ДНК (1) не приводит к введению мутации по типу сдвига рамки, (2) не нарушает способность промоторного участка направлять транскрипцию кодируемых последовательностей, или (3) не нарушает способность соответствующего транскрипта РНК транслироваться в белок. Таким образом, промоторная область была бы функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, если бы промоторная область была способна воздействовать на последовательность ДНК таким образом, что образующийся в результате транскрипт мог бы транслироваться в необходимый белок или полипептид. Аналогичным образом, две или более кодирующих областей являются функционально связанными таким образом, если их транскрипция из одного промотора приводит к экспрессии двух или более белков, транслируемых в рамке считывания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функционально связанные кодирующие последовательности приводят к образованию слитого белка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функционально связанные кодирующие последовательности приводят к образованию функциональной РНК (например, shRNA, miRNA, ингибитора miRNA).

В случае нуклеиновых кислот, кодирующих белки, последовательность полиаденилирования, как правило, вставляют после трансгенных последовательностей и до последовательности 3' ITR AAV. Конструкция гAAV, пригодная в настоящем раскрытии, может также содержать интрон, желателно расположенный между промоторной/энхансерной последовательностью и трансгеном. Одна возможная интронная последовательность происходит из SV-40 и обозначается как интронная последовательность Т SV-40. Другой векторный элемент, который может быть использован, представляет собой участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES используется для продуцирования более одного полипептида из одного генного транскрипта. Последовательность IRES была бы использована для продуцирования белка, который содержит более одной полипептидной цепи. Выбор этих и других распространенных векторных элементов является стандартным и многие такие последовательности являются доступными [см., например, Sambrook et al, и ссылки, цитируемые в данном документе, например, на страницах 3.18 3.26 и 16.17 16.27, а также Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989]. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность вируса ящера 2А включена в полипротеин; было показано, что такой небольшой пептид

(примерно 18 аминокислот в длину) опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459). Расщепляющая активность последовательности 2А ранее была продемонстрирована в искусственных системах, в том числе плаزمидях и векторах для генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et al., Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et al., Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931.; и Klump, H et al., Gene Therapy, 2001; 8: 811-817).

Точная природа регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии генов в клетках-хозяевах, будет варьироваться между видами, тканями и типами клеток, однако в целом будет включать в себя, при необходимости, 5' нетранскрибируемые последовательности и 5' нетранслируемые последовательности, участвующие в инициации транскрипции и трансляции соответственно, такие как ТАТА-бокс, последовательность кэппинга, последовательность СААТ, энхансерные элементы и т.п. В особенности такие 5' нетранскрибируемые регуляторные последовательности будут включать в себя промоторную область, которая включает промоторную последовательность для контроля трансляции функционально связанного гена. Регуляторные последовательности также могут включать энхансерные последовательности или выше расположенные активирующие последовательности, при необходимости. Векторы по настоящему раскрытию могут необязательно содержать 5' лидерные или сигнальные последовательности. Выбор и разработка подходящего вектора находится в пределах способностей и усмотрения специалиста в данной области техники.

Примеры конститутивных промоторов включают в себя без ограничения промотор LTR ретровирусного вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) [см., например, Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)], промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор  $\beta$ -актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK) и промотор EF1 $\alpha$  [Invitrogen].

Индукцируемые промоторы обеспечивают регуляцию экспрессии генов и могут регулироваться с помощью экзогенно поставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или присутствия специфического физиологического состояния, например, острой фазы, определенного состояния дифференцировки клетки, или только в реплицирующихся клетках. Индуцируемые промоторы доступны из ряда коммерческих источников, в том числе без ограничения Invitrogen, Clontech и Ariad.

Многие другие системы были описаны и могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники. Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно поставляемыми соединениями, включают в себя индуцируемый цинком промотор металлотионина овцы (MT), индуцируемый дексаметазоном (Dex) промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промоторную систему, индуцируемую полимеразой T7 (WO 98/10088); промотор, индуцируемый экзидонами насекомых (No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), тетрациклин-репресслируемую систему (Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), тетрациклин-индуцируемую систему (Gossen et al, Science, 268:1766-1769 (1995), см. также Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), RU486-индуцируемую систему (Wang et al, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) и Wang et al, Gene Ther., 4:432-441 (1997)) и рапамицин-индуцируемую систему (Magari et al, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Еще одними типами индуцируемых промоторов, которые могут быть пригодны в данном контексте, являются индуцируемые промоторы, которые регулируются специфическим физиологическим состоянием, например, температурой, острой фазой, определенным состоянием дифференцировки клетки, или только в реплицирующихся клетках.

В соответствии с другим вариантом осуществления может быть использован нативный промотор для трансгена. Нативный промотор может быть предпочтительным в случае, если требуется, чтобы экспрессия трансгена имитировала экспрессию нативного гена. Нативный промотор может быть использован, если экспрессия трансгена должна регулироваться временным или онтогенетическим образом, или тканеспецифичным образом, или в ответ на специфические транскрипционные раздражители. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления для имитации экспрессии нативного гена также можно применять другие нативные элементы контроля экспрессии, такие как энхансерные элементы, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Козак.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления регуляторные последовательности придают способности тканеспецифичной экспрессии генов. В некоторых случаях тканеспецифичные регуляторные последовательности связываются с тканеспецифичными факторами транскрипции, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифичным образом. Такие тканеспецифичные регуляторные последовательности (например, промоторы, энхансеры и т.д.) хорошо известны в данной области техники. Иллюстративные тканеспецифичные регуляторные последовательности включают в себя без ограничения следующие тканеспецифичные промоторы: печень-специфичный промотор глобулина сыворотки, связывающего тироксин (TBG), промотор инсулина,

промотор глюкагона, промотор соматостатина, промотор панкреатического полипептида (PPY), промотор синапсина-1 (Syn), промотор креатинкиназы (МСК), промотор десмина млекопитающих (DES), промотор тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина ( $\alpha$ -МНС), специфичный в отношении желудочно-кишечного тракта промотор муцина 2, специфичный в отношении глаза промотор ретиношизина, специфичный в отношении глаза промотор K12, специфичный в отношении ткани дыхательной системы промотор CC10, специфичный в отношении дыхательной системы промотор сурфактанта С (SP-C), специфичный в отношении ткани молочной железы промотор PRC1, специфичный в отношении ткани молочной железы промотор RRM2, специфичный в отношении мочевыводящих путей промотор уроплакина 2 (UPII), специфичный в отношении матки промотор лактоферрина или промотор сердечного тропонина Т (сTnT). Другие иллюстративные промоторы включают в себя промотор бета-актина, промотор кора вируса гепатита В, Sandig et al., *Gene Ther.*, 3:1002-9 (1996); промотор альфа-фетопротеина (AFP), Arbuthnot et al., *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996)), промотор костного остеокальцина (Stein et al., *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96 (1997)); промотор костного сиалопротеина (Chen et al., *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64 (1996)), промотор CD2 (Hansal et al., *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998); промотор тяжелой цепи иммуноглобулина; промотор  $\alpha$ -цепи Т-клеточного рецептора, нейрональный, такой как нейрон-специфичный промотор енолазы (NSE) (Andersen et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), промотор гена легкой цепи нейрофиламентов (Piccioli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)) и нейрон-специфичный промотор гена *vgf* (Piccioli et al., *Neuron*, 15:373-84 (1995)), среди прочих, которые будут очевидны специалисту в данной области.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько сайтов связывания для одной или нескольких miRNA включены в трансген вектора гAAV с целью ингибирования экспрессии трансгена в одной или нескольких тканях субъекта, содержащих трансген. Специалисту в данной области будет понятно, что сайты связывания могут быть выбраны для контроля экспрессии трансгена тканеспецифичным образом. Например, сайты связывания для печенъ-специфичного miR-122 могут быть включены в трансген для ингибирования экспрессии этого трансгена в печени. Целевые сайты в мРНК могут располагаться в 5' UTR, 3' UTR или кодирующей области. В типичном случае целевой сайт располагается в 3' UTR мРНК. Кроме того, трансген может быть сконструирован таким образом, что несколько miRNA регулируют мРНК путем распознавания одного или нескольких сайтов. Наличие нескольких сайтов связывания miRNA может приводить к совместному действию нескольких RISC и обеспечивать высокоэффективное ингибирование экспрессии. Последовательность

целевого сайта может содержать в общей сложности 5-100, 10-60 или более нуклеотидов. Последовательность целевого сайта может содержать по меньшей мере 5 нуклеотидов последовательности сайта связывания целевого гена.

#### 5 ***Рекомбинантные векторы на основе AAV последовательности, кодирующие трансгены***

Состав трансгенной последовательности вектора гAAV будет зависеть от применения, к которому образующийся в результате вектор будет прилагаться. Например, один тип трансгенной последовательности содержит репортерную  
10 последовательность, которая при экспрессии образует подлежащий выявлению сигнал. В другом примере трансген кодирует терапевтический белок или терапевтическую функциональную РНК. В другом примере трансген кодирует белок или функциональную РНК, которые предполагается использовать в научно-исследовательских целях, например, для создания соматической трансгенной животной модели, содержащей трансген,  
15 например, для исследования функции трансгенного продукта. В другом примере трансген кодирует белок или функциональную РНК, которую предполагается использовать для создания животной модели заболевания. Подходящие последовательности, кодирующие трансген, будут очевидны специалисту в данной области техники.

Репортерные последовательности, которые могут быть предусмотрены в трансгене,  
20 включают в себя без ограничения последовательности ДНК, кодирующие  $\beta$ -лактамазу,  $\beta$ -галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), люциферазу и другие, известные в данной области техники. При ассоциации с регуляторными элементами, которые регулируют их экспрессию, репортерные последовательности обеспечивают сигналы,  
25 выявляемые стандартными средствами, в том числе ферментативными, радиографическими, колориметрическими, флуоресцентными или другими спектрографическими анализами, анализами на основе сортировки клеток с флуоресценцией, в том числе иммуноферментным анализом (ELISA), радиоиммунологическим анализом (RIA) и радиогистохимическим анализом. Например,  
30 в случаях, когда маркерная последовательность представляет собой ген LacZ, наличие вектора, несущего сигнальную последовательность, выявляют с помощью анализов на наличие активности  $\beta$ -галактозидазы. В случае, если трансген представляет собой зеленый флуоресцентный белок или люциферазу, то вектор, несущий сигнальную последовательность, может быть измерен визуально, по образованию цвета или света в  
35 люминометре. Такие репортеры могут быть пригодны, например, при подтверждении

способностей целенаправленно специфическим образом воздействовать на ткани и тканеспецифической промоторной регуляторной активности гAAV.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие предусматривает векторы гAAV для применения в способах предупреждения или лечения одной или нескольких генетических недостаточностей или дисфункций у млекопитающего, такой как, например, недостаточность полипептида или избыток полипептида у млекопитающего, и, в частности, для лечения или ослабления тяжести или степени недостаточности у человека, проявляющего одно или несколько нарушений, связанных с недостаточностью в таких полипептидах в клетках и тканях. Способ предусматривает введение вектора гAAV, который кодирует один или несколько терапевтических пептидов, полипептидов, siRNA, микроРНК, антисмысловых нуклеотидов и т.д., в фармацевтически приемлемом носителе субъекту, в количестве и в течение периода времени, достаточном для лечения недостаточности или нарушения у субъекта, страдающего от такого нарушения.

Таким образом, настоящее раскрытие предусматривает доставку векторов гAAV, кодирующих один или несколько пептидов, полипептидов или белков, которые пригодны для лечения или предупреждения патологических состояний у субъекта-млекопитающего. Иллюстративные терапевтические белки включают в себя один или несколько полипептидов, выбранных из группы, состоящей из факторов роста, интерлейкинов, интерферонов, антиапоптозных факторов, цитокинов, антидиабетических факторов, антиапоптозных средств, факторов коагуляции, противоопухолевых факторов. Другие неограничивающие примеры терапевтических белков включают в себя BDNF, CNTF, CSF, EGF, FGF, G-SCF, GM-CSF, гонадотропин, IFN, IFG-1, M-CSF, NGF, PDGF, PEDF, TGF, VEGF, TGF-B2, TNF, пролактин, соматотропин, XIAP1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-10 (187A), вирусный IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17 и IL-18.

Векторы гAAV могут содержать ген, подлежащий переносу в организм субъекта, для лечения заболевания, ассоциированного с ослабленной экспрессией, отсутствием экспрессии или дисфункцией гена. Иллюстративные гены и ассоциированные патологические состояния включают в себя без ограничения глюкозо-6-фосфатазу, ассоциированную с недостаточностью накопления гликогена типа 1A; фосфоенолпируваткарбоккиназу, ассоциированную с недостаточностью Перск; галактозо-1-фосфатуридилтрансферазу, ассоциированную с галактоземией; фенилаланингидроксилазу, ассоциированную с фенилкетонурией; дегидрогеназу альфа-кетокислоты с разветвленной цепью, ассоциированную с болезнью кленового сиропа;

фумарилацетоацетатгидролазу, ассоциированную с тирозинемией 1 типа; метилмалонил-  
 CoA-мутаза, ассоциированную с метилмалоновой ацидемией; среднецепочечную ацил-  
 CoA-дегидрогеназу, ассоциированную с недостаточностью среднецепочечной ацетил-  
 CoA; омитинтранскарбамилазу, ассоциированную с недостаточностью  
 5 омитинтранскарбамилазы; синтетазу аргининянтарной кислоты, ассоциированную с  
 цитруллинемией; белок рецептора липопротеина низкой плотности, ассоциированного с  
 семейной гиперхолестеринемией; UDP-глюкоронизилтрансферазу, ассоциированную с  
 болезнью Криглера-Найара; аденозиндезаминазу, ассоциированную с тяжелым  
 комбинированным иммунодефицитом; гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу,  
 10 ассоциированную с подагрой и синдромом Леша-Найхана; биотинидазу,  
 ассоциированную с недостаточностью биотинидазы; бета-глюкоцеребозидазу,  
 ассоциированную с болезнью Гоше; бета-глюкуронидазу, ассоциированную с синдромом  
 Слая; мембранный белок пероксисом с молекулярной массой 70 кДа, ассоциированный с  
 синдромом Цельвегера; порфобилиногендезаминазу, ассоциированную с острой  
 15 интермиттирующей порфирией; альфа-1-антитрипсин для лечения недостаточности  
 альфа-1-атритрипсина (эмфиземы); эритропоэтин для лечения анемии вследствие  
 талассемии или почечной недостаточности; фактор роста сосудистого эндотелия,  
 ангиопоэтин-1 и фактор роста фибробластов для лечения ишемических заболеваний;  
 тромбомодулин и ингибитор тканевого фактора для лечения окклюзированных  
 20 кровеносных сосудов, как наблюдается, например, в случае атеросклероза, тромбоза или  
 эмболий; декарбоксилазу ароматических кислот (AADC) и тирозингидролазу (TH) для  
 лечения болезни Паркинсона; бета-адренергический рецептор, антисмысловый в  
 отношении или мутантная форма фосфоламбана, аденозинтрифосфатаза-2  
 сарко(эндо)плазматической сети (SERCA2) и сердечную форму аденилатциклазы для  
 25 лечения застойной сердечной недостаточности; ген супрессора опухоли, такой как p53,  
 для лечения различных видов рака; цитокин, такой как один из различных интерлейкинов  
 для лечения воспалительных и иммунных нарушений и видов рака; дистрофин или  
 минидистрофин и утрофин или миниутрофин для лечения мышечных дистрофий; и  
 инсулин для лечения сахарного диабета.

30 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие  
 относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или  
 функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания  
 или нарушения, ассоциированного с центральной нервной системой (ЦНС). Далее  
 представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС:  
 35 DRD2, GRIA1, GRIA2, GRIN1, SLC1A1, SYP, SYT1, CHRNA7, 3Rtau/4rTUS, APP, BAX,

BCL-2, GRIK1, GFAP, IL-1, AGER, ассоциированный с болезнью Альцгеймера; UCH-L1, SKP1, EGLN1, Nurr-1, BDNF, TrkB, gstm1, S106 $\beta$ , ассоциированный с болезнью Паркинсона; IT15, PRNP, JPH3, TBP, ATXN1, ATXN2, ATXN3, атрофин 1, FTL, TITF-1, ассоциированный с болезнью Гентингтона; FXN, ассоциированный с атаксией Фридрейха; ASPA, ассоциированный с болезнью Канавана; DMD, ассоциированный с мышечной дистрофией; и SMN1, UBE1, DYNC1H1, ассоциированный со спинальной мышечной дистрофией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей белок или функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, ассоциированного с сердечно-сосудистой системой. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием сердечно-сосудистой системы: VEGF, FGF, SDF-1, коннексин 40, коннексин 43, SCN4a, HIF1 $\alpha$ , SERCa2a, ADCY1 и ADCY6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, ассоциированного с дыхательной системой. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием дыхательной системы: TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC, HPS1, HPS3, HPS4, ADTB3A, IL1A, IL1B, LTA, IL6, CXCR1 и CXCR2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных

генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

5 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, ассоциированного с печенью. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием печени:  $\alpha$ 1-AT, HFE, ATP7B, 10 фумарилацетоацетатгидролаза (FAH), глюкозо-6-фосфатаза, NCAN, GSKR, LYPLAL1 и PNPLA3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к 15 рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или 20 функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, ассоциированного с почками. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием почек: PKD1, PKD2, PKHD1, NPHS1, NPHS2, PLCE1, CD2AP, LAMB2, TRPC6, WT1, LMX1B, SMARCAL1, COQ2, PDSS2, SCARB3, FN1, COL4A5, COL4A6, COL4A3, COL4A4, FOX1C, RET, UPK3A, BMP4, SIX2, 25 CDC5L, USF2, ROBO2, SLIT2, EYA1, MYOG, SIX1, SIX5, FRAS1, FREM2, GATA3, KAL1, PAX2, TCF2 и SALL1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие 30 относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или 35 функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания

или нарушения, ассоциированного с глазом. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием глаз: CFH, C3, MT-ND2, ARMS2, TIMP3, CAMK4, FMN1, RHO, USH2A, RPGR, RP2, TMCO, SIX1, SIX6, LRP12, ZFPM2, TBK1, GALC, миоцилин, CYP1B1, CAV1, CAV2, оптинейрин и CDKN2B. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, ассоциированного с молочной железой. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием молочной железы: BRCA1, BRCA2, Trp53, PTEN, HER2, BRAF и PARP1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, ассоциированного с желудочно-кишечным трактом. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием желудочно-кишечного тракта: CYP2C19, CCL26, APC, IL12, IL10 и IL-18. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну

или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, ассоциированного с поджелудочной железой. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием поджелудочной железы: PRSS1, SPINK1, STK11, MLH1, KRAS2, p16, p53 и BRAF. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, ассоциированного с мочевыводящими путями. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием мочевыводящих путей: HSPA1B, CXCR1 & 2, TLR2, TLR4, TGF-1, FGFR3, RB1, HRAS, TP53, и TSC1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к AAV, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, пригодные для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения, ассоциированного с маткой. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с заболеванием глаз: DN-ER, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 и PMS2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты,

которые экспрессируют один или несколько из вышеизложенных генов или их фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV, содержащим нуклеиновые кислоты, которые экспрессируют одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких из вышеуказанных генов.

гAAV по настоящему раскрытию могут быть использованы для восстановления экспрессии генов, экспрессия которых ослаблена, которые подвергнуты сайленсингу или иным образом дисфункциональны у субъекта (например, супрессор опухоли, который был подвергнут сайленсингу у субъекта, имеющего рак). гAAVs по настоящему раскрытию также могут быть использованы для нокдауна экспрессии генов, которые aberrантным образом экспрессированы у субъекта (например, онкоген, который экспрессируется у субъекта, имеющего рак). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую генный продукт, ассоциированный с раком (например, супрессоры опухоли), может быть использован для лечения рака, путем введения гAAV, содержащего вектор гAAV, субъекту, имеющему рак.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую малую интерферирующую нуклеиновую кислоту (например, shRNA, miRNA), которая ингибирует экспрессию генного продукта, ассоциированного с раком (например, онкогены), может быть использован для лечения рака, путем введения гAAV, содержащего вектор гAAV, субъекту, имеющему рак. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую генный продукт, ассоциированный с раком (или функциональную РНК, которая ингибирует экспрессию гена, ассоциированного с раком), может быть использован для научно-исследовательских целей, например, для изучения рака или для выявления терапевтических средств, которые лечат рак. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с развитием рака (например, онкогены и супрессоры опухоли): AARS, ABCB1, ABCC4, ABI2, ABL1, ABL2, ACK1, ACP2, ACY1, ADSL, AK1, AKR1C2, AKT1, ALB, ANPEP, ANXA5, ANXA7, AP2M1, APC, ARHGAP5, ARHGEF5, ARID4A, ASNS, ATF4, ATM, ATP5B, ATP5O, AXL, BARD1, BAX, BCL2, BHLHB2, BLMH, BRAF, BRCA1, BRCA2, BTK, CANX, CAP1, CAPN1, CAPNS1, CAV1, CBFB, CBLB, CCL2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CCT5, CCYR61, CD24, CD44, CD59, CDC20, CDC25, CDC25A, CDC25B, CDC2L5, CDK10, CDK4, CDK5, CDK9, CDKL1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2D, CEBPG, CENPC1, CGRRF1, CHAF1A, CIB1, CKMT1, CLK1, CLK2, CLK3, CLNS1A, CLTC, COL1A1, COL6A3, COX6C, COX7A2, CRAT, CRHR1, CSF1R, CSK, CSNK1G2, CTNNA1, CTNNB1,

CTPS, CTSC, CTSD, CUL1, CYR61, DCC, DCN, DDX10, DEK, DHCR7, DHRS2, DHX8, DLG3, DVL1, DVL3, E2F1, E2F3, E2F5, EGFR, EGR1, EIF5, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC3, ETV1, ETV3, ETV6, F2R, FASTK, FBN1, FBN2, FES, FGFR1, FGR, FKBP8, FN1, FOS, FOSL1, FOSL2, FOXG1A, FOXO1A, FRAP1, FRZB, FTL, FZD2, FZD5, FZD9, G22P1, GAS6, GCN5L2, GDF15, GNA13, GNAS, GNB2, GNB2L1, GPR39, GRB2, GSK3A, GSPT1, GTF2I, HDAC1, HDGF, HMMR, HPRT1, HRB, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPB1, HSPH1, HYAL1, HYOU1, ICAM1, ID1, ID2, IDUA, IER3, IFITM1, IGF1R, IGF2R, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IL1B, ILK, ING1, IRF3, ITGA3, ITGA6, ITGB4, JAK1, JARID1A, JUN, JUNB, JUND, K-ALPHA-1, KIT, KITLG, KLK10, KPNA2, KRAS2, KRT18, KRT2A, KRT9, LAMB1, LAMP2, LCK, LCN2, LEP, LITAF, LRPAP1, LTF, LYN, LZTR1, MADH1, MAP2K2, MAP3K8, MAPK12, MAPK13, MAPKAPK3, MAPRE1, MARS, MAS1, MCC, MCM2, MCM4, MDM2, MDM4, MET, MGST1, MICB, MLLT3, MME, MMP1, MMP14, MMP17, MMP2, MNDA, MSH2, MSH6, MT3, MYB, MYBL1, MYBL2, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYL9, MYLK, NEO1, NF1, NF2, NFKB1, NFKB2, NFSF7, NID, NINJ1, NMBR, NME1, NME2, NME3, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, NPM1, NQO1, NR1D1, NR2F1, NR2F6, NRAS, NRG1, NSEP1, OSM, PA2G4, PABPC1, PCNA, PCTK1, PCTK2, PCTK3, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDPK1, PEA15, PFDN4, PFDN5, PGAM1, PHB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG, PIM1, PKM2, PKMYT1, PLK2, PPARD, PPARG, PPIH, PPP1CA, PPP2R5A, PRDX2, PRDX4, PRKAR1A, PRKCBP1, PRNP, PRSS15, PSMA1, PTCH, PTEN, PTGS1, PTMA, PTN, PTPRN, RAB5A, RAC1, RAD50, RAF1, RALBP1, RAP1A, RARA, RARB, RASGRF1, RB1, RBBP4, RBL2, REA, REL, RELB, RET, RFC2, RGS19, RHOA, RHOB, RHOC, RHOD, RIPK1, RPN2, RPS6KB1, RRM1, SARS, SELENBP1, SEMA3C, SEMA4D, SEPP1, SERPINH1, SFN, SFPQ, SFRS7, SHB, SHH, SIAH2, SIVA, SIVA TP53, SKI, SKIL, SLC16A1, SLC1A4, SLC20A1, SMO, SMPD1, SNAI2, SND1, SNRBP2, SOCS1, SOCS3, SOD1, SORT1, SPINT2, SPRY2, SRC, SRPX, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, STC1, TAF1, TBL3, TBRG4, TCF1, TCF7L2, TFAP2C, TFDP1, TFDP2, TGFA, TGFB1, TGFBI, TGFBR2, TGFBR3, THBS1, TIE, TIMP1, TIMP3, TJP1, TK1, TLE1, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF6, TNFRSF7, TNK1, TOB1, TP53, TP53BP2, TP53I3, TP73, TPBG, TPT1, TRADD, TRAM1, TRRAP, TSG101, TUFM, TXNRD1, TYRO3, UBC, UBE2L6, UCHL1, USP7, VDAC1, VEGF, VHL, VIL2, WEE1, WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WT1, XRCC1, YES1, YWHAB, YWHAZ, ZAP70 и ZNF9.

Вектор гAAV может содержать в качестве трансгена нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, которые модулируют апоптоз. Далее представлен неограничивающий перечень генов, ассоциированных с апоптозом, и

нуклеиновых кислот, кодирующих продукты этих генов, и их гомологи, и кодирующие малые интерферирующие нуклеиновые кислоты (например, shRNA, miRNA), которые ингибируют экспрессию этих генов, и их гомологи, которые пригодны в качестве трансгенов в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего раскрытия: RPS27A, ABL1, AKT1, APAF1, BAD, BAG1, BAG3, BAG4, BAK1, BAX, BCL10, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L11, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L2, BCLAF1, BFAR, BID, BIK, NAIP, BIRC2, BIRC3, XIAP, BIRC5, BIRC6, BIRC7, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BOK, BRAF, CARD10, CARD11, NLRC4, CARD14, NOD2, NOD1, CARD6, CARD8, CARD9, CASP1, CASP10, CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR, CIDEA, CIDEB, CRADD, DAPK1, DAPK2, DFFA, DFFB, FADD, GADD45A, GDNF, HRK, IGF1R, LTA, LTBR, MCL1, NOL3, PYCARD, RIPK1, RIPK2, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF14, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF25, CD40, FAS, TNFRSF6B, CD27, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF14, TNFSF18, CD40LG, FASLG, CD70, TNFSF8, TNFSF9, TP53, TP53BP2, TP73, TP63, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5 DRD2, GRIA1, GRIA2, GRIN1, SLC1A1, SYP, SYT1, CHRNA7, 3Rtau/4rTUS, APP, BAX, BCL-2, GRIK1, GFAP, IL-1, AGER, UCH-L1, SKP1, EGLN1, Nurr-1, BDNF, TrkB, gstm1, S106 $\beta$ , IT15, PRNP, JPH3, TBP, ATXN1, ATXN2, ATXN3, атрофин 1, FTL, TITF-1, FXN, ASPA, DMD и SMN1, UBE1, DYNC1H1.

Специалисту в данной области также будет понятно, что в случае трансгенов, кодирующих белки или полипептиды, мутации, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам, могут быть выполнены в трансгене для обеспечения функционально эквивалентных вариантов или гомологов белка или полипептида. В соответствии с некоторыми аспектами настоящего раскрытия предусматривает изменения последовательностей, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам трансгена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген представляет собой ген, содержащий доминантную отрицательную мутацию. Например, трансген может экспрессировать мутантный белок, который взаимодействует с теми же самыми элементами, что и белок дикого типа, и, тем самым, блокирует некоторый аспект функции белка дикого типа.

Пригодные трансгенные продукты также включают в себя miRNA. miRNA и другие малые интерферирующие нуклеиновые кислоты регулируют экспрессию генов путем расщепления/разрушения целевого транскрипта РНК или репрессии трансляции целевой матричной РНК (мРНК). miRNA нативно экспрессируются, в типичном случае в виде конечных 19-25-нуклеотидных нетранслируемых продуктов РНК. miRNA проявляют

свою активность посредством специфичных в отношении последовательности взаимодействий с 3' нетранслируемыми областями (UTR) целевых мРНК. Эти эндогенно экспрессируемые miRNA образуют шпильчатые предшественники, которые затем подлежат процессингу в дуплекс из miRNA, а затем в «зрелую» одонитевую молекулу miRNA. Такая зрелая miRNA направляет мультибелковый комплекс, miRISC, который идентифицирует целевой сайт, например, в 3' UTR области целевых мРНК на основании их комплементарности со зрелой miRNA.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способов предусмотрен следующий неограничивающий перечень генов miRNA и их гомологов, пригодных в качестве трансгенов или в качестве мишеней для малых интерферирующих нуклеиновых кислот, кодируемых трансгенами (например, «губки» miRNA, антисмысловые олигонуклеотиды, РНК TuD): hsa-let-7a, hsa-let-7a\*, hsa-let-7b, hsa-let-7b\*, hsa-let-7c, hsa-let-7c\*, hsa-let-7d, hsa-let-7d\*, hsa-let-7e, hsa-let-7e\*, hsa-let-7f, hsa-let-7f-1\*, hsa-let-7f-2\*, hsa-let-7g, hsa-let-7g\*, hsa-let-7i, hsa-let-7i\*, hsa-miR-1, hsa-miR-100, hsa-miR-100\*, hsa-miR-101, hsa-miR-101\*, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-105\*, hsa-miR-106a, hsa-miR-106a\*, hsa-miR-106b, hsa-miR-106b\*, hsa-miR-107, hsa-miR-10a, hsa-miR-10a\*, hsa-miR-10b, hsa-miR-10b\*, hsa-miR-1178, hsa-miR-1179, hsa-miR-1180, hsa-miR-1181, hsa-miR-1182, hsa-miR-1183, hsa-miR-1184, hsa-miR-1185, hsa-miR-1197, hsa-miR-1200, hsa-miR-1201, hsa-miR-1202, hsa-miR-1203, hsa-miR-1204, hsa-miR-1205, hsa-miR-1206, hsa-miR-1207-3p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1208, hsa-miR-122, hsa-miR-122\*, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-1225-3p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1226, hsa-miR-1226\*, hsa-miR-1227, hsa-miR-1228, hsa-miR-1228\*, hsa-miR-1229, hsa-miR-1231, hsa-miR-1233, hsa-miR-1234, hsa-miR-1236, hsa-miR-1237, hsa-miR-1238, hsa-miR-124, hsa-miR-124\*, hsa-miR-1243, hsa-miR-1244, hsa-miR-1245, hsa-miR-1246, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1249, hsa-miR-1250, hsa-miR-1251, hsa-miR-1252, hsa-miR-1253, hsa-miR-1254, hsa-miR-1255a, hsa-miR-1255b, hsa-miR-1256, hsa-miR-1257, hsa-miR-1258, hsa-miR-1259, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-125b-1\*, hsa-miR-125b-2\*, hsa-miR-126, hsa-miR-126\*, hsa-miR-1260, hsa-miR-1261, hsa-miR-1262, hsa-miR-1263, hsa-miR-1264, hsa-miR-1265, hsa-miR-1266, hsa-miR-1267, hsa-miR-1268, hsa-miR-1269, hsa-miR-1270, hsa-miR-1271, hsa-miR-1272, hsa-miR-1273, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1274a, hsa-miR-1274b, hsa-miR-1275, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-1276, hsa-miR-1277, hsa-miR-1278, hsa-miR-1279, hsa-miR-128, hsa-miR-1280, hsa-miR-1281, hsa-miR-1282, hsa-miR-1283, hsa-miR-1284, hsa-miR-1285, hsa-miR-1286, hsa-miR-1287, hsa-miR-1288, hsa-miR-1289, hsa-miR-129\*, hsa-miR-1290, hsa-miR-1291, hsa-miR-1292, hsa-miR-1293, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-1294, hsa-miR-1295, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-1297, hsa-miR-1298, hsa-miR-1299, hsa-

miR-1300, hsa-miR-1301, hsa-miR-1302, hsa-miR-1303, hsa-miR-1304, hsa-miR-1305, hsa-miR-1306, hsa-miR-1307, hsa-miR-1308, hsa-miR-130a, hsa-miR-130a\*, hsa-miR-130b, hsa-miR-130b\*, hsa-miR-132, hsa-miR-132\*, hsa-miR-1321, hsa-miR-1322, hsa-miR-1323, hsa-miR-1324, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a, hsa-miR-135a\*, hsa-miR-135b, hsa-miR-135b\*, hsa-miR-136, hsa-miR-136\*, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-138-1\*, hsa-miR-138-2\*, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-141\*, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-143\*, hsa-miR-144, hsa-miR-144\*, hsa-miR-145, hsa-miR-145\*, hsa-miR-146a, hsa-miR-146a\*, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147, hsa-miR-147b, hsa-miR-148a, hsa-miR-148a\*, hsa-miR-148b, hsa-miR-148b\*, hsa-miR-149, hsa-miR-149\*, hsa-miR-150, hsa-miR-150\*, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-154, hsa-miR-154\*, hsa-miR-155, hsa-miR-155\*, hsa-miR-15a, hsa-miR-15a\*, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b\*, hsa-miR-16, hsa-miR-16-1\*, hsa-miR-16-2\*, hsa-miR-17, hsa-miR-17\*, hsa-miR-181a, hsa-miR-181a\*, hsa-miR-181a-2\*, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181c\*, hsa-miR-181d, hsa-miR-182, hsa-miR-182\*, hsa-miR-1825, hsa-miR-1826, hsa-miR-1827, hsa-miR-183, hsa-miR-183\*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-185\*, hsa-miR-186, hsa-miR-186\*, hsa-miR-187, hsa-miR-187\*, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a, hsa-miR-18a\*, hsa-miR-18b, hsa-miR-18b\*, hsa-miR-190, hsa-miR-190b, hsa-miR-191, hsa-miR-191\*, hsa-miR-192, hsa-miR-192\*, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-193b\*, hsa-miR-194, hsa-miR-194\*, hsa-miR-195, hsa-miR-195\*, hsa-miR-196a, hsa-miR-196a\*, hsa-miR-196b, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-19a\*, hsa-miR-19b, hsa-miR-19b-1\*, hsa-miR-19b-2\*, hsa-miR-200a, hsa-miR-200a\*, hsa-miR-200b, hsa-miR-200b\*, hsa-miR-200c, hsa-miR-200c\*, hsa-miR-202, hsa-miR-202\*, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-206, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20a\*, hsa-miR-20b, hsa-miR-20b\*, hsa-miR-21, hsa-miR-21\*, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-214, hsa-miR-214\*, hsa-miR-215, hsa-miR-216a, hsa-miR-216b, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-218-1\*, hsa-miR-218-2\*, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-22\*, hsa-miR-220a, hsa-miR-220b, hsa-miR-220c, hsa-miR-221, hsa-miR-221\*, hsa-miR-222, hsa-miR-222\*, hsa-miR-223, hsa-miR-223\*, hsa-miR-224, hsa-miR-23a, hsa-miR-23a\*, hsa-miR-23b, hsa-miR-23b\*, hsa-miR-24, hsa-miR-24-1\*, hsa-miR-24-2\*, hsa-miR-25, hsa-miR-25\*, hsa-miR-26a, hsa-miR-26a-1\*, hsa-miR-26a-2\*, hsa-miR-26b, hsa-miR-26b\*, hsa-miR-27a, hsa-miR-27a\*, hsa-miR-27b, hsa-miR-27b\*, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-297, hsa-miR-298, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29a\*, hsa-miR-29b, hsa-miR-29b-1\*, hsa-miR-29b-2\*, hsa-miR-29c, hsa-miR-29c\*, hsa-miR-300, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-

miR-302a, hsa-miR-302a\*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302b\*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302c\*, hsa-miR-302d, hsa-miR-302d\*, hsa-miR-302e, hsa-miR-302f, hsa-miR-30a, hsa-miR-30a\*, hsa-miR-30b, hsa-miR-30b\*, hsa-miR-30c, hsa-miR-30c-1\*, hsa-miR-30c-2\*, hsa-miR-30d, hsa-miR-30d\*, hsa-miR-30e, hsa-miR-30e\*, hsa-miR-31, hsa-miR-31\*, hsa-miR-32, hsa-miR-32\*,

5 hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d, hsa-miR-323-3p, hsa-miR-323-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-328, hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-335\*, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a, hsa-miR-33a\*, hsa-miR-33b, hsa-miR-33b\*, hsa-miR-340, hsa-miR-340\*,

10 hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34a\*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b\*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363\*, hsa-miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-367\*, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373\*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374a\*, hsa-miR-374b, hsa-miR-374b\*, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a\*, hsa-miR-376b, hsa-miR-376c,

15 hsa-miR-377, hsa-miR-377\*, hsa-miR-378, hsa-miR-378\*, hsa-miR-379, hsa-miR-379\*, hsa-miR-380, hsa-miR-380\*, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-411\*, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-424\*, hsa-miR-425, hsa-miR-425\*, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-431\*, hsa-miR-432, hsa-miR-432\*, hsa-miR-433, hsa-miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452\*, hsa-miR-453, hsa-miR-454, hsa-miR-454\*, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487a, hsa-miR-487b,

25 hsa-miR-488, hsa-miR-488\*, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-493\*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-497, hsa-miR-497\*, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-500\*, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-505\*, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-513c, hsa-miR-514, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516b, hsa-miR-517\*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c\*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-miR-518e\*, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f\*, hsa-miR-

35

519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e, hsa-miR-519e\*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522, hsa-miR-523, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b\*, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539, hsa-miR-541, hsa-miR-541\*, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-545\*, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-548b-3p, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-548e, hsa-miR-548f, hsa-miR-548g, hsa-miR-548h, hsa-miR-548i, hsa-miR-548j, hsa-miR-548k, hsa-miR-548l, hsa-miR-548m, hsa-miR-548n, hsa-miR-548o, hsa-miR-548p, hsa-miR-549, hsa-miR-550, hsa-miR-550\*, hsa-miR-551a, hsa-miR-551b, hsa-miR-551b\*, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-555, hsa-miR-556-3p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-589\*, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-593\*, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616, hsa-miR-616\*, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-624\*, hsa-miR-625, hsa-miR-625\*, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-629\*, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-653, hsa-miR-654-3p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-663b, hsa-miR-664, hsa-miR-664\*, hsa-miR-665, hsa-miR-668, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-675, hsa-miR-7, hsa-miR-708, hsa-miR-708\*, hsa-miR-7-1\*, hsa-miR-7-2\*, hsa-miR-720, hsa-miR-744, hsa-miR-744\*, hsa-miR-758, hsa-miR-760, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-873, hsa-miR-874, hsa-miR-875-3p, hsa-miR-875-5p, hsa-miR-

876-3p, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-877, hsa-miR-877\*, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-887, hsa-miR-888, hsa-miR-888\*, hsa-miR-889, hsa-miR-890, hsa-miR-891a, hsa-miR-891b, hsa-miR-892a, hsa-miR-892b, hsa-miR-9, hsa-miR-9\*, hsa-miR-920, hsa-miR-921, hsa-miR-922, hsa-miR-923, hsa-miR-924, hsa-miR-92a, hsa-miR-92a-1\*, hsa-miR-92a-2\*, hsa-miR-92b, hsa-miR-92b\*, hsa-miR-93, hsa-miR-93\*, hsa-miR-933, hsa-miR-934, hsa-miR-935, hsa-miR-936, hsa-miR-937, hsa-miR-938, hsa-miR-939, hsa-miR-940, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-943, hsa-miR-944, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-96\*, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-99a\*, hsa-miR-99b и hsa-miR-99b\*.

miRNA ингибирует функцию мРНК, на которую она целенаправленно воздействует, и в результате этого ингибирует экспрессию полипептидов, кодируемых мРНК. Таким образом, блокирование (частично или полностью) активности miRNA (например, сайленсинг miRNA) может эффективно индуцировать или восстанавливать экспрессию полипептида, экспрессия которого ингибирована (дерепрессировать полипептид). В соответствии с одним вариантом осуществления дерепрессирование полипептидов, кодируемых мишенями мРНК из miRNA, сопровождается ингибированием активности miRNA в клетках путем любого из множества способов. Например, блокирование активности miRNA может сопровождаться гибридизацией с малой интерферирующей нуклеиновой кислотой (например, антисмысловым олигонуклеотидом, «губкой» miRNA, РНК TuD), которая является комплементарной или по сути комплементарной miRNA, тем самым, блокируя взаимодействие miRNA с его целевой мРНК. Используемый в данном документе термин «малая интерферирующая нуклеиновая кислота, которая по сути комплементарна miRNA», представляет собой малую интерферирующую нуклеиновую кислоту, которая способна к гибридизации с miRNA, и блокированию активности miRNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления малая интерферирующая нуклеиновая кислота, которая по сути комплементарна miRNA, представляет собой малую интерферирующую нуклеиновую кислоту, которая комплементарна miRNA во всех, кроме 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 оснований. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность малой интерферирующей нуклеиновой кислоты, которая по сути комплементарна miRNA, представляет собой последовательность малой интерферирующей нуклеиновой кислоты, которая комплементарна miRNA, за исключением по меньшей мере одного основания.

«Ингибитор miRNA» представляет собой средство, которое блокирует функцию, экспрессию и/или процессинг miRNA. Например, эти молекулы включают в себя без ограничения специфическую в отношении микроРНК антисмысловую последовательность, «губки» микроРНК, РНК типа tough decoy (РНК TuD) и

олигонуклеотиды микроРНК (двунитевые, шпилечные, короткие олигонуклеотиды), которые ингибируют взаимодействие miRNA с комплексом Drosha. Ингибиторы микроРНК могут экспрессироваться в клетках из трансгенов вектора gAAV, как описано выше. «Губки» микроРНК специфично ингибируют miRNA путем комплементарных гептамерных затравочных последовательностей (Ebert, M.S. Nature Methods, Epub August, 12, 2007). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления все семейство miRNA может быть подвергнуто сайленсингу с помощью последовательности одной «губки». РНК TuD обеспечивают эффективную и длительную супрессию специфичных miRNA в клетках млекопитающих (см., например, Takeshi Naraguchi, et al., Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 6 e43, содержание которого в связи с РНК TuD включено в данный документ посредством ссылки). Другие способы сайленсинга функции miRNA (дерепрессия мишеней miRNA) в клетках будут очевидны специалисту в данной области техники.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клонирующая способность рекомбинантного РНК-вектора может ограничивать необходимую кодирующую последовательность и может требовать полного замещения вирусного 4,8 т.п.н. генома. Таким образом, в некоторых случаях крупные гены могут быть неподходящими для применения в стандартном рекомбинантном векторе AAV. Специалисту в данной области будет понятно, что доступны возможности для преодоления ограничивающей кодирующей способности. Например, ITR AAV двух геномов могут гибридизироваться с образованием конкатемеров типа «голова к хвосту», почти удваивая способность вектора. Вставка сплайс-сайтов способствует удалению ITR из транскрипта. Другие возможности преодоления ограничивающей клонирующей способности будут очевидны специалисту в данной области техники.

*Соматические трансгенные животные модели, полученные с помощью переноса генов на основе gAAV*

Настоящее раскрытие также относится к получению соматических трансгенных животных моделей заболевания с помощью способов на основе рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (gAAV). Способы основаны по меньшей мере отчасти на наблюдении того, что серотипы AAV и их варианты опосредуют эффективный и стабильный перенос генов тканеспецифичным образом в организм взрослых животных. Элементы gAAV (капсид, промотор, трансгенные продукты) объединяют с целью получения соматических трансгенных животных моделей, которые экспрессируют стабильный трансген специфичным во времени и тканеспецифичным образом.

Соматическое трансгенное животное, получаемое с помощью способов по настоящему раскрытию могут выступать в качестве пригодных моделей заболевания, патологического состояния человека и/или для характеристики гена, для которого функция (например, тканеспецифичность, роль в заболеваниях) является неизвестной или не полностью понятной. Например, животное (например, мышь) может быть инфицировано на определенной стадии развития (например, возраст) гААV, содержащим капсид, имеющий способность целенаправленно специфическим образом воздействовать на ткани (например, печень, сердце, поджелудочная железа), и трансген, имеющий тканеспецифичный промотор, направляющий экспрессию гена, участвующего в заболевании. При инфицировании гААV инфицирует определенные клетки целевой ткани и приводит к образованию продукта трансгена.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность кодирующей области трансгена является модифицированной. Модификация может изменять функцию продукта, кодируемого трансгеном. Затем влияние модификации можно изучать *in vivo* в результате создания соматической трансгенной животной модели с помощью способов, раскрытых в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модификация последовательности кодирующей области представляет собой нонсенс-мутацию, которая приводит к образованию фрагмента (например, усеченного варианта). В других случаях модификация представляет собой миссенс-мутацию, которая приводит к аминокислотной замене. Другие модификации возможны и будут очевидны специалисту в данной области техники.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген вызывает патологическое состояние. Трансген, который вызывает патологическое состояние, представляет собой ген, продукт которого играет роль в заболевании или нарушении (например, вызывает заболевание или нарушение, делает животное восприимчивым к заболеванию или нарушению) и/или может индуцировать заболевание или нарушение у животного. Затем животное можно наблюдать для оценки ряда аспектов заболевания (например, прогрессирования, ответа на лечение и т.д.). Эти примеры не подразумевают носить ограничивающий характер, другие аспекты и примеры раскрыты в данном документе и описаны более подробно ниже.

Настоящее раскрытие в соответствии с некоторыми аспектами предусматривает соматические трансгенные животные модели путем целевого уничтожения специфических типов клеток. Например, модели сахарного диабета 1 типа могут быть получены в результате целевого уничтожения бета-островков поджелудочной железы. В других примерах целевое уничтожение специфических типов клеток может быть

использовано для оценки роли специфических типов клеток в заболевании человека. В этом отношении трансгены, которые кодируют клеточные токсины (например, дифтерийный токсин А (DTA)) или проапоптозные гены (NTR, Вох и др.) могут быть пригодными в качестве трансгенов для функциональной абляции специфических типов клеток. Другие иллюстративные трансгены, продукты которых уничтожают клетки, предусмотрены способами, раскрытыми в данном документе, и будут очевидны специалисту в данной области техники.

Настоящее раскрытие в соответствии с некоторыми аспектами предусматривает способы получения соматических трансгенных животных моделей для изучения длительных эффектов сверхэкспрессии или нокдауна генов. Длительная сверхэкспрессия или нокдаун (например, с помощью shRNA, miRNA, ингибитора miRNA и т.д.) генов в специфических целевых тканях может нарушать нормальное метаболическое равновесие и приводить к образованию патологического состояния, тем самым, приводя к образованию животной модели заболевания, такого как, например, рак. Настоящее раскрытие в соответствии с некоторыми аспектами предусматривает способы получения соматических трансгенных животных моделей для изучения длительных эффектов сверхэкспрессии или нокдауна гена из потенциальных онкогенов или других генов для изучения опухолеобразования и функции генов в целевых тканях. Пригодные трансгенные продукты включают в себя белки, которые, как известно, ассоциированы с раком, и малые интерферирующие нуклеиновые кислоты, ингибирующие экспрессию таких белков.

Другие подходящие трансгены могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники, при условии, что они являются пригодными для создания животных моделей тканеспецифичного патологического состояния и/или заболевания.

#### *Способы введения рекомбинантных AAV*

гAAV могут быть доставлены субъекту в композициях в соответствии с любыми подходящими способами, известными в данной области техники. гAAV, предпочтительно суспендированные в физиологически совместимом носителе (например, в композиции), могут быть введены субъекту, например, животному-хозяину, такому как человек, мышь, крыса, кошка, собака, овца, кролик, лошадь, корова, коза, свинья, морская свинка, хомяк, курица, индейка или отличный от человека примат (например, макака). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления животное-хозяин не включает в себя человека.

Доставка гAAV субъекту-млекопитающему может происходить, например, путем внутримышечной инъекции или путем введения в кровоток субъекта-млекопитающего.

Введение в кровоток может происходить путем инъекции в вену, артерию или любой другой сосудистый канал. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV вводят в кровоток путем изолированной перфузии конечностей, методики, хорошо известной в области хирургии, при этом данный способ позволяет специалисту в данной области техники изолировать конечность из системного кровотока до введения вирионов гAAV. Вариант методики изолированной перфузии конечностей, описанный в патенте США № 6177403, также может быть использован специалистом в данной области техники для введения вирионов в сосудистое русло изолированной конечности с целью потенциального усиления трансдукции в мышечные клетки или ткань. Кроме того, в определенных примерах может быть желательной доставка вирионов в ЦНС субъекта. Под «ЦНС» подразумеваются все клетки и ткань головного мозга и спинного мозга позвоночного. Таким образом, данный термин включает в себя без ограничения нейроны, глиальные клетки, астроциты, спинномозговую жидкость (CSF), интерстициальные пространства, костную ткань, хрящевую ткань и т.п. Рекомбинантные AAV могут быть доставлены непосредственно в ЦНС или головной мозг путем инъекции, например, в область желудочка, а также в область полосатого тела (например, хвостатое ядро или скорлупу полосатого тела), спинной мозг и нейромышечное соединение, или дольку мозжечка, с помощью иглы, катетера или соответствующего изделия, с использованием нейрохирургических методик, известных в данной области, таких как стереотактическая инъекция (см., например, Stein et al., *J Virol* 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., *PNAS* 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., *Nat. Genet.* 3:219-223, 1993; и Alisky and Davidson, *Hum. Gene Ther.* 11:2315-2329, 2000).

Композиции по настоящему раскрытию могут содержать гAAV в отдельности или в комбинации с одним или несколькими вирусами (например, вторым гAAV, кодирующим один или несколько других трансгенов). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различных гAAV, каждый из которых имеет один или несколько различных трансгенов.

Подходящие носители могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники с точки зрения показания, на которое направлен гAAV. Например, один подходящий носитель включает в себя солевой раствор, который может образовывать состав с рядом буферных растворов (например, фосфатно-солевым солевым раствором). Другие иллюстративные носители включают в себя стерильный солевой раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло и воду. Выбор носителя не ограничен настоящим раскрытием.

Необязательно композиции по настоящему раскрытию могут содержать, помимо гAAV и носителя(носителей), другие стандартные фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы. Подходящие иллюстративные консерванты включают в себя хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновую кислоту, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол и параклорфенол. Подходящие химические стабилизаторы включают в себя желатин и альбумин.

гAAV вводят в достаточных количествах для трансфекции клеток необходимой ткани и для обеспечения достаточных уровней переноса и экспрессии генов без излишних побочных эффектов. Стандартные и фармацевтически приемлемые пути введения включают в себя без ограничения непосредственную доставку в выбранный орган (например, интрапортальную доставку в печень), пероральные, ингаляционные (в том числе интраназальную и интратрахеальную доставку), внутриглазные, внутривенные, внутримышечные, подкожные, интрадермальные, интратуморальные и другие парентеральные пути введения. Пути введения при необходимости могут быть комбинированными.

Доза вирионов гAAV, требуемая для достижения определенного «терапевтического эффекта», например, единицы дозы в геномных копиях/кг массы тела (GC/кг), будут варьироваться в зависимости от нескольких факторов, в том числе без ограничения пути введения вирионов гAAV, уровня экспрессии генов или РНК, требуемого для достижения терапевтического эффекта, конкретного заболевания или нарушения, подлежащего лечению, а также стабильности генного продукта или продукта на основе РНК. Специалист в данной области техники может легко определить диапазон дозы вирионов гAAV для лечения пациента, имеющего определенное заболевание или нарушение, на основе вышеупомянутых факторов, а также других факторов, которые хорошо известны в данной области техники.

Эффективное количество гAAV представляет собой количество, достаточное для целенаправленного инфицирования животного, целенаправленного воздействия на необходимую ткань. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество гAAV представляет собой количество, достаточное для получения стабильной соматической трансгенной животной модели. Эффективное количество будет зависеть главным образом от факторов, таких как вид, возраст, масса, состояние здоровья субъекта и ткань, подлежащая целенаправленному воздействию, и, таким образом, может варьироваться между животными или тканями. Например, эффективное количество гAAV, как правило, находится в диапазоне от приблизительно 1 мл до приблизительно 100 мл раствора, содержащего от приблизительно  $10^9$  до  $10^{16}$

геномных копий. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV вводят в дозе  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{14}$  или  $10^{15}$  геномных копий на субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV вводят в дозе  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  или  $10^{14}$  геномных копий на кг. В некоторых случаях доза между приблизительно  $10^{11}$  до  $10^{12}$  геномных копий гAAV является подходящей. В соответствии с определенными вариантами осуществления доза  $10^{12}$  геномных копий гAAV считается эффективной для целенаправленного воздействия на ткани сердца, печени и поджелудочной железы. В некоторых случаях стабильные трансгенные животные получают в результате введения несколько доз гAAV.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции гAAV составляют с целью снижения агрегации частиц AAV в композиции, в частности, если присутствуют высокие концентрации гAAV (например,  $\sim 10^{13}$  GC/мл или более). Способы снижения агрегации гAAV хорошо известны в данной области техники и включают в себя, например, добавление поверхностно-активных веществ, регуляцию pH, регуляцию концентрации солей и т.д. (См., например, Wright FR, et al., *Molecular Therapy* (2005) 12, 171–178, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.)

Состав фармацевтически приемлемых наполнителей и растворов носителей хорошо известен специалистам в данной области техники, а разработка подходящих режимов дозирования и лечения для применения определенных композиций, описана в данном документе в ряде режимов лечения.

В типичном случае эти составы могут содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% активного соединения или более, хотя процент активного(активных) ингредиента(ингредиентов), безусловно, может варьироваться и может для удобства находиться от приблизительно 1 или 2% и до приблизительно 70% или 80% или более от массы или объема всего состава. Естественным образом, количество активного соединения в каждой терапевтически пригодной композиции может быть подготовлено таким образом, чтобы подходящая доза была получена в любой определенной унифицированной дозе соединения. Факторы, такие как растворимость, биодоступность, биологический период полужизни, путь введения, срок хранения продукта, а также другие фармакологические аспекты будут учитываться специалистом в данной области приготовления таких фармацевтических составов, и, таким образом, ряд дозировок и режимов лечения может быть желательным.

В соответствии с определенными обстоятельствами будет желательно доставлять терапевтические конструкции на основе гAAV в подходящим образом составленных фармацевтических композициях, раскрытых в данном документе, подкожно,

интрапанкреатически, интраназально, парентерально, внутривенно, внутримышечно, интратекально или перорально, интраперитонеально или путем ингаляции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы введения, описанные в патентах США №№ 5543158; 5641515 и 5399363 (каждый из которых особым образом включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме), могут быть использованы для доставки rAAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предпочтительным способом введения является инъекцию в воротную вену.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсий. Дисперсии также могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предупреждения роста микроорганизмов. Во многих случаях форма является стерильной и жидкой до той степени, до которой существует легкая проходимость через иглу. Она должна быть стабильным в условиях производства и хранения и должен быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель также может представлять собой раствор или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Подходящая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, в результате поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов может осуществляться с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.д. Во многих случаях будет предпочтительным включение изотонических средств, например, сахаров или хлорида натрия. Длительное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто с помощью применения в композиции средств, которые замедляют всасывание, например, алюминия моностеарата и желатина.

В случае введения водных растворов для инъекций, например, раствор может быть подходящим образом забуферен, при необходимости, а жидкий разбавитель вначале делают изотоническим с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Эти определенные водные растворы являются особенно подходящими для внутривенного, внутримышечного, подкожного и интраперитонеального введения. В этой

связи стерильная водная среда, которая может быть использована, будет известна специалистам в данной области техники. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и добавлена к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса или введена в предполагаемый участок в результате инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Некоторая вариация дозы будет определенным образом происходить в зависимости от состояния хозяина. Лицо, ответственное за введение, будет в любом случае определять подходящую дозу для индивидуального хозяина.

Стерильные растворы для инъекций получают путем включения активного гAAV в требуемом количестве в подходящий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными в данном документе, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в состав стерильной основы, которая содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются методики вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые приводят к образованию порошка активного ингредиента совместно с любым дополнительным необходимым ингредиентом из его предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Композиции гAAV, раскрытые в данном документе, также могут быть составлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образованные с помощью свободных аминогрупп белка), которые образуются с участием неорганических кислот, таких как, например, соляной или фосфорной кислот, или таких органических кислот, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные с помощью свободных карбоксильных групп, также могут происходить из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п. После составления растворы будут вводить способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводят в нескольких лекарственных формах, таких как растворы для инъекций, капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

Используемый в данном документе термин «носитель» включает в себя любой и все растворители, диспергаторы, основы, покрытия, разбавителя, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие

всасывание, буферы, растворы носителя, суспензии, коллоиды и т.п. Использование таких сред и средств для фармацевтических активных субстанций хорошо известно в данной области техники. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным структурам и композициям, которые не вызывают аллергической или аналогичной нежелательной реакции при введении хозяину.

Средства доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрокапсулы, микросферы, липидные частицы, везикулы и т.п., могут быть использованы для ведения композиций по настоящему раскрытию в клетки подходящего хозяина. В частности, трансгены, доставляемые вектором гAAV, могут быть составлены для доставки инкапсулированными в липидной частице, липосоме, везикуле, наносфере или наночастице и т.п.

Таким составы могут быть предпочтительными для введения фармацевтически приемлемых составов нуклеиновых кислот или конструкций гAAV, раскрытых в данном документе. Получение и применение липосом является хорошо известным специалистам в данной области техники. Недавно были разработаны липосомы с повышенной стабильностью в сыворотке крови и повышенным периодом полужизни в кровяном русле (патент США № 5741516). Кроме того, были описаны различные способы получения липосом и липосомоподобных препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственных средств (патенты США №№ 5567434; 5552157; 5565213; 5738868 и 5795587).

Липосомы были успешно использованы в ряде типов клеток, которые в обычных условиях являются устойчивыми к трансфекции с помощью других процедур. Кроме того, липосомы не содержат ограничений на длину ДНК, которые типичны систем доставки на основе вирусов. Липосомы были эффективно использованы для введения генов, лекарственных средств, радиотерапевтических средств, вирусов, факторов транскрипции и аллостерических эффекторов, в некоторые культивируемые клеточные линии и организмы животных. Помимо этого, были завершены несколько успешных клинических исследований, в которых изучали эффективность доставки лекарственных средств на основе липосом.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергируются в водной среде и спонтанно образуют многослойные концентрические двухслойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (MLV)). MLV, как правило, имеют диаметры, от 25 нм до 4 мкм. Соникация MLV приводит к образованию малых однослойных везикул (SUV) с диаметрами в диапазоне от 200 до 500 ангстрем, содержащих водный раствор в коре.

В альтернативном варианте могут быть использованы нанокапсулярные составы гAAV. Нанокапсулы, как правило, могут захватывать вещества стабильным и воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных эффектов вследствие внутриклеточной полимерной перегрузки, такие ультратонкие частицы (размером около 0,1 мкм) должны быть сконструированы с помощью полимеров, способных распадаться *in vivo*. Для применения предусмотрены биоразлагаемые полиалкилцианоакрилатные наночастицы, которые соответствуют этим требованиям.

Помимо способов доставки, описанных выше, следующие методики предусмотрены в качестве альтернативных способов доставки композиций гAAV хозяину. Сонофорез (т.е., ультразвуковой способ) был использован и описан в патенте США № 5656016 в качестве устройства для усиления скорости и эффективности проникновения лекарственного средства в кровеносную систему и по ней. Другие альтернативы доставки лекарственных средств представляют собой внутрикостную инъекцию (патент США № 5779708), микрочиповые устройства (патент США № 5797898), офтальмологические составы (Bourlais et al., 1998), трансдермальные матрицы (патенты США №№ 5770219 и 5783208) и доставку, управляемую обратной связью (патент США № 5697899).

### ***Наборы и связанные с ними композиции***

Средства, описанные в данном документе, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, могут быть собраны в фармацевтические или диагностические или научно-исследовательские наборы для облегчения их применения в терапевтических, диагностических или научно-исследовательских областях применения. Набор может включать в себя один или несколько контейнеров, содержащих компоненты по настоящему раскрытию и инструкции по применению. В частности, такие наборы могут содержать одно или несколько средств, описанных в данном документе, совместно с инструкциями, описывающими предполагаемое применение и надлежащее использование этих средств. В соответствии с определенными вариантами осуществления средства в наборе могут находиться в фармацевтическом составе и дозе, подходящих для определенного применения и для способа введения средств. Наборы для научно-исследовательских целей могут содержать компоненты в соответствующих концентрациях или количествах для выполнения различных экспериментов.

Набор может быть разработан для облегчения исследователями применения способов, описанных в данном документе, и может принимать различные формы. Каждая из композиций в наборе, при необходимости, может быть предусмотрена в жидкой форме (например, в растворе) или в твердой форме (например, сухом порошке). В определенных

случаях некоторые из композиций могут быть составлены или иным образом обработаны (например, до активной формы), например, путем добавления подходящего растворителя или других молекул (например, воды или среды для культивирования клеток), которые могут быть предусмотрены или могут быть не предусмотрены в наборе. Используемый в данном документе термин «инструкции» могут определять инструкцию и/или рекламный материал, и в типичном случае содержат письменные инструкции на упаковке или в связи с упаковкой по настоящему раскрытию. Инструкции также могут содержать любые устные или электронные инструкции, представленные таким образом, чтобы пользователь легко распознал то, что инструкции предполагают связь с набором, например, в результате аудиовизуальной (например, видеокассета, DVD и др.), интернет и/или веб-информации и т.д. Письменные инструкции могут находиться в форме, предусмотренной государственными органами, регулирующими производство, применение или продажу фармацевтических или биологических препаратов, инструкции к которым также могут отражать утверждение государственным органом производства, применения или продажи для введения животным.

Набор может содержать любой один или несколько из компонентов, описанных в данном документе, в одном или нескольких контейнерах. В качестве примера в соответствии с одним вариантом осуществления набор может содержать инструкции для смешивания одного или нескольких компонентов набора и/или выделения или смешивания образца или применения в отношении субъекта. Набор может включать в себя контейнер, содержащий средства, описанные в данном документе. Средства могут находиться в форме жидкости, геля или твердого вещества (порошок). Средства могут быть приготовлены стерильным путем, упакованы в шприц и доставлены замороженными. В альтернативном варианте его можно содержать во флаконе или другом контейнере для хранения. Второй контейнер может содержать другие средства, приготовленные стерильно. В альтернативном варианте набор может содержать активные средства, предварительно смешанные и доставленные в шприц, флакон, пробирку или другой контейнер. Набор может содержать один или несколько из всех компонентов, требуемых для введения средств животному, таких как шприц, изделия для местного нанесения или система для внутривенных инфузий, особенно в случае наборов для получения конкретных соматических животных моделей.

Набор может иметь несколько форм, таких как блистерная упаковка, упаковка в целлофане, запаянная упаковка, герметично термоформируемый лоток или аналогичная упаковка или лоточная форма, с вспомогательными средствами, неплотно упакованными в упаковке, одной или нескольких пробирках, контейнерах, ящике или сумке. Набор можно

стерилизовать после того, как добавлены вспомогательные средства, тем самым, обеспечивая, чтобы отдельные вспомогательные средства в контейнере были иным образом распакованы. Набор можно стерилизовать с помощью любых подходящих методик стерилизации, таких как стерилизация облучением, тепловая стерилизация или другие способы стерилизации, известные в данной области техники. Набор может также содержать другие компоненты, в зависимости от конкретного применения, например, контейнеры, среды для выращивания клеток, соли, буферы, реагенты, шприцы, иглы, ткань, такую как марля, для нанесения или удаления дезинфицирующего средства, одноразовые перчатки, подложку для средств до введения и т.д.

Инструкции, включенные в набор, могут содержать способы выявления латентного AAV в клетке. Помимо этого, наборы по настоящему раскрытию могут содержать инструкции, отрицательный и/или положительный контроль, контейнеры, разбавители и буферы для образца, пробирки для приготовления образца и таблицу референсной последовательности AAV в печатном или электронном виде для сравнения последовательностей.

## Примеры

### Пример 1

#### **Выделение транскрипционно активных новых капсидных последовательностей**

#### **AAV с необходимыми тканевыми тропизмами и свойствами из тканей человека**

Данный пример описывает новые капсидные последовательности AAV, выделенные в результате следующих стадий: 1) ПЦР-амплификации геномов wtAAV, присутствующих в нормальных и патологических тканях человека; 2) высокопроизводительного одномолекулярного секвенирования в реальном времени (SMRT) библиотек ампликонов ПЦР; 3) идентификации/профилирования вариантов с помощью биоинформатических анализов; и 4) выбора высокодостоверных ORF, которые могут быть транслированы в полноразмерные капсидные белки. Схематические обозначения технологических процессов, используемых в данном примере, показаны на Фиг. 1A-1B.

В данном подходе использовали природный пул геномного разнообразия, наблюдаемого среди вирусных геномов, выделенных из нормальных и опухолевых тканей. Концептуально, ткани *in vivo* выступают в качестве природных инкубаторов вирусного природного разнообразия в результате селективного давления и/или ускользания от иммунологического надзора. Таким образом, для обнаружения меж- и внутритканевой вариабельности, а также разнообразия между пациентами полезны

способы, которые способны профилировать полный спектр вариантов AAV, обнаруженных среди тканей и органов человеческого происхождения.

*ПЦР-амплификация геномов AAV из тканей человека*

5 Для выделения различных вариантов AAV с возможностью идентификации новых серотипов с уникальными тропизмами 844 образцов, полученных в результате хирургического вмешательства у человека, от 455 пациентов, собирали из West China Hospital, Sichuan University, Чэнду, Китай. Эти ткани включали широкий спектр типов тканей/органов, а также различные типы опухолей (Табл. 1). В частности, варианты AAV  
10 идентифицировали из девяти образцов нормальной ткани печени, 7 образцов ткани опухоли печени, четырех образцов тканей увеличенной предстательной железы, двух нормальных образцов ткани легких, одного опухолевого образца ткани поджелудочной железы, одного образца раковой ткани молочной железы, одного образца нормальной ткани молочной железы, одного образца раковой ткани желудка, одного образца  
15 нормальной ткани желудка, одного образца ткани головного мозга и одного образца глиомы.

Суммарную геномную ДНК экстрагировали из человеческих тканей и подвергли ПЦР-амплификации капсидную последовательность AAV. Праймеры для ПЦР, используемые в данном примере, описаны в Табл. 2. Вкратце, праймеры всех AAV для  
20 амплификации 4,1 т.п.н. последовательности гер-сар AAV (например, RepF318, AV2cas) или праймеры всех AAV для амплификации 2,3 т.п.н. последовательности сар AAV (например, CapF, CapR) использовали для ПЦР.

Таблица 1

25 Клинические образцы для амплификации генома wtAAV

Орган	Количество тканей	
	Нормальная ткань	Опухолевая ткань
Печень	100	101
Головной мозг	4	50
Желудок	37	37
Легкие	100	100
Молочная железа	52	57
Поджелудочная железа	Н.о.	45
Прямая кишки	50	50
Предстательная железа	34	Н.о.
Выделительная система	3	12

Шейка матки	2	10
<b>Сумма</b>	<b>378</b>	<b>466</b>

Таблица 2

Последовательности праймеров для ПЦР

Праймер	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
RepF318	GCCATGCCGGGGTTCTACGAGAT	872
AV2cas	ACAGGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA	873
CapF	GACTGCATCTTTGAACAATAAATGA	874
CapR	GAAACGAATTAACCGGTTTATTGATTA	875

5 *Высокопроизводительное секвенирование продуктов ПЦР AAV и биоинформатический анализ*

Продукты ПЦР AAV подвергали высокопроизводительному одномолекулярному секвенированию в реальном времени (SMRT). Данный подход устраняет необходимость осуществлять реконструкцию вирусного генома и прогнозирование химерных организмов  
10 на основе выравненных короткочитаемых фрагментов, полученных в результате других стандартных высокопроизводительных методик секвенирования генома.

Используя потоки анализа вариантов, разработанных на основе общедоступных биоинформатических средств, выявляли более 600 ранее неописанных высокодостоверных вариантов капсидных последовательностей AAV2, гибрида AAV2/3 и  
15 AAV8. В частности, были идентифицированы 224 варианта AAV8 (содержащих от 1 до 10 вариантов с отличием по одной аминокислоте); 425 вариантов AAV2 (содержащих от 1 до 20 вариантов с отличием по одной аминокислоте); и 194 варианта гибрида AAV2/3 (содержащих от 10 до 50 вариантов с отличием по одной аминокислоте). В Табл. 3, 4 и 5 представлены уникальные варианты капсидных белков. В целях сравнения  
20 аминокислотные последовательности капсидов AAV2, AAV3 и AAV8 дикого типа описаны в SEQ ID NO: 869, 870 и 871 соответственно. На Фиг. 7 представлена диаграмма рассеяния, на которой отображено распределение различных вариантов капсида AAV2 и вариантов AAV2/3, содержащих один или несколько вариантов с отличием по одной аминокислоте.

25

Таблица 3

Уникальные варианты AAV2 и гибрида AAV2/3 (аминокислотные последовательности), идентифицированные с помощью секвенирования SMRT и биоинформатического анализа.

<b>Уникальные варианты AAV2</b>						
Источник образца	№ пациента	Размер ДНК (т.о.)	Уникальные варианты (а.к.)	SEQ ID NO:	Всего уникальных вариантов (а.к.)	
Печень	7927N	2,3 т.о. (cap)	85	325-409	<b>409</b>	
Опухоль печени	37HCC		3	322-324		
Молочная железа	18B		26	118-143		
Рак молочной железы	19B		21	211-231		
Легкие	18L		55	144-198		
Предстательная железа	5		24	1-24		
	17		12	106-117		
	18		12	199-210		
	27		90	232-321		
Рак поджелудочной железы	10		81	25-105		
Печень	1178N	4,1 т.о. (rep+cap)	4	410-414; 837-840	<b>16</b>	
	9955N		3	429-434; 850-852		
Опухоль печени	9955C		9	415-428; 841-849		
<b>Уникальные варианты AAV2/3</b>						
Источник образца	№ пациента	Размер ДНК (т.о.)	Уникальные варианты (а.к.)		Всего уникальных вариантов (а.к.)	
Печень	42	2,3 т.о. (cap)	6	512-517	<b>194</b>	
	74		11	543-553		
Опухоль печени	37HCC		6	506-511		
	65		4	539-542		
	7449C		15	554-568		
Молочная железа	18B		23	435-457		
Рак молочной железы	19B		44	462-505		
Предстательная железа	5		60	569-628		
	17		4	458-461		
	18					
Рак желудка	17G	Н.о. (420 в ДНК)	-			
Желудок	50G	21	518-538			

Последовательности ДНК представлены для 4,1 т.о. библиотек.

Таблица 4

Уникальные варианты AAV8 (аминокислотные последовательности), идентифицированные с помощью секвенирования SMRT и биоинформатического анализа.

Источник образца	№ пациента	Размер ДНК (т.о.)	Уникальные варианты (а.к.)	SEQ ID NO:	Всего уникальных вариантов (а.к.)
Печень	0067N	2,3 т.о. (cap)	12	647-658	<b>208</b>
	3522N		73	674-746	
	5110N		3	747-749	
	7427N		6	750-755	
Опухоль печени	0067C		9	638-646	
	7803C		9	756-764	
	8818C		63	765-827	
Головной мозг	G5		9	828-836	
Глиома	2236		14	659-672	
Легкие	24		10	629-637; 673	

Таблица 5

## 5 Дополнительные капсидные белки варианта AAV8

Название варианта AAV8	SEQ ID NO:
B1	853
B2	854
B3	855
B4	856
B12	857
B18	858
B24	859
B41	860
B44	861
B45	862
B46	863
B60	864
B61	865
B62	866
B63	867
B64	868

## Пример 2

### Идентификация вариантов AAV8 с улучшенным тропизмом *in vivo*

Подсовокупность кандидатных вариантов AAV8 (например, B2, B3, B44 и B61) клонировали в пакующие векторы AAV с помощью стандартных способов молекулярного клонирования и упаковывали с репортерными генами люциферазы, регулируемые промотором CB6. Полученные векторы инъецировали в мышей и уровни экспрессии трасгена люциферазы *in vivo* анализировали с помощью визуализации целого животного и количественной оценки люминесценции. Было замечено, что варианты B2 (SEQ ID NO: 854) и B3 (SEQ ID NO: 855) имели более высокую экспрессию в печени после внутримышечной инъекции (Фиг. 2A-2D), в то время как после IV инъекции у неонатальных мышей вариант B61 (SEQ ID NO: 865) характеризовался более высокими эффективностями трансдукции в головном мозге и спинном мозге по сравнению с AAV9 (Фиг. 3A-3B). Это было примечательно, поскольку наблюдали, что AAV8 дикого типа проникал через гематоэнцефалический барьер меньше, чем AAV9. Один вариант AAV8, B44 (SEQ ID NO: 861) характеризовался более высокой способностью трансдуцироваться в печень после IM инъекции по сравнению с AAV8 (Фиг. 4A-4B).

Филогенетический анализ выполняли для сравнения капсидных вариантов AAV8 B2, B3, B44 и B61 по сравнению с другими серотипами AAV. Вкратце, аминокислотные последовательности вариантов AAV8 выравняли с другими опубликованными последовательностями AAV с помощью ClustalW и филогенетические деревья получали с помощью метода минимальной эволюции в MEGA6.06. Результаты биоинформатического анализа указывали на то, что последовательности B2, B3, B44 и B61 были связаны с капсидными белками клада E [AAV8]. (Фиг. 5). Иллюстративные аминокислотные замены в вариантах AAV8 показаны в Табл. 6.

Таблица 6

Иллюстративные аминокислотные замены в вариантах AAV8 по отношению к вариантам AAV8 дикого типа

Вариант AAV	Иллюстративные замены (по отношению к wtAAV8)
B2	E63G
B3	K259R
B44	L91Q, T234A, M374T
B61	M374T, M561V

### Пример 3

#### Оценка *in vitro* эффективности упаковки генома rAAV и исходная характеристика кандидатных капсидных вариантов

5 Молекулярное клонирование упакованных плазмидных конструкций, содержащих  
выбранные капсидные варианты AAV

Капсидные варианты AAV2 и гибрида AAV2/3, идентифицированные с помощью  
секвенирования SMRT, клонировали в пакующие плазмиды в результате замены  
стандартных вирусных капсидных генов путем стандартной стратегии молекулярного  
10 клонирования (например, сайт-направленного мутагенеза исходных экспрессионных  
плазмид капсида AAV2 или AAV2/3, клонирования на основе ПЦР и сборки Гибсона, или  
синтезировали с привлечением сторонних организаций). На Фиг. 8 показаны векторные  
конструкции, подлежащие использованию в мультиплексном скрининге обнаруженных  
капсидных вариантов. Обобщенная информация о предложенных трансгенных кассетах,  
15 подлежащих использованию, для различных диагностических стратегий, показано в Табл.  
7.

Таблица 7

Трансгенные кассеты для различных диагностических стратегий

Промотор	Трансген	Анализ репортерных/терапевтических генов
Энхансер CMV β-Актин кур	EGFP	Эффективность тканеспецифичной или специфичной в отношении типов клеток трансдукции
Энхансер CMV β-Актин кур	Люцифераза	Профилирование тропизма целого животного и количественная оценка индивидуальных тканей
Глобулин сыворотки крови, связывающий тироксин	Фактор IX	Печень-специфичная трансдукция секретируемых факторов. Доклиническое исследование

*Мультиплексная оценка эффективности упаковки с помощью высокопроизводительного получения векторов в малом масштабе и титрования векторных геномов*

Количественную оценку векторных геномов гAAV в неочищенном лизате использовали для прямого исследования эффективности упаковки вариантов гAAV векторов первого поколения (однонитевых AAV) и второго поколения (самокомплементарных AAV) непосредственно после тройной трансфекции пакующих клеток НЕК 293. Это обеспечивает оптимизированную альтернативу осуществлению полного технологического процесса для получения векторов в малом масштабе с последующим окрашиванием серебром и титрованием векторных геномов с использованием стандартной ПЦР для оценки качества вирусов в случае всех обнаруженных вариантов. Поскольку этот способ может быть представлен в масштабе 96-луночных форматов, он используется для быстрой идентификации вариантов, которые образуют насыщенные векторы.

15

*Серологическая оценка новых вариантов AAV*

Кандидатные варианты с высокой эффективностью упаковки подлежали скринингу в отношении перекрестной реактивности антител к настоящим AAV с помощью стандартных средств, таких как иммунологические анализы капсидов с целью исследования новых гAAV против сыворотки от иммунизированных AAV кроликов. Помимо этого, выполняли анализы нейтрализации объединенных IgG (IVIg) человека для каждого кандидатного варианта с целью определения возможности предсуществующего гуморального иммунитета в человеческой популяции.

**Пример 4**

**Анализы *in vivo* вариантов гAAV2 и гAAV2/3 для изучения биологии трансдукции векторов, распространенности патотоксичности, тропизма тканей/органов и профилей биораспределения**

*Исследования на мышцах*

Кандидатные капсидные варианты группировали на основе распределения в тканях и устанавливали приоритет в зависимости от органов, представляющих интерес. Группы кандидатных вариантов подвергали кластер-индексированию (Фиг. 6А), при этом несколько пакующих плазмид, экспрессирующих кандидатные капсидные варианты, смешивали и экспрессировали с целью упаковки уникальным образом ДНК-штрихкодированных трансгенов в результате тройной трансфекции (например, фактор

35

коагуляции IX F9 (F.IX), для оценки целенаправленного воздействия на печень и эффективности экспрессии секретируемых факторов; EGFP, для оценки биораспределения и степени тканеспецифичной трансдукции путем выполнения срезов органов/тканей и сравнительного иммунофлуоресцентного микроскопического анализа; или люцифераза (Luc), для оценки качества трансдукции в ЦНС и печень путем визуализации живого животного.

Для исследований, которые оценивали способность вариантов rAAV целенаправленно воздействовать на печень в связи с экспрессией и секрецией трангена, разрабатывали конструкции rAAV, содержащие печень-специфичный промотор глобулина сыворотки крови, связывающего тироксин (TGB). Для исследований, которые профилировали трансдукцию векторов в целом животном, разрабатывали конструкции, содержащие регуляторную кассету на основе энхансера CMV промотора  $\beta$ -актина кур (CB6).

Векторы, инкапсулирующие индексированные трансгены, инъецировали во взрослых и новорожденных мышей с помощью различных путей введения и подвергали скринингу в отношении экспрессии F.IX, экспрессии EGFP и экспрессии Luc в 1-месячных лонгитюдных исследованиях с целью профилирования трансгенной экспрессии, опосредованной вариантами AAV. Пути введения в случае ЦНС/головного мозга включали периферические интраваскулярные (IV, для исследования трансдукции через гематоэнцефалический барьер), интрацеребровентрикулярные (ICV), интарпаренхиматозные и интратекальные. Введение в сетчатку осуществляли с помощью субретинальной инъекции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления IV инъекции также целенаправленно воздействовали на печень.

Животных, которые проявляли уникальную трансгенную экспрессию по сравнению с контрольными животными (например, трансгены, доставляемые с помощью AAV2, AAV2/3 или AAV8), умерщвляли, а органы извлекали. Отдельные органы анализировали на присутствие и распространенность штрихкодированных трансгенов с помощью стандартной ПЦР-амплификации неочищенных экстрактов ДНК или библиотек кДНК, содержащих трансгенную последовательность, с последующим секвенированием с помощью Illumina для отслеживания штрихкодированных трансгенов, обогащенных в каждой ткани. На Фиг. 9 представлена общая стратегия разработки индексирования трансгенов. Распространенность и распределение в тканях/органах подлежащих выявлению штрихкодированных трансгенов отражает тропизм и эффективность трансдукции кандидатных вариантов rAAV из каждой группы. Выбирали высокоэффективные кандидатные группы с необходимыми векторными свойствами.

Индивидуальные кандидатные варианты из выбранных групп использовали для упаковки штрихкодированных трансгенов для второго раунда скрининга с целью идентификации индивидуальных высокоэффективных вариантов. Кластер-индексирование можно было выполнять итерационно в нескольких раундах иерархической селекции для снижения рабочей нагрузки.

#### *Исследования у отличных от человека приматов (NHP)*

Кандидатные варианты гAAV подвергали скринингу в отношении биораспределения у отличных от человека приматов путем модальности, аналогичной методике кластер-индексирования, изложенного в исследованиях на мышах (Фиг. 6B). Эффективности трансдукции в отношении целевых органов с помощью различных путей введения повторно оценивали у NHP для валидации профилей вариантов гAAV, наблюдаемых в исследованиях событий-предшественников у мышей.

Иммуногенность, распространенность нейтрализующих антител в человеческих популяциях, возможность генотоксичности и общие аспекты патогенности измеряли в дополнение к первичным оценкам, например, гистопатологическому исследованию нескольких тканей и органов с целью внимательного изучения инфильтратов Т-клеток или нейтрофилов, отслеживания гепатотоксичности с помощью активности ALT/AST и анализа воспаления в результате исследования гистологических срезов с определением профилей трансдукции у животных, относящимся к отличных от человека приматам (NHP).

#### **Пример 5**

##### **Выделение новых капсидных последовательностей AAV**

Выделяли дополнительные капсидные последовательности AAV. Используя потоки анализа вариантов, разработанных на основе биоинформатических средств, выявляли дополнительные 263 ранее неописанных высокодостоверных вариантов капсидных последовательностей AAV2 и гибрида AAV2/3. В целях сравнения аминокислотные последовательности капсидов AAV2 и AAV3 дикого типа описаны в SEQ ID NO: 869 и 870 соответственно.

#### Таблица 8

Дополнительные уникальные варианты AAV2 и гибрида AAV2/3 (аминокислотные последовательности), идентифицированные с помощью секвенирования SMRT и биоинформатического анализа

<b>Уникальные варианты AAV2</b>				
Источник образца	Размер ДНК (т.о.)	Уникальные варианты (а.к.)	SEQ ID NO (а.к.):	Всего уникальных вариантов (а.к.)
Рак молочной железы	2,2 т.о.	8	1726-1733	<b>89</b>
Опухоль желудка		15	1734-1748	
Глиома		2	1749-1750	
Печень		25	1751-1775	
Опухоль печени		36	1776-1811	
Опухоль легких		3	1812-1814	
<b>Уникальные варианты AAV2/3</b>				
Источник образца	Размер ДНК (т.о.)	Уникальные варианты (а.к.)		Всего уникальных вариантов (а.к.)
Рак молочной железы	2,2 т.о.	18	1815-1832	<b>174</b>
Желудок		17	1833-1849	
Печень		117	1850-1966	
Опухоль печени		22	1967-1988	

Соответствующие последовательности ДНК представлены для всех библиотек. Последовательности нуклеиновых кислот для капсидных вариантов AAV2 соответствуют SEQ ID NO: 1989-2077. Последовательности нуклеиновых кислот для капсидных вариантов AAV2/3 соответствуют SEQ ID NO: 2078-2251.

Настоящее раскрытие не ограничено в своем применении подробностями конструкции и компоновки компонентов, изложенными в данном описании, или проиллюстрированными в чертежах. Настоящее раскрытие может быть реализовано в соответствии с другими вариантами осуществления и может быть осуществлено на практике или выполнено различными путями. Кроме того, фразеология и терминология, используемая в данном документе, предусмотрена лишь с целью описания и не должна рассматриваться в качестве ограничения. Применение фраз «включающий в себя», «содержащий» или «имеющий», «содержащий в себе» и «включающий» и их вариантов в данном документе предполагает включение пунктов, перечисленных далее, и их эквивалентов, а также дополнительных пунктов.

Таким образом, при описании нескольких аспектов по меньшей мере одного варианта осуществления настоящего раскрытия, специалистам в данной области техники следует понимать, что будут легко осуществляться различные изменения, модификации и усовершенствования. Предполагается, что такие изменения, модификации и усовершенствования являются частью данного раскрытия и находятся в пределах сути и

объема настоящего раскрытия. Соответственно, вышеизложенное описание и чертежи представлены лишь в целях примера.

## **ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-198, 1-24, 106-143 или 199-868, и 1726-1988.
2. Рекомбинантный вектор экспрессии по п. 1, где полипептид содержит последовательность из любой SEQ ID NO: 144-198.
3. Рекомбинантный вектор экспрессии по п.1 или 2, где полипептид содержит последовательность из любой SEQ ID NO: 149, 152, 157, 161, 175 или 182.
4. Рекомбинантный вектор экспрессии по п.1 или 2, где полипептид содержит последовательность из любой SEQ ID NO: 305-409, 118-143, 211-231.
5. Выделенный капсидный белок AAV, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-198, 1-24, 106-143 или 199-868 и 1726-1988.
6. Выделенный капсидный белок AAV по п. 5, где полипептид содержит последовательность из любой SEQ ID NO: 144-198.
7. Выделенный капсидный белок AAV по п.5 или 6, где полипептид содержит последовательность из любой SEQ ID NO: 149, 152, 157, 161, 175 или 182.
8. Выделенный капсидный белок AAV по п. 5, где полипептид содержит последовательность из любой SEQ ID NO: 305-409, 118-143, 211-231.
9. Рекомбинантный AAV (rAAV), содержащий выделенный капсидный белок AAV по любому из пп. 5-8.
10. Способ доставки трансгена субъекту, предусматривающий введение rAAV по п. 9 субъекту, при этом rAAV содержит по меньшей мере один трансген и при этом rAAV инфицирует клетки целевой ткани субъекта.

11. Способ по п.10, где трансген представляет собой ген, кодирующий белок или малую интерферирующую нуклеиновую кислоту, где необязательно малая интерферирующая нуклеиновая кислота представляет собой «губку» miRNA или РНК TuD, которая ингибирует активность по меньшей мере одной miRNA у субъекта или животного.

12. Способ по п.11, где этот miRNA экспрессируется в клетке целевой ткани.

13. Способ по любому из пп. 10-12, где гAAV вводят внутривенно, трансдермально, интраокулярно, интратекально, перорально, внутримышечно, подкожно, интраназально или путем ингаляции.

14. Способ по любому из пп. 10-13, где субъекта выбирают из мыши, крысы, кролика, собаки, кошки, овцы, свиньи, отличного от человека примата и человека.

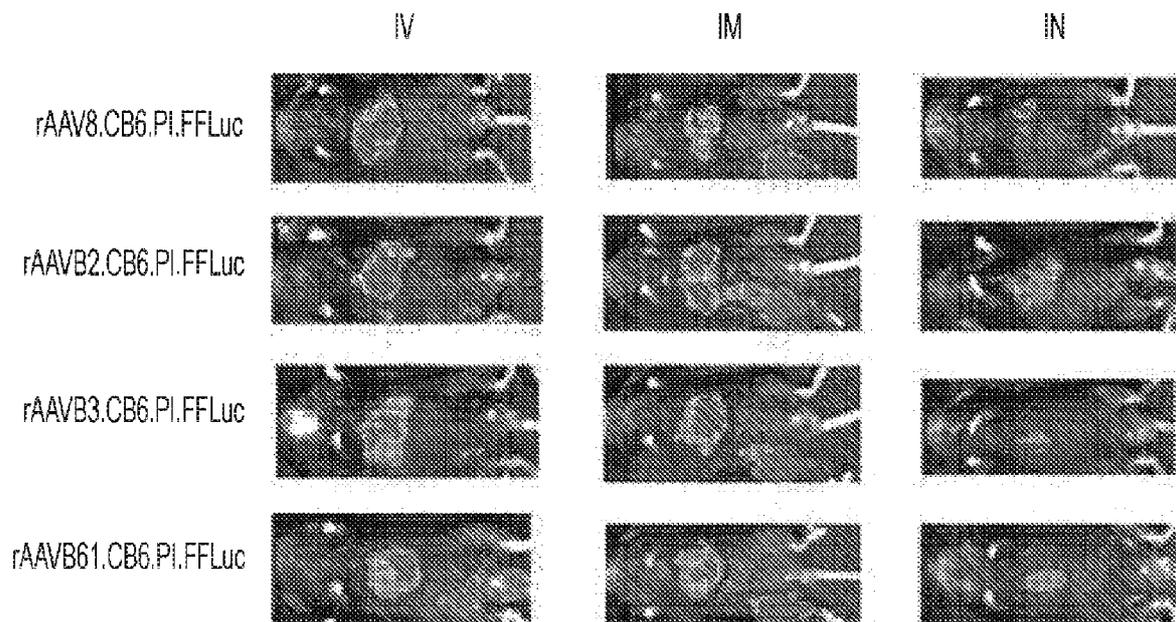
15. Набор для получения гAAV, при этом набор содержит:

контейнер, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, имеющий последовательность из любой SEQ ID NO: 144-198, 1-24, 106-143, или 199-868 и 1726-1988;

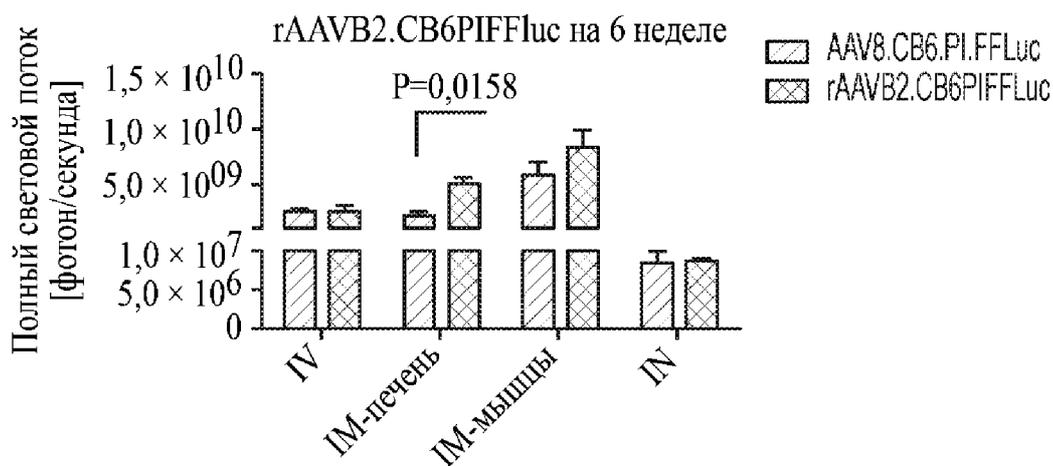
дополнительно содержащий инструкции для получения гAAV и/или по меньшей мере один контейнер, содержащий рекомбинантный вектор AAV, при этом рекомбинантный вектор AAV содержит трансген.

16. Рекомбинантный вектор экспрессии по любому из пп. 1-4 или выделенный капсидный белок AAV по любому из пп. 5-8, где капсидный белок представляет собой капсидный белок VP1, капсидный белок VP2 или капсидный белок VP3.

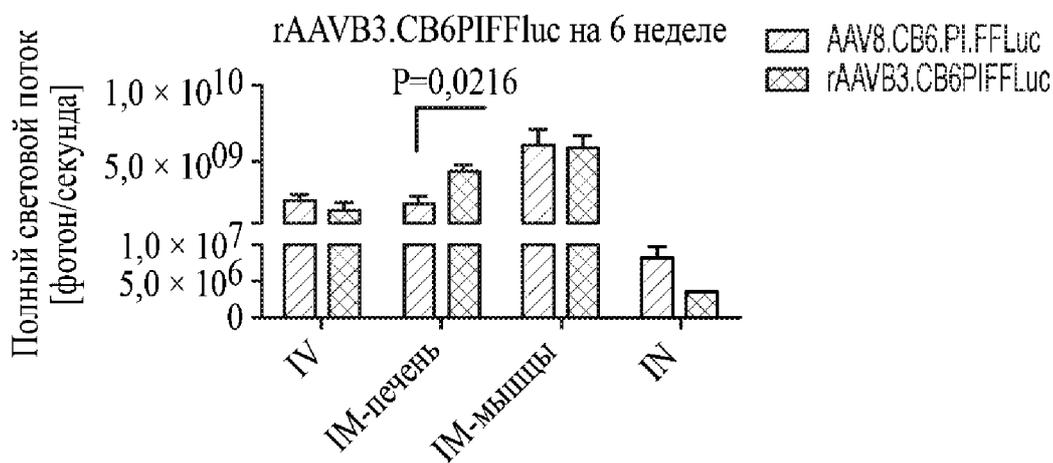




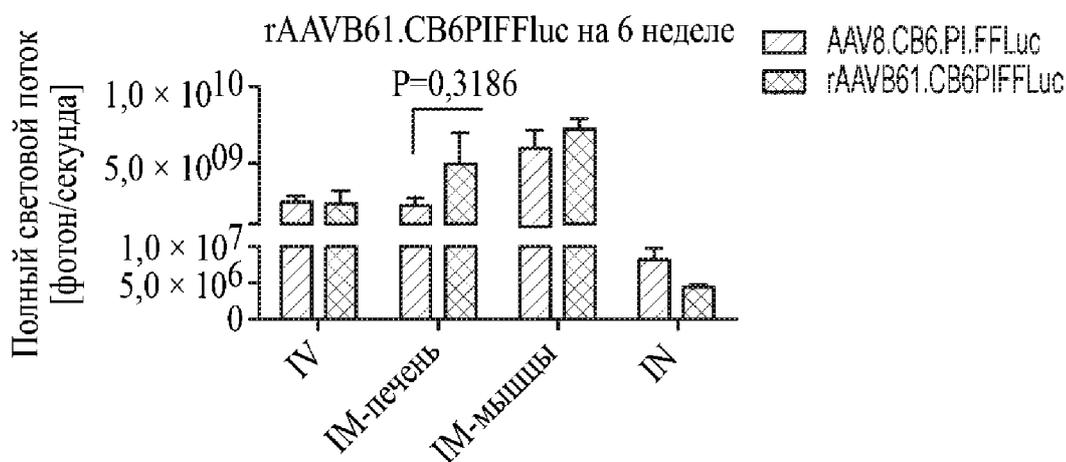
Фиг. 2А



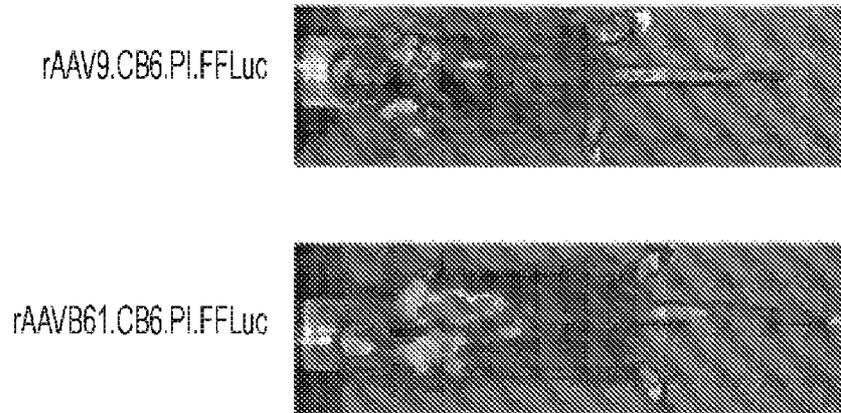
Фиг. 2В



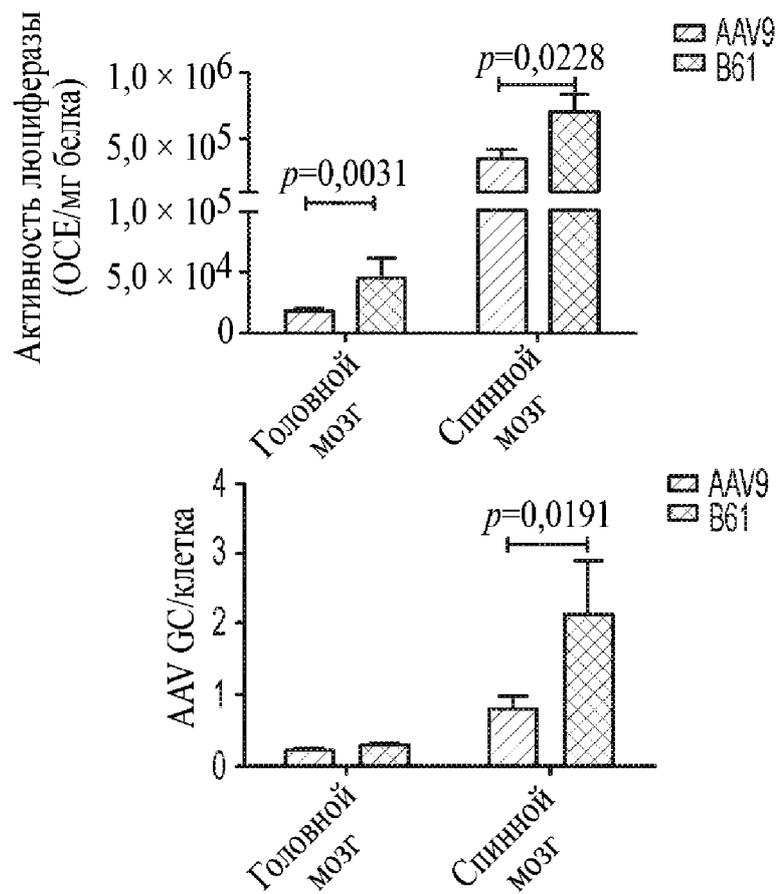
Фиг. 2С



Фиг. 2D

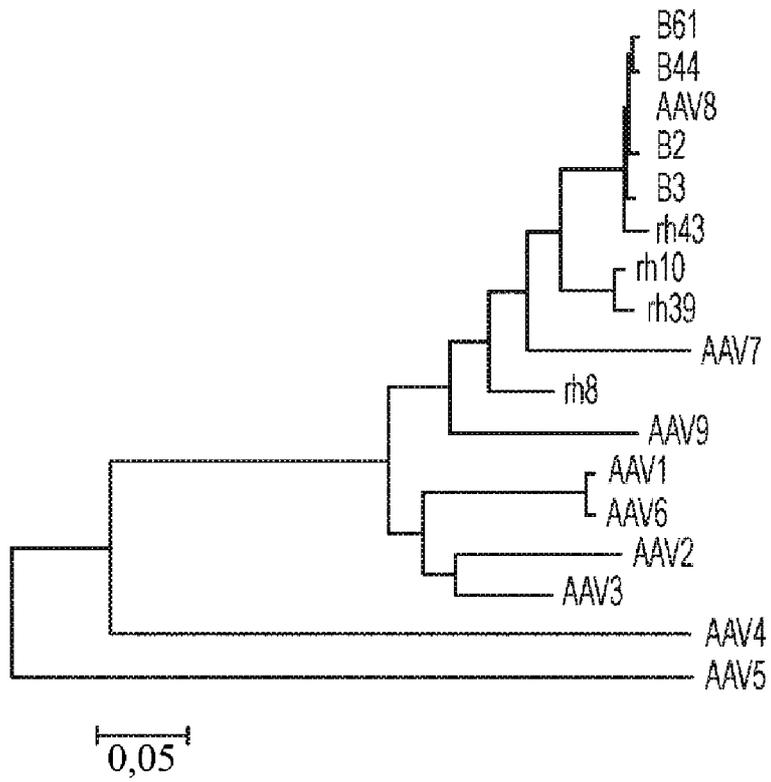


Фиг. 3А

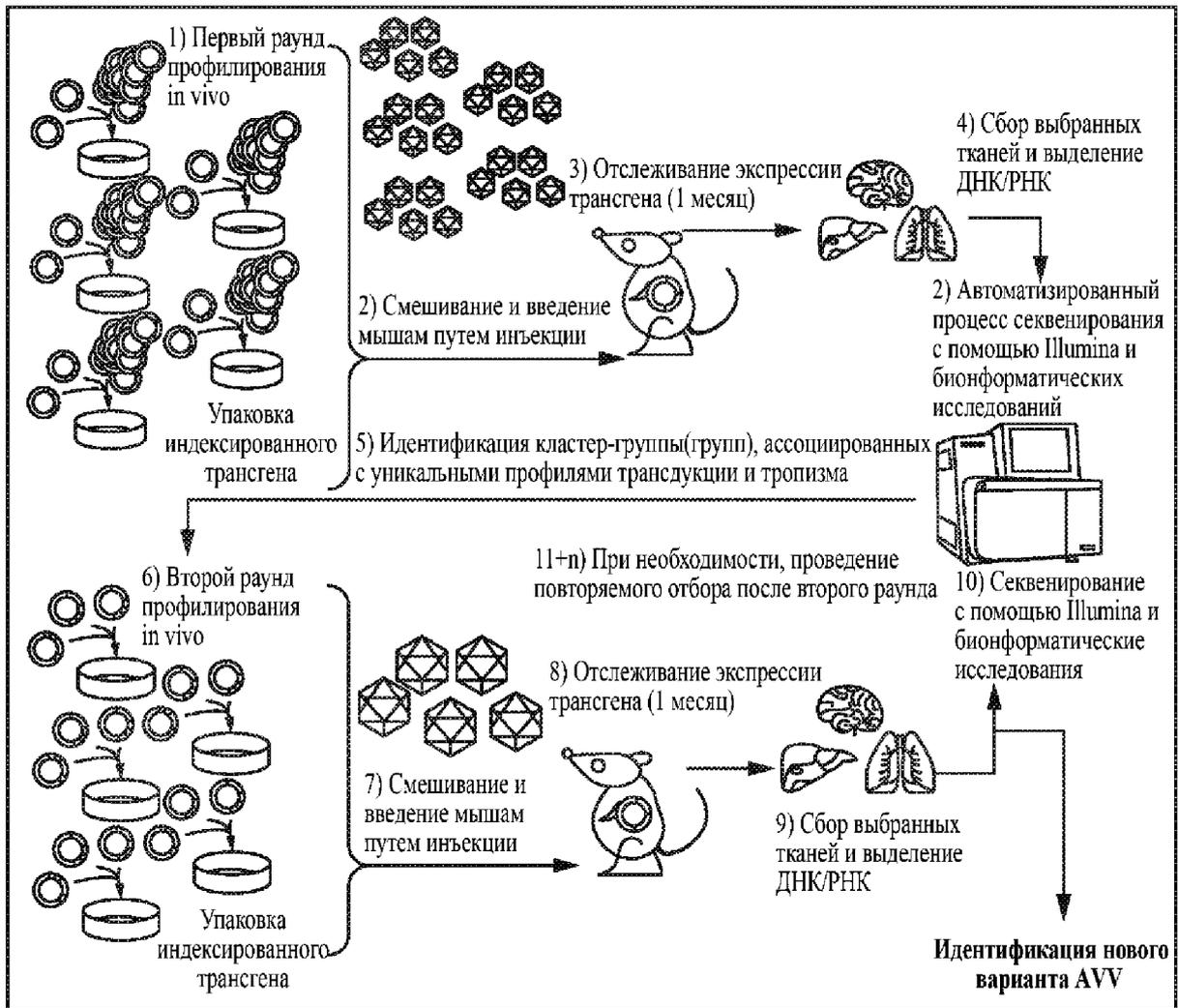


Фиг. 3В

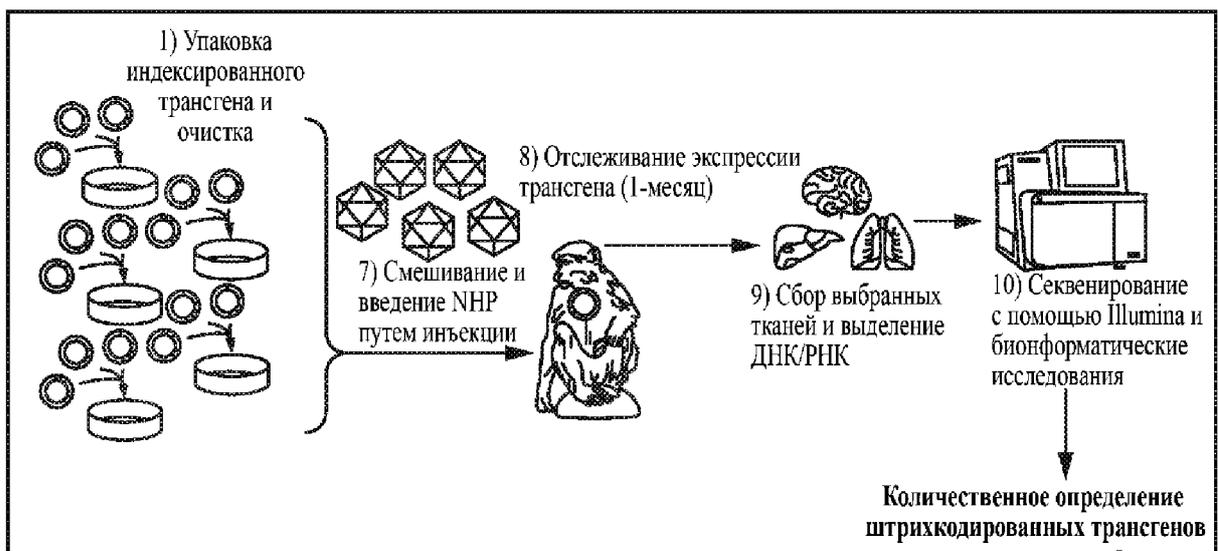




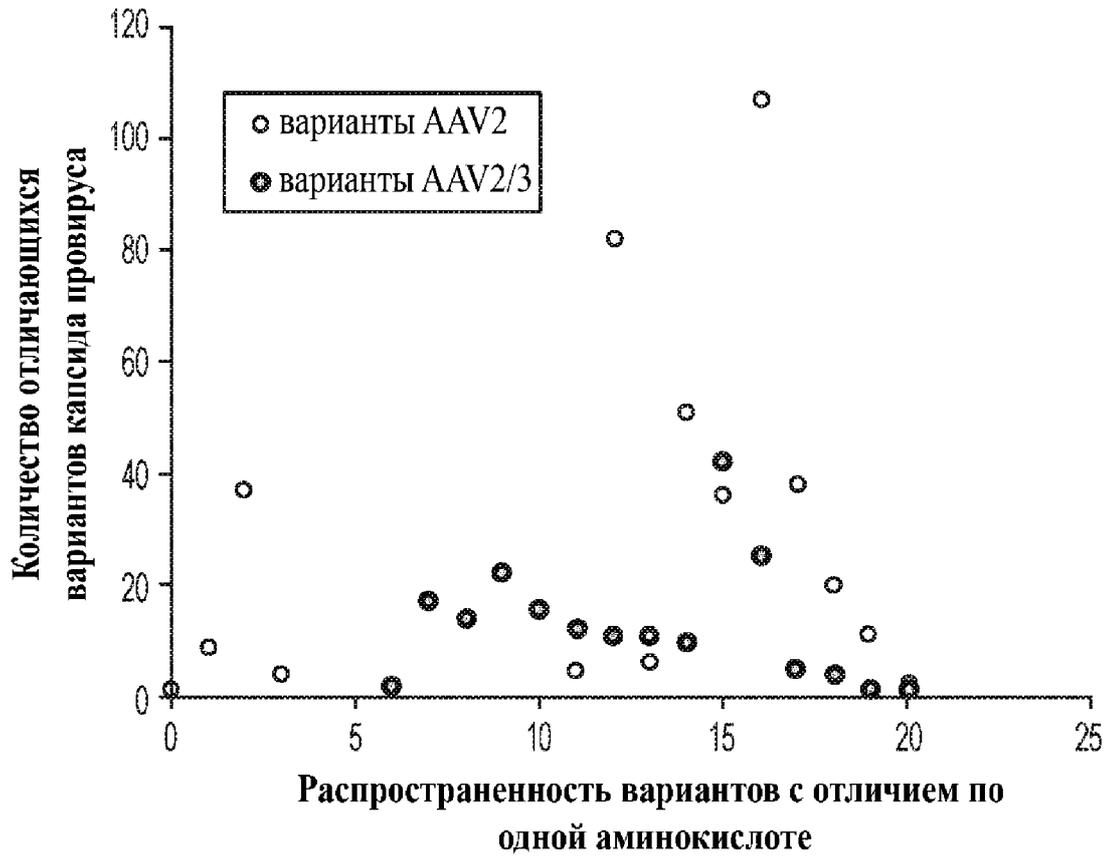
Фиг. 5



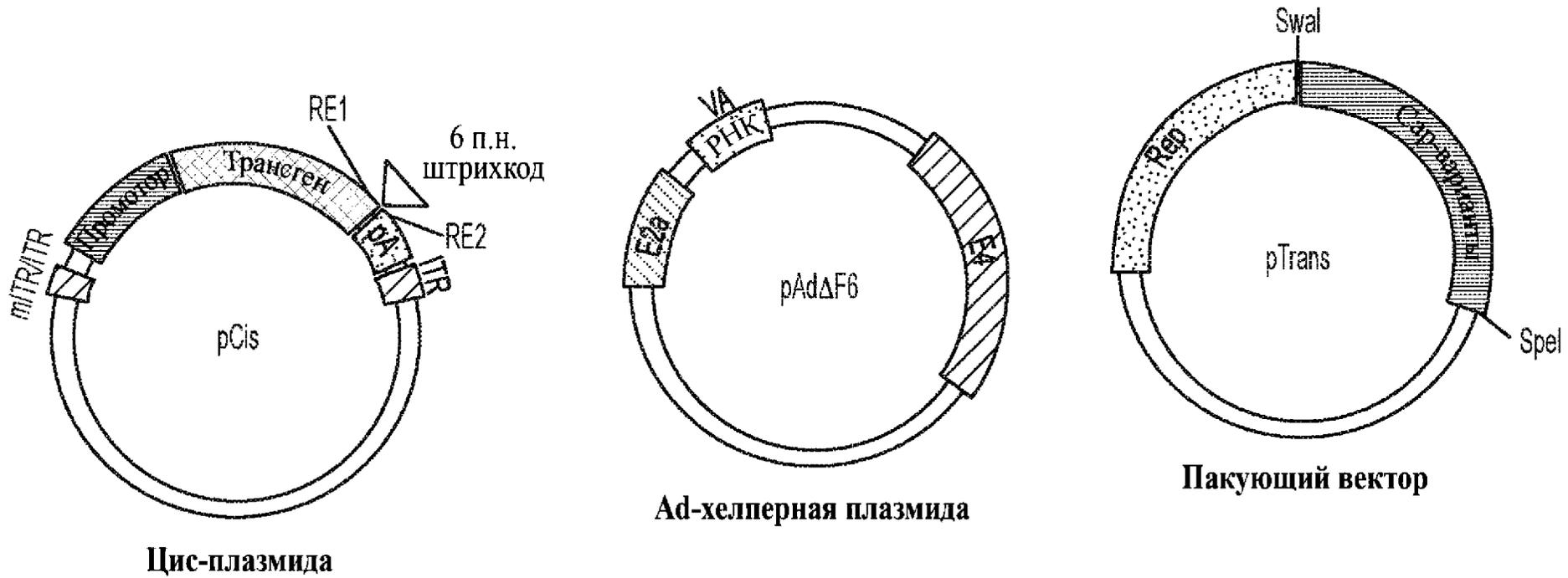
Фиг. 6А



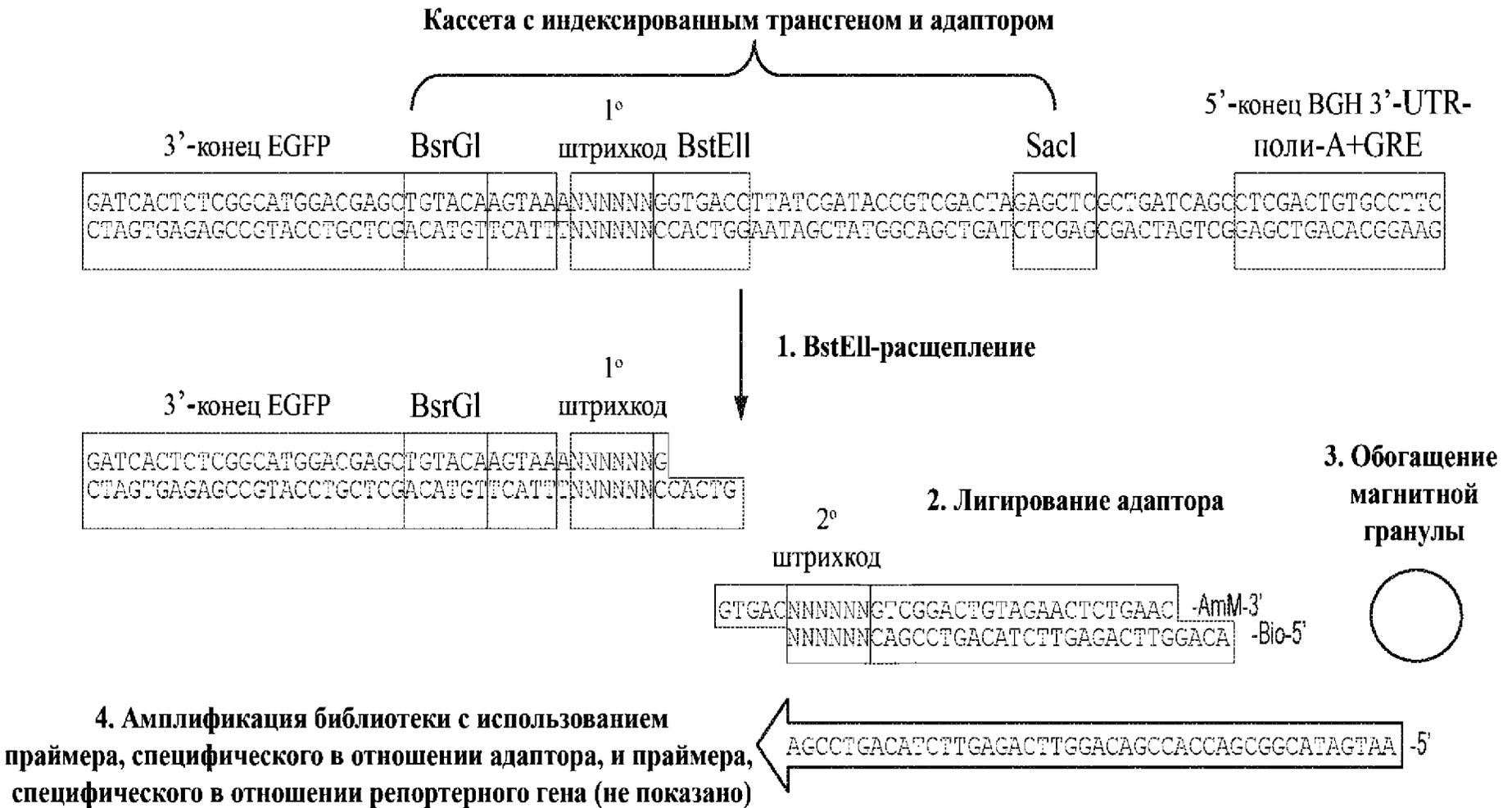
Фиг. 6В



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9