

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392899** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.12.13

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.15

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА**

(31) 63/175,507; 63/299,835

(32) 2021.04.15; 2022.01.14

(33) US

(86) PCT/US2022/025061

(87) WO 2022/221684 2022.10.20

(71) Заявитель:
СПАЙРОВАНТ САЙЕНСИЗ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

**Смит Марк, Эксоффон Кэтрин, Линь
Шэнь, Маханкали Мадхуприя, Юэнь
Эрик, Колбек Роланд, Глатфелтер
Мэттью (US)**

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

(57) В настоящем документе представлены способы лечения муковисцидоза (МВ), в том числе у пациентов с мутациями CFTR I класса. Способы могут включать введение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), который содержит капсидный белок AV.TL65 и полинуклеотид, который содержит энхансер F5 и промотор tg83, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R, или фармацевтическую композицию на его основе.

202392899
A1

202392899

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579375EA/071

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая заявка заявляет приоритет на предварительные заявки на патент США с серийными номерами 63/175507, поданную 15 апреля 2021 г., и 63/299835, поданную 14 января 2022 г., все содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Упомянутая копия ASCII, созданная 13 апреля 2022 года, называется 51209-028WO3_Sequence_Listing_4_12_22_ST25 и имеет размер 73 498 байта.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Генная терапия с использованием аденоассоциированного вируса (AAV) является новым методом лечения, в том числе для лечения дефектов одного гена. Муковисцидоз (МВ) представляет собой смертельное аутосомно-рецессивное заболевание, которым страдают не менее 30 000 человек только в США и не менее 70 000 человек во всем мире. Средний возраст выживания пациентов с МВ составляет около 40 лет. МВ вызван мутациями в гене, кодирующем регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR), канал, который проводит ионы хлорида и бикарбоната через мембраны эпителиальных клеток. Нарушение функции CFTR приводит к воспалению дыхательных путей и прогрессированию бронхоэктаза. Из-за моногенной этиологии МВ и различных мутаций CFTR в популяции пациентов генная терапия потенциально обеспечивает универсальное лечение МВ.

Аденоассоциированный вирус (AAV), член семейства парвовирусов человека, представляет собой непатогенный вирус, репликация которого зависит от вирусом-помощников. По этой причине рекомбинантные векторы AAV (rAAV) являются одними из наиболее часто используемых в доклинических исследованиях и клинических испытаниях генной терапии. Действительно, клинические испытания rAAV2 при заболеваниях легких при МВ продемонстрировали как хороший профиль безопасности, так и длительную персистенцию вирусного генома в тканях дыхательных путей (по данным биопсии) по сравнению с другими агентами переноса генов (такими как рекомбинантный аденовирус). Тем не менее, перенос генов не смог улучшить функцию легких у пациентов с МВ, поскольку транскрипция мРНК CFTR, полученного из вектора rAAV, не была обнаружена.

Таким образом, в данной области техники сохраняется потребность в улучшенных композициях и способах для лечения МВ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем описании, среди прочего, предусмотрены способы лечения МВ путем

введения rAAV и/или средств, усиливающих трансдукцию AAV, а также rAAV и композиций на их основе (например, фармацевтических композиций) для применения в способах, раскрытых в настоящем документе.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ лечения муковисцидоза (МВ) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает rAAV для применения при лечении МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I, при этом rAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, у которого отсутствует белок CFTR, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества rAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает rAAV для применения при лечении МВ у субъекта, у которого отсутствует белок CFTR, при этом rAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов по меньшей мере одна мутация CFTR класса I представляет собой нонсенс-мутацию, мутацию сплайсинга или делецию.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов по меньшей мере одна мутация CFTR класса I включает мутацию Q2X, мутацию S4X, мутацию W19X, мутацию G27X, мутацию Q39X, мутацию W57X, мутацию E60X, мутацию R75X, мутацию L88X, мутацию E92X, мутацию Q98X, мутацию Y122X, мутацию E193X, мутацию W216X, мутацию L218X, мутацию Q220X, мутацию Y275X, мутацию C276X, мутацию Q290X, мутацию G330X, мутацию W401X, мутацию Q414X, мутацию S434X, мутацию S466X, мутацию S489X, мутацию Q493X, мутацию W496X, мутацию C524X, мутацию Q525X, мутацию G542X, мутацию G550X, мутацию Q552X, мутацию R553X, мутацию E585X, мутацию G673X, мутацию Q685X, мутацию R709X,

мутацию K710X, мутацию Q715X, мутацию L732X, мутацию R764X, мутацию R785X, мутацию R792X, мутацию E822X, мутацию W882X, мутацию W846X, мутацию Y849X, мутацию R851X, мутацию Q890X, мутацию S912X, мутацию Y913X, мутацию Q1042X, мутацию W1089X, мутацию Y1092X, мутацию W1098X, мутацию R1102X, мутацию E1104X, мутацию W1145X, мутацию R1158X, мутацию R1162X, мутацию S1196X, мутацию W1204X, мутацию L1254X, мутацию S1255X, мутацию W1282X, мутацию Q1313X, мутацию Q1330X, мутацию E1371X, мутацию Q1382X, мутацию Q1411X, мутацию 2116delCTAA или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация класса I включает мутацию G542X, мутацию W1282X, мутацию R1162X, мутацию R553X, мутацию 2116delCTAA или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса I.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип субъекта содержит мутацию W1282X и мутацию R1162X.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества rAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает rAAV для применения при лечении МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, при этом rAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов по меньшей мере одна мутация CFTR класса III включает мутацию G551D или мутацию S549N.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса III.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип субъекта содержит одну мутацию CFTR класса I и одну мутацию CFTR класса III.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов способ или применение дополнительно включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 48 часов после введения rAAV.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, при этом способ включает: (a) введение субъекту терапевтически эффективного

количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение около 48 часов после введения гAAV.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения в способе лечения МВ у субъекта, причем способ включает: (a) введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение около 48 часов после введения гAAV.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, при этом средство, усиливающее трансдукцию AAV, вводят субъекту в течение примерно 48 часов после введения гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает средство, усиливающее трансдукцию AAV, для применения при лечении МВ у субъекта, при этом указанное средство вводят субъекту в течение примерно 48 часов после введения гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 24 часов после введения гAAV.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 12 часов после введения гAAV.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов усиливающее средство представляет собой средство, модулирующее протеасомы.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов средство, модулирующее протеасомы, представляет собой антрациклин, ингибитор протеасом, трипептидилальдегид или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления любых из предыдущих аспектов усиливающее средство представляет собой антрациклин, ингибитор протеасом, трипептидилальдегид или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов

антрациклин представляет собой доксорубицин, идарубицин, акларубицин, даунорубицин, эпирубицин, валрубицин, митоксантрон или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов антрациклин представляет собой доксорубицин, идарубицин или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов антрациклин представляет собой доксорубицин.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов ингибитор протеасом представляет собой бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов трипептидилальдегид представляет собой N-ацетил-L-лейцил-L-лейцил-L-норлейцин (LLnL).

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов у субъекта отсутствует белок CFTR.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов по меньшей мере одна мутация CFTR класса I представляет собой нонсенс-мутацию, мутацию сплайсинга или делецию.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов по меньшей мере одна мутация CFTR класса I включает мутацию Q2X, мутацию S4X, мутацию W19X, мутацию G27X, мутацию Q39X, мутацию W57X, мутацию E60X, мутацию R75X, мутацию L88X, мутацию E92X, мутацию Q98X, мутацию Y122X, мутацию E193X, мутацию W216X, мутацию L218X, мутацию Q220X, мутацию Y275X, мутацию C276X, мутацию Q290X, мутацию G330X, мутацию W401X, мутацию Q414X, мутацию S434X, мутацию S466X, мутацию S489X, мутацию Q493X, мутацию W496X, мутацию C524X, мутацию Q525X, мутацию G542X, мутацию G550X, мутацию Q552X, мутацию R553X, мутацию E585X, мутацию G673X, мутацию Q685X, мутацию R709X, мутацию K710X, мутацию Q715X, мутацию L732X, мутацию R764X, мутацию R785X, мутацию R792X, мутацию E822X, мутацию W882X, мутацию W846X, мутацию Y849X, мутацию R851X, мутацию Q890X, мутацию S912X, мутацию Y913X, мутацию Q1042X, мутацию W1089X, мутацию Y1092X, мутацию W1098X, мутацию R1102X, мутацию E1104X, мутацию W1145X, мутацию R1158X, мутацию R1162X, мутацию S1196X, мутацию W1204X, мутацию L1254X, мутацию S1255X, мутацию W1282X, мутацию Q1313X, мутацию Q1330X, мутацию E1371X, мутацию Q1382X, мутацию Q1411X, мутацию 2116delCTAA или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса I.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип субъекта содержит мутацию W1282X и мутацию R1162X.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип

субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II, по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV, по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V, по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI или по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса II, две мутации CFTR класса III, две мутации CFTR класса IV, две мутации CFTR класса V, две мутации CFTR класса VI или две мутации CFTR класса VII.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов гAAV содержит капсидный белок AV.TL65.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов капсидный белок AV.TL65 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов полинуклеотид содержит энхансер F5.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:14.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов полинуклеотид содержит промотор tg83.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов промотор tg83 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов миниген CFTRΔR представляет собой миниген CFTRΔR человека.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов миниген CFTRΔR человека кодируется полинуклеотидом, содержащим последовательность SEQ ID NO:4.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов полинуклеотид содержит в направлении от 5' к 3' энхансер F5, промотор tg83 и миниген CFTRΔR.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:7.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов способ или применение дополнительно включает введение субъекту одного или более дополнительных терапевтических средств.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов один или несколько дополнительных терапевтических средств включают антибиотик, средство, разжижающее мокроту, модулятор CFTR, муколитическое средство, физиологический раствор, гипертонический физиологический раствор, иммунодепрессивное средство или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов введение осуществляется путем ингаляции, распыления, аэролизации, интраназально, интратрахеально, внутрибронхиально, перорально, внутривенно, подкожно или внутримышечно.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов введение осуществляется путем ингаляции, распыления, аэролизации, интраназально, интратрахеально и/или внутрибронхиально.

В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих аспектов введение осуществляется путем ингаляции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1А и 1В показана эффективность люциферазной активности после трансдукции первичного эпителия дыхательных путей человека с помощью репортера AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 в течение 4 часов и обработки усиливающим средством доксорубицином через 2, 4, 6 и 22 часа после добавления AAV. На фиг. 1А показана схема кратковременного курса лечения с помощью усиливающего средства. На фиг. 1В показан сигнал люциферазы, определенный в кондиционированных средах трансдуцированных НАЕ, не связанных и связанных с МВ, на 2 и 4 DAT. Для каждой группы n=2-4 технических повтора; * $<0,05$ по сравнению с необработанными контрольными лунками по двустороннему непарному Т-критерию.

На фиг. 2А и 2В показана эффективность люциферазной активности после трансдукции первичного эпителия дыхательных путей человека с помощью репортера AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 в течение 16 часов и обработки усиливающим средством доксорубицином через 14, 16, 18 и 22 часа после добавления AAV. На фиг. 2А показана схема промежуточного лечения с помощью усиливающего средства. На фиг. 2В показан сигнал люциферазы, определенный в кондиционированных средах трансдуцированного НАЕ, не связанного с МВ, на 2 DAT. Для каждой группы n=2-4 технических повтора; * $<0,05$ по сравнению с необработанными контрольными лунками по двустороннему непарному Т-критерию.

На фиг. 3А и 3В показана эффективность люциферазной активности после трансдукции первичного эпителия дыхательных путей человека с помощью репортера AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 в течение 16 часов и обработки усиливающим средством доксорубицином через 16, 40 и 88 часов после добавления AAV. На фиг. 3А показана схема продолжительного лечения с помощью усиливающего средства. На фиг. 3В показан сигнал люциферазы, определенный в кондиционированных средах трансдуцированного НАЕ, не связанного с МВ, на 4, 6 и 8 DAT. Для каждой группы n=2-4 технических повтора; * $<0,05$ по сравнению с необработанными контрольными клетками по двустороннему непарному Т-критерию.

На фиг. 4 показано, что апикальный SP-101 продемонстрировал дозозависимую функциональную коррекцию первичного НАЕ МВ. В отличие от модуляторов CFTR Vertex (VX)-770/661/445, не восстановивших функцию у доноров с мутациями класса I

(W1282X/R1162X), обработка SP-101 (множественность заражения (MOI) 1K, 10K, 100K) + доксорубицин (Dox, 5 мкМ) дозозависимо значительно увеличивала токи до уровней, аналогичных НАЕ, не связанного с МВ.

На фиг. 5 показано, что капсидный репортер SP-101, кодирующий mCherry, трансдуцирует многие типы эпителиальных клеток при НАЕ МВ (F508del/F508del). Репортер SP-101 (mCherry) выявил >30% положительных клеток, которые совместно локализовались с маркерами реснитчатых (α -тубулин) или секреторных клеток (MUC5AC) или не локализовались совместно с маркерами каких-либо типов клеток (нереснитчатые или базально-ориентированные клетки).

На фиг. 6 показано, что векторные геномы SP-101 были в избытке во многих областях легких хорьков без МВ. Векторные геномы SP-101 (точки) были обнаружены во многих клетках, тогда как предварительная обработка ДНКазой не показала окрашивания, что указывает на специфичность окрашивания.

На фиг. 7 показано, что экспрессия мРНК hCFTR Δ R в тканях дыхательных путей хорьков увеличивалась более чем в 10 раз при введении доксорубицина. В отличие от контрольных образцов мРНК hCFTR Δ R была обнаружена в большинстве образцов от животных, подвергшихся воздействию только SP-101. Однако мРНК hCFTR Δ R была > 10 раз выше в образцах от животных, подвергшихся воздействию того же количества SP-101, а затем доксорубицина ($p < 0,0001$). Копии мРНК hCFTR Δ R нормализовали до общего количества 500 нг мРНК/образец.

На фиг. 8 показано, что экспрессия мРНК hCFTR Δ R была устойчивой в легких хорьков без МВ. мРНК hCFTR Δ R существенно не снижалась через 12 недель (конец исследования) после введения, что указывает на устойчивую экспрессию. Копии мРНК hCFTR Δ R нормализовали до общего количества 500 нг мРНК/образец.

На фиг. 9 показано, что экспрессия мРНК hCFTR Δ R была одинаковой в легких хорьков с МВ и без МВ. В отличие от контрольных животных (только разбавитель), мРНК hCFTR Δ R обнаруживалась в одинаковой степени как у животных с МВ (G551D), так и у животных без МВ, что указывает на то, что легкие при МВ не являются дополнительным барьером для SP-101. Копии мРНК hCFTR Δ R нормализовали до общего количества 500 нг мРНК/образец.

На фиг. 10 показано, что низкий уровень доксорубицина был достаточен для повышения способности SP-101 демонстрировать функциональную активность при НАЕ МВ класса I по данным анализа камеры Уссинга.

На фиг. 11 показано, что число копий вектора (VCN) коррелирует с MOI SP-101 и дозой доксорубицина при НАЕ МВ класса I.

На фиг. 12 показано, что абсолютное число копий мРНК hCFTR Δ R (нормализованное во время преобразования кДНК) увеличивается с увеличением MOI SP-101 и дозы доксорубицина при НАЕ МВ класса I.

На фиг. 13 показана дозозависимая (MOI) коррекция SP-101 в НАЕ МВ у этого донора класса I при дозе 1 мкМ доксорубицина.

На фиг. 14 показано, что все дозы SP-101 выше MOI 5×10^2 стимулировали ток Уссинга значительно сильнее, чем НАЕ, не связанный с МВ, в присутствии 1 мкМ доксорубицина.

На фиг. 15 показано, что реакция на дозу доксорубицина и реакция на дозу MOI SP-101 наблюдались при НАЕ МВ от этого донора МВ класса I.

На фиг. 16 показано, что увеличение доз доксорубицина и вектора SP-101 увеличивало коррекцию эпителия дыхательных путей человека при МВ, полученного от доноров с мутациями CFTR класса I, II или III, до уровней, аналогичных эпителию, не связанному с МВ. Напротив, лечение модулятором Vertex (VX-770/661/445) не корректировало эпителий с двумя мутациями класса I и лишь частично корректировало эпителий, гетерозиготный по мутациям класса I и III. Единственным эпителием, который лечение модулятором Vertex могло полностью скорректировать, был эпителий с двумя мутациями класса II. Символы обозначают средний пиковый ток Уссинга для 3-4 эпителиев указанного донора.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Генная терапия - единственный мутационно-независимый подход к лечению муковисцидоза (МВ). Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что описанные в данном документе векторы гAAV (например, AV.TL65-SP183-hCFTR Δ R) неожиданно эффективны в дополнении CFTR-опосредованного транспорта хлоридов в поляризованном эпителии дыхательных путей человека при МВ, в том числе от пациентов, чьи генотипы содержат мутации класса I в гене CFTR. Такие мутации класса I приводят к почти полному отсутствию или отсутствию белка CFTR и включают мутации стоп-кодона и мутации сдвига рамки считывания, которые приводят к преждевременному образованию терминирующего кодона. Приблизительно 22% пациентов с МВ имеют по меньшей мере одну мутацию класса I, представляющую собой самый крупный класс мутаций, для которого в настоящее время не существует одобренной терапии. МВ, вызванный мутациями класса I, считается особенно трудным для лечения, по меньшей мере частично, потому что он не поддается лечению одобренными в настоящее время методами лечения, такими как корректоры (например, люмакафтор или тезакафтор), которые помогают правильно складывать дефектный CFTR, или потенцирующие средства (например, ивакафтор), которые помогают открыть канал CFTR и повысить функцию нормального CFTR. Таким образом, на основании результатов, раскрытых в настоящем документе, ожидается, что раскрытые в данном документе способы будут эффективны для лечения МВ, вызванного мутациями CFTR класса I, в том числе для пациентов, чей генотип содержит одну или две мутации CFTR класса I. Настоящее изобретение также основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что последовательное введение вектора гAAV, раскрытого в настоящем документе (например, AV.TL65-SP183-hCFTR Δ R), с последующим введением усиливающего средства (например, доксорубицина), например, в течение примерно 72 часов, примерно

48 часов, примерно 24 часов или примерно 12 часов приводит к устойчивой экспрессии генов в дыхательных путях принятой в данной области модели МВ у животных. Степень трансдукции была неожиданно высокой, учитывая уже существовавшее ранее накопление слизи в дыхательных путях хорьков с МВ.

Определения

Термин «AAV» относится к аденоассоциированному вирусу и может использоваться для обозначения самого встречающегося в природе вируса дикого типа или его производных. Этот термин охватывает все подтипы, серотипы и псевдотипы, а также встречающиеся в природе и рекомбинантные формы, за исключением случаев, когда требуется иное. Геном AAV построен из одноцепочечной ДНК и включает инвертированные концевые повторы (ITR) на обоих концах цепи ДНК и две открытые рамки считывания: гер и сар, кодирующие белки репликации и капсида соответственно. Чужеродный полинуклеотид может заменить нативные гер и сар. AAV могут быть получены с использованием различных капсидов серотипов, которые имеют различные профили трансдукции или, как используется в данном документе, «тропизм» для разных типов тканей.

В настоящем документе термин «серотип» относится к AAV, который идентифицируется и отличается от других AAV на основе реактивности капсидного белка с определенными антителами, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAVrh10. Например, серотип AAV2 используется для обозначения AAV, который содержит капсидные белки, кодируемые сар-геном AAV2, и геном, содержащий 5'- и 3'-ITR последовательности того же серотипа AAV2. Псевдотипированный AAV относится к AAV, который содержит капсидные белки одного серотипа и вирусный геном, содержащий 5'- и 3'- ITR второго серотипа. Ожидается, что псевдотипированный rAAV будет обладать свойствами связывания с клеточной поверхностью серотипа капсида и генетическими свойствами, соответствующими серотипу ITR. Псевдотипированные rAAV производят с использованием стандартных методик, описанных в данной области техники.

Термин «приблизительно» используется в данном документе для обозначения значения, которое составляет $\pm 10\%$ от указанного значения.

В настоящем документе под «введением» подразумевается способ введения дозы композиции, описанной в настоящем документе (например, rAAV или его фармацевтической композиции) субъекту. Композиции, используемые в способах, описанных в настоящем документе, можно вводить любым подходящим путем, включая, например, ингаляцию, распыление, аэролизацию, интраназально, интратрахеально, внутрибронхиально, перорально, парентерально (например, внутривенно, подкожно или внутримышечно), перорально, назально, ректально, местно или буккально. В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в настоящем документе, вводят в виде аэрозольных частиц интратрахеально и/или интрабронхиально с использованием распылителя (например, с помощью устройства для распыления слизистой оболочки

гортани-трахеи MADgic®). Композиции, используемые в описанных в данном документе способах, также можно вводить местно или системно. Способ введения может варьироваться в зависимости от различных факторов (например, компонентов вводимой композиции и тяжести состояния, подлежащего лечению).

Термин «AV.TL65» относится к развитому химерному капсидному белку AAV, который является высокотропным для дыхательных путей человека. AV.TL65 описан Excoffon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(10):3865-3870, 2009, который полностью включен в данный документ посредством ссылки и также известен в данной области техники как AAV2.5T. AV.TL65 представляет собой химеру между AAV2 (1-128 а.о.) и AAV5 (129-725 а.о.) с одной точечной мутацией (A581T). Аминокислотная последовательность капсида AV.TL65 показана ниже:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYL
GPFNGLD
KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGN
LGRAVFQ
AKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG
SQQLQ
IPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVT
KSTRTWVL
PSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLIN
NYWGFRP
RSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLSTVQVFTDDDYQLPYVVGNNGTEGCLP
AFPPQ
VFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHS
SFAP
SQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGR
TQGWNLGS
GVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQP
ANPGTT
ATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPTTGTYNLQEIVPG
SVWMER
DVYLLQGPIWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVP
VSSFI
TQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTT
RPIGTRY
LTRPL (SEQ ID NO:13).

Термин «мутация CFTR класса I» относится к мутации, которая препятствует выработке белка CFTR, включая отсутствие или почти полное отсутствие белка CFTR. Типичные мутации CFTR класса I включают, например, нонсенс-мутации, мутации сплайсинга и делеции. Примерно 22% пациентов с МВ имеют по меньшей мере одну

мутацию CFTR класса I. В некоторых примерах по меньшей мере одна мутация CFTR класса I включает мутацию Q2X, мутацию S4X, мутацию W19X, мутацию G27X, мутацию Q39X, мутацию W57X, мутацию E60X, мутацию R75X, мутацию L88X, мутацию E92X, мутацию Q98X, мутацию Y122X, мутацию E193X, мутацию W216X, мутацию L218X, мутацию Q220X, мутацию Y275X, мутацию C276X, мутацию Q290X, мутацию G330X, мутацию W401X, мутацию Q414X, мутацию S434X, мутацию S466X, мутацию S489X, мутацию Q493X, мутацию W496X, мутацию C524X, мутацию Q525X, мутацию G542X, мутацию G550X, мутацию Q552X, мутацию R553X, мутацию E585X, мутацию G673X, мутацию Q685X, мутацию R709X, мутацию K710X, мутацию Q715X, мутацию L732X, мутацию R764X, мутацию R785X, мутацию R792X, мутацию E822X, мутацию W882X, мутацию W846X, мутацию Y849X, мутацию R851X, мутацию Q890X, мутацию S912X, мутацию Y913X, мутацию Q1042X, мутацию W1089X, мутацию Y1092X, мутацию W1098X, мутацию R1102X, мутацию E1104X, мутацию W1145X, мутацию R1158X, мутацию R1162X, мутацию S1196X, мутацию W1204X, мутацию L1254X, мутацию S1255X, мутацию W1282X, мутацию Q1313X, мутацию Q1330X, мутацию E1371X, мутацию Q1382X, мутацию Q1411X, мутацию 2116delCTAA, мутацию T663rfsX8 или их комбинацию. В данной области известны и другие мутации CFTR класса I. В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса I. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса I. В качестве одного неограничивающего примера можно отметить, что в некоторых случаях генотип субъекта содержит мутацию W1282X и мутацию R1162X.

Термин «мутация CFTR класса II» относится к мутации, которая препятствует процессингу белка CFTR. При мутациях класса II образуется белок CFTR, но он обычно неправильно сворачивается, что препятствует его транспортировке на поверхность клетки. Примерно 88% пациентов с МВ имеют по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II. Типичные мутации CFTR класса II включают, например, F508del, N1303K и I507del.

Термин «мутация CFTR класса III» относится к мутации, которая препятствует гейтированию белка CFTR. При мутациях класса III создается белок CFTR, который перемещается на поверхность клетки, но ворота канала не открываются должным образом. Примерно 6% пациентов с МВ имеют по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III. Типичные мутации CFTR класса III включают, например, G551D и S549N.

Термин «мутация CFTR класса IV» относится к мутации, которая препятствует проведению белка CFTR. При мутациях CFTR класса IV белок CFTR создается и перемещается на поверхность клетки, но функция канала нарушена. Примерно 6% пациентов с МВ имеют по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV. Типичные мутации CFTR класса IV включают, например, D1152H, R347P и R117H.

Термин «мутация CFTR класса V» относится к мутации, которая приводит к недостаточности белка CFTR. При мутациях CFTR класса V создается нормальный белок CFTR, который перемещается на поверхность клетки, но в недостаточных количествах. Примерно 5% пациентов с МВ имеют по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V.

Типичные мутации CFTR класса V включают, например, 3849+10kbC→T, 2789+5G→A и A455E.

Термин «мутация CFTR класса VI» относится к мутации, которая приводит к образованию менее стабильной версии белка CFTR. Типичные мутации класса VI включают, например, с. 120del23.

Термин «мутация CFTR класса VII» относится к мутации, которая приводит к отсутствию мРНК CFTR. Типичные мутации класса VII включают, например, dele2,3(21kb) и 1717-1G→A.

Нумерация мутаций CFTR, описанных в настоящем документе, может быть относительно последовательности CFTR дикого типа (например, последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислоты). Например, нумерация аминокислотных последовательностей мутаций CFTR может относиться к белку CFTR человека дикого типа, представленному в SEQ ID NO: 19 ниже:

MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYSRQRLLESDIYQIPSVDSADNLSEKLERE
WDRE
LASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGIFLYLGEVTKAVQPLLLGRIIASYDPDNKE
ERSIA
IYLGIGLCLLFIVRTHLLHPAIFGLHHIGMQMRIAMFSLIYKKTLKSSRVLDKISIG
QL
VSLLSNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASAFGLGFLIVLAL
FQAGL
GRMMMKYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEEAMEKMIENLRQTEL
KLTRKAA
YVRYFNSSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKGIILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAV
QT
WYDSLGAINKIQDFLQKQEYKTLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEGFGELFEKAK
QNNNNRK
TSNGDDSLFFSNFSLGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELE
PSEG
KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKD
NIV
LGEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTEKEIFESCVCKLM
ANKTR
ILVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFSSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAE
RRNS
ILTETLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFKQTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKT
PLQ
MNGIEEDSDEPLERLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHS
VNQG
QNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTELDIYSRRLSQTGLEISEEINEEDLKECFDD

MESI

PAVTTWNTYLRYYTVHKSLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNS

THSRN

NSYAVIITSTSSYYVFYIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSV

LQAP

MSTLNTLKAGGILNRFSKDIAILDDLPLTIFDFIQLLLIVIGAIAVVAVLQPYIFVA

TV

PVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSKGLWTLRAFRGRQPYFET

LFHK

ALNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFFAVTFISILTTGEGEGRVGIILTLAM

NIM

STLQWAVNSSIDVDSLMSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIEN

SHVKK

DDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVLLGRTGSGKSTLLS

AFLRL

LNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIPQKVFIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEI

WKVAD

EVGLRSVIEQFPGKLDVFLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAKILLLDEPSAH

LDPVT

YQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECQQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSL

FRQA

ISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEETEEVQDTRL (SEQ ID NO:19).

Обзор, описывающий различные классы мутаций CFTR, см., например, De Boeck et al. *Acta Paediatrica* 2020; 109:893-899. Типичные мутации CFTR, принадлежащие к описанным выше классам, известны в данной области. Например, типичные мутации CFTR описаны в базе данных мутаций муковисцидоза (genet.sickkids.on.ca), базе данных CFTR2 (клиническая и функциональная трансляция CFTR; cfr2.org) и базе данных UMD-CFTR (см., например, Bareil et al. *Hum. Mutat.* 2020; 31(9):1011-1019).

«Контрольный элемент» или «контрольная последовательность» представляет собой нуклеотидную последовательность, участвующую во взаимодействии молекул, способствующих функциональной регуляции полинуклеотида, включая репликацию, дупликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию или деградацию полинуклеотида. Регулирование может влиять на частоту, скорость или специфичность процесса и может быть усиливающим или ингибирующим по своей природе. Контрольные элементы, известные в данной области техники, включают, например, регуляторные последовательности транскрипции, такие как промоторы и энхансеры. Промотор представляет собой область ДНК, способную в определенных условиях связывать РНК-полимеразу и инициировать транскрипцию кодирующей области, обычно расположенной ниже по ходу транскрипции (в направлении 3') от промотора. Промоторы включают промоторы AAV, например, промоторы P5, P19, P40 и ITR AAV, а также гетерологичные

промоторы (например, SP183, PGK, CMV и другие эукариотические и вирусные промоторы). В конкретных вариантах осуществления энхансер представляет собой F5. В конкретных вариантах осуществления промотор представляет собой tg83.

«Вектор экспрессии» представляет собой вектор, содержащий область, которая кодирует представляющий интерес полипептид, и используется для осуществления экспрессии белка в намеченной клетке-мишени. Вектор экспрессии также содержит контрольные элементы, функционально связанные с кодирующей областью для облегчения экспрессии белка в мишени. Комбинацию контрольных элементов и гена или генов, с которыми они функционально связаны для экспрессии, иногда называют «кассетой экспрессии», большое количество которых известно и доступно в данной области техники или может быть легко сконструировано из компонентов, которые доступны в уровне техники.

«Ген» относится к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере одну открытую рамку считывания, которая способна кодировать конкретный белок после транскрипции и трансляции.

Термин «доставка гена» относится к введению экзогенного полинуклеотида в клетку для переноса гена и может включать нацеливание, связывание, поглощение, транспорт, локализацию, интеграцию и экспрессию репликона.

Термин «перенос гена» относится к введению экзогенного полинуклеотида в клетку, которое может включать нацеливание, связывание, поглощение, транспорт, локализацию и интеграцию репликона, но отличается от и не подразумевает последующую экспрессию гена.

Термин «экспрессия гена» или «экспрессия» относится к процессу транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации гена.

«Хелперный вирус» для AAV относится к вирусу, который позволяет AAV (например, AAV дикого типа) реплицироваться и упаковываться клеткой млекопитающего. В данной области техники известно множество таких хелперных вирусов для AAV, включая аденовирусы, вирусы герпеса и поксвирусы, например, вирус осповакцины. Аденовирусы включают ряд различных подгрупп, хотя чаще всего используется аденовирус типа 5 подгруппы C. Известно множество аденовирусов человека, млекопитающих и птиц, которые могут быть получены в депозитариях, таких как ATCC. К вирусам семейства герпеса относятся, например, вирусы простого герпеса (HSV) и вирусы Эпштейна-Барра (EBV), а также цитомегаловирусы (CMV) и вирусы псевдобешенства (PRV); которые также доступны в депозитариях, таких как ATCC.

«Ген обнаруживаемого маркера» представляет собой ген, который позволяет специфически обнаруживать клетки, несущие этот ген (например, отличать от клеток, которые не несут маркерный ген). В данной области известно большое разнообразие таких маркерных генов.

«Ген селективируемого маркера» представляет собой ген, который позволяет клеткам, несущим этот ген, специфически отбираться за или против в присутствии

соответствующего селективного агента. В качестве иллюстрации ген устойчивости к антибиотику можно использовать в качестве гена положительного селектируемого маркера, который позволяет проводить положительную селекцию клетки-хозяина в присутствии соответствующего антибиотика. В данной области техники известно множество положительных и отрицательных селектируемых маркеров, некоторые из которых описаны ниже.

«Гетерологичный» означает полученный из генотипически отличного объекта от остальной части объекта, с которым его сравнивают. Например, полинуклеотид, введенный методами генной инженерии в другой тип клеток, представляет собой гетерологичный полинуклеотид (и при экспрессии может кодировать гетерологичный полипептид).

«Клетки-хозяева», «линии клеток», «культуры клеток», «линия упаковочных клеток» и другие подобные термины означают эукариотические клетки, предпочтительно клетки млекопитающих, наиболее предпочтительно клетки человека, полезные в настоящем изобретении. Эти клетки можно использовать в качестве реципиентов для рекомбинантных векторов, вирусов или других полинуклеотидов-переносчиков, и они включают потомство исходной клетки, которая была трансдуцирована. Понятно, что потомство одной клетки не обязательно может быть полностью идентично (по морфологии или геномному дополнению) исходной родительской клетке.

«Выделенная» плазида, вирус или другое вещество относится к препарату вещества, лишенному по меньшей мере некоторых других компонентов, которые также могут присутствовать там, где вещество или подобное вещество встречается в природе или происходит из него первоначально. Так, например, выделенное вещество можно получить, используя способ очистки, обогащающий его из исходной смеси. Обогащение можно измерять на абсолютной основе, например, по весу на объем раствора, или его можно измерять по отношению ко второму, потенциально мешающему веществу, присутствующему в исходной смеси. Обогащение может быть, например, 2-кратным, 10-кратным, 100-кратным, 1000-кратным или выше.

Используемый в данном документе термин «функциональная связь» или «функционально связанный» относится к физическому или функциональному расположению компонентов, описанных таким образом, чтобы позволить им функционировать по назначению. Более конкретно, например, две функционально связанные последовательности ДНК означают, что две ДНК расположены (*цис* или *транс*) в таком соотношении, что по меньшей мере одна из последовательностей ДНК способна оказывать физиологическое воздействие на другую последовательность. Например, энхансер и/или промотор могут быть функционально связаны с трансгеном (например, терапевтическим трансгеном, таким как миниген CFTR Δ R).

Термин «упаковка», используемый в настоящем документе, относится к ряду внутриклеточных событий, которые приводят к сборке и инкапсидации вирусного вектора, в частности, вектора AAV. Таким образом, когда подходящий вектор вводится в

паковую клеточную линию в соответствующих условиях, его можно собрать в вирусную частицу. Функции, связанные с упаковкой вирусных векторов, в частности, векторов AAV, описаны в данном документе и в данной области техники.

Термин «полинуклеотид» относится к полимерной форме нуклеотидов любой длины, включая дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды или их аналоги. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные или кэпированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, и может быть прерван ненуклеотидными компонентами. Если присутствует, модификация нуклеотидной структуры может быть внесена до или после сборки полимера. Термин «полинуклеотид», используемый в данном документе, взаимозаменяемо относится к двухцепочечным и одноцепочечным молекулам. Если не указано иное или не требуется, любой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, который представляет собой полинуклеотид, охватывает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, о которых известно или предсказано, что они составляют двухцепочечную форму.

Термины «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Эти термины также охватывают модифицированный аминокислотный полимер; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, липидирование или конъюгация с меченым компонентом. Полипептиды, такие как «CFTR» и т.п., при обсуждении в контексте генной терапии и композиций для них, относятся к соответствующему интактному полипептиду или любому его фрагменту или генно-инженерному производному, который сохраняет желаемую биохимическую функцию интактного белка (например, CFTR Δ R). Аналогичным образом, ссылки на CFTR, CFTR Δ R и другие подобные гены для использования в генной терапии (обычно называемые «трангенами», предназначенными для доставки в клетку-реципиент), включают полинуклеотиды, кодирующие интактный полипептид или любой фрагмент или генетически сконструированное производное, обладающее желаемой биохимической функцией.

Под «фармацевтической композицией» подразумевается любая композиция, которая содержит терапевтически или биологически активное средство (например, полинуклеотид, содержащий трансген (например, миниген CFTR Δ R; см., например, Ostedgaard et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:2952-2957, 2005, и Ostedgaard et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(7):2921-6, 2011)), либо включенный в вирусный вектор (например, вектор rAAV), либо независимый от вирусного вектора (например, включенный в липосому, микрочастицу или наночастицу)), который подходит для введения субъекту. Любая из этих композиций может быть получена хорошо известными и общепринятыми способами. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, ed. J. Swarbrick, Informa Healthcare, 2006, каждый из которых включен в

настоящий документ путем ссылки.

Под «фармацевтически приемлемым разбавителем, вспомогательным веществом, носителем или адьювантом» понимают разбавитель, вспомогательное вещество, носитель или адьювант, который физиологически приемлем для субъекта, сохраняя при этом терапевтические свойства фармацевтической композиции, с которой его вводят.

«Рекомбинантный» применительно к полинуклеотиду означает, что полинуклеотид является продуктом различных комбинаций стадий клонирования, рестрикции и/или лигирования и других процедур, которые приводят к образованию конструкции, отличной от полинуклеотида, встречающегося в природе. Рекомбинантный вирус представляет собой вирусную частицу, содержащую рекомбинантный полинуклеотид. Термины соответственно включают повторы исходной полинуклеотидной конструкции и потомство исходной вирусной конструкции.

Под «рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (AAV)» или «вектором rAAV» понимают полученный рекомбинантным путем AAV или частицу AAV, которая содержит полинуклеотидную последовательность, не имеющую происхождения из AAV (например, полинуклеотид, содержащий трансген, который может быть функционально связан с одним или несколькими энхансерами и/или промоторами) для доставки в клетку либо *in vivo*, *ex vivo*, либо *in vitro*. rAAV может использовать встречающиеся в природе капсидные белки любого серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления в описанных в данном документе rAAV можно использовать капсиды неприродного происхождения (например, химерные), например, AV.TL65.

Под «эталоном» подразумевается любой образец, стандарт или уровень, используемый для целей сравнения. «Нормальный эталонный образец» или «эталонный образец дикого типа» может представлять собой, например, образец от субъекта, не имеющего расстройства (например, муковисцидоза). «Положительный эталонный образец, стандарт или значение представляет собой образец, стандарт, значение или число, полученные от субъекта, у которого известно наличие заболевания (например, муковисцидоз), который можно сопоставить с образцом субъекта путем по меньшей мере одного из следующих критериев: возраст, вес, стадия заболевания и общее состояние здоровья.

Термины «субъект» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения любого млекопитающего (например, человека, примата, кошки, собаки, хорька, коровы, лошади, свиньи, козы, крысы или мыши). Предпочтительно субъектом является человек.

«Терминатор» относится к полинуклеотидной последовательности, которая имеет тенденцию уменьшать или предотвращать сквозную транскрипцию (т.е. она уменьшает или предотвращает продолжение транскрипции, происходящей на одной стороне терминатора, на другую сторону терминатора). Степень нарушения транскрипции обычно зависит от последовательности оснований и/или длины терминаторной последовательности. В частности, как хорошо известно во многих молекулярных

биологических системах, определенные последовательности ДНК, обычно называемые «последовательностями терминации транскрипции», представляют собой специфические последовательности, которые имеют тенденцию нарушать сквозное считывание транскрипции РНК-полимеразой, предположительно заставляя молекулу РНК-полимеразы останавливаться и/или отсоединиться от транскрибируемой ДНК. Типичный пример таких специфичных для последовательности терминаторов включает последовательности полиаденилирования («полиА»), например, SV40 полиА. В дополнение к таким специфичным для последовательности терминаторам или вместо них вставки относительно длинных последовательностей ДНК между промотором и кодирующей областью также имеют тенденцию нарушать транскрипцию кодирующей области, обычно пропорционально длине промежуточной последовательности. Этот эффект, по-видимому, возникает потому, что всегда существует некоторая тенденция к отделению молекулы РНК-полимеразы от транскрибируемой ДНК, а увеличение длины последовательности, которую необходимо пройти до достижения кодирующей области, обычно увеличивает вероятность того, что отсоединение произойдет до транскрипции кодирующей области, было завершено или, возможно, даже инициировано. Таким образом, терминаторы могут предотвращать транскрипцию только в одном направлении («однонаправленные» терминаторы) или в обоих направлениях («двунаправленные» терминаторы) и могут состоять из специфичных для последовательности последовательностей терминации, или неспецифичных для последовательности терминаторов, или того и другого. В данной области техники известно множество таких терминаторных последовательностей; и иллюстративные варианты использования таких последовательностей в контексте настоящего изобретения представлены ниже.

«Терапевтический ген», «профилактический ген», «целевой полинуклеотид», «трансген», «ген, представляющий интерес» и т.п. обычно относятся к гену или генам, подлежащим переносу с использованием вектора. Обычно в контексте настоящего изобретения такие гены расположены внутри вектора гAAV (этот вектор фланкирован областями инвертированного концевой повтора (ITR) и, таким образом, может реплицироваться и инкапсидироваться в частицы гAAV). В настоящем описании целевые полинуклеотиды можно использовать для создания векторов гAAV для ряда различных применений. Такие полинуклеотиды включают, помимо прочего: (i) полинуклеотиды, кодирующие белки, полезные в других формах генной терапии для устранения недостатков, вызванных отсутствием, дефектами или субоптимальными уровнями структурного белка или фермента; (ii) полинуклеотиды, которые транскрибируются в бессмысловые молекулы; (iii) полинуклеотиды, которые транскрибируются в ловушки, связывающие факторы транскрипции или трансляции; (iv) полинуклеотиды, которые кодируют клеточные модуляторы, такие как цитокины; (v) полинуклеотиды, которые могут сделать клетки-реципиенты чувствительными к специфическим лекарственным средствам, такие как ген тимидинкиназы вируса герпеса; (vi) полинуклеотиды для терапии рака, такие как гены-супрессоры опухолей E1A или гены-супрессоры опухолей p53 для

лечения различных видов рака; и (vii) полинуклеотиды для редактирования генов (например, CRISPR). Для осуществления экспрессии трансгена в клетке-хозяине-реципиенте его предпочтительно функционально связывают с промотором, либо собственным, либо гетерологичным промотором. В данной области известно большое количество подходящих промоторов, выбор которых зависит от желаемого уровня экспрессии целевого полинуклеотида; требуется ли конститутивная экспрессия, индуцируемая экспрессия, клеточно-специфическая или тканеспецифичная экспрессия и т.д. Вектор gAAV также может содержать селективируемый маркер. Типичные трансгены включают, помимо прочего, регулятор трансмембранной проводимости муковисцидоза (CFTR) или его производные (например, миниген CFTRΔR; см., например, Ostedgaard et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(7):2921-6, 2011, который полностью включен в данный документ посредством ссылки), α-антитрипсин, β-глобин, γ-глобин, тирозингидроксилаза, глюкоцереброзидаза, арилсульфатаза А, фактор VIII, дистрофин, эритропоэтин, альфа 1-антитрипсин, поверхностно-активный белок SP-D, SP-A или SP-C, эритропоэтин или цитокин, например, IFN-альфа, IFNγ, TNF, IL-1, IL-17 или IL-6, или профилактический белок, который представляет собой антиген, такой как вирусный, бактериальный, опухолевый или грибковый антиген или нейтрализующее антитело или его фрагмент, который нацелен на эпитоп антигена, такого как эпитоп респираторного вируса человека, например, вируса гриппа или RSV, включая, помимо прочего, белок HBoV, белок вируса гриппа, белок RSV или белок SARS.

Под «терапевтически эффективным количеством» понимают количество композиции, вводимой для улучшения, подавления или облегчения состояния субъекта или симптома расстройства или заболевания, например, муковисцидоза, клинически значимым образом. Любое улучшение состояния субъекта считается достаточным для достижения лечения. Предпочтительно, количество, достаточное для лечения, представляет собой количество, которое уменьшает, подавляет или предотвращает возникновение одного или нескольких симптомов муковисцидоза, или представляет собой количество, которое уменьшает тяжесть или продолжительность времени, в течение которого субъект страдает от одного или нескольких симптомов муковисцидоза (например, по меньшей мере примерно на 10%, примерно 20% или примерно 30%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 50%, примерно 60% или примерно 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 80%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 99% или более по отношению к контрольному субъекту, которого не лечат композицией, описанной в настоящем документе). Эффективное количество фармацевтической композиции, используемой для применения на практике способов, описанных в настоящем документе (например, лечения муковисцидоза), варьируется в зависимости от способа введения, а также возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта, получающего лечение. Врач или исследователь может определить подходящее количество и режим дозирования.

«Трансдукция» или «трансдуцирующий», используемые в настоящем документе,

представляют собой термины, относящиеся к способу введения экзогенного полинуклеотида, например, трансгена в гAAV, в клетку-хозяина, приводящего к экспрессии полинуклеотида, например, трансгена в клетке. Этот способ обычно включает 1) эндоцитоз AAV после того, как он связался с рецептором на поверхности клетки, 2) выход из эндосом или других внутриклеточных компартментов цитозоля клетки, 3) транспорт вирусной частицы или вирусного генома в ядро, 4) снятие покрытия с вирусных частиц и создание экспрессируемых двухцепочечных форм генома AAV, включая кольцевые промежуточные соединения. Экспрессируемая двухцепочечная форма гAAV может сохраняться в виде ядерной эписомы или необязательно может интегрироваться в геном хозяина. Изменение любого или комбинации эндоцитоза AAV после его связывания с рецептором поверхности клетки, выхода из эндосом или других внутриклеточных компартментов в цитозоль клетки, транспорта вирусной частицы или вирусного генома в ядро или снятия покрытия с вирусных частиц и создание экспрессивных двухцепочечных форм генома AAV, включая кольцевые промежуточные соединения, может привести к изменению уровней экспрессии или устойчивости экспрессии, или изменению доставки в ядро, или изменению типов или относительного количества клеток-хозяев или популяции клетки, экспрессирующей введенный полинуклеотид. Измененную экспрессию или персистенцию полинуклеотида, введенного посредством гAAV, можно определить способами, хорошо известными в данной области техники, включая, помимо прочего, экспрессию белка, например, с помощью ELISA, проточной цитометрии и вестерн-блоттинга, измерения выработки ДНК и РНК с помощью анализов гибридизации, например, нозерн-блоттинг, саузерн-блоттинг и анализы подвижности сдвига в геле, или количественную или неколичественную обратную транскрипцию, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) или анализы с помощью цифровой капельной ПЦР.

«Лечение» индивидуума или клетки представляет собой любой тип вмешательства в попытке изменить естественное течение индивидуума или клетки в момент начала лечения, например, вызывая профилактический, лечебный или другой полезный эффект у индивидуума. Например, лечение индивидуума может быть предпринято для уменьшения или ограничения патологии, вызванной любым патологическим состоянием, включая (но не ограничиваясь этим) наследственную или индуцированную генетическую недостаточность (например, муковисцидоз), инфекцию вирусным, бактериальным или паразитарным организмом, неопластическое или апластическое состояние или дисфункцию иммунной системы, такую как аутоиммунитет или иммуносупрессия. Лечение включает (но не ограничивается этим) введение композиции, такой как фармацевтическая композиция, и введение совместимых клеток, обработанных композицией. Лечение может проводиться либо профилактически, либо терапевтически; то есть либо до, либо после начала патологического события или контакта с этиологическим агентом. Лечение может уменьшить один или несколько симптомов патологического состояния. Например, симптомы муковисцидоза известны в данной области и включают, например, постоянный кашель, свистящее дыхание, одышку,

непереносимость физической нагрузки, повторяющиеся инфекции легких, воспаление носовых ходов или заложенность носа, неприятный запах или жирный стул, плохой набор веса и рост, кишечную непроходимость, запор, повышенную концентрацию солей в поту, панкреатит и пневмонию. Обнаружение улучшения или отсутствия одного или нескольких симптомов заболевания (например, муковисцидоза) указывает на успешное лечение.

«Вариант» относится к полинуклеотиду или полипептиду, который по существу гомологичен нативному или эталонному полинуклеотиду или полипептиду. Например, вариантный полинуклеотид может быть по существу гомологичен нативному или эталонному полинуклеотиду, но иметь полинуклеотидную последовательность, отличную от последовательности нативного или эталонного полинуклеотида из-за одной или множества делеций, вставок и/или замен. В другом примере вариантный полипептид может быть по существу гомологичен нативному или эталонному полипептиду, но иметь аминокислотную последовательность, отличную от последовательности нативного или эталонного полипептида из-за одной или множества делеций, вставок и/или замен. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие вариант полипептида, включают последовательности, которые содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с нативной или эталонной полинуклеотидной последовательностью, но которые кодируют вариантный белок или его фрагмент, сохраняющий активность. В данной области известно широкое разнообразие подходов к мутагенезу, которые могут быть применены специалистом в данной области.

Вариантная полинуклеотидная или полипептидная последовательность может иметь по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичность нативной или эталонной последовательности. В некоторых примерах вариантная полинуклеотидная или полипептидная последовательность может быть по меньшей мере на 95% или более идентичной нативной или эталонной последовательности. В некоторых примерах вариантная полинуклеотидная или полипептидная последовательность может быть по меньшей мере на 96% или более идентичной нативной или эталонной последовательности. В некоторых примерах вариантная полинуклеотидная или полипептидная последовательность может быть по меньшей мере на 97% или более идентичной нативной или эталонной последовательности. В некоторых примерах вариантная полинуклеотидная или полипептидная последовательность может быть по меньшей мере на 98% или более идентичной нативной или эталонной последовательности. В некоторых примерах вариантная полинуклеотидная или полипептидная последовательность может быть по меньшей мере на 99% или более идентичной нативной или эталонной последовательности. Степень гомологии (процентной идентичности) между нативной и вариантной последовательностями можно

определить, например, путем сравнения двух последовательностей с использованием свободно доступных в сети Интернет компьютерных программ, обычно используемых для этой цели (например, BLASTp или BLASTn с настройками по умолчанию).

Термин «вектор», используемый в данном документе, относится к макромолекуле или объединению макромолекул, которые содержат полинуклеотид или связаны с ним и которые можно использовать для опосредования доставки полинуклеотида в клетку либо *in vitro*, либо *in vivo*. Иллюстративные векторы включают, например, плазмиды, вирусные векторы, липосомы и другие средства доставки генов. Полинуклеотид, подлежащий доставке, иногда называемый трансгеном, может содержать кодирующую последовательность, представляющую интерес для генной терапии (например, ген, кодирующий белок, представляющий терапевтический или представляющий интерес), кодирующую последовательность, представляющую интерес для разработки вакцины (например, полинуклеотид, экспрессирующий белок, полипептид или пептид, подходящий для индукции иммунного ответа у млекопитающего), и/или селективируемый или обнаруживаемый маркер.

Способы лечения МВ

В настоящем документе предложены способы лечения МВ у субъекта. В некоторых примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I. В других примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II. В еще других примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III. В еще других примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV. В еще других примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V. В еще других примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI. В еще других примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII. Способы могут включать введение субъекту любого из векторов (например, гAAV), раскрытых в настоящем документе, включая AV.TL65-SP183-hCFTRΔR. Способы могут также включать введение субъекту усиливающего средства (например, доксорубицина). Также предложены способы, которые включают последовательное введение гAAV (например, AV.TL65-SP183-hCFTRΔR) и усиливающего средства (например, доксорубицина), например, в которых усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 72 часов, примерно 48 часов, примерно 24 часов или примерно 12 часов после введения гAAV субъекту.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при лечении

МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом примере изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, у которого отсутствует белок CFTR, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом. В некоторых примерах генотип субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I.

В другом примере изобретение предусматривает гAAV для применения при лечении МВ у субъекта, у которого отсутствует белок CFTR, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом. В некоторых примерах генотип субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I, при этом способ включает введение субъекту гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при улучшении проводимости хлоридов эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом примере изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) субъекта, у которого отсутствует белок CFTR, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом. В некоторых примерах генотип субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I.

В другом примере изобретение предусматривает гAAV для применения при

улучшении проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, у которого отсутствует белок CFTR, при этом gAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом. В некоторых примерах генотип субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I.

В некоторых примерах субъект может иметь любую мутацию CFTR класса I. В некоторых примерах по меньшей мере одна мутация CFTR класса I представляет собой нонсенс-мутацию, мутацию сплайсинга или делецию. В некоторых примерах по меньшей мере одна мутация CFTR класса I включает мутацию Q2X, мутацию S4X, мутацию W19X, мутацию G27X, мутацию Q39X, мутацию W57X, мутацию E60X, мутацию R75X, мутацию L88X, мутацию E92X, мутацию Q98X, мутацию Y122X, мутацию E193X, мутацию W216X, мутацию L218X, мутацию Q220X, мутацию Y275X, мутацию C276X, мутацию Q290X, мутацию G330X, мутацию W401X, мутацию Q414X, мутацию S434X, мутацию S466X, мутацию S489X, мутацию Q493X, мутацию W496X, мутацию C524X, мутацию Q525X, мутацию G542X, мутацию G550X, мутацию Q552X, мутацию R553X, мутацию E585X, мутацию G673X, мутацию Q685X, мутацию R709X, мутацию K710X, мутацию Q715X, мутацию L732X, мутацию R764X, мутацию R785X, мутацию R792X, мутацию E822X, мутацию W882X, мутацию W846X, мутацию Y849X, мутацию R851X, мутацию Q890X, мутацию S912X, мутацию Y913X, мутацию Q1042X, мутацию W1089X, мутацию Y1092X, мутацию W1098X, мутацию R1102X, мутацию E1104X, мутацию W1145X, мутацию R1158X, мутацию R1162X, мутацию S1196X, мутацию W1204X, мутацию L1254X, мутацию S1255X, мутацию W1282X, мутацию Q1313X, мутацию Q1330X, мутацию E1371X, мутацию Q1382X, мутацию Q1411X, мутацию 2116delCTAA, мутацию T663rfsX8 или их комбинацию. Например, в некоторых случаях по меньшей мере одна мутация класса I включает мутацию G542X, мутацию W1282X, мутацию R1162X, мутацию R553X, мутацию 2116delCTAA или их комбинацию. В данной области известны и другие мутации CFTR класса I. В некоторых примерах генотип субъекта не содержит мутацию R553X.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса I. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса I, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса I, указанных выше. В качестве одного неограничивающего примера можно отметить, что в некоторых случаях генотип субъекта содержит мутацию W1282X и мутацию R1162X.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества gAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при лечении МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает субъекта, включающий введение субъекту меньшей мере одну мутацию CFTR класса II, при этом способ включает введение субъекту гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при улучшении проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

Генотип субъекта может содержать любую мутацию CFTR класса II. Типичные мутации CFTR класса II включают, например, F508del, N1303K и I507del. В некоторых примерах генотип субъекта не содержит мутацию F508del. Например, в некоторых примерах генотип субъекта содержит мутацию CFTR класса II, которая не включает мутацию F580del.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса II. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса II, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса II, указанных выше.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при лечении МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает субъекта, включающий введение субъекту меньшей мере одну

мутацию CFTR класса III, при этом способ включает введение субъекту гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при улучшении проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

Генотип субъекта может содержать любую мутацию CFTR класса III. Типичные мутации CFTR класса III включают, например, G551D и S549N.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса III. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса III, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса III, указанных выше.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при лечении МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает субъекта, включающий введение субъекту меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV, при этом способ включает введение субъекту гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при улучшении проводимости хлоридов эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

Генотип субъекта может содержать любую мутацию CFTR класса IV. Типичные

мутации CFTR класса IV включают, например, D1152H, R347P и R117H.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса IV. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса IV, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса IV, указанных выше.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при лечении МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает субъекта, включающий введение субъекту меньшей мере одну мутацию CFTR класса V, при этом способ включает введение субъекту гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при улучшении проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

Генотип субъекта может содержать любую мутацию CFTR класса V. Типичные мутации CFTR класса V включают, например, 3849+10kbC→T, 2789+5G→A и A455E.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса V. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса V включая любую комбинацию мутаций CFTR класса V, указанных выше.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при лечении

МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает субъекта, включающий введение субъекту меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI, при этом способ включает введение субъекту гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при улучшении проводимости хлоридов эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

Генотип субъекта может содержать любую мутацию CFTR класса VI. Типичные мутации класса VI включают, например, с. 120del23.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса VI. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса VI, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса VI, указанных выше.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при лечении МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает субъекта, включающий введение субъекту меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII, при этом способ включает введение субъекту гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения при улучшении проводимости хлоридов эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII, при этом гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

Генотип субъекта может содержать любую мутацию CFTR класса VII. Типичные мутации класса VII включают, например, *dele2,3(21kb)* и *1717-1G→A*.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса VII. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса VII, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса VII, указанных выше.

В некоторых примерах субъект может иметь любую комбинацию мутаций CFTR класса I, класса II, класса III, класса IV, класса V, класса VI или класса VII.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит одну мутацию CFTR класса I (включая любую мутацию CFTR класса I, описанную в настоящем документе или известную в данной области) и одну мутацию CFTR класса III (включая любую мутацию CFTR класса III, описанную в настоящем документе или известную в данной области).

В некоторых примерах способ дополнительно включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, например, любого усиливающего средства, описанного в настоящем документе. В некоторых примерах усиливающим средством является доксорубицин, например, доксорубицин-HCl.

В некоторых примерах усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 72 часов (например, в течение примерно 48 часов, примерно 24 часов или примерно 12 часов) после введения гAAV.

В другом аспекте изобретение предлагает способ лечения MB у субъекта, при этом способ включает: (a) введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение около 72 часов после введения гAAV.

В другом аспекте изобретение предлагает гAAV для применения в способе лечения MB у субъекта, причем способ включает: (a) введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение около 72 часов после введения гAAV.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости

хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) субъекта, при этом способ включает: (а) введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение около 72 часов после введения гAAV.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения в способе улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) субъекта, при этом способ включает: (а) введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение около 72 часов после введения гAAV.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ лечения МВ у субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, при этом средство, усиливающее трансдукцию AAV, вводят субъекту в течение примерно 72 часов после введения гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает средство, усиливающее трансдукцию AAV, для применения при лечении МВ у субъекта, при этом указанное средство вводят субъекту в течение примерно 72 часов после введения гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) субъекта, при этом способ включает: (а) введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение около 72 часов после введения гAAV.

В другом аспекте изобретение предусматривает гAAV для применения в способе улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) субъекта, при этом способ включает: (а) введение субъекту

терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение около 72 часов после введения гAAV.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ улучшения проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, при этом средство, усиливающее трансдукцию AAV, вводят субъекту в течение примерно 72 часов после введения гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

В другом аспекте изобретение относится к средству, усиливающему трансдукцию AAV, для применения в улучшении проводимости хлоридов в эпителиальных клетках дыхательных путей (например, легких) субъекта, при этом указанное средство вводят субъекту в течение примерно 72 часов после введения гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

Например, в некоторых примерах любого из способов, описанных в настоящем документе, усиливающее средство можно вводить субъекту в течение около 88 ч., 72 ч., около 71 ч., около 70 ч., около 69 ч., около 68 ч., около 67 ч., около 66 ч., около 65 ч., около 64 ч., около 63 ч., около 62 ч., около 61 ч., около 60 ч., около 59 ч., около 58 ч., около 57 ч., около 56 ч., около 55 ч., около 54 ч., около 53 ч., около 52 ч., около 51 ч., около 50 ч., около 49 ч., около 48 ч., около 47 ч., около 46 ч., около 45 ч., около 44 ч., около 43 ч., около 42 ч., около 41 ч., около 40 ч., около 39 ч., около 38 ч., около 37 ч., около 36 ч., около 35 ч., около 34 ч., около 33 ч., около 32 ч., около 31 ч., около 30 ч., около 29 ч., около 28 ч., около 27 ч., около 26 ч., около 25 ч., около 24 ч., около 23 ч., около 22 ч., около 21 ч., около 20 ч., около 19 ч., около 18 ч., около 17 ч., около 16 ч., около 15 ч., около 14 ч., около 13 ч., около 12 ч., около 11 ч., около 10 ч., около 9 ч., около 8 ч., около 7 ч., около 6 ч., около 5 ч., около 4 ч., около 3 ч., около 2 ч. или около 1 ч. после введения гAAV.

В некоторых примерах усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 48 часов после введения гAAV.

В некоторых примерах усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 40 часов после введения гAAV.

В некоторых примерах усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 24 часов после введения гAAV.

около 62 ч., от около 44 ч. до около 60 ч., от около 44 ч. до около 58 ч., от около 44 ч. до около 56 ч., от около 44 ч. до около 54 ч., от около 44 ч. до около 52 ч., от около 44 ч. до около 50 ч., от около 44 ч. до около 48 ч., от около 44 ч. до около 46 ч., от около 48 ч. до около 72 ч., от около 48 ч. до около 70 ч., от около 48 ч. до около 68 ч., от около 48 ч. до около 66 ч., от около 48 ч. до около 64 ч., от около 48 ч. до около 62 ч., от около 48 ч. до около 60 ч., от около 48 ч. до около 58 ч., от около 48 ч. до около 56 ч., от около 48 ч. до около 54 ч., от около 48 ч. до около 52 ч., от около 48 ч. до около 50 ч., от около 52 ч. до около 72 ч., от около 52 ч. до около 70 ч., от около 52 ч. до около 68 ч., от около 52 ч. до около 66 ч., от около 52 ч. до около 64 ч., от около 52 ч. до около 62 ч., от около 52 ч. до около 60 ч., от около 52 ч. до около 58 ч., от около 52 ч. до около 56 ч., от около 52 ч. до около 54 ч., от около 56 ч. до около 72 ч., от около 56 ч. до около 70 ч., от около 56 ч. до около 68 ч., от около 56 ч. до около 66 ч., от около 56 ч. до около 64 ч., от около 56 ч. до около 62 ч., от около 56 ч. до около 60 ч., от около 56 ч. до около 58 ч., от около 60 ч. до около 72 ч., от около 60 ч. до около 70 ч., от около 60 ч. до около 68 ч., от около 60 ч. до около 66 ч., от около 60 ч. до около 64 ч., от около 60 ч. до около 62 ч., от около 64 ч. до около 72 ч., от около 64 ч. до около 70 ч., от около 64 ч. до около 68 ч., от около 64 ч. до около 66 ч., от около 68 ч. до около 72 ч., от около 68 ч. до около 70 ч. или от около 70 ч. до около 72 ч. после введения гAAV.

Может быть использовано любое подходящее усиливающее средство. В некоторых примерах усиливающее средство представляет собой средство, модулирующее протеасомы. В некоторых примерах усиливающее средство представляет собой антрациклин, ингибитор протеасом, трипептидилальдегид или их комбинацию. В некоторых примерах антрациклин представляет собой доксорубицин, идарубицин, акларубицин, даунорубицин, эпирубицин, валрубицин, митоксантрон или их комбинацию. В некоторых примерах антрациклин представляет собой доксорубицин, идарубицин или их комбинацию. В некоторых примерах антрациклин представляет собой доксорубицин. В некоторых примерах ингибитором протеасом является бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб. В некоторых примерах трипептидилальдегид представляет собой N-ацетил-l-лейцил-l-лейцил-l-норлейцин (LLnL). В конкретных примерах усиливающим средством является доксорубицин, например, доксорубицин-HCl.

В некоторых примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I. В некоторых примерах по меньшей мере одна мутация CFTR класса I представляет собой нонсенс-мутацию, мутацию сплайсинга или делецию.

В некоторых примерах по меньшей мере одна мутация CFTR класса I включает мутацию G542X, мутацию W1282X, мутацию R1162X, мутацию R553X или их комбинацию. В некоторых примерах генотип субъекта не содержит мутацию R553X.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса I. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса I. В качестве одного неограничивающего примера можно отметить, что в некоторых случаях генотип субъекта содержит мутацию W1282X и мутацию R1162X.

В других примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II (например, F508del, N1303K или A561E), по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III (например, G551D, S549R или G1349D), по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV (например, R117H, R334W или A455E), по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V (например, A455G, 3272-26A→G или 3849+10kg C→T), по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI (например, dele2,3(21kb), 1717-1G→A) или по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII (например, dele2,3(21kb) и 1717-1G→A). См., например, De Boeck et al. *Acta Paediatrica* 2020; 109:893-899, для обзора разных классов мутация CFTR.

Например, в любом из предыдущих примеров, в которых усиливающее средство вводят субъекту после введения гAAV, генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II (например, F508del, N1303K или A561E). В некоторых примерах генотип субъекта не содержит мутацию F508del. Например, в некоторых примерах генотип субъекта содержит мутацию CFTR класса II, которая не включает мутацию F580del. В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса II. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса II, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса II, указанных выше.

В другом примере в любом из предыдущих примеров, в которых усиливающее средство вводят субъекту после введения гAAV, генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III (например, G551D, S549R или G1349D). В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса III. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса III, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса III, указанных выше.

В другом примере в любом из предыдущих примеров, в которых усиливающее средство вводят субъекту после введения гAAV, генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV (например, R117H, R334W или A455E). В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса IV. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса IV, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса IV, указанных выше.

В другом примере в любом из предыдущих примеров, в которых усиливающее средство вводят субъекту после введения гAAV, генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V (например, A455G, 3272-26A→G или 3849+10kg C→T). В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса V. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса V, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса V, указанных выше.

В другом примере в любом из предыдущих примеров, в которых усиливающее средство вводят субъекту после введения гAAV, генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI (например, dele2,3(21kb), 1717-1G→A). В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса VI. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса VI, включая любую

комбинацию мутаций CFTR класса VI, указанных выше.

В другом примере в любом из предыдущих примеров, в которых усиливающее средство вводят субъекту после введения rAAV, генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII (например, *dele2,3(21kb)* и *1717-1G→A*). В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса VII. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса VII, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса VII, указанных выше.

В некоторых примерах генотип субъекта может содержать по меньшей мере одну из следующих мутаций CFTR: *185+1G>T*, *296+1G>A*, *296+1G>T*, *405+1G>A*, *405+3A>C*, *406-1G>A*, *621+1G>T*, *711+1G>T*, *711+5G>A*, *712-1G>T*, *1248+1G>A*, *1249-1G>A*, *1341+1G>A*, *1525-2A>G*, *1525-1G>A*, *1717-8G>A*, *1717-1G>A*, *1811+1G>C*, *1811+1.6kbA>G*, *1811+1643G>T*, *1812-1G>A*, *1898+1G>A*, *1898+1G>C*, *2622+1G>A*, *2790-1G>C*, *3040G>C (G970R)*, *3120G>A*, *3120+1G>A*, *3121-2A>G*, *3121-1G>A*, *3500-2A>G*, *3600+2insT*, *3850-1G>A*, *4005+1G>A*, *4374+1G>T*, *182delT*, *306insA*, *365-366insT*, *394delTT*, *442delA*, *444delA*, *457TAT>G*, *541delC*, *574delA*, *663delT*, *849delG*, *935delA*, *1078delT*, *1119delA*, *1138insG*, *1154insTC*, *1161delC*, *1213delT*, *1259insA*, *1288insTA*, *1343delG*, *1471delA*, *1497delGG*, *1548delG*, *1609del CA*, *1677delTA*, *1782delA*, *1824delA*, *1833delT*, *2043delG*, *2143delT*, *2183AA>G^a*, *2184delA*, *2184insA*, *2307insA*, *2347delG*, *2585delT*, *2594delGT*, *2711delT*, *2732insA*, *2869insG*, *2896insAG*, *2942insT*, *2957delT*, *3007delG*, *3028delA*, *3171delC*, *3171insC*, *3271delGG*, *3349insT*, *3659delC*, *3737delA*, *3791delC*, *3821delT*, *3876delA*, *3878delG*, *3905insT*, *4016insT*, *4021dupT*, *4022insT*, *4040delA*, *4279insA*, *4326delTC*, *CFTRdele1*, *CFTRdele2*, *CFTRdele2,3*, *CFTRdele2-4*, *CFTRdele3-10,14b-16*, *CFTRdele4-7*, *CFTRdele4-11*, *CFTR50kbdel*, *CFTRdup6b-10*, *CFTRdele11*, *CFTRdele13,14a*, *CFTRdele14b-17b*, *CFTRdele16-17b*, *CFTRdele17a,17b*, *CFTRdele17a-18*, *CFTRdele19*, *CFTRdele19-21*, *CFTRdele21*, *CFTRdele22-24*, *CFTRdele22,23*, *124del23bp*, *306delTAGA*, *602del14*, *852del22*, *991del5*, *1461ins4*, *1924del7*, *2055del9>A*, *2105-2117del13insAGAAA*, *2372del8*, *2721del11*, *2991del32*, *3121-977_3499+248del2515*, *3667ins4*, *4010del4*, *4209TGTT>AA*, *A46D*, *G85E*, *R347P*, *L467P*, *I507del*, *V520F*, *A559T*, *R560T*, *R560S*, *A561E*, *Y569D*, *L1065P*, *R1066C*, *L1077P*, *M1101K* и *N1303K*.

В некоторых примерах rAAV содержит капсидный белок AV.TL65. В некоторых примерах капсидный белок AV.TL65 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичностью SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления последовательность, характеризующаяся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере

97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичностью SEQ ID NO:13, содержит остаток треонина (Т) в положении 581. В некоторых примерах капсидный белок AV.TL65 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

гAAV может включать любой из полинуклеотидов, описанных в настоящем документе.

В некоторых примерах полинуклеотид содержит энхансер F5. В некоторых примерах энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1. В других примерах энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:14.

В некоторых примерах полинуклеотид содержит промотор tg83. В некоторых примерах промотор tg83 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

В некоторых примерах полинуклеотид содержит миниген CFTRΔR. В некоторых примерах миниген CFTRΔR представляет собой миниген CFTRΔR человека. В некоторых примерах миниген CFTRΔR человека кодируется полинуклеотидом, содержащим последовательность SEQ ID NO:4.

В некоторых примерах полинуклеотид содержит в направлении от 5' к 3' энхансер F5, промотор tg83 и миниген CFTRΔR.

В некоторых примерах полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:7.

В некоторых примерах способ дополнительно включает введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. Можно использовать любое подходящее дополнительное терапевтическое средство(-а) или их комбинацию, например, любое дополнительное терапевтическое средство(-а), описанное в настоящем документе. В некоторых примерах одно или несколько дополнительных терапевтических средств включают антибиотик, средство, разжижающее мокроту, модулятор CFTR, муколитическое средство, физиологический раствор, гипертонический физиологический раствор, иммунодепрессивное средство или их комбинацию.

В соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе, композиция, описанная в настоящем документе (например, гAAV или фармацевтическая композиция), может использоваться *in vivo*, а также *ex vivo*. Генная терапия *in vivo* включает введение векторов по настоящему изобретению непосредственно субъекту. Фармацевтические композиции могут поставляться в виде жидких растворов или суспензий, эмульсий или твердых форм, пригодных для растворения или суспендирования в жидкости перед применением. Для введения в дыхательные пути одним из типичных способов введения является аэрозоль с использованием композиции, которая представляет собой либо твердый, либо жидкий аэрозоль при использовании с соответствующим аэрозольным устройством. Другой способ введения векторов в дыхательные пути - использование гибкого оптоволоконного бронхоскопа для введения векторов.

В соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе, описанную в данном документе композицию (например, гAAV или фармацевтическую композицию) можно вводить любым подходящим путем, например, путем ингаляции, распыления,

аэрозолизации, интраназально, интратрахеально, внутривенно, перорально, парентерально (например, внутривенно, подкожно или внутримышечно), перорально, назально, ректально, местно или буккально. Их также можно применять местно или системно. В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в настоящем документе, вводят в виде аэрозольных частиц интратрахеально и/или интрабронхиально с использованием распылителя (например, с помощью устройства для распыления слизистой оболочки гортани-трахеи MADgic®). В некоторых вариантах осуществления композицию вводят парентерально. В других некоторых вариантах осуществления композицию вводят системно. Векторы также могут быть введены посредством биопротезов, включая, например, сосудистые трансплантаты (PTFE и лавсан), сердечные клапаны, внутрисосудистые стенты, внутрисосудистые покрытия, а также другие несосудистые протезы. Общие методы, касающиеся доставки, частоты, состава и диапазонов доз векторных растворов, известны специалистам в данной области техники.

Для введения в верхние (назальные) или нижние дыхательные пути путем ингаляции композиции, описанные в настоящем документе (например, гAAV или фармацевтические композиции), удобно доставлять из инсуфлятора, распылителя или герметичной упаковки или других удобных средств доставки аэрозольного спрея. Пакеты под давлением могут содержать подходящий пропеллент, такой как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другой подходящий газ. В случае аэрозоля под давлением единицу дозировки можно определить путем установки клапана для подачи отмеренного количества.

Альтернативно для введения путем ингаляции или инсуффляции композиция может иметь форму сухого порошка, например, порошковой смеси средства и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал. Порошковая композиция может быть представлена в единичной дозированной форме, например, в капсулах или картриджах, или, например, в желатиновых или блистерных упаковках, из которых порошок можно вводить с помощью ингалятора, инсуфлятора или ингалятора отмеренных доз.

Для интраназального введения средство можно вводить через капли в нос, жидкий спрей, например, с помощью распылителя из пластиковой бутылки или ингалятора отмеренных доз. Типичными распылителями являются Mistometer (Wintrop) и Medihaler (Riker).

В соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе, композиция, описанная в настоящем документе (например, гAAV или фармацевтическая композиция), может быть непрерывной или периодической, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, является ли цель введения терапевтической или профилактической, и других факторов, известных опытным специалистам. Описанные в данном документе композиции можно вводить один или несколько раз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 или более раз) в одно и то же или в разные места. Введение средств по настоящему изобретению может быть по существу непрерывным в течение заранее

выбранного периода времени или может осуществляться серией разделенных доз.

В соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе, композиция, описанная в настоящем документе (например, rAAV или фармацевтическая композиция), может вводиться в качестве монотерапии. Описанные в данном документе композиции (например, rAAV или фармацевтические композиции) также можно вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Могут быть использованы любые подходящие дополнительные терапевтические средства, включая стандартные методы лечения МВ. В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных терапевтических средств включают антибиотик (например, азитромицин (ZITHROMAX®), амоксициллин и клавулановую кислоту (AUGMENTIN®), клоксациллин и диклоксациллин, тикарциллин и клавулановую кислоту (TIMENTIN®), цефалексин, цефдинир, цефпрозил, цефаклор; сульфаметоксазол и триметоприм (BACTRIM®), эритромицин/сульфизоксазол, эритромицин, кларитромицин, тетрациклин, доксициклин, миноциклин, тигециклин, ванкомицин, имипенем, мерипенем, колистиметат/COLISTIN®, линезолид, ципрофлоксацин, левофлоксацин или их комбинацию), разжижитель слюны (например, гипертонический физиологический раствор или дорназа альфа (PULMOZYME®)), модулятор CFTR (например, ивакафтор (Kalydeco®), люмакафтор, люмакафтор/ивакафтор (Orkambi®), тезакафтор/ивакафтор (Symdeko®) или TRIKAFTA® (элексакафтор/ивакафтор/тезакафтор)), муколитик (например, ацетилцистеин, амброксол, бромгексин, карбоцистеин, эрдостеин, мецистеин и дорназа альфа), иммунодепрессант, физиологический раствор, гипертонический физиологический раствор или их комбинацию.

Например, любой из способов, раскрытых в настоящем документе, может включать введение любой из описанных в данном документе композиций (например, rAAV или фармацевтических композиций) в комбинации с одним или несколькими иммунодепрессантами. Можно использовать любой подходящий иммунодепрессант. Например, неограничивающие примеры иммунодепрессантов включают кортикостероиды (например, ингаляционный кортикостероид (например, беклометазон (QVAR®), будесонид (PULMICORT®), будесонид/формотерол (SYMBICORT®), циклесонид (ALVESCO®), флутиказон (FLOVENT HFA®), флутиказона пропионат (FLOVENT DISKUS®), флутиказона фуруат (ARNUITY ELLIPTA®), флутиказона пропионат/салметерол (ADVAIR®), флутиказона фуруат/умеклидиний/вилантерол (TRELEGY ELLIPTA®), мометазона фуруат (ASMANEX®) или мометазон/формотерол (DULERA®), предизон или метилпреднизолон), поликлональные антилимфоцитарные антитела (например, антитела против лимфоцитарного глобулина (ALG) и антитела против тимоцитарного глобулина (ATG), которые могут быть получены, например, от лошади или кролика), моноклональные антилимфоцитарные антитела (например, антитела против CD3 (например, мурмомаб и алемтузумаб) или антитела против CD20 (например, ритуксимаб)), антагонисты рецепторов интерлейкина-2 (IL-2) (например, даклизумаб и базиликсимаб), ингибиторы кальциневрина (например, циклоспорин А и такролимус),

ингибиторы клеточного цикла (например, азатиоприн, микофенолат мофетил (MMF) и микофеноловая кислота (MPA)), ингибиторы мишени млекопитающих рапамицина (mTOR) (например, сиролимус (рапамицин) и эверолимус), метотрексат, циклофосфамид, антрациклин (например, доксорубин, идарубин, акларубин, даунорубин, эпирубин, валрубин, митоксантрон или их комбинация), таксан (например, TAXOL® (паклитаксел)) и их комбинацию (например, комбинацию ингибитора кальциневрина, ингибитора клеточного цикла и кортикостероида).

В конкретных вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в настоящем документе, может включать введение любой из описанных в данном документе композиций (например, гAAV или фармацевтических композиций) в комбинации с одним или несколькими кортикостероидами (например, ингаляционным кортикостероидом (например, беклометазон (QVAR®), будесонид (PULMICORT®), будесонид/формотерол (SYMBICORT®), циклесонид (ALVESCO®), флутиказон (FLOVENT HFA®), флутиказона пропионат (FLOVENT DISKUS®), флутиказона фуруат (ARNIVITY ELLIPTA®), флутиказона пропионат/салметерол (ADVAIR®), флутиказона фуруат/умеклидиний/вилантерол (TRELEGY ELLIPTA®), мометазона фуруат (ASMANEX®) или мометазон/формотерол (DULERA®), предизон или метилпреднизолон). В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой ингаляционный кортикостероид.

Иммунодепрессант (например, любой иммунодепрессант, описанный в настоящем документе) можно вводить путем ингаляции или системно (например, внутривенно или подкожно).

В некоторых примерах любой из способов, раскрытых в настоящем документе, может включать введение любой из описанных в данном документе композиций (например, гAAV или фармацевтических композиций) млекопитающему отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями. Как отмечалось выше, относительные пропорции активного ингредиента и носителя определяются растворимостью и химической природой соединения, выбранным путем введения и стандартной фармацевтической практикой.

Дозировка композиций по изобретению будет варьироваться в зависимости от формы введения, конкретного выбранного соединения и физиологических характеристик конкретного пациента, проходящего лечение. Желательно использовать самую низкую эффективную концентрацию вируса, чтобы снизить риск нежелательных эффектов, таких как токсичность.

Полинуклеотиды

В настоящем описании представлены полинуклеотиды, которые можно включать в векторы гAAV для использования в способах, раскрытых в настоящем документе, или использовать при получении векторов гAAV. Полинуклеотид может включать любые подходящие элементы или компоненты, включая один или несколько элементов, выбранных из 5'-ITR AAV (например, 5'-ITR AAV2), энхансера F5, промотора tg83, 5'-

нетранслируемой области (UTR), минигена CFTR Δ R, 3'-UTR, сайт полиаденилирования и/или 3'-ITR AAV (например, 3'-ITR AAV2). Хотя полинуклеотиды обычно включены в векторы rAAV, следует понимать, что их можно доставлять или вводить в контексте других типов векторов, известных в данной области техники. Любой из полинуклеотидов, описанных ниже, можно использовать в способах, раскрытых в настоящем документе.

В одном аспекте изобретение обеспечивает выделенный полинуклеотид, который включает последовательность SEQ ID NO:7 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:1, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTR Δ R, содержащий последовательность SEQ ID NO:4. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:14, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTR Δ R, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит в 3'-направлении 3'-нетранслируемую область (3'-UTR), содержащую последовательность SEQ ID NO:5 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит в 3'-направлении (например, 3' относительно 3'-UTR) синтетический сайт полиаденилирования, содержащий последовательность SEQ ID NO:6.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) 5'-аденоассоциированного вируса (AAV) на 5'-конце полинуклеотида и/или 3'-ITR AAV на 3'-конце полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:11 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:11. В других некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:1, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTR Δ R, содержащий последовательность SEQ ID NO:4. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:14, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTR Δ R, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

В других вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:17 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности

с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:17. В других некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:1, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:14, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

Любой из полинуклеотидов может содержать 5'-ITR AAV. Можно использовать любую подходящую 5'-ITR AAV, включая 5'-ITR AAV любого серотипа AAV (например, AAV2). В некоторых вариантах осуществления 5'-ITR AAV содержит последовательность SEQ ID NO:9 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:9. В другом примере в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает 5'-ITR AAV, содержащую последовательность SEQ ID NO:15 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:15. Любой из полинуклеотидов может содержать 3'-ITR AAV. Можно использовать любую подходящую 3'-ITR AAV, включая 3'-ITR AAV любого серотипа AAV (например, AAV2). В некоторых вариантах осуществления 3' AAV ITR содержит последовательность SEQ ID NO:10 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:10. В другом примере в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит 3'-ITR AAV, содержащую последовательность SEQ ID NO:16 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:16. Последовательности ITR могут быть палиндромными, например, как в SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:16, где последовательность ITR на 5'-конце расположена на обратной цепи, а последовательность ITR на 3'-конце расположена на передней цепи.

Любой из полинуклеотидов может содержать энхансер F5. См., например, заявку на патент США № 16/082767, которая полностью включена в данный документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления энхансер F5 содержит последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:14 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1. В других вариантах осуществления энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:14.

Любой из полинуклеотидов может содержать промотор tg83. См., например, заявку

на патент США № 16/082767. В некоторых вариантах осуществления промотор tg83 содержит последовательность SEQ ID NO:2 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:2.

Любой из полинуклеотидов может содержать 5'-UTR. Может быть использована любая подходящая 5'-UTR. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR содержит последовательность SEQ ID NO:3 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:3.

Любой из полинуклеотидов может содержать последовательность, кодирующую миниген CFTRΔR. Можно использовать любой подходящий миниген CFTRΔR, включая CFTRΔR человека (hCFTRΔR) или CFTRΔR хорька. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая миниген hCFTRΔR, включает последовательность SEQ ID NO:4 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:4.

Любой из полинуклеотидов может содержать 3'-UTR. Можно использовать любую подходящую 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR содержит последовательность SEQ ID NO:3 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5.

Любой из полинуклеотидов может содержать сайт полиаденилирования. Можно использовать любой подходящий сайт полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления сайт полиаденилирования содержит последовательность SEQ ID NO:6 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:6.

В одном аспекте изобретение обеспечивает выделенный полинуклеотид, который включает последовательность SEQ ID NO:8 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:1, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4. В других некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:14,

промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

В одном аспекте изобретение обеспечивает выделенный полинуклеотид, который включает последовательность SEQ ID NO:11 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:11. В других некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:1, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:14, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

В одном аспекте изобретение обеспечивает выделенный полинуклеотид, который включает последовательность SEQ ID NO:12 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:12. В других некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:1, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:14, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

В другом аспекте изобретение обеспечивает выделенный полинуклеотид, который включает последовательность SEQ ID NO:18 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% , 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:18. В других некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:1, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:14, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

Полинуклеотид также может содержать один или несколько обнаруживаемых маркеров. Известны различные такие маркеры, включая, в качестве иллюстрации, ген бактериальной бета-галактозидазы (lacZ); ген плацентарной щелочной фосфатазы (AP) человека и гены, кодирующие различные маркеры клеточной поверхности, которые использовались в качестве репортерных молекул как *in vitro*, так и *in vivo*. Полинуклеотид

также может содержать один или несколько селективируемых маркеров.

Рекомбинантные векторы AAV

Рекомбинантные векторы AAV являются потенциально мощным инструментом генной терапии человека, особенно при таких заболеваниях, как муковисцидоз. Основное преимущество векторов гAAV перед другими подходами к генной терапии заключается в том, что они обычно не требуют постоянной репликации клетки-мишени для эпизодического существования или стабильной интеграции в клетку-хозяина. В общем, изобретение относится к гAAV, который включает капсидный белок AV.TL65 и полинуклеотид, который содержит энхансер F5 и промотор tg83, функционально связанный с трансгеном. Любой из гAAV, описанных ниже, может быть использован в раскрытых в данном документе способах. В некоторых примерах любой гAAV, описанный в публикации международной патентной заявки № WO 2020/214668 или в патентной заявке США № 17,603/831, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, может быть использован в раскрытых в данном документе способах.

Например, в одном аспекте изобретение предлагает гAAV, который содержит (i) капсидный белок AV.TL65; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5 и промотор tg83, функционально связанный с минигеном CFTRΔR.

В другом аспекте изобретение обеспечивает гAAV для применения при лечении муковисцидоза (например, МВ, связанного с мутацией класса I) у субъекта, нуждающегося в этом, причем гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5 и промотор tg83, функционально связанный с минигеном CFTRΔR.

В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AV.TL65 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% , 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления последовательность, характеризующаяся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичностью SEQ ID NO:13, содержит остаток треонина (T) в положении 581.

В некоторых вариантах осуществления энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:14 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1. В других вариантах осуществления энхансер F5 содержит полинуклеотидную

последовательность SEQ ID NO:14.

В некоторых вариантах осуществления промотор tg83 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:2.

Можно использовать любой подходящий миниген CFTR Δ R или его производное. В некоторых вариантах осуществления миниген CFTR Δ R представляет собой миниген CFTR Δ R человека. В других вариантах осуществления миниген CFTR Δ R представляет собой миниген CFTR Δ R хорька. В некоторых вариантах осуществления миниген CFTR Δ R человека кодируется полинуклеотидом, содержащим последовательность SEQ ID NO:4 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:4.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит в направлении от 5' к 3' энхансер F5, промотор tg83 и миниген CFTR Δ R. В некоторых конкретных вариантах осуществления полинуклеотид содержит в направлении от 5'-к 3' 5'-ITR AAV (например, 5'-ITR AAV2), энхансер F5, промотор tg83, 5'-нетранслируемую область (UTR), миниген CFTR Δ R, 3'-UTR, сайт полиаденилирования и 3'-ITR AAV (например, 3'-ITR AAV2).

В другом аспекте изобретение обеспечивает rAAV, содержащий любой из полинуклеотидов, описанных в настоящем документе, например, полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:17 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:17. Например, изобретение предусматривает rAAV, содержащий полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:17 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:17. В некоторых вариантах осуществления rAAV обладает тропизмом к эпителиальным клеткам дыхательных путей (например, эпителиальным клеткам легких). В некоторых вариантах осуществления rAAV содержит капсидный белок AV.TL65, капсидный белок AAV1, капсидный белок AAV2, капсидный белок AAV5, капсидный белок AAV6 или капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления rAAV содержит капсидный белок AV.TL65. В других некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:1, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTR Δ R, содержащий последовательность SEQ ID NO:4. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:14,

промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTR Δ R, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

Гетерологичный полинуклеотид может быть интегрирован рекомбинантными методами в геномную кодирующую область AAV или предпочтительно вместо нее (т.е. вместо генов гер и сар AAV), но обычно с обеих сторон фланкирован областями инвертированного концевой повтора AAV (ITR). Это означает, что ITR появляется как выше, так и ниже кодирующей последовательности, либо в прямом сопоставлении, предпочтительно (хотя и не обязательно) без какой-либо промежуточной последовательности происхождения AAV, чтобы уменьшить вероятность рекомбинации, которая могла бы регенерировать компетентный к репликации геном AAV. Однако одного ITR может быть достаточно для выполнения функций, обычно связанных с конфигурациями, содержащими два ITR (см., например, WO 94/13788), и векторные конструкции только с одним ITR могут, таким образом, использоваться в сочетании со способами упаковки и производства по настоящему изобретению.

Нативные промоторы гер являются саморегулирующимися и могут ограничивать количество образующихся частиц AAV. Ген гер также может быть функционально связан с гетерологичным промотором независимо от того, предоставляется ли гер как часть векторной конструкции или отдельно. Подходящим является любой гетерологичный промотор, экспрессия которого не подвергается сильному снижению экспрессии гена гер; но некоторые из них включают индуцируемые промоторы, поскольку конститутивная экспрессия гена гер может оказывать негативное влияние на клетку-хозяина. В данной области известно большое разнообразие индуцируемых промоторов; включая, в качестве иллюстрации, промоторы, индуцируемые ионами тяжелых металлов (такие как промоторы металлотионеина); промоторы, индуцируемые стероидными гормонами (такие как промотор MMTV или промоторы гормона роста); и промоторы, такие как промоторы фага T7, которые активны в присутствии РНК-полимеразы T7. Одним из подклассов индуцируемых промоторов являются те, которые индуцируются вирусом-помощником, который используется для дополнения репликации и упаковки вектора rAAV. Также был описан ряд промоторов, индуцируемых вирусом-помощником, включая промотор раннего гена аденовируса, который индуцируется белком E1A аденовируса; главный поздний промотор аденовируса; промотор герпесвируса, индуцируемый белками герпесвируса, такими как VP16 или ICP4; а также промоторы, индуцируемые вирусом коровьей оспы или оспы.

Учитывая относительные пределы размера инкапсулирования различных геномов AAV, вставка большого гетерологичного полинуклеотида в геном требует удаления части последовательности AAV. Удаление одного или нескольких генов AAV в любом случае желательно, чтобы снизить вероятность образования репликационно-компетентного AAV («RCA»). Соответственно, кодирующие или промоторные последовательности для гер, сар или того и другого предпочтительно удалять, поскольку функции, обеспечиваемые этими генами, могут быть реализованы в транс.

Полученный в результате вектор в этих функциях называется «дефектным». Чтобы реплицировать и упаковать вектор, недостающие функции дополняют упаковывающим геном или их множеством, которые вместе кодируют необходимые функции для различных продуктов отсутствующих генов *тер* и/или *сар*. Упаковывающие гены или генные кассеты предпочтительно не фланкированы ITR AAV и предпочтительно не имеют какой-либо существенной гомологии с геномом гAAV. Таким образом, чтобы свести к минимуму гомологичную рекомбинацию во время репликации между векторной последовательностью и отдельно предоставленными упаковывающими генами, желательно избегать перекрытия двух полинуклеотидных последовательностей. Уровень гомологии и соответствующая частота рекомбинации увеличиваются с увеличением длины гомологичных последовательностей и уровня их общей идентичности. Уровень гомологии, который будет вызывать беспокойство в данной системе, может быть определен теоретически и подтвержден экспериментально, как известно в данной области техники. Однако обычно рекомбинация может быть существенно уменьшена или устранена, если перекрывающаяся последовательность составляет менее примерно 25 нуклеотидов, если она по меньшей мере на 80% идентична по всей своей длине, или менее примерно 50 нуклеотидных последовательностей, если она по меньшей мере на 70% идентична по всей длине. Конечно, предпочтительнее даже более низкие уровни гомологии, поскольку они еще больше уменьшают вероятность рекомбинации. Похоже, что даже без какой-либо перекрывающейся гомологии существует некоторая остаточная частота генерации RCA. Еще большее снижение частоты генерации RCA (например, за счет негомологичной рекомбинации) можно получить путем «разделения» функций репликации и инкапсулирования AAV, как описано Allen et al., WO 98/27204).

Векторная конструкция гAAV и конструкции комплементарного упаковывающего гена могут быть реализованы в настоящем описании в ряде различных форм. Вирусные частицы, плазмиды и стабильно трансформированные клетки-хозяева могут быть использованы для временного или стабильного введения таких конструкций в упаковывающую клетку.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения вектор AAV и комплементарный упаковывающий ген(-ы), если таковые имеются, представлены в форме бактериальных плазмид, частиц AAV или любой их комбинации. В других вариантах осуществления либо последовательность вектора AAV, либо упаковочный ген(-ы), либо оба они представлены в форме генетически измененных (предпочтительно наследственно измененных) эукариотических клеток. Развитие клеток-хозяев, наследственно измененных для экспрессии последовательности вектора AAV, упаковывающих генов AAV или того и другого, обеспечивает установленный источник материала, который экспрессируется на надежном уровне.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения можно использовать множество различных генетически измененных клеток. В качестве иллюстрации можно использовать клетку-хозяина млекопитающего по меньшей мере с одной интактной

копией стабильно интегрированного вектора rAAV. Упаковывающая плазида AAV, содержащая по меньшей мере ген гер AAV, функционально связанный с промотором, может быть использована для обеспечения функций репликации (как описано в патенте США № 5658776). Альтернативно для обеспечения функций репликации можно использовать стабильную линию клеток млекопитающих с геном гер AAV, функционально связанным с промотором (см., например, Trempe et al. (WO 95/13392); Burstein et al. (WO 98/23018). и Johnson et al. (патент США № 5656785)). Ген cap AAV, обеспечивающий белки инкапсулирования, как описано выше, может быть предоставлен вместе с геном гер AAV или отдельно (см., например, вышеупомянутые заявки и патенты, а также Allen et al. (WO 98/27204)). Возможны и другие комбинации, включенные в объем настоящего изобретения.

В данной области известны подходы к получению rAAV, например, rAAV, которые содержат капсидные белки AV.TL65. См., например, Excoffon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(10):3865-3870, 2009 и патент США № 10046016, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

Усиливающие средства

Любой из способов, раскрытых в настоящем документе, может включать введение субъекту средства, усиливающего трансдукцию AAV (также называемого «усиливающим средством»). В некоторых примерах усиливающее средство вводят субъекту после введения вектора rAAV, раскрытого в настоящем документе, например, в течение примерно 72 часов, примерно 48 часов, примерно 24 часов или примерно 12 часов. Например, описанные в данном документе rAAV можно использовать в комбинации со средствами, усиливающими трансдукцию AAV, для достижения значительного увеличения трансдукции и/или экспрессии трансгенов. Можно использовать любое подходящее усиливающее средство. Например, патент США № 7749491, который полностью включен в данный документ в качестве ссылки, описывает подходящие усиливающие средства. Усиливающее средство может представлять собой средство, модулирующее протеасомы. Усиливающим средством может быть антрациклин (например, доксорубин, идарубин, акларубин, даунорубин, эпирубин, валрубин или митоксантрон), ингибитор протеасом (например, бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб), трипептидилальдегид (например, N-ацетил-l-лейцил-l-лейцил-l-норлейцин (LLnL)) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления усиливающим средством является доксорубин, например, доксорубин-HCl. В других вариантах осуществления усиливающим средством является идарубин.

rAAV и усиливающее средство (средства) можно приводить в контакт с клеткой или вводить субъекту в одной и той же композиции или в разных композициях (например, фармацевтических композициях). Контакт или введение rAAV и усиливающего средства (средств) может быть последовательным (например, за rAAV следует усиливающее средство (средства) или наоборот) или одновременным.

Фармацевтические композиции

В настоящем описании представлены фармацевтические композиции для применения в раскрытых в данном документе способах, включая фармацевтические композиции, которые содержат любой из описанных в данном документе гAAV. Фармацевтический носитель может включать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ, разбавителей, буферов и т.п. Любая из фармацевтических композиций, описанных ниже, может быть использована в любом из раскрытых в данном документе способов.

Например, в одном аспекте изобретение предлагает фармацевтическую композицию, которая содержит гAAV, причем гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5 и промотор tg83, функционально связанный с минигеном CFTRΔR.

В другом аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую гAAV, для применения при лечении муковисцидоза у субъекта, нуждающегося в этом (например, МВ, связанного с мутацией класса I), причем гAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, и промотор tg83, функционально связанный с минигеном CFTRΔR.

В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AV.TL65 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% , 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления последовательность, характеризующаяся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичностью SEQ ID NO:13, содержит остаток треонина (T) в положении 581.

В некоторых вариантах осуществления энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:14 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1. В других вариантах осуществления энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:14.

В некоторых вариантах осуществления промотор tg83 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:2.

Можно использовать любой подходящий миниген CFTRΔR или его производное. В

некоторых вариантах осуществления миниген CFTRΔR представляет собой миниген CFTRΔR человека. В других вариантах осуществления миниген CFTRΔR представляет собой миниген CFTRΔR хорька. В некоторых вариантах осуществления миниген CFTRΔR человека кодируется полинуклеотидом, содержащим последовательность SEQ ID NO:4 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:4.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит в направлении от 5' к 3' энхансер F5, промотор tg83 и миниген CFTRΔR. В некоторых конкретных вариантах осуществления полинуклеотид содержит в направлении от 5'-к 3' 5'-ITR AAV (например, 5'-ITR AAV2), энхансер F5, промотор tg83, 5'-нетранслируемую область (UTR), миниген CFTRΔR, 3'-UTR, сайт полиаденилирования и 3'-ITR AAV (например, 3'-ITR AAV2).

В другом аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую rAAV, причем rAAV содержит любой из полинуклеотидов, описанных в настоящем документе, например, полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:7, 11 или 17 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:7, 11 или 17). Например, в настоящем документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая rAAV, причем rAAV содержит полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:17 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:17. В некоторых вариантах осуществления rAAV обладает тропизмом к эпителиальным клеткам дыхательных путей (например, эпителиальным клеткам легких). В некоторых вариантах осуществления rAAV содержит капсидный белок AV.TL65, капсидный белок AAV1, капсидный белок AAV2, капсидный белок AAV5, капсидный белок AAV6 или капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления rAAV содержит капсидный белок AV.TL65. В других некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:1, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит энхансер F5, содержащий последовательность SEQ ID NO:14, промотор tg83, содержащий последовательность SEQ ID NO:2, и/или миниген hCFTRΔR, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

В данном документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая одно или несколько усиливающих средств. Любое из усиливающих средств, раскрытых в настоящем документе (например, доксорубицин), может быть включен в фармацевтическую композицию.

Описанные в данном документе фармацевтические композиции могут содержать гAAV отдельно или гAAV в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Типичные дополнительные терапевтические средства включают, помимо прочего, антибиотик (например, азитромицин (ZITHROMAX®), амоксициллин и клавулановую кислоту (AUGMENTIN®), клоксациллин и диклокациллин, тикарциллин и клавулановую кислоту (TIMENTIN®), цефалексин, цефдинир, цефпрозил, цефаклор; сульфаметоксазол и триметоприм (BACTRIM®), эритромицин/сульфизоксазол, эритромицин, кларитромицин, тетрациклин, доксициклин, миноциклин, тигециклин, ванкомицин, имипенем, мерипенем, колистиметат/COLISTIN®, линезолид, ципрофлоксацин, левофлоксацин или их комбинацию), разжижитель слюны (например, гипертонический физиологический раствор или дорназа альфа (PULMOZYME®)), модулятор CFTR (например, ивакафтор (Kalydeco®), люмакафтор, люмакафтор/ивакафтор (Orkambi®), тезакафтор/ивакафтор (Symdeko®) или TRIKAFTA® (элексакафтор/ивакафтор/тезакафтор)), муколитик (например, ацетилцистеин, амброксол, бромгексин, карбоцистеин, эрдостеин, мецистеин и дорназа альфа), иммунодепрессант, физиологический раствор, гипертонический физиологический раствор или их комбинацию.

Например, фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут содержать один или несколько иммунодепрессантов. Можно использовать любой подходящий иммунодепрессант. Например, неограничивающие примеры иммунодепрессантов включают кортикостероиды (например, ингаляционный кортикостероид (например, беклометазон (QVAR®), будесонид (PULMICORT®), будесонид/формотерол (SYMBICORT®), циклесонид (ALVESCO®), флутиказон (FLOVENT HFA®), флутиказона пропионат (FLOVENT DISKUS®), флутиказона фуруат (ARNIVITY ELLIPTA®), флутиказона пропионат/салметерол (ADVAIR®), флутиказона фуруат/умеклидиний/вилантерол (TRELEGY ELLIPTA®), мометазона фуруат (ASMANEX®) или мометазон/формотерол (DULERA®), предизон или метилпреднизолон), поликлональные антилимфоцитарные антитела (например, антитела против лимфоцитарного глобулина (ALG) и антитела против тимоцитарного глобулина (ATG), которые могут быть получены, например, от лошади или кролика), моноклональные антилимфоцитарные антитела (например, антитела против CD3 (например, мурмомаб и алемтузумаб) или антитела против CD20 (например, ритуксимаб)), антагонисты рецепторов интерлейкина-2 (IL-2) (например, даклизумаб и базиликсимаб), ингибиторы кальциневрина (например, циклоспорин А и такролимус), ингибиторы клеточного цикла (например, азатиоприн, микофенолат мофетил (MMF) и микофеноловая кислота (MPA)), ингибиторы мишени млекопитающих рапамицина (mTOR) (например, сиролимус (рапамицин) и эверолимус), метотрексат, циклофосфамид, антрациклин (например, доксорубицин, идарубицин, акларубицин, даунорубицин, эпирубицин, валрубицин, митоксантрон или их комбинация), таксан (например, TAXOL® (паклитаксел)) и их комбинацию (например, комбинацию ингибитора кальциневрина,

ингибитора клеточного цикла и кортикостероида).

В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут включать один или несколько кортикостероидов (например, ингаляционный кортикостероид (например, беклометазон (QVAR®), будесонид (PULMICORT®), будесонид/формотерол (SYMBICORT®), циклесонид (ALVESCO®), флутиказон (FLOVENT HFA®), флутиказона пропионат (FLOVENT DISKUS®), флутиказона фуруат (ARNUITY ELLIPTA®), флутиказона пропионат/салметерол (ADVAIR®), флутиказона фуруат/умеклидиний/вилантерол (TRELEGY ELLIPTA®), мометазона фуруат (ASMANEX®) или мометазон/формотерол (DULERA®), предизон или метилпреднизолон). В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой ингаляционный кортикостероид.

Иммунодепрессант (например, любой иммунодепрессант, описанный в настоящем документе) можно вводить путем ингаляции или системно (например, внутривенно или подкожно).

Обычно вирусные векторы находятся в фармацевтически подходящем апирогенном буфере, таком как сбалансированный солевой раствор Рингера (pH 7,4). Хотя это и не обязательно, фармацевтические композиции необязательно могут поставляться в стандартной дозированной форме, подходящей для введения точного количества. Фармацевтические композиции обычно стерильны.

Наборы и изделия

В данном документе представлены наборы и изделия, которые можно использовать для реализации раскрытых в данном документе способов. Например, набор или изделие может включать один или несколько гAAV (например, AV.TL65-SP183-hCFTRΔR), усиливающее средство (например, доксорубин) и инструкции по введению гAAV и/или усиливающего средства субъекту, имеющему MB, в соответствии с любым из способов, раскрытых в настоящем документе.

В одном аспекте изобретение предусматривает набор для лечения MB у субъекта, генотип которого содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I, причем набор содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV), содержащий (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

Субъект может иметь любую мутацию CFTR класса I. В некоторых примерах по меньшей мере одна мутация CFTR класса I представляет собой нонсенс-мутацию, мутацию сплайсинга или делецию. В некоторых примерах по меньшей мере одна мутация CFTR класса I включает мутацию Q2X, мутацию S4X, мутацию W19X, мутацию G27X, мутацию Q39X, мутацию W57X, мутацию E60X, мутацию R75X, мутацию L88X, мутацию E92X, мутацию Q98X, мутацию Y122X, мутацию E193X, мутацию W216X, мутацию L218X, мутацию Q220X, мутацию Y275X, мутацию C276X, мутацию Q290X, мутацию G330X, мутацию W401X, мутацию Q414X, мутацию S434X, мутацию S466X, мутацию

S489X, мутацию Q493X, мутацию W496X, мутацию C524X, мутацию Q525X, мутацию G542X, мутацию G550X, мутацию Q552X, мутацию R553X, мутацию E585X, мутацию G673X, мутацию Q685X, мутацию R709X, мутацию K710X, мутацию Q715X, мутацию L732X, мутацию R764X, мутацию R785X, мутацию R792X, мутацию E822X, мутацию W882X, мутацию W846X, мутацию Y849X, мутацию R851X, мутацию Q890X, мутацию S912X, мутацию Y913X, мутацию Q1042X, мутацию W1089X, мутацию Y1092X, мутацию W1098X, мутацию R1102X, мутацию E1104X, мутацию W1145X, мутацию R1158X, мутацию R1162X, мутацию S1196X, мутацию W1204X, мутацию L1254X, мутацию S1255X, мутацию W1282X, мутацию Q1313X, мутацию Q1330X, мутацию E1371X, мутацию Q1382X, мутацию Q1411X, мутацию 2116delCTAA или их комбинацию. В некоторых примерах по меньшей мере одна мутация CFTR класса I включает мутацию G542X, мутацию W1282X, мутацию R1162X, мутацию R553X или их комбинацию. В данной области известны и другие мутации CFTR класса I.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса I. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса I. В качестве одного неограничивающего примера можно отметить, что в некоторых случаях генотип субъекта содержит мутацию W1282X и мутацию R1162X.

В одном аспекте изобретение предусматривает набор для лечения МВ у субъекта, генотип которого содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II, причем набор содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает набор для лечения МВ у субъекта, генотип которого содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, причем набор содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

Генотип субъекта может содержать любую мутацию CFTR класса III. Типичные мутации CFTR класса III включают, например, G551D и S549N.

В некоторых примерах генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса III. Генотип субъекта может содержать любую комбинацию мутаций CFTR класса III, включая любую комбинацию мутаций CFTR класса III, указанных выше.

В одном аспекте изобретение предусматривает набор для лечения МВ у субъекта, генотип которого содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV, причем набор содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает набор для лечения МВ у субъекта, генотип которого содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V, причем набор содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает набор для лечения МВ у субъекта, генотип которого содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI, причем набор содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В одном аспекте изобретение предусматривает набор для лечения МВ у субъекта, генотип которого содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII, причем набор содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

В некоторых примерах набор дополнительно содержит средство, усиливающее трансдукцию AAV, например, любое усиливающее средство, описанное в настоящем документе.

В некоторых примерах набор включает инструкции по введению усиливающего средства субъекту в течение примерно 72 часов (например, в течение примерно 48 часов, примерно 24 часов или примерно 12 часов) после введения rAAV.

В другом аспекте изобретение предусматривает набор для лечения МВ у субъекта, причем набор содержит: rAAV, содержащий (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5 или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом; и инструкции по введению субъекту средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение примерно 72 часов после введения rAAV.

ПРИМЕРЫ

Изобретение будет более полно понято с помощью ссылки на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и сферу применения этой заявки и объема прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Доставка SP-101 восстанавливает функцию CFTR в эпителиальных культурах дыхательных путей человека при МВ, в том числе из генотипов класса I,

и стимулирует экспрессию транскена *hCFTRΔR* в дыхательных путях хорьков с МВ.

SP-101 (AV.TL65-SP183-hCFTRΔR) представляет собой новый вектор для генной терапии рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), который можно вводить путем ингаляции людям с муковисцидозом (МВ), которым не помогает лечение низкомолекулярными модуляторами. Эта популяция составляет ~20% всех людей с МВ. Например, пациенты с генотипами класса I, в результате которых не вырабатывается функциональный белок CFTR, не получают пользы от корректоров, таких как люмакафтор или тезакафтор.

SP-101 содержит капсидный белок AV.TL65, который оптимизирован для эффективной апикальной трансдукции эпителиальных культур дыхательных путей (НАЕ) человека, и синтетическую энхансерную последовательность промотора (SP-183 или F5tg83), управляющую экспрессией минигена CFTR человека (hCFTRΔR), который функционально эквивалентен полноразмерному CFTR.

При доставке на апикальную поверхность культур МВ НАЕ различных генотипов класса I или II SP-101 восстанавливал форсколин-индуцированную CFTR-опосредованную проводимость хлоридов до тех же уровней, которые наблюдались при лечении модулятором. Проводимость хлоридов увеличивалась с увеличением множественности инфекции и значительно усиливалась при одновременном применении небольшой молекулы доксорубина.

Тропизм капсида AV.TL65 для эпителиальных культур дыхательных путей хорьков был продемонстрирован с помощью репортера (AAV2.5T-CBA_mCherry-SP183gLuc), и у хорьков с МВ развивается спонтанное заболевание легких, напоминающее многие признаки МВ. Чтобы исследовать потенциал SP-101 по стимулированию экспрессии *hCFTRΔR* в дыхательных путях, SP-101 вводили хорькам дикого типа и МВ посредством ингаляции только через нос с использованием распылителя, прикрепленного к системе воздействия на пленум, с последующим распылением доксорубина в течение 24 ч. Экспрессию мРНК *hCFTRΔR* определяли с помощью RT-qPCR, оптимизированной для удаления ДНК вирусного генома и нормализованной по общей РНК. Удивительно, что устойчивая экспрессия *hCFTRΔR* наблюдалась в дыхательных путях хорьков как дикого типа, так и хорьков с МВ. Уровни экспрессии *hCFTRΔR* увеличивались с увеличением доз SP-101/доксорубина и были самыми высокими в тканях легких. Экспрессия была очевидна уже через 48 часов после воздействия и продолжалась по меньшей мере 12 недель (последний исследованный момент времени). Важно отметить, что сопоставимая экспрессия мРНК *hCFTRΔR* была очевидна в дыхательных путях хорьков с МВ, что указывает на успешную трансдукцию в дыхательных путях, несмотря на ранее существовавшее накопление слизи.

С учетом этих данных ожидается, что SP-101 будет эффективен для лечения пациентов с МВ, включая пациентов с МВ с генотипами класса I, которым не помогают доступные в настоящее время способы лечения МВ.

Пример 2. Динамика влияния добавления доксорубина на трансдукцию

репортерным вектором (AV.TL65-CBA-mCherry-SP183) в первичном эпителии дыхательных путей человека

В этом исследовании период действия, связанный с усилением трансдукции AAV доксорубицином, был изучен с использованием репортерной вирусной конструкции AV.TL65-CBA-mCherry-SP183. Экспериментальная модель представляла собой анализ *in vitro*, основанный на поляризованной границе раздела воздух-жидкость (ALI) эпителия дыхательных путей человека (NAE).

Репортерная конструкция рекомбинантного AAV (rAAV) AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 включает тот же капсид, что и SP-101 (AV.TL65), который является высокотропным по отношению к апикальной стороне эпителия дыхательных путей человека, стороне, обращенной к просвету дыхательных путей. Кроме того, эта репортерная конструкция rAAV использует промотор F5tg83 для управления экспрессией люциферазы Gaussia; F5tg83 (также называемый SP183) представляет собой тот же промотор, который управляет экспрессией трансгена hCFTR Δ R человека в SP-101.

На основании общих характеристик, изложенных выше, репортер rAAV AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 можно считать заменителем трансдукции SP-101 для механистических исследований *in vitro*.

Эффективность трансдукции с помощью AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 исследовали в анализе *in vitro*, который измеряет функциональную люциферазу, секретируемую в культуральную среду поляризованных культур эпителиальных клеток дыхательных путей человека. Были изучены различные моменты времени посттрансдукционного лечения усиливающим средством доксорубицином, чтобы определить оптимизированные сроки лечения для усиления трансдукции AAV. Двухчасовая обработка доксорубицином в различные моменты времени в течение 40 часов после трансдукции привела к аналогичной эффективности, установив временной интервал для оптимальной эффективности трансдукции, обусловленной усиливающим средством доксорубицином в исследованиях этого типа. Тенденция к несколько более низкому сигналу люциферазы наблюдалась при введении доксорубицина >40 часов после AAV.

Методы и материалы

Схема исследования

Целью данного исследования было определить оптимизированный временной интервал лечения усиливающим средством доксорубицином для усиления трансдукционной активности репортера AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 в поляризованном NAE. Конечной точкой оценки эффективности трансдукции с помощью репортерного AAV был уровень активности люциферазы, обнаруженный в кондиционированной среде трансдуцированных клеток, обработанных доксорубицином в течение 2 часов в различные моменты времени после воздействия AAV. Эффект лечения доксорубицином исследовали в различные моменты времени от 2 до 88 часов после воздействия AAV в серии независимых экспериментов. Активность люциферазы определяли через 2, 4, 6 или 8 дней

после трансдукции (DAT) в различных исследованиях, обобщенных в этом примере.

Выработка rAAV

Целостность вируса проверяли с использованием методов, описанных ранее (Yan et al. J. Virol. 78:2863-2874, 2004; Yan et al. Hum. Gene Ther. 26:334-346, 2015). Вкратце, плазмиду получали с использованием штамма *Escherichia coli* SURE (Stratagene) и выделяли с использованием набора для выделения плазмиды, не содержащей эндотоксинов. Рекомбинантный AAV получали путем совместной трансфекции клеток эмбриональной почки человека 293 тремя плазмидами и очищали с помощью двух раундов ультрацентрифугирования CsCl. Количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией TaqMan® использовали для количественного определения физического титра (устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) очищенных исходных вирусов, как описано в Ding et al. Mol. Ther. 13:671-682, 2006.

Клеточная культура и условия для трансдукций и инфекций

Поляризованные первичные клетки НАЕ получали от доноров легких и трансплантированной ткани дыхательных путей, как описано, например, у Kapr et al. Methods Mol. Biol. 188:115-137, 2002. Клетки НАЕ выращивали в трансвеллах диаметром 6,5 мм с порами диаметром 0,4 мкм (Corning) в среде, содержащей USG. По оценкам, все культуры содержали примерно $\sim 7,5 \times 10^5$ клеток во время репортерной трансдукции AAV.

НАЕ, не связанный с МВ (код донора: В-7-19, В-13-19, В-15-19, В-16-19), и НАЕ, связанный с МВ (код донора: СВ-32-18, СВФ-4-19), с генотипом F508del/F508del использовали в этом исследовании.

Клетки трансдуцировали репортером AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 при множественности заражения (МОI; соотношение геномов вирусных векторов (vg) к клеткам) примерно 6600 и инкубировали в течение 4 или 16 часов, после чего избыток жидкости удаляли с апикальной поверхности. Репортер rAAV разводили в среде USG. Доксорубин в концентрации 5 мкМ (эквивалент 2,9 мкг/мл) применялся в течение 2 часов в разное время после воздействия AAV, как показано в таблице 1 и представлено на схемах, показанных на фиг. 1-3. Для контрольных условий «без AAV» (т.е. без лечения) и «только AAV» на каждое условие использовали 2 трансвелла (N=2). При других вариантах лечения (т.е. «AAV плюс доксорубин») анализировали по меньшей мере 4 трансвелла (N=4) на каждое состояние.

Таблица 1. Краткое изложение экспериментальных парадигм: продолжительность инкубации AAV с указанием момента начала 2-часового лечения доксорубином, добавления после AAV.

Фигура	Парадигма исследования	Длина воздействия AV.TL65-CBA-mCherry-SP183	Момент времени после воздействия AAV 2-часовой обработки	Тип клетки	Активность люциферазы определяют при

			доксорубицином		
1	Короткий курс лечения доксорубицином	4 часа	2, 4, 6 и 22 часа после воздействия	Не связанный с МВ и связанный с МВ	2 и 4 дня после трансдукции (DAT)
2	Средний курс лечения доксорубицином	16 часов	14, 16, 18 и 22 часа после воздействия	Не связанный с МВ	2 DAT
3	Продолжитель ный курс лечения доксорубицином	16 часов	16, 40 и 88 часов после воздействия	Не связанный с МВ	4, 6 и 8 DAT

Во всех случаях репортер AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 добавляли апикально к клеткам НАЕ в объеме 50 мкл и инкубировали в течение 4 или 16 часов, а затем удаляли аспирацией. Затем в базальную камеру добавляли доксорубицин (5 мкМ) в различные моменты времени после воздействия AAV (см. обобщенную информацию в таблице 1 и схемы на фиг. 1-3). Во всех случаях обработка доксорубицином продолжалась 2 часа. В указанные моменты времени все растворы в нижних камерах удаляли и в нижнюю камеру каждой трансвелл добавляли свежую среду USG без доксорубицина. В указанные моменты времени (т. е. через 2, 4, 6 или 8 дней после трансдукции, DAT) образец объемом 200 мкл отбирали из базальной камеры каждого трансвелла и использовали для определения активности люциферазы, как описано ниже. В каждый из этих моментов времени также осуществляли полную замену среды.

Измерение активности люциферазы

На 2-й, 4-й, 6-й и/или 8-й день после трансдукции (DAT) активность люциферазы измеряли путем взятия 50-мкл аликвоты из 200-мкл образца кондиционированной среды, собранного из базального компартмента трансвеллов. Эту аликвоту объемом 50 мкл смешивали с 10 мкл смеси субстрат/буфер (номер набора в каталоге E2810, Promega Corporation, Мэдисон, Висконсин), как указано производителем (Техническое руководство системы анализа люциферазы Promega). Люминесценцию измеряли на люминометре Promega GloMax™ 20/20, следуя инструкциям производителя.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с помощью GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, Калифорния). Активность люциферазы сравнивали между группами лечения (воздействие AAV, AAV плюс доксорубицин) и контрольными необработанными клетками (без AAV, без доксорубицина) с использованием

двустороннего непарного Т-критерия. Во втором анализе сравнивали группы, получавшие AAV+доксорубин, с группами, получавшими только AAV. Различия между группами считались значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты

Для определения влияния времени добавления доксорубина после обработки AAV клеток НАЕ, исследования были проведены с использованием AV.TL65-CBA-mCherry-SP183, репортерной конструкции AAV с тем же капсидом, что и SP-101, но несущей люциферазу *Gaussia* в качестве репортера под контролем того же промотора, который управляет экспрессией hCFTRΔR в SP-101. Рабочая концентрация усиливающего средства доксорубина (5 мкМ) была идентифицирована на основании нетоксических ответов в клетках НАЕ (а именно >200-кратное увеличение кратности трансдукции и <50% увеличение по сравнению с исходным уровнем высвобождения LDH).

Комбинация трансдукции AAV и обработки усиливающим средством была исследована в трех экспериментальных парадигмах на клетках, не связанных с МВ и/или МВ, для установления оптимизированного окна лечения доксорубином, как это обобщено в параграфе ниже и в таблице 1 и дополнительно проиллюстрировано схемами, показанными на фиг. 1А, 2А и 3А. В целом в этих экспериментах изучался эффект двухчасовой обработки доксорубином в период от 2 до 88 часов после воздействия AAV.

На фиг. 1А и 1В краткосрочное исследование было основано на воздействии на культуры НАЕ AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 в течение 4 часов (MOI ~ 6600 мкг/клетка, апикальная сторона) с 2-часовой обработкой доксорубином (5 мкМ, добавленных в среду на базальной стороне) в моменты времени 2, 4, 6 и 22 часа после добавления AAV. Этот эксперимент проводился как в здоровом НАЕ (не связанном с МВ), так и в НАЕ, связанном с МВ. Активность люциферазы определяли через 2 и 4 дня после трансдукции (DAT). Как для культур НАЕ, не связанных с МВ, так и для связанных с МВ, воздействие доксорубина в каждый указанный момент времени обычно приводило к значительно более высокому сигналу люциферазы, чем в контрольных культурах без AAV (фиг. 1В) и в условиях только AAV для каждого типа клеток НАЕ. В целом результаты показывают, что двухчасовое лечение доксорубином в течение этого периода времени существенно не изменило выработку сигнала люциферазы в этих условиях ни в здоровых клетках, не связанных с МВ, ни в клетках, связанных с МВ.

На фиг. 2А и 2В исследование промежуточного периода времени было основано на воздействии на культуры НАЕ AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 в течение 16 часов (MOI ~ 6600 мкг/клетка, апикальная сторона) с последующей 2-часовой обработкой доксорубином (5 мкМ, добавлено в среду на базальной стороне) в моменты времени 14, 16, 18 и 22 часа после добавления AAV. Этот эксперимент проводили в здоровом НАЕ (не связанном с МВ), и активность люциферазы определяли через 2 DAT. Подобно эксперименту с краткосрочным курсом лечения доксорубином обычно приводило к значительно более высокому сигналу люциферазы во всех культурах по сравнению с

контролем без AAV (фиг. 2B) и условиями только с AAV. Кроме того, результаты показывают, что момент времени 2-часовой обработки доксорубицином в течение периода времени от 14 до 22 часов (добавление после AAV) не оказал существенного влияния на выработку сигнала люциферазы в этом эксперименте. Кроме того, обработка доксорубицином через 22 часа привела к появлению сигнала люциферазы, согласующегося с результатами, наблюдавшимися в предыдущем эксперименте для этого конкретного момента времени (см. фиг. 1A и 1B).

На фиг. 3A и 3B исследование продолжительного периода времени было основано на воздействии на культуры HAE AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 в течение 16 часов (MOI ~ 6600 мкг/клетка, апикальная сторона) с последующей 2-часовой обработкой доксорубицином (5 мкМ, добавлено в среду на базальной стороне) в моменты времени 16, 40 и 88 часов после добавления AAV. Этот эксперимент проводили в здоровом HAE (не связанном с MB), и активность люциферазы определяли через 4, 6, 8 DAT. Результаты этого набора данных показывают, что лечение доксорубицином обычно приводило к значительно более высокому сигналу люциферазы по сравнению с контролем, не содержащим AAV (фиг. 3B), и контролем, содержащим только AAV.

Добавление доксорубицина к среде на базальной стороне в течение 2 часов сразу после 16-часовой инкубации с AAV приводило к экспрессии люциферазы на DAT 4, сравнимой с той, которая наблюдалась при предыдущем 4-часовом воздействии AAV на DAT 2 (промежуточный временной ход, фиг. 2A и 2B). Кроме того, уровень экспрессии люциферазы, наблюдаемый при «16-часовом воздействии AAV с последующим 2-часовым воздействием доксорубицина» на DAT 4, сравним с уровнями экспрессии, наблюдаемыми в каждой из культур AAV+доксорубицин, оцененных в эксперименте с кратковременным курсом, как на DAT 2, так и на DAT 4 (фиг. 1A и 1B). Увеличение временного интервала между воздействием AAV и введением доксорубицина до 40 или 88 часов по-прежнему приводило к значительным уровням экспрессии люциферазы по сравнению с культурой, содержащей только AAV, хотя общая тенденция к небольшому снижению уровней экспрессии люциферазы наблюдалась с увеличением временного интервала. Наконец, общий характер сигнала люциферазы относительно моментов времени наблюдения (DAT 4, 6 и 8) оставался постоянным в этом расширенном эксперименте, при этом уровни экспрессии люциферазы оставались постоянными для каждого данного условия культивирования в течение 4-дневного окна измерения.

Таким образом, в экспериментах, описанных в этом примере и показанных на фиг. 1-3, эффективность трансдукции репортерным AAV обычно значительно повышалась при обработке эпителиальных клеток дыхательных путей усиливающим средством доксорубицином.

Выводы

Воздействие как здорового HAE (не связанного с MB), так и на HAE, связанного с MB, на рекомбинантный репортер AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 при MOI 6600 приводит к заметному сигналу люциферазы, который можно измерить в базальных

кондиционированных средах из этих дифференцированных и поляризованных культуры эпителиальных клеток дыхательных путей. Кроме того, данные показывают, что эффективность трансдукции, как правило, значительно повышалась при обработке этих культур НАЕ 2-часовым воздействием усиливающего средства доксорубицина (5 мкМ) по сравнению с контрольными необработанными клетками и клетками, обработанными только AAV, во всех экспериментах.

Кроме того, в экспериментальных условиях, использованных в этих исследованиях, усиливающее средство доксорубицин можно вводить в клетки НАЕ в течение по меньшей мере 40 часов после обработки AAV без существенного изменения уровней трансдукции, наблюдаемых по сравнению с более ранними моментами времени.

Репортер AV.TL65-CBA-mCherry-SP183 является отличным заменителем SP-101 (AAV2.5T-SP183-hCFTRΔR) на основе общих характеристик, а именно капсида AV.TL65 и промотора F5tg83/SP183, который управляет экспрессией трансгенной люциферазы Gaussia и CFTRΔR человека соответственно. На основе этих характеристик представленные в данном документе данные показывают, что доксорубицин можно назначать после воздействия AAV в разное время в течение по меньшей мере 40-часового окна без значительной потери активности. В целом данные, представленные в этом примере, устанавливают временной интервал для усиления эффектов трансдукции при лечении низкомолекулярным усиливающим средством доксорубицином.

Пример 3. Дополнительные данные для исследований, описанных в примере 1.

В этом примере представлены дополнительные данные и результаты, относящиеся к исследованиям, описанным в примере 1.

Исследование НАЕ, связанного с МВ

Как описано в примере 1, SP-101 (AV.TL65-SP183-hCFTRΔR) был тропным к НАЕ, связанному с МВ, и корректировал его. На фиг. 4 показано, что апикальный SP-101 продемонстрировал дозозависимую функциональную коррекцию первичного НАЕ МВ. В отличие от модуляторов CFTR VX-770/661/445, которые не восстанавливали функцию у доноров с мутациями I класса (W1282X/R1162X), обработка SP-101 (MOI 1K, 10K, 100K) + доксорубицин (5 мкМ) значительно повышала токи дозозависимым образом до уровней, аналогичных НАЕ МВ. На фиг. 5 показано, что капсидный репортер SP-101, кодирующий mCherry, трансдуцирует многие типы эпителиальных клеток при НАЕ МВ (F508del/F508del). Репортер SP-101 (mCherry, желтый) показал > 30% положительных клеток, которые совместно локализовались с маркерами мерцательных (α-тубулин, белый) или секреторных клеток (MUC5AC, бирюзовый) или совместно не локализовались с маркерами каких-либо типов клеток (немерцательные или базально-ориентированные клетки).

Исследование на хорьках

Как также описано в примере 1, хорьков можно использовать в качестве модели для оценки вдыхаемого SP-101. AV.TL65 является тропным к клеткам дыхательных путей

хорька, а модель хорька с МВ воспроизводит патологию легких человека при МВ. Кроме того, SP-101 можно вводить хорькам ингаляционно.

Дополнительные материалы и методы исследования хорьков

Хорьков, не страдающих МВ и с МВ, подвергали распылению SP-101 или плацебо с последующим введением доксорубина или плацебо в день 1. Животных вскрывали через 2 или 12 недель после воздействия и собирали ткани для гибридизации *in situ* (ISH) или определения количества копий мРНК hCFTRΔR. Хорьки с МВ имеют аллель G551D, который соответствует мутации класса III.

ISH: Срезы фиксированного формалином и залитого в парафин легкого оценивали с помощью анализа RNAScore™ ISH с использованием zz-зондов, предназначенных для обнаружения уникальных областей смысловой цепи векторного генома SP-101.

Копии мРНК hCFTRΔR: РНК выделяли с использованием процедуры ДНКазы для обеспечения удаления векторных геномов из образцов массой 25-50 мг, взятых из 9 различных участков дыхательных путей (3 из трахеи, 4 из бронхов, 2 из альвеолярных/долевых областей). qPCR +/- обратная транскриптаза выполнялась с

праймерами и зондом для уникального участка мРНК hCFTRΔR. В отсутствие обратной транскриптазы сигнала не наблюдалось, что указывает на полное удаление векторных геномов. Данные показаны в виде размаха диаграммы вокруг медианного значения (количество копий hCFTRΔR, нормализованное до 500 нг общей РНК)..

Дополнительные результаты исследования хорьков

Как описано в примере 1, экспрессия мРНК hCFTRΔR усиливалась под действием доксорубина и оставалась продолжительной. На фиг. 6 показано, что векторные геномы SP-101 были в избытке во многих областях легких хорьков без МВ. Векторные геномы SP-101 (красные точки) были обнаружены во многих клетках, тогда как предварительная обработка ДНКазой не показала окрашивания, что указывает на специфичность окрашивания. Кроме того, на фиг. 7 показано, что экспрессия мРНК hCFTRΔR увеличивалась более чем в 10 раз при введении доксорубина и сохранялась в легких хорьков, не страдающих МВ (фиг. 8). В отличие от контрольных образцов мРНК hCFTRΔR была обнаружена в большинстве образцов от животных, подвергшихся воздействию только SP-101. Однако мРНК hCFTRΔR была > в 10 раз выше в образцах от животных, подвергшихся воздействию того же количества SP-101, а затем доксорубина ($p < 0,0001$). Более того, мРНК hCFTRΔR существенно не снижалась через 12 недель (конец исследования) после введения, что указывает на устойчивую экспрессию (фиг. 8). Кроме того, экспрессия мРНК hCFTRΔR увеличивалась с увеличением доз SP-101/доксорубина и была самой высокой в тканях легких.

Кроме того, как также описано в примере 1, легкие хорька с МВ были пермиссивными

для SP-101. Экспрессия мРНК hCFTRΔR была сходной в легких хорьков с МВ и без МВ (фиг. 9). В отличие от контрольных животных (только разбавитель), мРНК hCFTRΔR обнаруживалась в одинаковой степени как у животных с МВ (G551D), так и у

животных без МВ, что указывает на то, что легкие при МВ не являются дополнительным барьером для SP-101.

Обобщенные результаты

Как описано в примере 1, SP-101 функционально корректировал НАЕ, связанный с МВ. SP-101 был тропен ко многим типам эпителия человека. Экспрессия hCFTRΔR и коррекция МВ были дозозависимыми и продолжительными. Кроме того, экспрессия мРНК hCFTRΔR была сходной у хорьков с МВ и без МВ, что указывает на то, что дыхательные пути с МВ не являются дополнительным барьером для SP-101.

Пример 4. Экспрессия hCFTRΔR и коррекция эпителия дыхательных путей человека при МВ коррелируют с множественностью заражения SP-101 и дозой доксорубицина

Обобщенные результаты

SP-101 (AAV2.5T-SP183-hCFTRΔR) можно использовать в качестве ингаляционного лечения для людей с муковисцидозом (МВ) независимо от мутаций. Мы обнаружили, что совместное введение низкомолекулярного энхансера доксорубицина важно для надежной экспрессии трансгена. Как описано выше, при апикальной инокуляции НАЕ МВ около 30-40% клеток, включая мерцательные, секреторные и базальные клетки, были трансдуцированы с использованием репортера AAV2.5T-mCherry в присутствии доксорубицина. Взаимосвязь «доза-реакция» для SP-101 и доксорубицина была дополнительно исследована при апикально трансдуцированной МВ НАЕ на 7-й день после трансдукции. Форсколин-индуцированная проводимость хлоридов CFTR, измеренная с помощью анализа камеры Уссинга, увеличивалась с увеличением множественности заражения SP-101 (MOI) в присутствии доксорубицина и коррелировала с увеличением числа копий вектора (VCN, измеренного с помощью цифровой капельной ПЦР (ddPCR)) и экспрессии мРНК hCFTRΔR (измеренная с помощью RT-qPCR). Доксорубицин также продемонстрировал дозозависимое увеличение опосредованной SP-101 экспрессии мРНК hCFTRΔR и проводимости хлоридов. Даже низкие концентрации обработки доксорубицином смогли частично восстановить CFTR-опосредованную проводимость хлоридов с низкой MOI SP-101. Однако, несмотря на значительное влияние на мРНК hCFTRΔR и проводимость хлоридов, доза доксорубицина существенно не изменила VCN. Эти данные также указывают на то, что режимы дозирования с более высокими дозами SP-101 и более низкими дозами доксорубицина могут быть эквивалентны режимам дозирования с более низкими дозами SP-101 и более высокими дозами доксорубицина.

Материалы и методы

В этом примере описаны данные от 2 доноров-человек с мутациями CFTR класса I (W1282X/R1162X). Клеткам позволяли поляризоваться и дифференцироваться в эпителий. Эпителий трансдуцировали с апикальной стороны с помощью SP-101 +/- доксорубицин. Количество SP-101 и/или доксорубицина варьировали.

Донор 1 (фиг. 10-12) демонстрирует влияние уровня обработки доксорубицином (0

мкМ, 0,5 мкМ и 5 мкМ) на число копий вектора SP-101, уровни мРНК и функциональную коррекцию с помощью анализа камеры Уссинга в НАЕ, связанном с МВ, с мутациями класса I. SP-101 тестировали при MOI 0, 5e3 и векторных геномах 1e5/клетка. SP-101 добавляли к апикальной стороне, а доксорубицин добавляли к базальной стороне, все они растворялись в среде UNC с интерфейсом воздух-жидкость (ALI) (см., например, Fulcher et al. *Methods Mol. Biol.* 945:109-121, 2013). SP-101 и доксорубицин добавляли одновременно и инкубировали в течение 16 часов перед отмыванием. Первичными клетками были KKD0300 (W1282X/R1162X).

Донор 2 (фиг. 13 и 14) демонстрирует функциональную коррекцию/ответ на основе дозозависимого ответа MOI SP-101 при 1 мкМ доксорубицина. SP-101 добавляли к апикальной стороне, а доксорубицин добавляли к базальной стороне, все растворяли в среде UNC ALI. SP-101 и доксорубицин инкубировали одновременно и инкубировали в течение 16 часов перед отмыванием. Первичными клетками были KKD0290 (W1282X/R1162X).

Донор 2 (фиг. 15) демонстрирует влияние более низких доз обработки доксорубицином на MOI SP-101 и коррекцию функции.

Результаты

На фиг. 10 показано, что низкий уровень доксорубицина был достаточен для повышения способности SP-101 демонстрировать функциональную активность при НАЕ МВ класса I по данным анализа камеры Уссинга. Более того, ответ на обработку доксорубицином наблюдался для низкой и высокой MOI SP-101. Эти данные указывают на то, что токи Уссинга увеличиваются с увеличением MOI SP-101 и концентрации доксорубицина. Не было значительной разницы между более высокой MOI (1e5) с более низким уровнем доксорубицина (0,5 мкМ) и более низкой MOI (5e3) с более высоким уровнем доксорубицина (5 мкМ), что указывает на то, что и MOI, и доксорубицин взаимодействуют друг с другом, обеспечивая сходный функциональный результат *in vitro*.

На фиг. 11 показано, что VCN коррелирует с MOI SP-101, но не с концентрациями доксорубицина ниже 5 мкМ.

На фиг. 12 показано, что мРНК hCFTRΔR положительно коррелирует с MOI SP-101 и уровнем обработки доксорубицином.

На фиг. 13 показано, что у этого донора наблюдался дозозависимый ответ MOI SP-101 при 1 мкМ доксорубицина. Низкая MOI SP-101 (5e2 MOI) + 1 мкМ доксорубицина продемонстрировали активность CFTR, аналогичную активности НАЕ, не связанного с МВ. Лечение модулятором Vertex не улучшило ток CFTR. Эти данные показывают, что токи Уссинга увеличивались с увеличением MOI SP-101 при концентрации доксорубицина 1 мкМ.

На фиг. 14 показано, что все дозы AAV выше 5e2 MOI стимулировали ток Уссинга значительно сильнее, чем НАЕ, не связанный с МВ. На фиг. 14 показаны те же данные, что и на фиг. 13, с использованием другого статистического подхода. В частности, Т-критерий использовался для сравнения НАЕ, не связанного с МВ, и SP-101+1 мкМ

доксорубицина. MOI 5e2 была аналогична НАЕ, не связанному с МВ, в то время как все остальные MOI имели значительно более высокий ток короткого замыкания, связанный с CFTR.

На фиг. 15 показано, что у этого донора наблюдался дозозависимый ответ на доксорубицин и дозозависимый ответ на MOI SP-101. При $1e5$ MOI низкий уровень доксорубицина (0,1 мкМ) был достаточным, чтобы привести к увеличению активности CFTR по Уссингу по сравнению с отсутствием (0 мкМ) доксорубицина. MOI 5e3+0,5 мкМ доксорубицина были аналогичны НАЕ, не связанному с МВ, как показано на фиг. 13 и 14. Эти данные показывают, что на каждом уровне лечения SP-101 токи Уссинга увеличивались с увеличением концентрации доксорубицина. По сравнению с предыдущими показателями для этого донора (фиг. 13 и 14), MOI 5e2+1 мкМ докс. были аналогичны MOI 5e3+0,5 мкМ докс., которые были аналогичны НАЕ, не связанному с МВ, что указывает на то, что MOI SP-101 и уровень обработки доксорубицином могут взаимодействовать друг с другом для получения одинаковых или эквивалентных функциональных результатов CFTR *in vitro*.

Пример 5. Дополнительные результаты исследований, описанные в примере 4

В этом примере представлены дополнительные данные и результаты, относящиеся к исследованиям, описанным в примере 4. В частности, эти результаты демонстрируют, что совместное введение SP-101 с доксорубицином восстанавливало форсколин-индуцированную CFTR-опосредованную проводимость хлоридов в культурах НАЕ, связанного с МВ, с мутациями класса I, класса II и класса III.

Дополнительные методы

SP-101 наносили на апикальные поверхности МВ-НАЕ, культивированных на границе раздела воздух-жидкость с добавлением доксорубицина в базальную среду или без него. Форсколин-индуцированная проводимость хлоридов CFTR, измеренная с помощью анализа камеры Уссинга, сравнивалась с числом копий клеточного вектора (VCN), измеренным с помощью ddPCR, и экспрессией мРНК, измеренной с помощью RT-qPCR, на 7 день после трансдукции. Целостность клеток измеряли путем оценки уровней трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) и лактатдегидрогеназы (LDH) в культуральной среде. Тропизм к МВ-НАЕ определяли с помощью пятицветного тотального иммуноокрашивания и конфокальной микроскопии для mCherry-положительных клеток и маркеров различных типов клеток после трансдукции репортерным вектором AAV2.5T-mCherry.

Дополнительные результаты

В присутствии доксорубицина SP-101 восстанавливал индуцированную форсколином CFTR-опосредованную проводимость хлоридов во всех протестированных классах мутаций до уровней, сопоставимых с контрольными группами без МВ или низкомолекулярными контрольными модуляторами, при этом донор мутации класса I демонстрировал наибольшую реакцию хлорида при наивысшей множественности заражения (MOI; $1e5$ vg/клетка). Функциональная коррекция хлоридов увеличивалась с

увеличением MOI, что коррелировало с увеличением экспрессии мРНК VCN и hCFTRΔR. Аналогичным образом, увеличение концентрации доксорубицина увеличивало проводимость хлоридов и экспрессию мРНК hCFTRΔR при НАЕ, связанном с МВ, не оказывая существенного влияния на VCN. Низкие концентрации доксорубицина (всего 0,5 мкМ) были способны восстанавливать CFTR-опосредованную проводимость хлоридов с минимальной MOI, составляющей 5×10^3 vg/клетка. Уровни TEER и LDH существенно не отличались от контрольного эпителия, что указывает на отсутствие явной токсичности в результате лечения. Используя репортерный вектор AAV2.5T-mCherry, мы показали, что примерно 30-40% клеток НАЕ, связанного с МВ, включая мерцательные, секреторные и базальноподобные клетки, экспрессируют репортерный ген в одних и тех же экспериментальных условиях, что позволяет понять, какие и сколько клеток способствуют коррекции МВ, наблюдаемого *in vitro*. Как показано на фиг. 16, увеличение доз доксорубицина и вектора SP-101 увеличивало коррекцию эпителия дыхательных путей человека с МВ, полученного от доноров с мутациями класса I, II или III, до уровней, сходных с эпителием, не связанным с МВ. Напротив, лечение модулятором Vertex (VX-770/661/445) не корректировало эпителий с двумя мутациями класса I и лишь частично корректировало эпителий, гетерозиготный по мутациям класса I и III. Единственным эпителием, который лечение модулятором Vertex могло полностью скорректировать, был эпителий с двумя мутациями класса II. Таким образом, настоящий подход позволяет улучшить коррекцию эпителия дыхательных путей человека при МВ по сравнению с существующими подходами, особенно для пациентов, чьи генотипы содержат мутации класса I и/или мутации класса III.

Пример 6. Дополнительные результаты исследований на хорьках, описанные в примерах 1 и 3

В этом примере представлены дополнительные данные и результаты, относящиеся к исследованиям на хорьках, описанным в примерах 1 и 3.

Аналогичные зависимости «доза-ответ», описанные в примерах 4 и 5, наблюдались в дыхательных путях хорьков дикого типа. Ингаляционное введение возрастающих доз SP-101 и доксорубицина приводило к дозозависимому увеличению экспрессии мРНК hCFTRΔR. Самые высокие уровни наблюдались в легких и бронхах, за ними следовали трахея и нос. Уровни экспрессии мРНК hCFTRΔR были сопоставимы с уровнями экспрессии эндогенного CFTR хорька через 14 дней после введения. Экспрессия мРНК hCFTRΔR начиналась уже через 48 часов (самый ранний исследованный момент времени) и сохранялась до 3 месяцев (самый длительный исследованный момент времени). Сопоставимая экспрессия мРНК hCFTRΔR также была очевидна в дыхательных путях хорьков с МВ, что указывает на успешную трансдукцию, несмотря на ранее существовавшее накопление слизи.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO	Название	Последовательность

1	Энхансер F5 с сайтами 5' EcoRI и 3' XhoI	GAATTCGTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTC TGGGCATGTCTGGGCATGTCGGGCATTCTGGGCGTCTG GGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATCTCGAG
2	Промотор tg83	AACGGTGACGTGCACGCGTGGGCGGAGCCATCACGCA GGTTGCTATAATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCA GA
3	5'-UTR	GTCGAGCCCGAGAGACC
4	hCFTRΔR	ATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTC CAAAC TTTTTTCAGCTGGACCAGACCAATTTTGAGGA AAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCAGACATATAC CAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAA AAATTGGAAAGAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAA AGAAAAATCCTAAACTCATTAATGCCCTTCGGCGATGT TTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAATCTTTTTATATT TAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTG GGAAGAATCATAGCTTCCTATGACCCGGATAACAAGGA GGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTTAT GCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCTCCTACACCCAG CCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAATGCAGATGAGA ATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAAGAAGACTTTAAAG CTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATAAGTATTGGACA ACTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAACAAATTTGA TGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGTGTGGATCGCTC CTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATCTGGGAG TTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTTCCTG ATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGAAT GATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGGAAGATC AGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATCGAGAA CATCCAATCTGTAAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAA TGGAAAAAATGATTGAAAACCTTAAGACAAACAGAACT GAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACTTCA ATAGCTCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGT TTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCA TCCTCCGGAAAATATTCACCACCATCTCATTCTGCATTG TTCTGCGCATGGCGGTCACCTCGGCAATTTCCCTGGGCTG

TACAAACATGGTATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAAA
ATACAGGATTTCTTACAAAAGCAAGAATATAAGACATT
GGAATATAACTTAACGACTACAGAAGTAGTGATGGAG
AATGTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGGATTTGGGGAATT
ATTTGAGAAAGCAAAACAAAACAATAACAATAGAAAA
ACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTCTTCAGTAATTC
TCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAAGATATTAATTC
AAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCGGTTGCTGGATC
CACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTCTAATGATGATTA
TGGGAGA ACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAATTAAGCA
CAGTGGAAAGAATTTCAATTCTGTTCTCAGTTTTCTGGAT
TATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGGTG
TTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAAA
GCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGA
GAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACAC
TGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGA
GCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACTCT
CCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAAT
ATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAA
CTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAG
AAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAG
CTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACA
GCCAGACTTTAGCTCAAACTCATGGGATGTGATTCTTT
CGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGAAATTCAATCCTAA
CTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCT
CCTGTCTCCTGGACAGAAACAAAAACAATCTTTTAA
ACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAAAGGAAGAATTCT
ATTCTCAATCCAATCAACTCTACGCTTCAGGCACGAAG
GAGGCAGTCTGTCCTGAACCTGATGACACACTCAGTTA
ACCAAGGTCAGAACATTCACCGAAAGACAACAGCATC
CACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCTCAGGCAA ACTTGA
CTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTTATCTCAAGAA
ACTGGCTTGAAATAAGTGAAGAAATTAACGAAGAAG
ACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATATGGAGAGCATA
CCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTTCGATATAT

TACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAATTTGGTG
CTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTTCTTTGGT
TGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAGACA
AAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATGCA
GTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTAC
ATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGG
ATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCAC
AGTGTCGAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTG
TTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAA
GCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATAGC
AATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTT
CATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGT
TGTCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGT
GCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTT
CCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAACCTGGAATCTG
AAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTTACAAGC
TTAAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCA
GCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAAGCTCTGAATTT
ACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTGTCAACACTGCG
CTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGATTTTTGTCATCTT
CTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATTTTAAACAACAGG
AGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATCCTGACTTTAG
CCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTGGGCTGTAAAC
TCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGATCTGTGAG
CCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAGAAGGTA
AACCTACCAAGTCAACCAAACCATAACAAGAATGGCCA
ACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGTGA
AGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACT
GTCAAAGATCTCACAGCAAATAACACAGAAGGTGGAA
ATGCCATATTAGAGAACATTTCCCTTCTCAATAAGTCCTG
GCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAACTGGATCAGG
GAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTTGAGACTACTGAA
CACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGG
ATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGA
GTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTT

		AGAAAAAACTTGGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCA AGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGAT CTGTGATAGAACAGTTTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCC TTGTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCCATGGCCACAAG CAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTTCTCAGTAAGGC GAAGATCTTGCTGCTTGATGAACCCAGTGCTCATTTGG ATCCAGTAACATAACCAATAATTAGAAGAACTCTAAAA CAAGCATTTGCTGATTGCACAGTAATTCTCTGTGAACA CAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCAACAATTTTTGG TCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCAGTACGATTCCATC CAGAAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCTTCCGGCAAGC CATCAGCCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTCTTTCCCCACC GGA ACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCCCAGATTGCT GCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAAGATA CAAGGCTTTAG
5	3'-UTR	AGAGCAGCATAAATGTTGACATGGGACATTTGCTCATG GAATTGG
6	s-pA	AATAAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGT TTTTTGTGTGTA
7	Энхансер F5, промотор Tg83, 5'-UTR, hCFTRΔR	GAATTCGTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTC TGGGCATGTCTGGGCATGTCGGGCATTCTGGGCGTCTG GGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTG ACGTGCACGCGTGGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTA TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAG CCCGAGAGACCATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGC CAGCGTTGTCTCCAAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACC AATTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGT CAGACATATACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACA ATCTATCTGAAAAATTGGAAAGAGAATGGGATAGAGA GCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTAATGCC TTCGGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAA TCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAG CCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCTATGACCCG GATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGG CATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCT

CCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAAT
GCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAAGA
AGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATA
AGTATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTG
AACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGT
GTGGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGC
TAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGAC
TTGGTTTCCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGC
TAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGC
TGGGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAA
TGATCGAGAACATCCAATCTGTAAAGGCATACTGCTGG
GAAGAAGCAATGGAAAAAATGATTGAAAACCTTAAGAC
AACAGAACTGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGT
GAGATACTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTTCAGGGTT
CTTTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATC
AAAGGAATCATCCTCCGGAAAATATTCACCACCATCTC
ATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCACTCGGCAATT
TCCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGACTCTCTTGGAG
CAATAAACAAAATACAGGATTTCTTACAAAAGCAAGA
ATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAG
TAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGG
ATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAACAACAATA
ACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTC
TTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAA
GATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGC
GGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTC
TAATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGT
AAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTCATTCTGTTCTCA
GTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATA
TCATCTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAA
GCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCC
AAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGG
TGGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTT
CTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTAT
TTATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACA

GAAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGAT
GGCTAACAAAAGCTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGG
AACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCAT
GAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACT
CCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAAAAGCTCATGG
GATGTGATTCTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGA
AATTCAATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTA
GAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGAAACAAAA
ACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAA
AGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTACGCTT
CAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCTGAACTGATGAC
ACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAAAGA
CAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCTCAG
GCAAAGTACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTT
ATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTA
ACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATATG
GAGAGCATAACCAGCAGTACTACATGGAACACATACCT
TCGATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCT
AATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGC
TTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCT
TCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAAC
AGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTA
TGTGTTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCT
TGCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATA
CTCTAATCACAGTGTGCGAAAATTTTACACCACAAAATG
TTACATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAAC
ACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAA
AGATATAGCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCAT
ATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGC
TATAGCAGTTGTGCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGT
TGCAACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGA
GAGCATATTTCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAA
CTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCT
TGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCT
TCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAA

		<p>GCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTG TCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGAT TTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCATT TTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTA TCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGT GGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATG CGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCC AACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAC AAGAATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAA TTCACACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGG GCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAATACACA GAAGGTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCCCTTCTC AATAAGTCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAA CTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGA GACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGT GTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAA AGCCTTTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTTC TGGAACATTTAGAAAAAACTTGGATCCCTATGAACAGT GGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGT TGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCCTGGGAAGC TTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCC ATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTT CTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGTGATGAACCCAG TGCTCATTTGGATCCAGTAACATAACCAAATAATTAGAA GAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTAATT CTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCA ACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCAGT ACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTC TTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCT CTTTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGC CCCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGA GGTGCAAGATACAAGGCTTTAG</p>
8	Энхансер F5, промотор Tg83, 5'-UTR,	<p>GAATTCGTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTC TGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATTCCTGGGCGTCTG GGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTG</p>

	hCFTRΔR, 3'- UTR	ACGTGCACGCGTGGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTA TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAG CCCGAGAGACCATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGC CAGCGTTGTCTCCAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACC AATTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGT CAGACATATACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACA ATCTATCTGAAAAATTGGAAAGAGAATGGGATAGAGA GCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTAATGCC TTCGGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAA TCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAG CCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCTATGACCCG GATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGG CATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCT CCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAAT GCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTGATTATAAGA AGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATA AGTATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTG AACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGT GTGGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGC TAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGAC TTGGTTTCCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTCAGGCTGGGC TAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGC TGGGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAA TGATCGAGAACATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGG GAAGAAGCAATGGAAAAAATGATTGAAAACCTTAAGAC AAACAGAACTGAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGT GAGATACTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTT CTTTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATC AAAGGAATCATCCTCCGGAAAATATTCACCACCATCTC ATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCACTCGGCAATT TCCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGACTCTCTTGGAG CAATAAACAAAATACAGGATTTCTTACAAAAGCAAGA ATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAG TAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGG ATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAACAAAACAATA
--	---------------------	--

ACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTC
TTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAA
GATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGC
GGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTC
TAATGATGATTATGGGAGAAGCTGGAGCCTTCAGAGGGT
AAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTTCAATTCTGTTCTCA
GTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATA
TCATCTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAA
GCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCC
AAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGG
TGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTT
CTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTAT
TTATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACA
GAAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAACTGAT
GGCTAACAAAAGCTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGG
AACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCAT
GAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACT
CCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAACTCATGG
GATGTGATTCTTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGA
AATTCAATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATT
GAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGAAACAAAAA
ACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAA
AGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTACGCTT
CAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCTGAACTGATGAC
ACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAAAGA
CAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCTCAG
GCAAACCTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTT
ATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTA
ACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTTGATGATATG
GAGAGCATACCAGCAGTACTACATGGAACACATACCT
TCGATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCT
AATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGC
TTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCT
TCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAAC
AGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTA

TGTGTTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCT
TGCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATA
CTCTAATCACAGTGTTCGAAAATTTTACACCACAAAATG
TTACATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAAC
ACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAA
AGATATAGCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCAT
ATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGC
TATAGCAGTTGTTCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGT
TGCAACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGA
GAGCATATTTCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAA
CTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCT
TGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCT
TCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAA
GCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTG
TCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGAT
TTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATT
TTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTA
TCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGT
GGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATG
CGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCC
AACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAC
AAGAATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAA
TTCACACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGG
GCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAAATACACA
GAAGGTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCTTCTC
AATAAGTCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAA
CTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTTGA
GACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGT
GTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAA
AGCCTTTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTTC
TGGAACATTTAGAAAAAACTTGGATCCCTATGAACAGT
GGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGT
TGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCCTGGGAAGC
TTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCC
ATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTT

		CTCAGTAAGGCCGAAGATCTTGCTGCTTGATGAACCCAG TGCTCATTGATCCAGTAACATAACCAAATAATTAGAA GAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTAATT CTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCA ACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCAGT ACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTC TTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCT CTTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGC CCCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGA GGTGCAAGATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAATGT TGACATGGGACATTTGCTCATGGAATTGG
9	5'-ITR AAV	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACCCCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCT
10	3'-ITR AAV	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTG CGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCC CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA
11	от 5'-ITR AAV до 3'-ITR	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACCCCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCAGATCT GAATTCGTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTC TGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATTCTGGGCGTCTG GGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTG ACGTGCACGCGTGGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTA TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAG CCCGAGAGACCATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGC CAGCGTTGTCTCCAAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACC AATTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGT CAGACATATACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACA ATCTATCTGAAAAATTGGAAAGAGAATGGGATAGAGA GCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTAATGCC TTCGGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAA

TCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAG
CCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCTATGACCCG
GATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGG
CATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCT
CCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAAT
GCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAAGA
AGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATA
AGTATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTG
AACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGT
GTGGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGC
TAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGAC
TTGGTTTCCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGC
TAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGC
TGGGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAA
TGATCGAGAACATCCAATCTGTAAAGGCATACTGCTGG
GAAGAAGCAATGGAAAAAATGATTGAAAACCTTAAGAC
AAACAGAACTGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGT
GAGATACTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTTCAGGGTT
CTTTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATC
AAAGGAATCATCCTCCGGAAAATATTCACCACCATCTC
ATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCACTCGGCAATT
TCCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGACTCTCTTGGAG
CAATAAACAAAATACAGGATTTCTTACAAAAGCAAGA
ATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAG
TAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGG
ATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAACAACAATA
ACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTC
TTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCTGAAA
GATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGC
GGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTC
TAATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGT
AAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTCATTCTGTTCTCA
GTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATA
TCATCTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAA
GCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCC

AAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGG
TGGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTT
CTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTAT
TTATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACA
GAAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGAT
GGCTAACAAAAGTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGG
AACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCAT
GAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACT
CCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAAAATCATGG
GATGTGATTCTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGA
AATTCAATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATT
GAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGAAACAAAA
ACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAA
AGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTACGCTT
CAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCTGAACCTGATGAC
ACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAAAGA
CAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCTCAG
GCAAACCTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTT
ATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTA
ACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTTGATGATATG
GAGAGCATACCAGCAGTACTACATGGAACACATACCT
TCGATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCT
AATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGC
TTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCT
TCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAAC
AGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTA
TGTGTTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCT
TGCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATA
CTCTAATCACAGTGTGCGAAAATTTTACACCACAAAATG
TTACATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAAC
ACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAA
AGATATAGCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCAT
ATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGC
TATAGCAGTTGTGCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTGT
TGCAACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGA

GAGCATATTTCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAA
CTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCT
TGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCT
TCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAA
GCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTG
TCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGAT
TTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATT
TTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTA
TCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGT
GGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATG
CGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCC
AACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAC
AAGAATGGCCAACCTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAA
TTCACACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGG
GCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAATACACA
GAAGGTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCTTCTC
AATAAGTCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAA
CTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGA
GACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGT
GTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAA
AGCCTTTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTTC
TGGAACATTTAGAAAAAAGTGGATCCCTATGAACAGT
GGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGT
TGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCTGGGAAGC
TTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCC
ATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTT
CTCAGTAAGGCCAAGATCTTGCTGCTTGTGATGAACCCAG
TGCTCATTTGGATCCAGTAACATACCAAATAATTAGAA
GAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTAATT
CTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCA
ACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCAGT
ACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTC
TTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCT
CTTTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGC
CCCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGA

		<p>GGTGCAAGATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAATGT TGACATGGGACATTTGCTCATGGAATTGGCAGGCCTAA TAAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTT TTTGTGTGTACTIONGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC CCGGGCAAAGCCCAGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT GGCCAA</p>
12	Bektop pAV- F5tg83-hCFTR- dR	<p>TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTCAGATCT GAATTCGTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTC TGGGCATGTCTGGGCATGTCGGGCATTCTGGGCGTCTG GGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTG ACGTGCACGCGTGGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTA TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAG CCCGAGAGACCATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGC CAGCGTTGTCTCCAAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACC AATTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGT CAGACATATACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACA ATCTATCTGAAAATTGGAAAGAGAATGGGATAGAGA GCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTAAATGCC TTCGGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAA TCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAG CCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCTATGACCCG GATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGG CATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCT CCTACACCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAAT GCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAAGA AGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATA AGTATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTG AACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGT GTGGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGC TAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGAC</p>

TTGGTTTCCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGC
TAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGC
TGGGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAA
TGATCGAGAACATCCAATCTGTAAAGGCATACTGCTGG
GAAGAAGCAATGGAAAAAATGATTGAAAACCTTAAGAC
AAACAGAACTGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGT
GAGATACTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTCTCAGGGTT
CTTTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATC
AAAGGAATCATCCTCCGGAAAATATTCACCACCATCTC
ATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCACTCGGCAATT
TCCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGACTCTCTTGGAG
CAATAAACAAAATACAGGATTTCTTACAAAAGCAAGA
ATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAG
TAGTGATGGAGAATGTAAACAGCCTTCTGGGAGGAGGG
ATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAACAACAATA
ACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTC
TTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAA
GATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGC
GGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTC
TAATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGT
AAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTCATTCTGTTCTCA
GTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATA
TCATCTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAA
GCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCC
AAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGG
TGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTT
CTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTAT
TTATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACA
GAAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGAT
GGCTAACAAAACCTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGG
AACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCAT
GAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACT
CCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAACTCATGG
GATGTGATTCTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGA
AATTCAATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATT

GAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGAAACAAAA
ACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAA
AGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTACGCTT
CAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCTGAACCTGATGAC
ACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAAAGA
CAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCTCAG
GCAAACCTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTT
ATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTA
ACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATATG
GAGAGCATACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCT
TCGATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCT
AATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGC
TTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCT
TCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAAC
AGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTA
TGTGTTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCT
TGCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATA
CTCTAATCACAGTGTGCGAAAATTTTACACCACAAAATG
TTACATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAAC
ACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAA
AGATATAGCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCAT
ATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGC
TATAGCAGTTGTGCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGT
TGCAACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGA
GAGCATATTTCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAA
CTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCT
TGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCT
TCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAA
GCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTG
TCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGAT
TTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATT
TTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTA
TCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGT
GGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATG
CGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCC

AACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAC
AAGAATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAA
TTCACACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGG
GCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAATACACA
GAAGGTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCTTCTC
AATAAGTCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAA
CTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGA
GACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGT
GTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAA
AGCCTTTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTTC
TGGAACATTTAGAAAAAACTTGGATCCCTATGAACAGT
GGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGT
TGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCTGGGAAGC
TTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCC
ATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTT
CTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGTGATGAACCCAG
TGCTCATTGGATCCAGTAACATACCAAATAATTAGAA
GAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTAATT
CTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCA
ACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCAGT
ACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTC
TTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCT
CTTTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGC
CCCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGA
GGTGCAAGATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAATGT
TGACATGGGACATTTGCTCATGGAATTGGCAGGCCTAA
TAAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTT
TTTGTGTGTA CTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC
CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC
CCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC
CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT
GGCCAACCCCCCCCCCCCCCCCCCTGCAGCCAGCTGGC
GTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAA
CAGTTGCGTAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGCC
CTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTA

CGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCG
CCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTCTCGCCACGT
TCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTC
CCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGAC
CCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGG
GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTT
GGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAAC
TGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGA
TTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAA
AAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTA
ACAAAATATTAACGTTTACAATTTCCCTGATGCGGTATTT
TCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATG
GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTT
AAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGC
CCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA
CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAG
GTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGG
GCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGA
TAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGG
GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAA
TACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCC
TGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT
GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTT
GCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACG
CTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC
ACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTA
AGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCA
ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGT
ATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTC
GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC
TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTG
ATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGA
GGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG
GGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC

TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC
GATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTAT
TAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAA
TTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACC
ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGC
TGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTA
TCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGT
ATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTAT
GGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC
TCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTA
CTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTA
ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCT
CATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTG
AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT
GAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAA
CAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCG
GATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGG
CTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAG
TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA
GCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCA
GTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGG
GTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC
GGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGC
TTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
GCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGG
AGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCG
GAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAA
CGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCT
CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
GGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTT
TTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATG
TTCTTTCCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGT
ATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAG
CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAA
GCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC

		GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGGCTGCAGGGG GGGGGGGGGGGGGGG
13	Капсидный белок AV.TL65	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHK DDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDK AYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGR AVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKA RTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSA GGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVT KSTRTWVLP SYN NHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPW GYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQ VKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGT EGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEY FPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLV DQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPM GRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQP NGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNM LITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPTTGTYNL QEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGG FGLKHPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQV TVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDST GEYRTTRPIGTRYLTRPL
14	Энхансер F5	GTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGGCA TGTCTGGGCATGTCTGGGCATTCTGGGCGTCTGGGCATG TCTGGGCATGTCTGGGCAT
15	5'-ITR AAV (флоп)	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG CCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCTGGGCGACCTTTGGTCGC CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAG TGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTCT
16	3'-ITR AAV (флоп)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTG CGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
17	от 5'-ITR AAV (флоп) до 3'- ITR AAV	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG CCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCTGGGCGACCTTTGGTCGC CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAG

	(флор)	<p> TGGCCA ACTCCATCACTAGGGG TTCCTCAGATCTGAAT TCGTGGT GAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGG CATGTCTGGGCATGTCTGGGCATTCTGGGCGTCTGGGCA TGTCTGGGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTGACGT GCACGCGTGGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTATATA AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAGCCCG AGAGACCATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGC GTTGTCTCCAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACCAATT TTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCAG ACATATAACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATC TATCTGAAAAATTGAAAAGAGAATGGGATAGAGAGCT GGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTAATGCCCTTC GGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAATCT TTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCT CTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCTATGACCCGGA TAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCA TAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCTCC TACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAATGC AGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAAGAAG ACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATAAG TATTGGACA ACTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAA CAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGTGT GGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTA ATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTT GGTTTCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGCTA GGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTG GGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATG ATCGAGAACATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGA AGAAGCAATGGAAAAAATGATTGAAA ACTTAAGACAA ACAGAACTGAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGA GATACTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCT TTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATCA AAGGAATCATCCTCCGGAAAATATTCACCACCATCTCA TTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCACTCGGCAATTT CCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGACTCTCTTGGAGC </p>
--	--------	---

AATAAACAAAATACAGGATTTCTTACAAAAGCAAGAAT
ATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAGTA
GTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGGATT
TGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAAAACAAAACAATAAC
AATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTCTT
CAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAAGA
TATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCGG
TTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTCTA
ATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAA
AATTAAGCACAGTGGAAGAATTCATTCTGTTCTCAGTT
TTCCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCA
TCTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGC
GTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAA
GTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTG
GAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCT
TTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTT
ATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGA
AAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGG
CTAACAAACTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAA
CATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGA
AGGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACTCC
AAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAACTCATGGGA
TGTGATTCTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGAAA
TTCAATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGA
AGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGAAACAAAAAAC
AATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAAAGG
AAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTACGCTTCAG
GCACGAAGGAGGCAGTCTGTCCTGAACCTGATGACACA
CTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAAAGACAA
CAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCCTCAGGCA
AACTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTTATC
TCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTAAC
GAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATATGGA
GAGCATACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTTC
GATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAA

TTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTT
CTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTC
AAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAG
CTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGT
GTTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGC
TATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCT
AATCACAGTGTCGAAAATTTTACACCACAAAATGTTAC
ATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGT
TGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGAT
ATAGCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTT
GACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGCTATA
GCAGTTGTCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCA
ACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGC
ATATTTCCCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAACCTGG
AATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTTA
CAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGA
CGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAAGCTCTG
AATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTGTCAACA
CTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGATTTTTGT
CATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATTTAACA
ACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATCCTGA
CTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTGGGCT
GTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGATC
TGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAG
AAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAACAAGAA
TGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCAC
ACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCA
AATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAATAACACAGAA
GGTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCCCTTCTCAAT
AAGTCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAAGTGG
GATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTTGAGA
CTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGT
GTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAG
CCTTTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTCTG
GAACATTTAGAAAAACTTGGATCCCTATGAACAGTGG

		<p>AGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGTTG GGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCCTGGGAAGCTT GACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCCAT GGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTTCT CAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGATGAACCCAGTG CTCATTTGGATCCAGTAACATACCAAATAATTAGAAGA ACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTAATTCT CTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCAA CAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAGTGCGGCAGTA CGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCT TCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTC TTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCC CCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAG GTGCAAGATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAATGTT GACATGGGACATTTGCTCATGGAATTGGCAGGCCTAAT AAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTT TTGTGTGTA CTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCCGACCCCCGGGCTTTGCCCGGG CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT GGCC</p>
18	Вектор pAV-F5tg83-hCFTR-dR (флоп ITR)	<p>CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG CCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGC CCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAG TGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTCCCTCAGATCTGAAT TCGTGGTGAGCGTCTGGGCATGTCTGGGCATGTCTGGG CATGTCTGGGCATGTCTGGGCATTCTGGGCGTCTGGGCA TGTCTGGGCATGTCTGGGCATCTCGAGAACGGTGACGT GCACGCGTGGGCGGAGCCATCACGCAGGTTGCTATATA AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAGTCGAGCCCG AGAGACCATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGC GTTGTCTCCAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACCAATT TTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCAG ACATATAACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATC TATCTGAAAATTGGAAAGAGAATGGGATAGAGAGCT</p>

GGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTAATGCCCTTC
GGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAATCT
TTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCT
CTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCTATGACCCGGA
TAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCA
TAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCTCC
TACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAATGC
AGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAAGAAG
ACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATAAG
TATTGGACAACCTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAA
CAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTCGTGT
GGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTA
ATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTT
GGTTTCCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGCTA
GGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTG
GGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATG
ATCGAGAACATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGA
AGAAGCAATGGAAAAAATGATTGAAAACCTAAGACAA
ACAGAACTGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGA
GATACTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCT
TTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATCA
AAGGAATCATCCTCCGGAAAATATTCACCACCATCTCA
TTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCCTCGGCAATTT
CCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGACTCTCTTGGAGC
AATAAACAAAATACAGGATTTCTTACAAAAGCAAGAAT
ATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAGTA
GTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGGATT
TGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAACAACAATAAC
AATAGAAAACCTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTCTT
CAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAAGA
TATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCGG
TTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTCTA
ATGATGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAA
AATTAAGCACAGTGGAAGAATTCATTCTGTTCTCAGTT
TTCCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCA

TCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGC
GTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAA
GTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTG
GAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCT
TTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTT
ATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGA
AAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGG
CTAACAAAAGTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAA
CATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGA
AGGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACTCC
AAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAAACTCATGGGA
TGTGATTCTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGAAA
TTCAATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGA
AGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGAAACAAAAAAC
AATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAAAGG
AAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTACGCTTCAG
GCACGAAGGAGGCAGTCTGTCCTGAACCTGATGACACA
CTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAAAGACAA
CAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCTCAGGCA
AACTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTTATC
TCAAGAACTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTAAC
GAAGAAGACTTAAAGGAGTGCCTTTTTGATGATATGGA
GAGCATACCAGCAGTGACTIONACATGGAACACATACCTTC
GATATATTACTIONGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAA
TTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTT
CTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTC
AAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAG
CTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGT
GTTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGC
TATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCT
AATCACAGTGTCGAAAATTTTACACCACAAAATGTTAC
ATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGT
TGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCAAAGAT
ATAGCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTT
GACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGCTATA

GCAGTTGTCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCA
ACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGC
ATATTCCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAAGTGG
AATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTTA
CAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGA
CGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAAGCTCTG
AATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTGTCAACA
CTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGATTTTTGT
CATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATTTAACA
ACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATCCTGA
CTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTGGGCT
GTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGATC
TGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAG
AAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAACAAGAA
TGGCCAACCTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCAC
ACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCA
AATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAAATACACAGAA
GGTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCTTCTCAAT
AAGTCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAACTG
GATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTTGAGA
CTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGT
GTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAG
CCTTTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTCTG
GAACATTTAGAAAAAAGTGGATCCCTATGAACAGTGG
AGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGTTG
GGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCCTGGGAAGCTT
GACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCCAT
GGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTTCT
CAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGATGAACCCAGTG
CTCATTTGGATCCAGTAACATAACCAAATAATTAGAAGA
ACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTAATTCT
CTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCAA
CAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAAGTGCGGCAGTA
CGATTCCATCCAGAAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCT
TCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTC

TTTCCCCACCGGAAGCTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCC
CCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAG
GTGCAAGATACAAGGCTTTAGAGAGCAGCATAAATGTT
GACATGGGACATTTGCTCATGGAATTGGCAGGCCTAAT
AAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTT
TTGTGTGTACTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC
ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG
GCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGG
CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT
GGCCCCCCCCCCCCCCCCCTGCAGCCTGGCGTAATA
GCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTG
CGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGC
GCATTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGT
GACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT
CGCTTTCTTCCCTTCTCTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTT
CCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTT
CCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAC
TTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCC
TGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACG
TTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACA
CTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGG
ATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG
ATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATT
AACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACG
CATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTC
AGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCC
CCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGG
CTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTG
ACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACC
GTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTG
ATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATG
GTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGT
GCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTC
AAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAA
TGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATT

CAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCA
TTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTG
AAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGAT
GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATC
CCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCA
TACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCA
GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAG
AGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACA
CTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCG
AAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAACATGGGGGATCA
TGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATG
AAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCT
GTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGG
CGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG
ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTG
CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAA
TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGC
AGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGAT
TAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA
TACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAA
GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACC
AAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCC
TTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA
ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAG
AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGC
AGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCC
GTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC
CTACATAACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
CTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGAC
TCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCG

		<p>GCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAG CGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA GCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAG GCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAG GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACT TGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGA GCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGGCCTTTTTACGG TTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTC CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCG CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACG ACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGG CCGATTCATTAATGCAGGCTGCAGGGGGGGGGGGGGGG GGGG</p>
19	Белок CFTR человека дикого типа	<p>MQRSPLEKASVVSCLFFSWTRPILRKG YRQRLELSDIYQIP SVDSADNLSEKLEREWRELASKKNPKLINALRRCFFWRF MFYGFILYLGEVTKAVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIAIY LGIGLCLLFIVRTL LLLHPAIFGLHHIGMQMRIAMFSLIYKKT LKLSSRVLDKISIGQLVSLLSNNLNKFDEGLALAHFVWIAP LQVALLMGLIWELLQASAFGLGFLIVLALFQAGLGRMM MKYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSVKAYCWEEAMEK MIENLRQTELKLTRKAA YVR YFNSSAFFFSGFFVFLSVLP YALIKGIILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQTWYDSL GAINKIQDFLQKQEYKTLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEG FGELFEKAKQNNNNRKT SNGDDSLFFSNFSLLGTPVLKDI NFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEGKIKH SGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYRSVIKACQL EEDISKFAEKDNIVLGE GGITLSGGQRARISLARAVYKDA DLYLLDSPFGYLDVLT EKEIFESCCKLMANKTRILVTSK MEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFSELQNLQPDFSSKLMG CDSFDQFSAERRNSILTETLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSF KQTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQMNGIEEDSD EPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSVLN LMTHSVNQQQNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTELDIYSRR</p>

		LSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLR TVHKSLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKG NSTHSRNNSYAVIITSTSSYYVFYIYVGVADTLLAMGFFR GLPLVHTLITVSKILHHKMLHSVLQAPMSTLNTLKAGGIL NRFSKDIAILDDLPLTIFDFIQLLLVIGAIAVVAVLQPYIF VATVPVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVT SLKGLWTLRAFGRRPYFETLFHKALNLHTANWFLYLSTL RWFQMRIEMIFVIFIAVTFISILTTGEGEGRVGIILTLAMNI MSTLQWAVNSSIDVDSLMSVSRVFKFIDMPTEGKPTKST KPYKNGQLSKVMIENSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAK YTEGGNAILENISFSISPGQRVGLLGRTGSGKSTLLSAFLRL LNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIPQKVIFISGTFR KNLDPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFPGKLDVFLV DGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAKILLDEPSAHLDPV TYQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECCQFLVIEENK VRQYDSIQKLLNERSLFRQAISPSDRVKLPHRNSSKCKSK PQIAALKEETEEEVQDTRL
--	--	--

Все публикации, патенты и заявки на патенты включены в данный документ посредством ссылки. Хотя в приведенном выше описании настоящее изобретение было описано в отношении некоторых его предпочтительных вариантов осуществления, и многие детали были изложены в целях иллюстрации, специалистам в данной области техники будет очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты осуществления и что некоторые детали здесь могут быть значительно изменены без отступления от основных принципов изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения муковисцидоза (МВ) у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

2. Способ лечения МВ у субъекта, у которого отсутствует белок CFTR, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант, и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

3. Способ по п. 2, в котором генотип субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I.

4. Способ по п. 1 или п. 3, в котором по меньшей мере одна мутация CFTR класса I представляет собой нонсенс-мутацию, мутацию сплайсинга или делецию.

5. Способ по любому из пп. 1, 3 и 4, в котором по меньшей мере одна мутация CFTR класса I включает мутацию Q2X, мутацию S4X, мутацию W19X, мутацию G27X, мутацию Q39X, мутацию W57X, мутацию E60X, мутацию R75X, мутацию L88X, мутацию E92X, мутацию Q98X, мутацию Y122X, мутацию E193X, мутацию W216X, мутацию L218X, мутацию Q220X, мутацию Y275X, мутацию C276X, мутацию Q290X, мутацию G330X, мутацию W401X, мутацию Q414X, мутацию S434X, мутацию S466X, мутацию S489X, мутацию Q493X, мутацию W496X, мутацию C524X, мутацию Q525X, мутацию G542X, мутацию G550X, мутацию Q552X, мутацию R553X, мутацию E585X, мутацию G673X, мутацию Q685X, мутацию R709X, мутацию K710X, мутацию Q715X, мутацию L732X, мутацию R764X, мутацию R785X, мутацию R792X, мутацию E822X, мутацию W882X, мутацию W846X, мутацию Y849X, мутацию R851X, мутацию Q890X, мутацию S912X, мутацию Y913X, мутацию Q1042X, мутацию W1089X, мутацию Y1092X, мутацию W1098X, мутацию R1102X, мутацию E1104X, мутацию W1145X, мутацию R1158X, мутацию R1162X, мутацию S1196X, мутацию W1204X, мутацию L1254X, мутацию S1255X, мутацию W1282X, мутацию Q1313X, мутацию Q1330X, мутацию E1371X, мутацию Q1382X, мутацию Q1411X, мутацию 2116delCTAA или их комбинацию.

6. Способ по любому из пп. 1 и 3-5, в котором генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса I.

7. Способ по п. 6, в котором генотип субъекта содержит мутацию W1282X и мутацию R1162X.

8. Способ лечения МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного аденоассоциированного

вируса (гAAV), содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

9. Способ по п. 7, в котором по меньшей мере одна мутация CFTR класса III включает мутацию G551D или мутацию S549N.

10. Способ по п. 8 и п. 9, в котором генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса III.

11. Способ по любому из пп. 1-10, дополнительно включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV.

12. Способ по п. 11, в котором усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 48 часов после введения гAAV.

13. Способ лечения МВ у субъекта, включающий:

(a) введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение примерно 48 часов после введения гAAV.

14. Способ лечения МВ у субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, причем усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 48 часов после введения гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

15. Способ по любому из пп. 12-14, в котором усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 24 часов после введения гAAV.

16. Способ по п. 15, в котором усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 12 часов после введения гAAV.

17. Способ по любому из пп. 11-16, в котором усиливающее средство представляет собой антрациклин, ингибитор протеасом, трипептидилальдегид или их комбинацию.

18. Способ по п. 17, в котором антрациклин представляет собой доксорубицин, идарубицин, акларубицин, даунорубицин, эпирубицин, валрубицин, митоксантрон или их комбинацию.

19. Способ по п. 18, в котором антрациклин представляет собой доксорубицин, идарубицин или их комбинацию.

20. Способ по п. 19, в котором антрациклин представляет собой доксорубицин.

21. Способ по п. 17, в котором ингибитор протеасом представляет собой бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб.

22. Способ по п. 17, в котором трипептидилальдегид представляет собой N-ацетил-1-лейцил-1-лейцил-1-норлейцин (LLnL).

23. Способ по любому из пп. 13-22, в котором у субъекта отсутствует белок CFTR.
24. Способ по любому из пп. 13-23, в котором генотип субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I.
25. Способ по п. 24, в котором по меньшей мере одна мутация CFTR класса I представляет собой нонсенс-мутацию, мутацию сплайсинга или делецию.
26. Способ по п. 24 или п. 25, в котором по меньшей мере одна мутация CFTR класса I включает мутацию Q2X, мутацию S4X, мутацию W19X, мутацию G27X, мутацию Q39X, мутацию W57X, мутацию E60X, мутацию R75X, мутацию L88X, мутацию E92X, мутацию Q98X, мутацию Y122X, мутацию E193X, мутацию W216X, мутацию L218X, мутацию Q220X, мутацию Y275X, мутацию C276X, мутацию Q290X, мутацию G330X, мутацию W401X, мутацию Q414X, мутацию S434X, мутацию S466X, мутацию S489X, мутацию Q493X, мутацию W496X, мутацию C524X, мутацию Q525X, мутацию G542X, мутацию G550X, мутацию Q552X, мутацию R553X, мутацию E585X, мутацию G673X, мутацию Q685X, мутацию R709X, мутацию K710X, мутацию Q715X, мутацию L732X, мутацию R764X, мутацию R785X, мутацию R792X, мутацию E822X, мутацию W882X, мутацию W846X, мутацию Y849X, мутацию R851X, мутацию Q890X, мутацию S912X, мутацию Y913X, мутацию Q1042X, мутацию W1089X, мутацию Y1092X, мутацию W1098X, мутацию R1102X, мутацию E1104X, мутацию W1145X, мутацию R1158X, мутацию R1162X, мутацию S1196X, мутацию W1204X, мутацию L1254X, мутацию S1255X, мутацию W1282X, мутацию Q1313X, мутацию Q1330X, мутацию E1371X, мутацию Q1382X, мутацию Q1411X, мутацию 2116delCTAA или их комбинацию.
27. Способ по любому из пп. 24-26, в котором генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса I.
28. Способ по п. 27, в котором генотип субъекта содержит мутацию W1282X и мутацию R1162X.
29. Способ по любому из пп. 13-26, в котором генотип субъекта содержит по меньшей мере одну мутацию CFTR класса II, по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, по меньшей мере одну мутацию CFTR класса IV, по меньшей мере одну мутацию CFTR класса V, по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VI или по меньшей мере одну мутацию CFTR класса VII.
30. Способ по п. 29, в котором генотип субъекта содержит две мутации CFTR класса II, две мутации CFTR класса III, две мутации CFTR класса IV, две мутации CFTR класса V, две мутации CFTR класса VI или две мутации CFTR класса VII.
31. Способ по любому из пп. 1-30, в котором гAAV содержит капсидный белок AV.TL65.
32. Способ по п. 31, в котором капсидный белок AV.TL65 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.
33. Способ по любому из пп. 1-32, в котором полинуклеотид содержит энхансер F5.
34. Способ по п. 33, в котором энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1.

35. Способ по п. 33, в котором энхансер F5 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:14.

36. Способ по любому из пп. 1-35, в котором полинуклеотид содержит промотор tg83.

37. Способ по п. 36, в котором промотор tg83 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

38. Способ по любому из пп. 1-37, в котором миниген CFTR Δ R представляет собой миниген CFTR Δ R человека.

39. Способ по п. 38, в котором миниген CFTR Δ R человека кодируется полинуклеотидом, содержащим последовательность SEQ ID NO:4.

40. Способ по любому из пп. 1-39, в котором полинуклеотид содержит в направлении от 5'-конца к 3'-концу энхансер F5, промотор tg83 и миниген CFTR Δ R.

41. Способ по п. 40, в котором полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:7.

42. Способ по любому из пп. 1-41, дополнительно включающий введение субъекту одного или более дополнительных терапевтических средств.

43. Способ по п. 42, в котором одно или несколько дополнительных терапевтических средств включают антибиотик, средство, разжижающее мокроту, модулятор CFTR, муколитическое средство, физиологический раствор, гипертонический физиологический раствор, иммунодепрессивное средство или их комбинацию.

44. Способ по любому из пп. 1-43, в котором введение осуществляется путем ингаляции, небулизации, аэрозолизации, интраназально, интратрахеально, внутрибронхиально, перорально, внутривенно, подкожно или внутримышечно.

45. Способ по п. 44, в котором введение осуществляется путем ингаляции, небулизации, аэрозолизации, интраназально, интратрахеально и/или внутрибронхиально.

46. Способ по п. 45, в котором введение осуществляют путем ингаляции.

47. rAAV для применения при лечении МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса I, при этом rAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

48. rAAV для применения при лечении МВ у субъекта, у которого отсутствует белок CFTR, при этом rAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

49. rAAV для применения при лечении МВ у субъекта, генотип которого включает по меньшей мере одну мутацию CFTR класса III, при этом rAAV содержит (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTR Δ R или его вариантом.

50. гAAV для применения в способе лечения МВ у субъекта, причем способ включает:

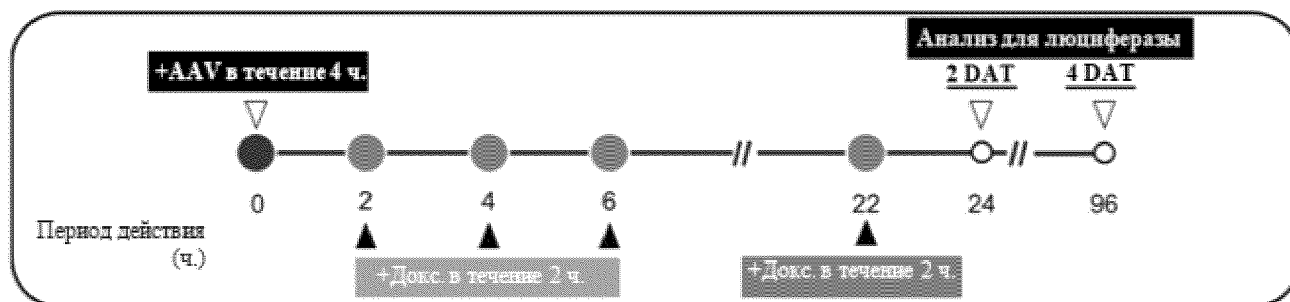
(a) введение субъекту терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом; и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, усиливающего трансдукцию AAV, в течение примерно 48 часов после введения гAAV.

51. Средство, усиливающее трансдукцию AAV, для применения при лечении МВ у субъекта, причем усиливающее средство вводят субъекту в течение примерно 48 часов после введения гAAV, содержащего (i) капсидный белок AV.TL65 или его вариант; и (ii) полинуклеотид, содержащий энхансер F5, или его вариант и промотор tg83 или его вариант, функционально связанный с минигеном CFTRΔR или его вариантом.

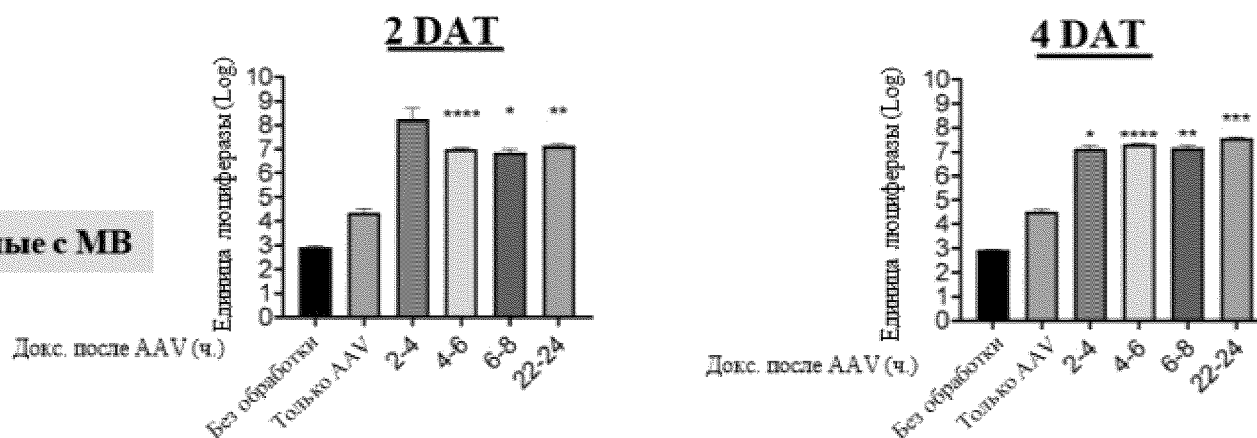
По доверенности

ФИГ. 1А

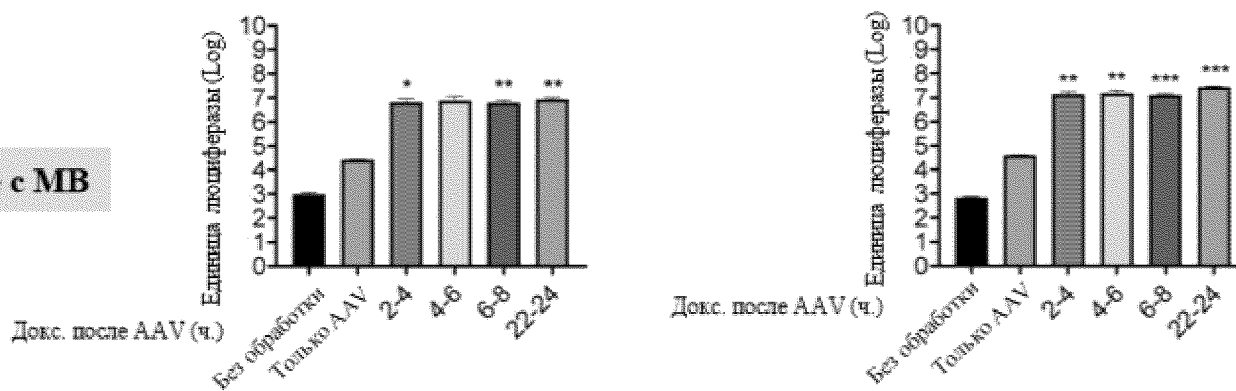


ФИГ. 1В

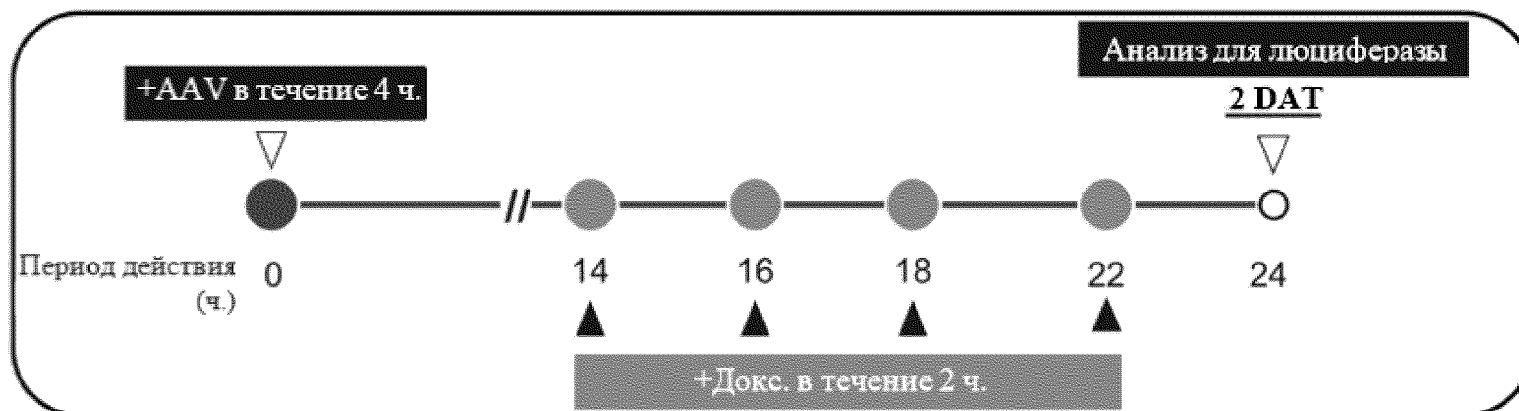
Клетки, не связанные с МВ



Клетки, связанные с МВ

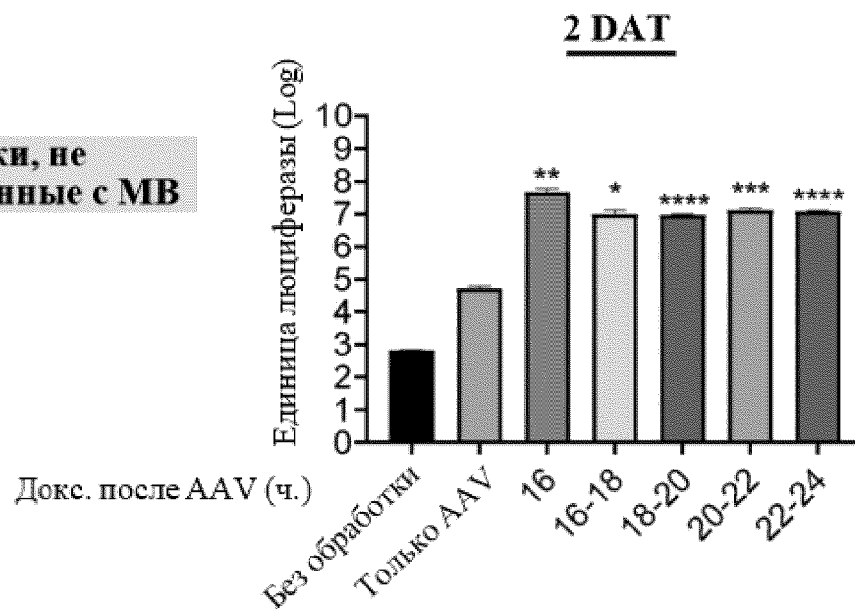


ФИГ. 2А

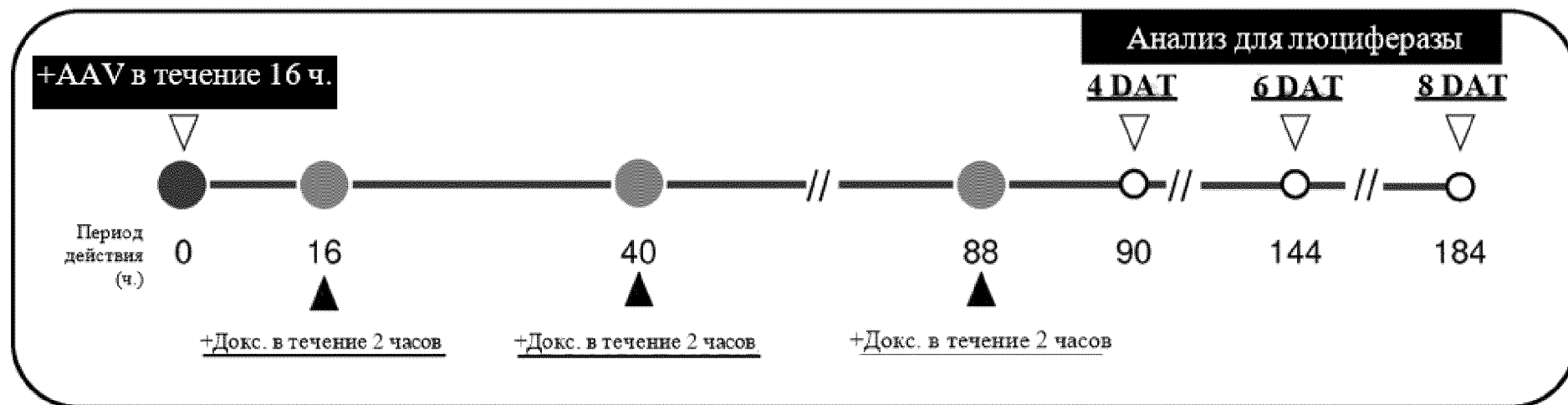


ФИГ. 2В

Клетки, не связанные с МВ

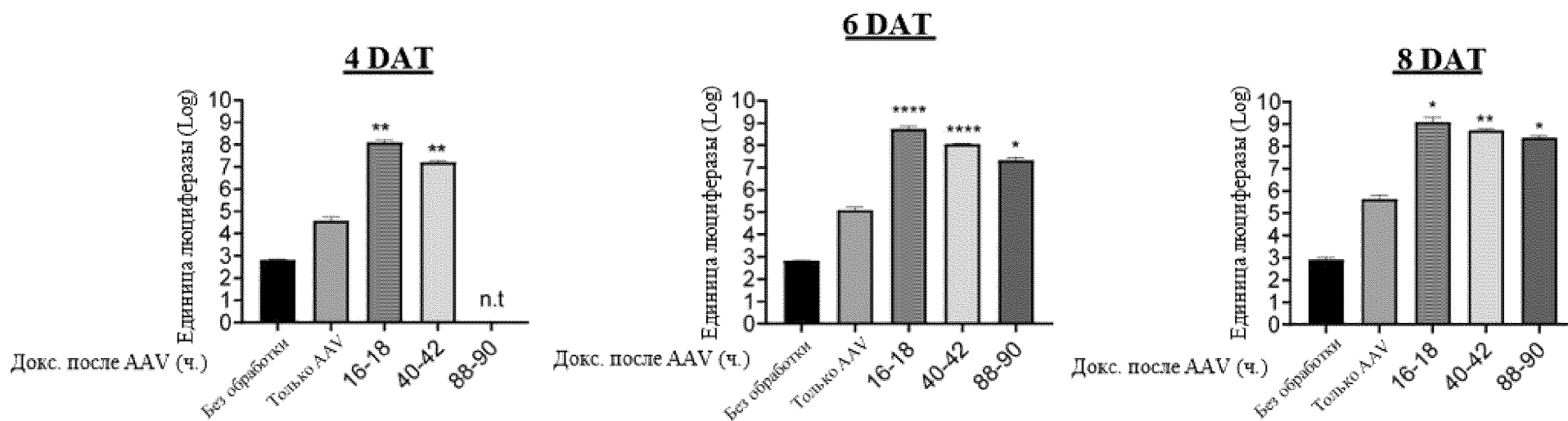


ФИГ. 3А

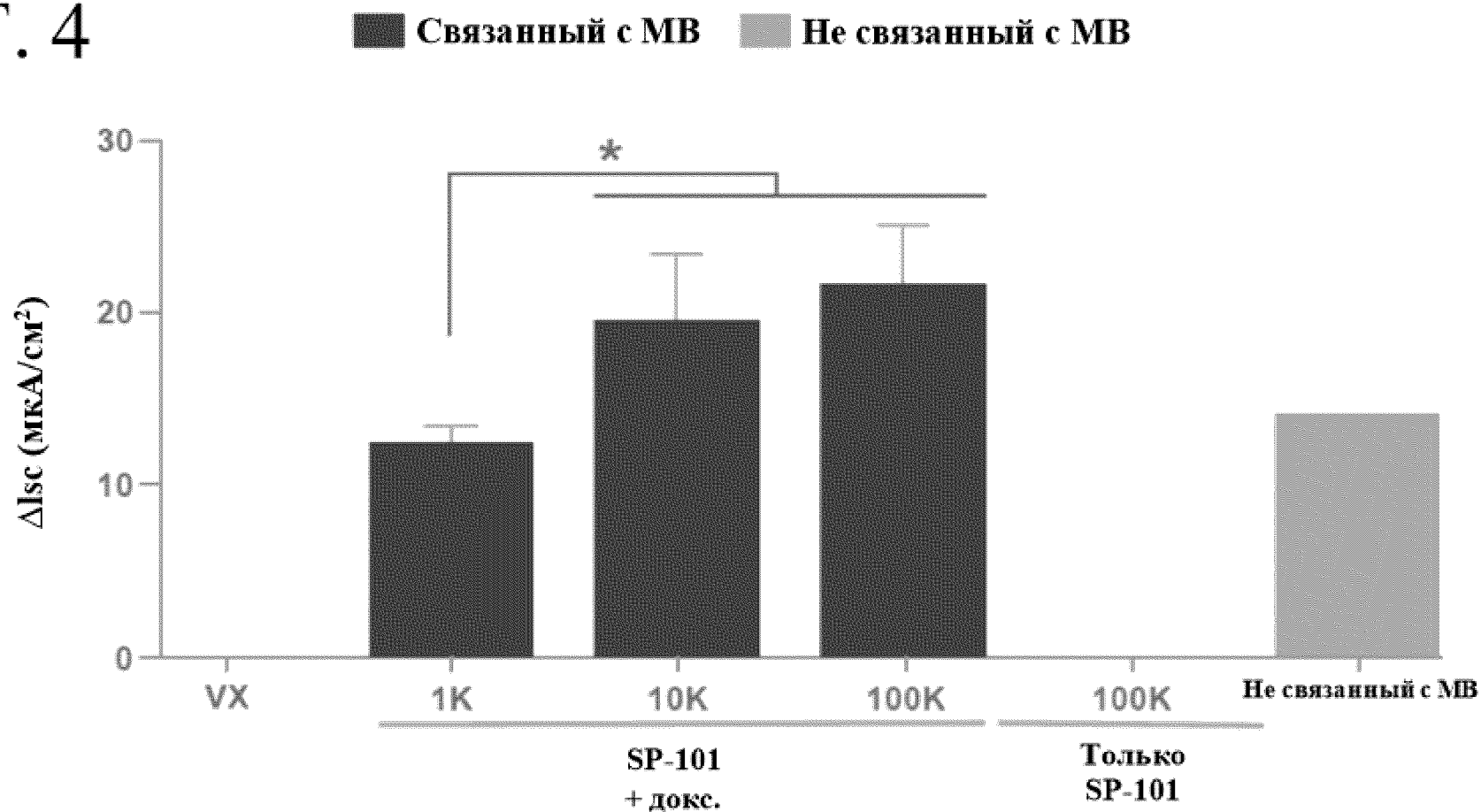


ФИГ. 3В

Клетки, не связанные с МВ



ФИГ. 4

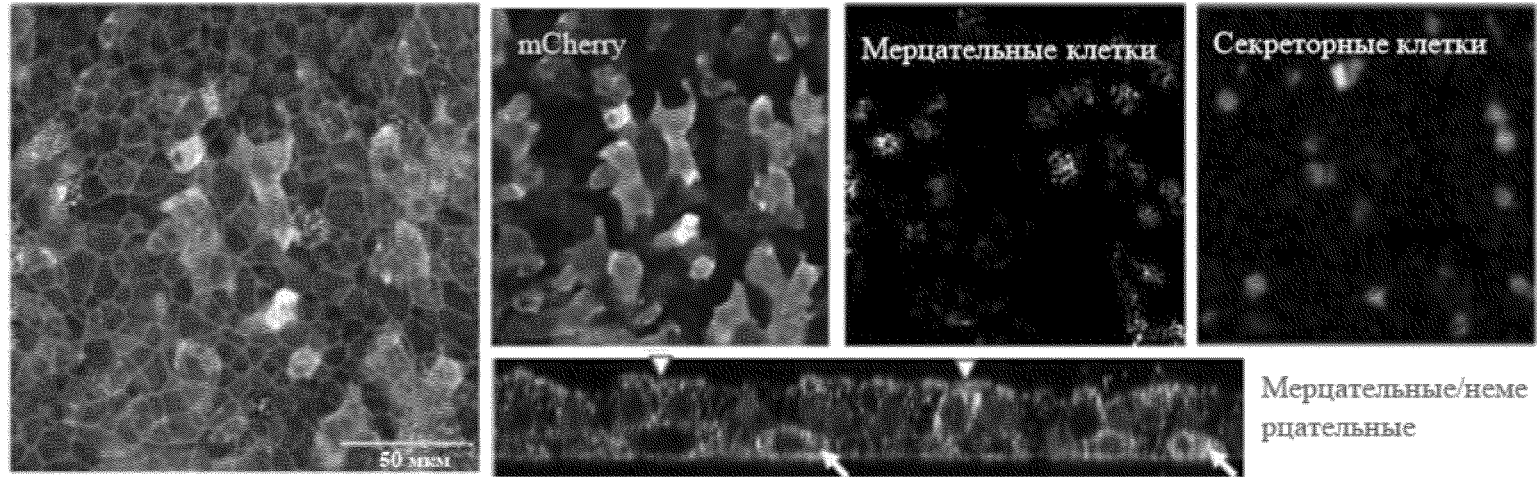


5/17

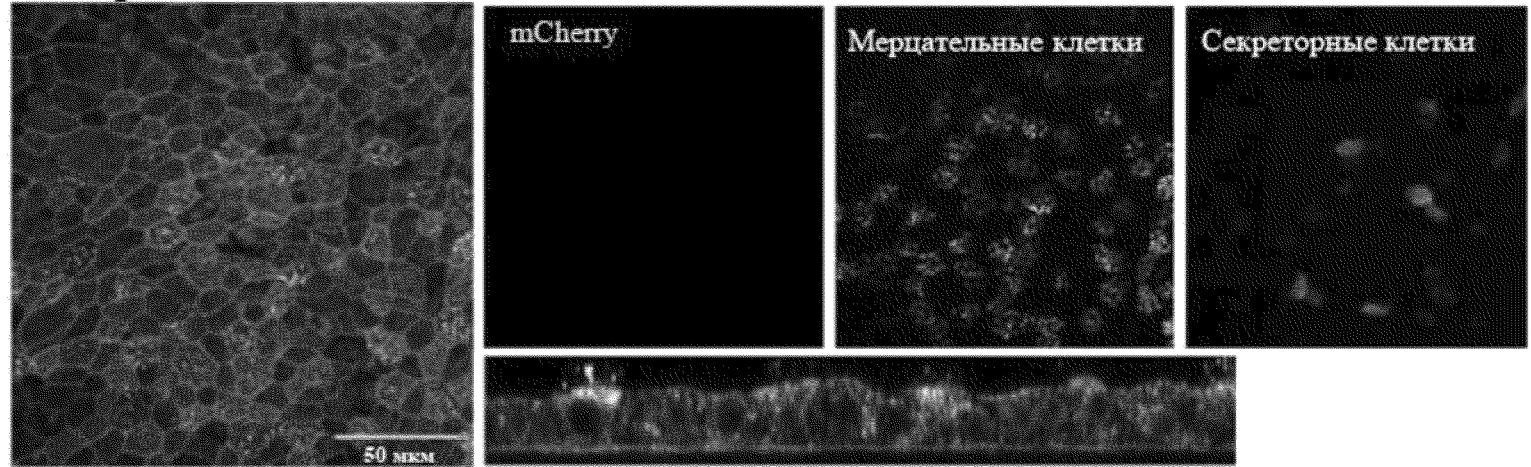
*p < 0,05
Тройные модуляторы VX - CFTR VX-770/661/445

ФИГ. 5

Капсидный репортер SP-101 (mCherry)



Контроль



mCherry

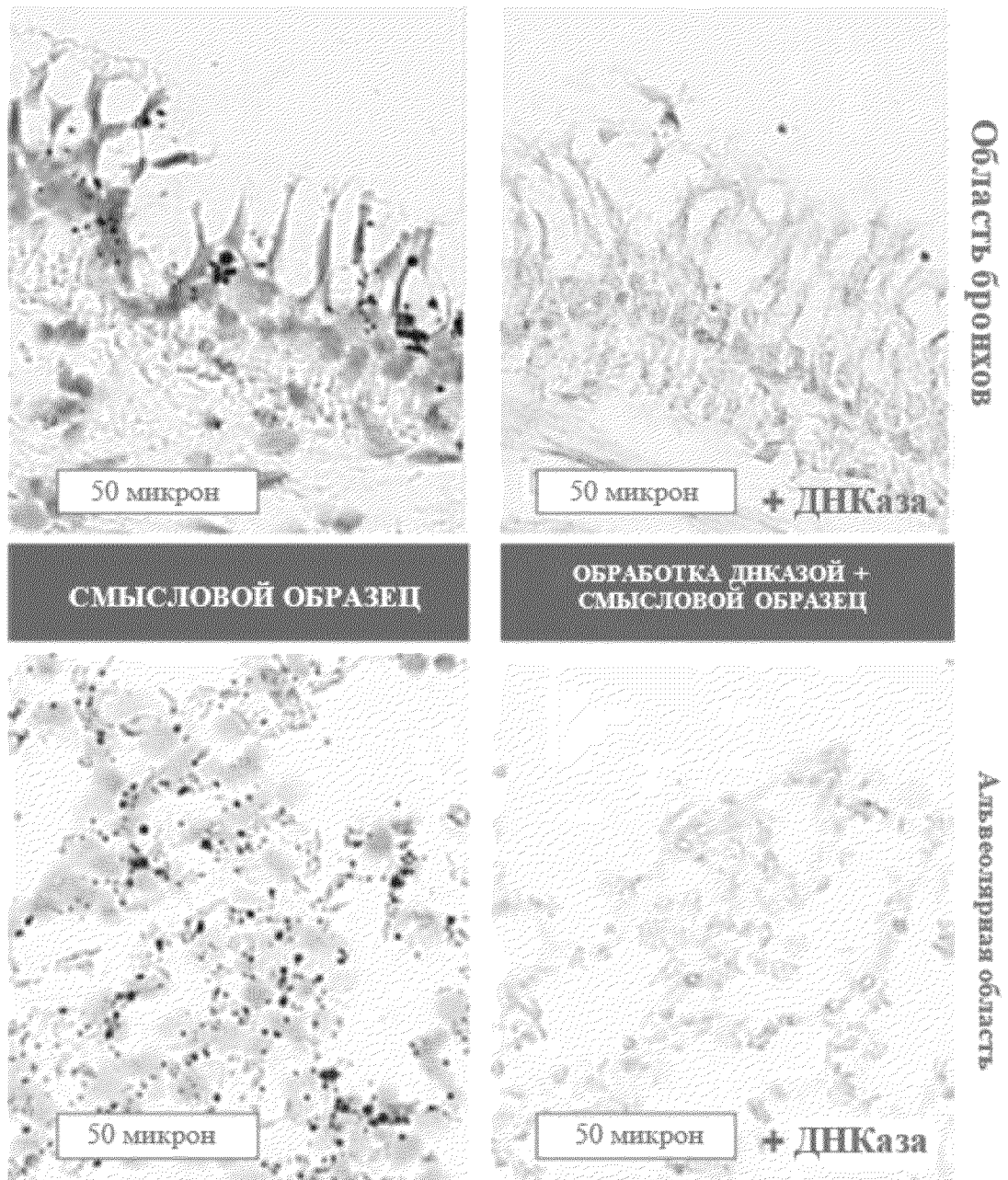
α -тубулин

MUC5AC

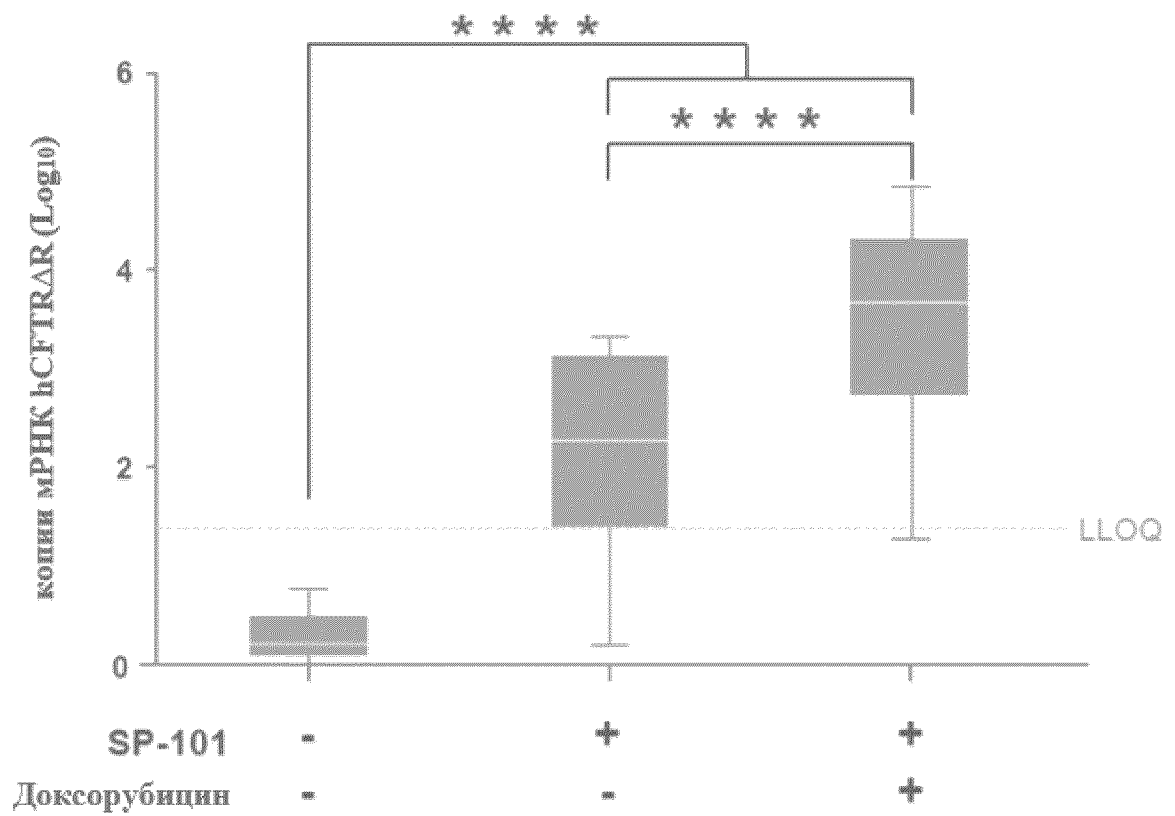
Hoechst

Фаллоидин

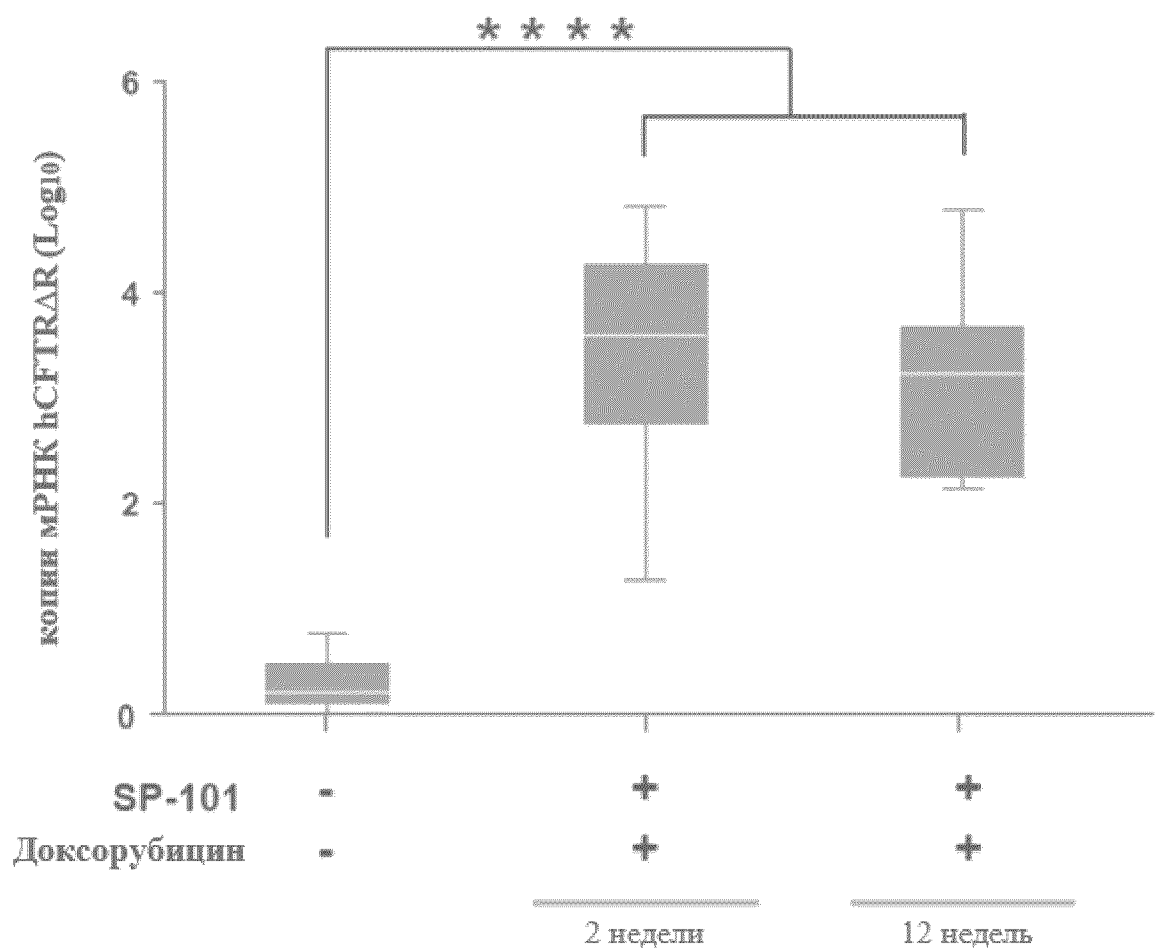
ФИГ. 6



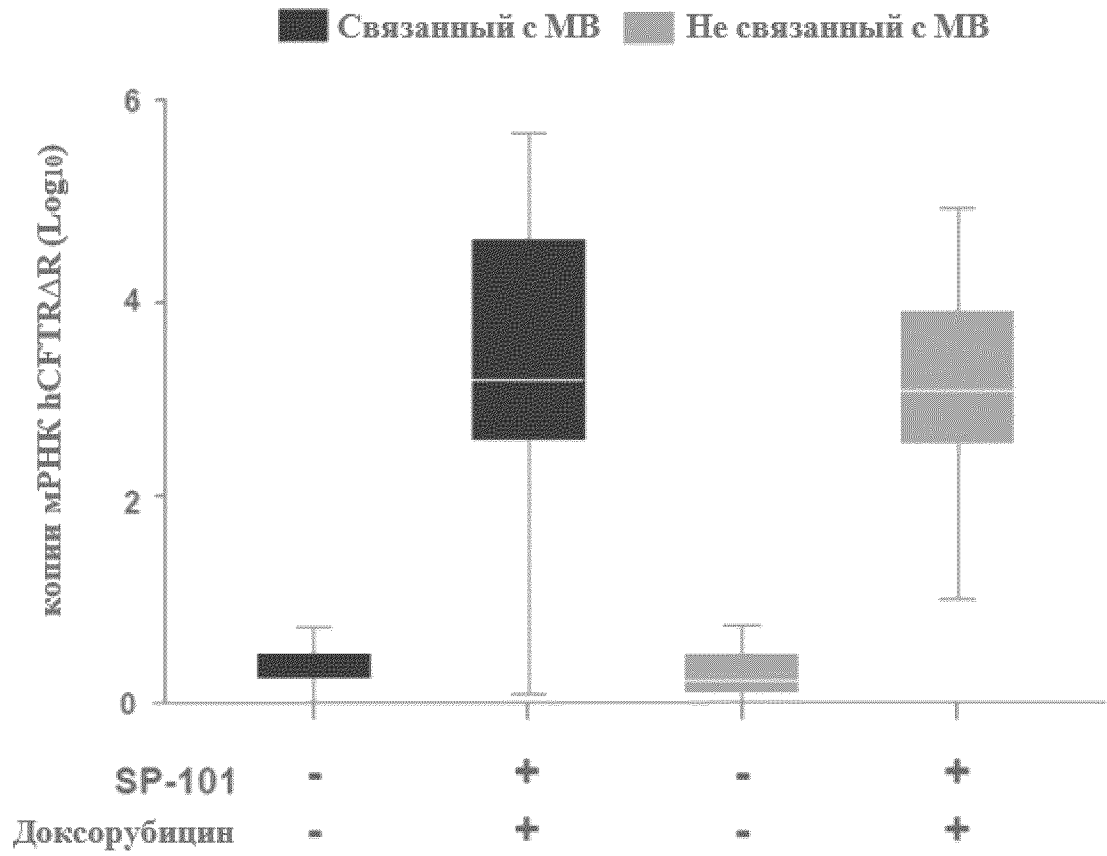
ФИГ. 7



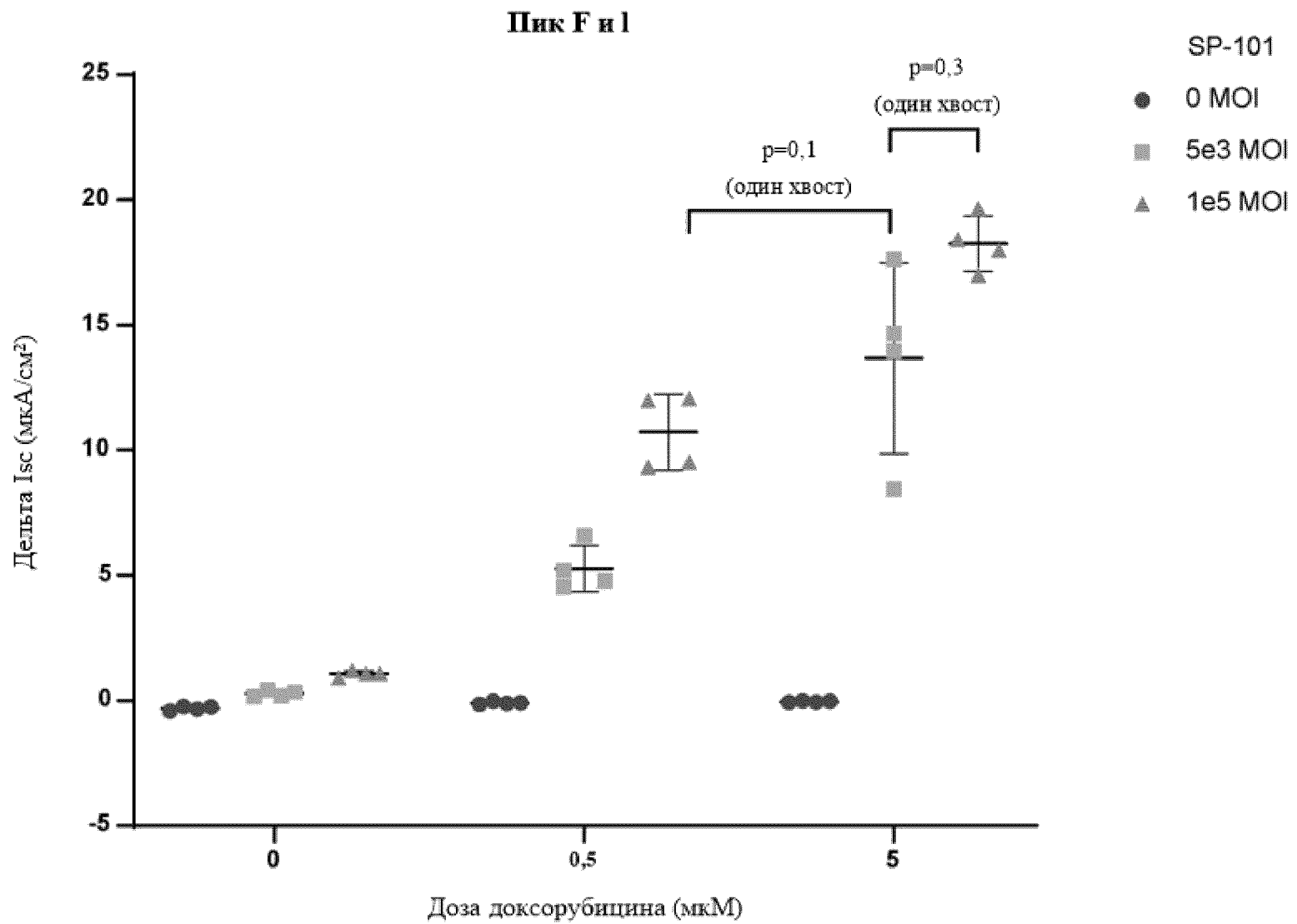
ФИГ. 8



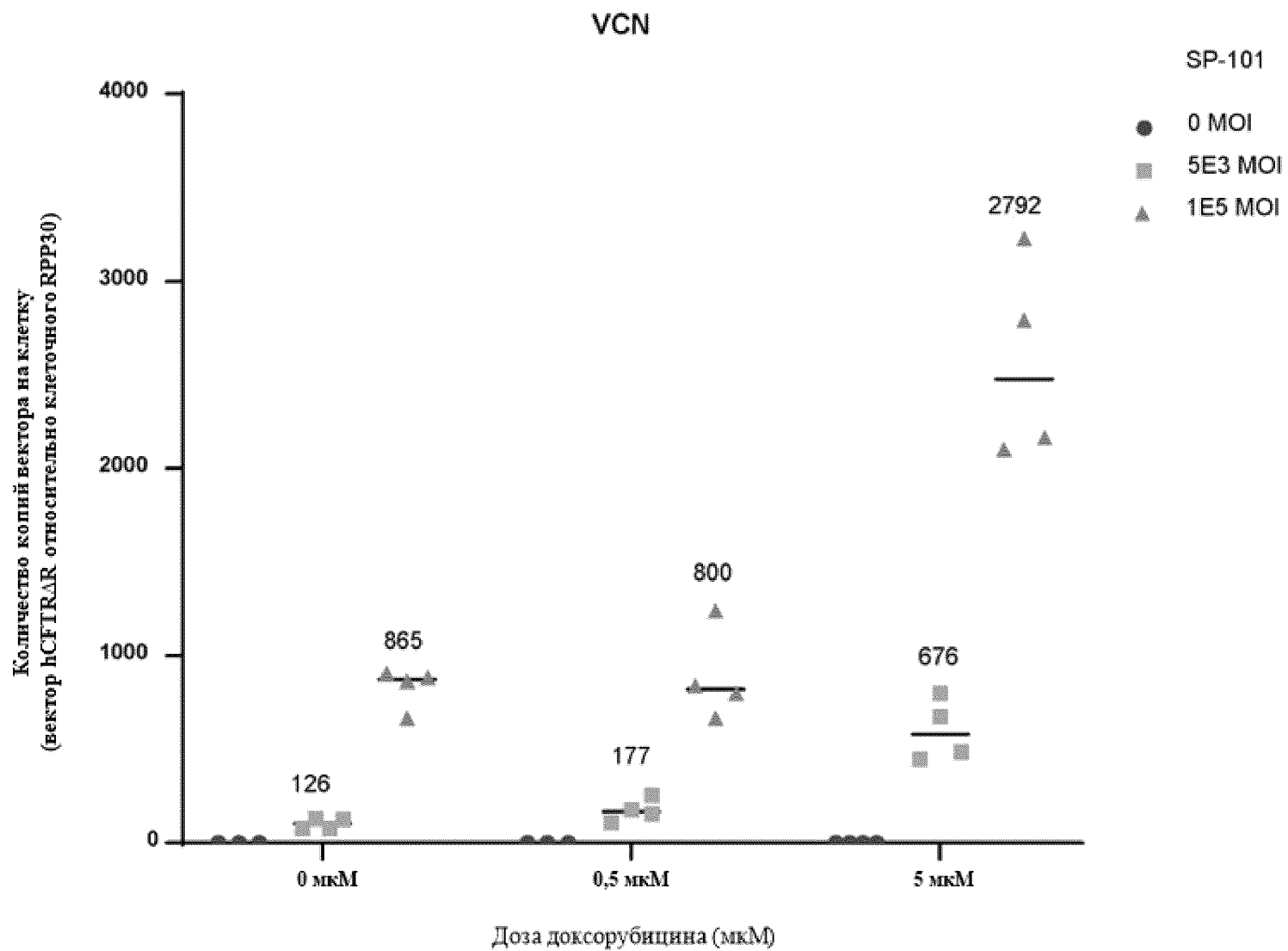
ФИГ. 9



ФИГ. 10

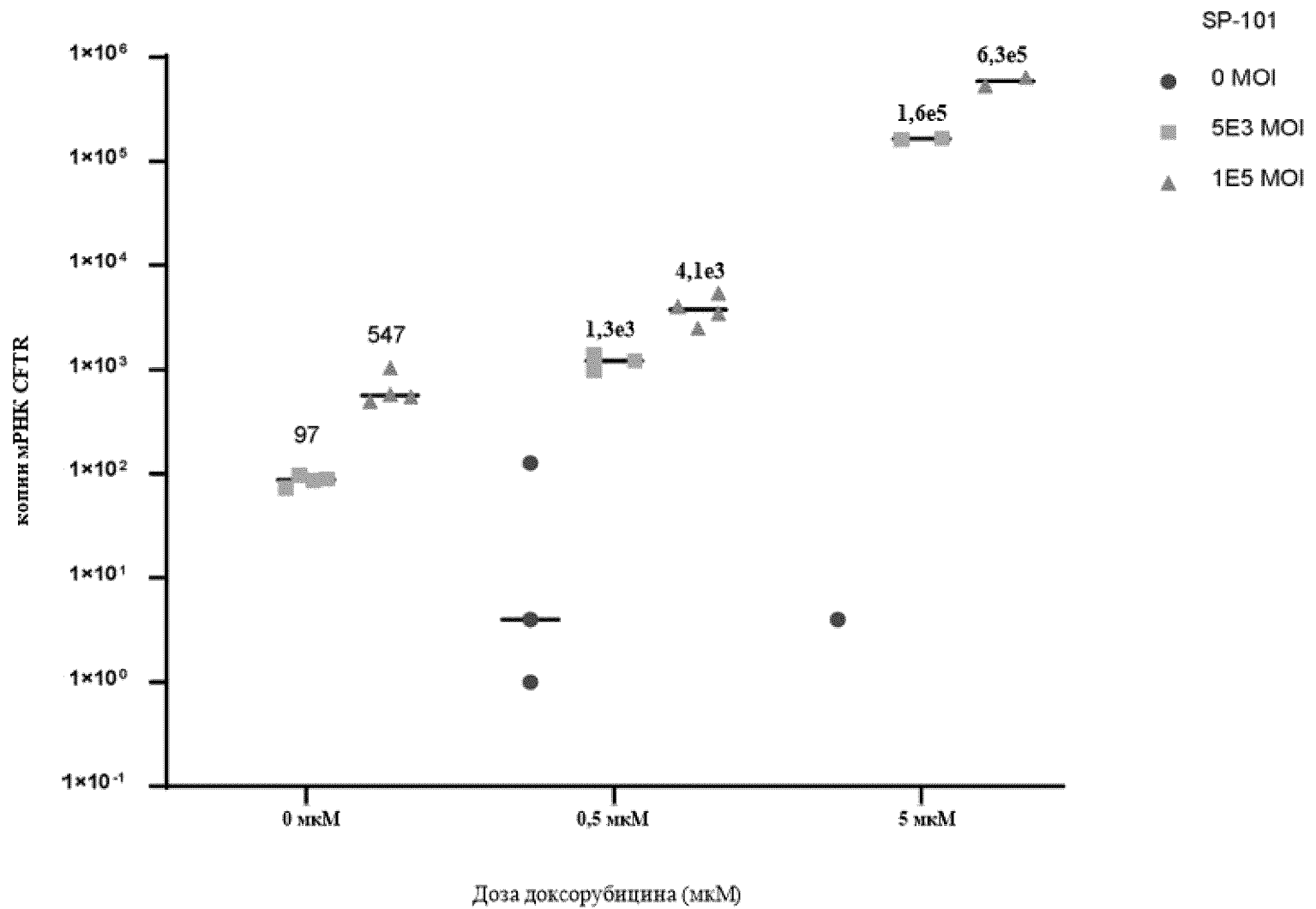


ФИГ. 11

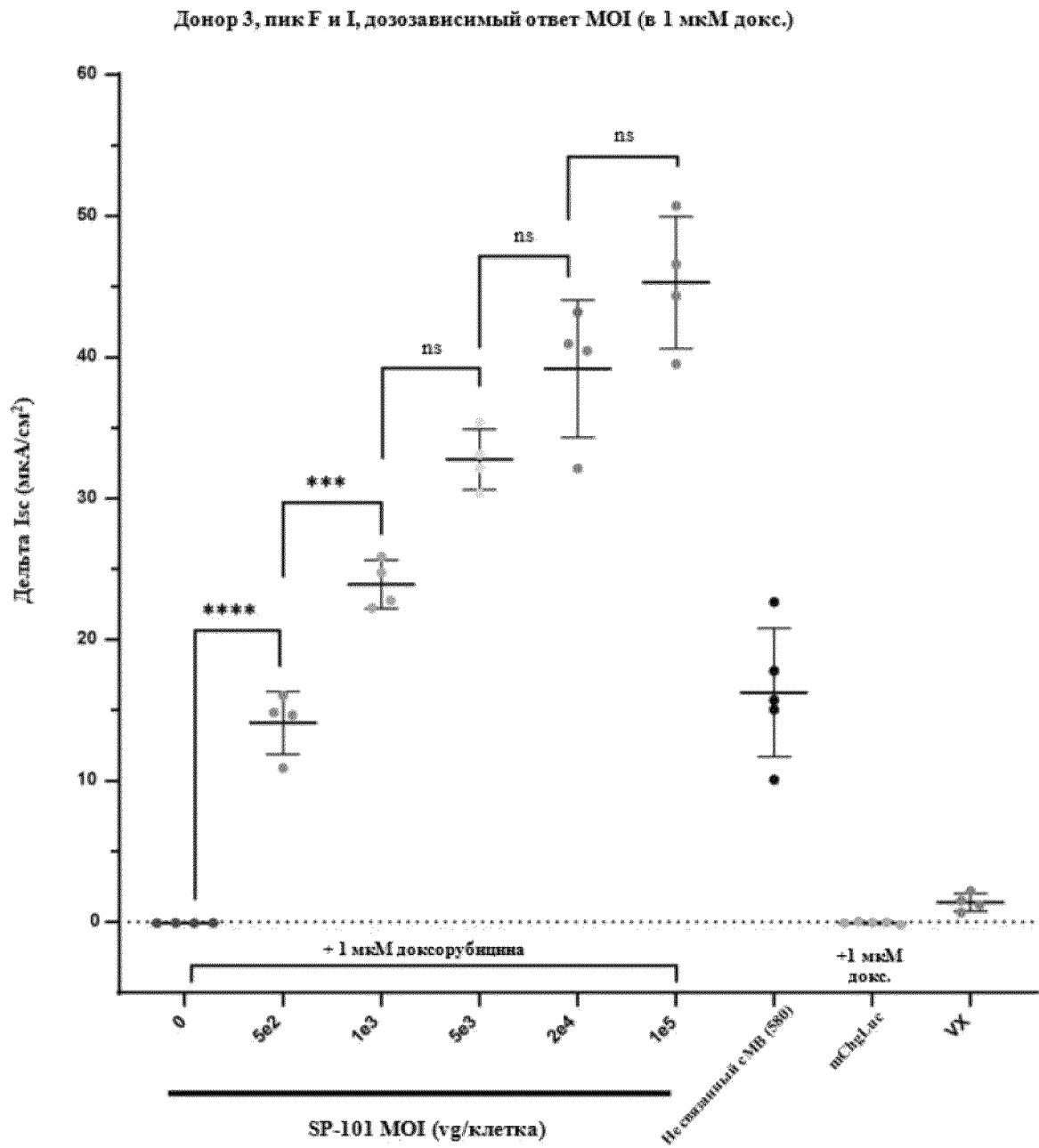


ФИГ. 12

Абсолютное количественное определение докс. по сравнению с MOI (мРНК)

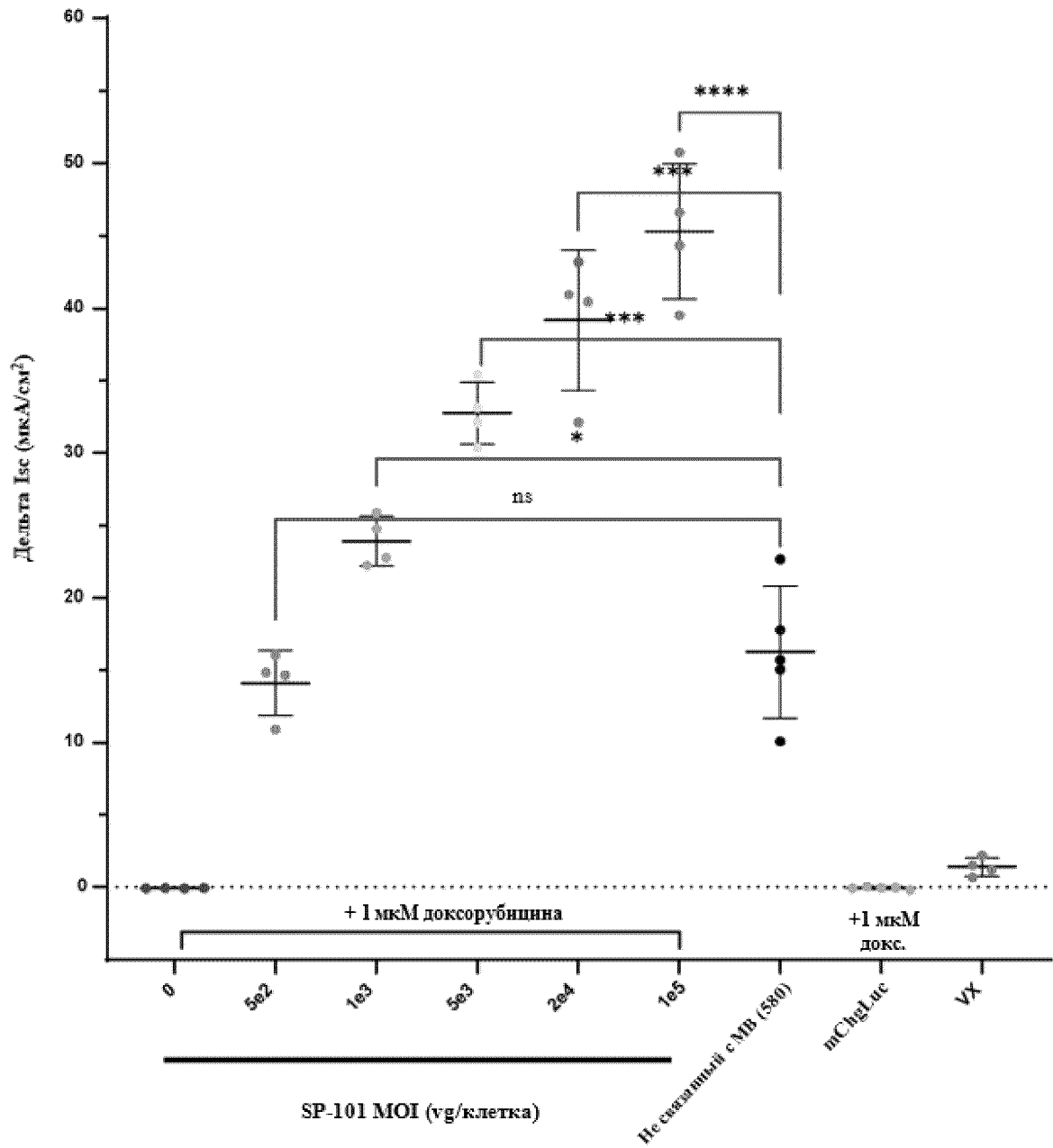


ФИГ. 13

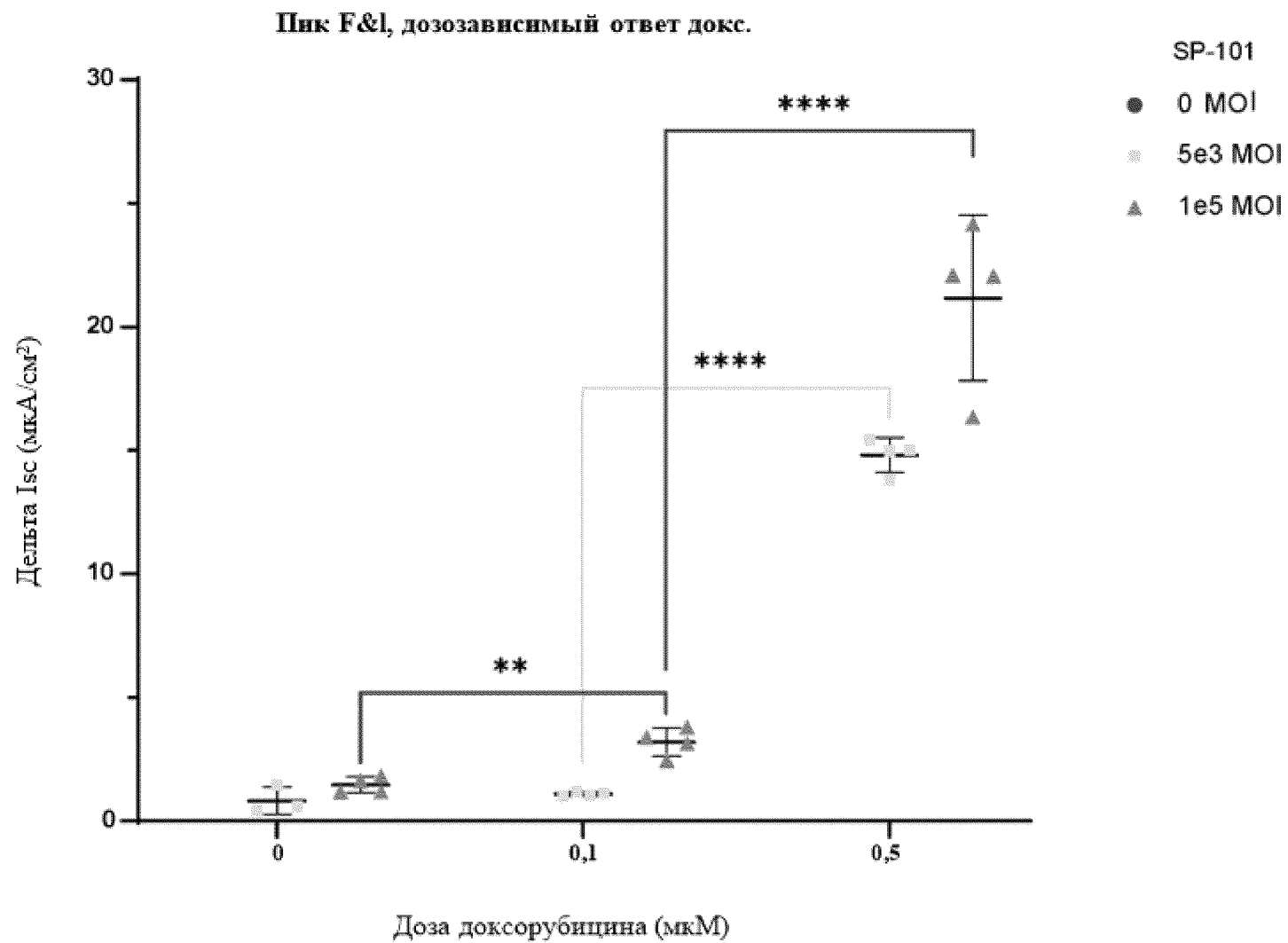


ФИГ. 14

Донор 3, пик F и I, дозозависимый ответ MOI (в 1 мкМ докс.)



ФИГ. 15



ФИГ. 16

