

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048149**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.30
- (21) Номер заявки
202490528
- (22) Дата подачи заявки
2022.08.21
- (51) Int. Cl. **C07K 14/075** (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) **ВЫДЕЛЕННЫЙ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ БЕЛОК VP1 КАПСИДА
АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА 5 СЕРОТИПА (AAV5), КАПСИД И ВЕКТОР
НА ЕГО ОСНОВЕ**

- (31) **2021124727**
- (32) **2021.08.20**
- (33) **RU**
- (43) **2024.04.19**
- (86) **PCT/RU2022/050257**
- (87) **WO 2023/022633 2023.02.23**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"БИОКАД" (RU)**
- (56) **RU-A1-2019126509**
US-A1-20070238684
US-A1-20150023924
US-A1-20160201088
**NASO Michael F. et al. Adeno-Associated
Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. BioDrugs,
2017, v. 31 (4): 317-doi: 10.1007/S40259-017-0234-5**
- (72) Изобретатель:
**Стрелкова Анна Николаевна,
Легоцкий Сергей Александрович,
Шугаева Татьяна Евгеньевна,
Гершович Павел Михайлович,
Прокофьев Александр Владимирович,
Перепелкина Мария Павловна,
Яковлев Павел Андреевич, Морозов
Дмитрий Валентинович (RU)**
- (74) Представитель:
Мельчаева О.А. (RU)

- (57) Изобретение относится к области генной терапии и молекулярной биологии. Более конкретно, изобретение относится к выделенному модифицированному белку VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), который содержит одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с белком VP1 капсида AAV5 дикого типа, которые повышают эффективность трансдукции, повышают эффективность упаковки вирусных геномов AAV препаратами на основе гAAV5, а также повышают эффективность продукции (сборки) вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), капсиду и вектору на основе вышеуказанного VP1, а также к их применению.

B1

048149

048149

B1

Область техники

Изобретение относится к области генной терапии и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенному модифицированному белку VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), который содержит одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с белком VP1 капсида AAV5 дикого типа, которые повышают эффективность трансдукции, повышают эффективность упаковки вирусных геномов AAV препаратами на основе rAAV5, а также повышают эффективность продукции (сборки) вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), капсиду и вектору на основе вышеуказанного VP1, а также к их применению.

Уровень техники

Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой небольшой (25 нм), неспособный к самостоятельной репликации, безоболочечный вирус. У человека и приматов описано множество различных серотипов AAV. Геном аденоассоциированного вируса содержит (+ или -) одноцепочечную ДНК (ssDNA) длиной около 4,7 тысяч нуклеотидов. На концах молекулы геномной ДНК располагаются инвертированные концевые повторы (англ. inverted terminal repeats, ITRs). Геном содержит две открытые рамки считывания (англ. ORF): Rep и Cap, содержащие в себе несколько альтернативных рамок считывания, кодирующих различные белковые продукты. Продукты Rep имеют важное значение для репликации AAV, при этом ген Cap, помимо других альтернативных продуктов, кодирует 3 капсидных белка (VP1, VP2 и VP3). Белки VP1, VP2 и VP3 находятся в соотношении 1:1:10, образуя икосаэдрический капсид (Xie Q. et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:10405-10410). При образовании рекомбинантного вектора AAV (rAAV) кассета экспрессии, фланкированная ITR, упаковывается в капсид AAV. Гены, необходимые для репликации AAV, не входят в кассету. Рекомбинантный AAV считается самым безопасным и одним из наиболее широко используемых вирусных векторов для переноса генов *in vivo*. Векторы могут инфицировать клетки множества типов тканей, обеспечивая эффективную и устойчивую экспрессию трансгена. Они также являются непатогенными и имеют низкий профиль иммуногенности (High KA et al., "rAAV human trial experience" Methods Mol Biol. 2011; 807:429-57).

Одной из насущных целей исследований в области разработки эффективной генотерапии является оптимизация векторов для улучшения тех или иных свойств данных векторов.

Известно, что различные серотипы AAV характеризуются сродством к различным рецепторам на поверхности клеток-хозяев, к которым они обладают тропизмом. Так основным известным рецептором для AAV2 является гепарансульфат-протеогликан, корецепторами выступают интегриновый гетеродимер $\alpha\beta 5$, рецептор фактора роста фибробластов первого типа и рецептор фактора роста гепатоцитов, с-Met. AAV12 связывается с гепарансульфат-протеогликанами и сиаловой кислотой. AAV4 и AAV5 связываются с N- и O-связанными сиаловыми кислотами соответственно. AAV5 задействует рецептор фактора роста тромбоцитов. При этом установлена связь между аминокислотной последовательностью белков капсида AAV с процессом его сборки, инкапсидирования генома и сродством к различным типам рецепторов, репрезентированных на поверхности клеток-хозяев (Govindasamy L. et. al. Structural insights into adeno-associated virus serotype 5. J Virol. 2013 Oct; 87(20):11187-99).

В международной заявке WO 2012145601 описаны вирионы аденоассоциированного вируса (AAV) с вариантным капсидным белком, где вирионы AAV демонстрируют большую инфекционность ретинальных клеток, когда вводятся интравитреальной инъекцией, по сравнению с AAV дикого типа.

В международной заявке WO 2013158879 описан вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей капсидный белок VP1, который содержит одну или несколько замен лизина, где одна замена лизина представляет K137R, где упомянутая замена лизина является эффективной для ингибирования убиквитинилирования упомянутого капсидного белка, и тем самым увеличивается трансдукция упомянутого вектора AAV в клетке-мишени.

На данный момент существует потребность в AAV с улучшенными свойствами по сравнению с AAV дикого типа, например, которые обладают увеличенной трансдуцирующей способностью, увеличенной эффективностью упаковки вирусных геномов AAV, а также увеличенной эффективностью наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV). Улучшение тканевой трансдукции позволяет минимизировать дозы вводимого субъекту вектора.

Описание изобретения

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких аминокислотных замен в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа, которые выбраны из группы

G226V,
S2A, G226V и T711S,
T614A,
S2A, T614A и T711S,
T614V,

S2A, T614V и T711S,

приводит к повышению эффективности трансдукции клеток-мишеней с помощью вектора на основе AAV серотипа 5 с данной(ыми) модификацией(ями) и существенному увеличению эффективности доставки трансгена векторами на основе гAAV с указанными выше мутациями.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких аминокислотных замен в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа, которые выбраны из группы

G226V,

S2A, G226V и T711S,

T614A,

S2A, T614A и T711S,

T614V,

S2A, T614V и T711S,

приводит к повышению эффективности упаковки вирусных геномов AAV препаратами на основе гAAV5.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких аминокислотных замен в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа, которые выбраны из группы

G226V,

S2A, G226V и T711S,

T614A,

S2A, T614A и T711S,

T614V,

S2A, T614V и T711S,

приводит к увеличению продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5) по сравнению со сборкой инкапсидированных вирусных векторов на основе гAAV5 дикого типа (без вышеуказанных мутаций), то есть при сборке инкапсидированных вирусных векторов на основе гAAV5, содержащих вышеуказанные модификации в капсиде AAV5, получают вирусные вектора на основе гAAV5, которые содержат трансген (инкапсидированную гетерологичную нуклеиновую кислоту), значительно чаще, чем при сборке инкапсидированных вирусных векторов на основе гAAV5 дикого типа (без вышеуказанных мутаций).

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному модифицированному белку VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), который содержит аминокислотную последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа, кодируемую геном Cap, с одной или несколькими заменами, которые выбраны из группы

G226V,

S2A, G226V и T711S,

T614A,

S2A, T614A и T711S,

T614V,

S2A, T614V и T711S,

где аминокислотная последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замену в положении G226V.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замены S2A, G226V и T711S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замену T614A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замены S2A, T614A и T711S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замену T614V.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

- 1) любой из вышеуказанных модифицированных белков VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа или любой из вышеуказанных капсидов, и
- 2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор на основе гAAV5 включает гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, где продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, которая содержит:

- a) любой из вышеуказанных векторов на основе гAAV5; и
- b) фармацевтически приемлемый эксципиент.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, который включает введение субъекту любого из вышеуказанных векторов на основе гAAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных векторов на основе гAAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

В некоторых вариантах осуществления применения применения заболевание выбирают из группы: заболевания крови; заболевания центральной нервной системы; заболевания метаболизма; заболевания мышц; наследственные заболевания.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения любого из вышеуказанных векторов на основе гAAV5, который включает трансфекцию клеток-продуцентов, соответственно, любой из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которые содержат последовательность, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), или вышеуказанной нуклеиновой кислотой, кодирующей капсид.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой кольцевую схему плазмиды рAAV-linker, предназначенной для клонирования библиотек случайных вариантов гена капсида AAV девятого серотипа.

GFP - последовательность, кодирующая зеленый флуоресцентный белок,

PolyA - сигнал полиаденилирования,

ITR - инвертированный концевой повтор аденоассоциированного вируса,

T2A - последовательность, кодирующая пептид способный к самовырезанию из полипептидной цепи получен от вируса *thossea asigna*,

HBG intron - интрон бета-глобина человека,

CMV promoter - промотор цитомегаловируса человека,

AmpR - последовательность гена бета-лактамазы обеспечивающая устойчивость *E.coli* к ампицилину,

pUC origin - высококопийный ориджин репликации бактерий.

Фиг. 2 представляет собой кольцевую схему плазмиды рAAV-GFP.

EGFP - последовательность кодирующая модифицированный зеленый флуоресцентный белок,

PolyA - сигнал полиаденилирования,

ITR - инвертированный концевой повтор аденоассоциированного вируса,

HBG intron - интрон бета-глобина человека,

CMV promoter - промотор цитомегаловируса человека,

AmpR - последовательность гена бета-лактамазы обеспечивающая устойчивость *E.coli* к ампицилину,

pUC origin - высококопийный ориджин репликации бактерий.

Фиг. 3 представляет собой кольцевую схему плазмиды рAAV-Rep, предназначенной для наработки рекомбинантных вирусных препаратов дикого типа AAV пятого серотипа из библиотеки случайных вариантов.

AmpR - последовательность гена бета-лактамазы обеспечивающая устойчивость *E.coli* к ампицилину,

pUC origin - высококопийный ориджин репликации бактерий,

AAV Rep genes - последовательность кодирующая белки Rep, необходимые для жизненного цикла вируса.

Фиг. 4 представляет собой кольцевую схему плазмиды рHelper, предназначенной для наработки рекомбинантных вирусных препаратов дикого типа AAV пятого серотипа из библиотеки случайных вариантов.

AmpR - ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину,

Ori - ориджин репликации в бактериях,

Adeno E2A - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК,

Adeno E4 - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК,

Adeno VARNA - последовательность гена хелперного аденовируса, отвечающая за стимуляцию трансляции как ранних, так и поздних вирусных генов.

Фиг. 5 представляет собой график, который показывает анализ эффективности трансдукции клеток CHO-K1-S вирусными препаратами на основе rAAV5-GFP с мутациями в последовательности белка VP1 при использовании различных MOI (вирусных геномов на клетку).

AAV5-01Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A и T711S.

AAV5-02Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями T614V, S2A и T711S.

AAV5-03Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями T614A, S2A и T711S.

AAV5-04Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями G226V, S2A и T711S.

AAV5-NullMut-GFP обозначает вектор на основе аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающий белок VP1 капсида AAV5 дикого типа.

Фиг. 6 представляет собой схему расположения гибридизации зондов на векторном геноме.

Probe 1 - точка детекции участка оцДНК, на последовательности непосредственно у 3' ITR минус цепи ДНК.

Probe 3 - точка детекции участка оцДНК, который располагается на середине экспрессионной каскады минус цепи (~2400-2500 по) ДНК.

Probe 5 - точка детекции участка оцДНК, который располагается непосредственно у 5' ITR минус цепи ДНК.

Probe 2 - точка детекции участка оцДНК, который располагается непосредственно у 5' ITR плюс цепи ДНК.

Probe 4 - точка детекции участка оцДНК, который располагается на середине экспрессионной каскады плюс цепи (~2400-2500 по) ДНК.

Probe 6 - точка детекции участка оцДНК, который располагается непосредственно у 3' ITR плюс цепи ДНК.

Фиг. 7 представляет собой данные Саузерн блот гибридизации векторной ДНК.

pDNA-GFP - Стандартный образец, двукратное серийное разведение стандартной плазмидной ДНК rAAV-GFP.

vgDNA-NullMut-GFP - Контрольный образец, двукратное серийное разведение векторной геномной ДНК экстрагированной из контрольного препарата rAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа.

vgDNA-02Mut-GFP - Двукратное серийное разведение векторной геномной ДНК экстрагированной из препарата rAAV5 с белком VP1 капсида, содержащего мутации S2A, T614V и T711S.

vgDNA-04Mut-GFP - Двукратное серийное разведение векторной геномной ДНК экстрагированной из препарата rAAV5 с белком VP1 капсида, содержащего мутации S2A, G226V и T711S.

Фиг. 8 представляет собой схему положения структурных белков капсида AAV5 в аминокислотной последовательности гена Cap.

1-725 ак-VP1

137-725 ак-VP2

193-725 ак-VP3

Фиг. 9 представляет собой график, который показывает анализ эффективности наработки векторов на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5).

AAV5-01Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A и T711S.

AAV5-02Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями T614V, S2A и T711S.

AAV5-03Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями T614A, S2A и T711S.

AAV5-04Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями G226V, S2A и T711S.

AAV5-NullMut-GFP обозначает вектор на основе аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающий белок VP1 капсида AAV5 дикого типа.

Vg/ml кж обозначает количество вирусных геномов на 1 мл культуральной жидкости.

Определения и общие методы.

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии и химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

"Выделенный" означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, в природе присутствующие в живых организмах, не являются "выделенными", но те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от материалов, сопутствующих им в их природном состоянии, являются "выделенными". Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать, по существу, в очищенной форме или могут существовать в неприродном окружении, таком как, например, генетически модифицированной клетке.

Определения "встречающийся в природе", "нативный" или "дикого типа" используют для описания объекта, который можно обнаружить в природе как отличающийся от получаемого искусственно. Например, белок или нуклеотидная последовательность, присутствующие в организме (включая вирус), которые можно изолировать из источника в природе, и которые не модифицированы умышленно специалистом в лаборатории, являются встречающимися в природе.

Термин "геном" относится к полному генетическому материалу организма.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова "включать" и "содержать" или их вариации, такие как "включает", "включающий", "содержит" или "содержащий", следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Белок (пептид).

В настоящем описании термины "пептид", "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемо, и они относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не существует ограничений по максимальному количеству аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как применяют в настоящем описании, термин относится и к коротким цепям, также общепринято обозначаемым в этой области, например, как пептиды, олигопептиды и олигомеры, и к более длинным цепям, как правило, обозначаемым в этой области как белки, множество типов которых существует. "Полипептиды" включают, помимо прочего, например, биологически активные фрагменты, по существу, гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитные белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинацию.

Молекулы нуклеиновых кислот.

Термины "нуклеиновая кислота", "нуклеиновая последовательность" или "нуклеиновокислотная последовательность", "полинуклеотид", "олигонуклеотид", "полинуклеотидная последовательность" и "нуклеотидная последовательность", которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Как применяют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, в качестве неограничивающих примеров, все последовательности нуклеиновой кислоты, получаемые любыми способами, доступными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки, использование обычной технологии клонирования и ПНР и т.п., и способами синтеза.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

Термин нуклеотидная последовательность охватывает его комплемент, если не указано иное. Таким образом, нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

Аденоассоциированный вирус (AAV).

Вирусы семейства Parvoviridae представляют собой небольшие ДНК-содержащие вирусы животных. Семейство Parvoviridae может быть разделено на два подсемейства: Parvovirinae, представители которого инфицируют позвоночных животных, и Densovirinae, представители которого инфицируют насекомых. К 2006 году были описаны 11 серотипов аденоассоциированного вируса (Mori, S. et al., 2004, "Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein", *Virology*, Т. 330 (2): 375-83). В 2008 году был описан 12 серотип аденоассоциированного вируса (Michael Schmidt et al., Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity, *J Virol.* 2008 Feb; 82(3):1399-406. doi: 10.1128/JVI.02012-07). Все известные серотипы могут инфицировать клетки многих видов тканей. Тканевая специфичность определяется серотипом белков капсида, поэтому векторы на основе аденоассоциированного вируса конструируют, задавая необходимый серотип. Дополнительная информация по парвовирусам и другим представителям Parvoviridae описана в литературе (Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication", Chapter 69 in *Fields Virology* (3d Ed. 1996)). Геномная организация всех известных серотипов AAV очень сходна. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, которая содержит менее чем примерно 5000 нуклеотидов (нт) в длину. Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности белков (Rep), необходимых для обеспечения жизненного цикла вируса, а также последовательности перекрывающихся белков капсида (Cap). Ген Cap кодирует белки VP (VP1, VP2 и VP3), которые образуют капсид, а также белки AAP (белок, активирующий сборку аденоассоциированного вируса (AAV) Sonntag F, Köther K., Schmidt K., et al. The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes. *J Virol.* 2011; 85(23):12686-12697. doi:10.1128/JVI.05359-11) и МААР (вспомогательный белок связывания с мембраной Ogdén P.J., Kelsic E.D., Sinai S., Church G.M. Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. *Science.* 2019;366(6469): 1139-1143. doi: 10.1126/science. aaw2900). Фланкирующие последовательности генома AAV длиной в 145 нуклеотидов являются самокомплементарными и организованы таким образом, что может быть сформирован энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильчатую структуру. Такие шпильчатые структуры функционируют как точки начала репликации ДНК вируса, являясь праймерами для клеточного ДНК-полимеразного комплекса. После инфекции клеток млекопитающих AAV дикого типа (wtAAV) гены Rep (например, Rep78 и Rep52) экспрессируются с помощью P5 промотора и P19 промотора, соответственно, и оба белка Rep выполняют определенную функцию в репликации генома вируса. Сплайсинг в открытой рамке считывания Rep (Rep ORF) приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (например, Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Однако было показано, что несплайсированная мРНК, кодирующая белки Rep78 и Rep52, является достаточной для продукции вектора AAV в клетках млекопитающих.

Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

Термин "вектор" при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. Кроме того, термин "вектор" в данном настоящем документе означает вирусную частицу, способную транспортировать нуклеиновую кислоту.

Как применяют в настоящем описании, термин "экспрессия" определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности, запускаемую ее промотором.

Применение.

"Генная терапия" представляет собой вставку генов в клетки и/или ткани субъекта для лечения заболевания, обычно, наследственных заболеваний, при этом дефектный мутантный аллель заменяется или дополняется функциональным аллелем.

"Лечить", "лечение" и "терапия" относятся к методу смягчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. Кроме того, содержащиеся в данном документе ссылки на "лечение" включает ссылки на лечебную, паллиативную и профилактическую терапию.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Термин "нарушение" означает любое состояние, которое можно улучшить в результате лечения по настоящему изобретению.

"Заболевание" является состоянием здоровья субъекта, где субъект не может поддерживать гомеостаз, и где, если заболевание не облегчают, то здоровье субъекта продолжает ухудшаться.

Термин "субъект", "пациент", "индивидуум" и т.п. используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к любому животному, которое поддается воздействию способами, представленными в настоящем описании. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления субъект, пациент или индивидуум является человеком. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Подробное описание изобретения

Выделенной модифицированной белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному модифицированному белку VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), который содержит аминокислотную последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа, кодируемую геном Cap, с одной или несколькими заменами, которые выбраны из группы

G226V,
S2A, G226V и T711S,
T614A,
S2A, T614A и T711S,
T614V,
S2A, T614V и T711S,

где аминокислотная последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, представленную

```
MSFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLAEGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNGNL
DRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLAADTSFGGNLKG
AVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG
SQQLQIPAPASSLGADTMSAGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVV
TKSTRTWVLP SYN NHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDW
QRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVDQDSTTTIANLNTSTVQVFTDDDYQLPYVVG
NGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY
NFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW
FPGPMGRQTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY
ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
ATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGANFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLI
KNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNDPQ
FVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 1).
```

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замену в положении G226V.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

```
MSFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLAEGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNGNL
DRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLAADTSFGGNLKG
```

AVFQAKKRVLEPFGLVEEAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG
 SQQQLIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMVDRVV
 TKSTRTWVLPSPYNNHQYREIKSGSVSDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDW
 QRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVTVDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVG
 NGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY
 NFEEVPFHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW
 FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY
 ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
 ATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLGPIWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPMMLI
 KNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQ
 FVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 3).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замены S2A, G226V и T711S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

MAFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNGG
 LDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGNLGK
 AVFQAKKRVLEPFGLVEEAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG
 SQQQLIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMVDRVV
 TKSTRTWVLPSPYNNHQYREIKSGSVSDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDW
 QRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVTVDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVG
 NGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY
 NFEEVPFHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW
 FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY
 ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
 ATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLGPIWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPMMLI
 KNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQ
 FVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 4).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замену T614A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNGGL
 DRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGNLGK
 AVFQAKKRVLEPFGLVEEAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG
 SQQQLIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVV
 TKSTRTWVLPSPYNNHQYREIKSGSVSDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDW
 QRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVTVDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVG
 NGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY
 NFEEVPFHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW
 FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY
 ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
 ATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLGPIWAKIPEAGAHFHPSPAMGGFGLKHPPMMLI
 KNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQ
 FVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замены S2A, T614A и T711S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

MAFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLGAEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNG
LDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGNLGK
AVFQAKKRVLPEFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG
SQQLQIPAPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVV
TKSTRTWVLPSSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDW
QRLINNYWGFPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVG
NGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY
NFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW
FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY
ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
ATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPEAGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLI
KNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQ
FVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замену T614V.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

MSFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLGAEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNG
DRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGNLGK
AVFQAKKRVLPEFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG
SQQLQIPAPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVV
TKSTRTWVLPSSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDW
QRLINNYWGFPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVG
NGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY
NFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW
FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY
ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
ATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPEVGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLI
KNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQ
FVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 7).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 включает замены S2A, T614V и T711S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 имеет аминокислотную последовательность, представленную

MAFVDHPPDWLEEVGEGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLPGNG
LDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSTFGGNLKG
AVFQAKKRVLPEFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG
SQQLQIPAPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVV
TKSTRTWVLPSTNNHQYREIKSGSVSDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDW
QRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANLNTSTVQVFTDDDYQLPYVVG
NGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY
NFEEVPFHSSFAPSQNLFLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW
FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY
ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
ATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPEVGAHFHPSAMGGFGLKHPPPMMLI
KNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPFIQYTNNDPQ
VFDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 8).

Выделенные модифицированные белки VP2 и VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5).

"Правая часть" (+)-цепи геномной ДНК аденоассоциированного вируса содержит перекрывающиеся последовательности, кодирующие три белка капсида - VP1, VP2 и VP3.

Транскрипция этих генов начинается с одного промотора, p40. Молекулярная масса соответствующих белков составляет 87, 72 и 62 кДа, соответственно. Все три белка транслируются с одной мРНК. После транскрипции пре-мРНК может подвергаться сплайсингу двумя разными способами, при этом вырезается более длинный или более короткий интрон и образуются мРНК длиной 2300 или 2600 нуклеотидов.

Таким образом, введение мутаций в ген Cap будет влиять не только на белок VP1 капсида AAV5, но и на VP2 и VP3 капсида AAV5.

На фиг. 8 приведено схематичное изображение положения структурных белков капсида AAV5 в последовательности гена Cap AAV:

1-725 ак-VP1
137-725 ак-VP2
193-725 ак-VP3

С учетом перекрывающейся последовательности, кодирующей три белка капсида - VP1, VP2 и VP3, аминокислотная замена T614A в VP1 будет соответствовать:

аминокислотной замене в положении T478A в VP2;
аминокислотной замене в положении T422A в VP3.

С учетом перекрывающейся последовательности, кодирующей три белка капсида - VP1, VP2 и VP3, аминокислотная замена T614V в VP1 будет соответствовать:

аминокислотной замене в положении T478V в VP2;
аминокислотной замене в положении T422V в VP3.

С учетом перекрывающейся последовательности, кодирующей три белка капсида - VP1, VP2 и VP3, аминокислотная замена G226V в VP1 будет соответствовать:

аминокислотной замене в положении G90V в VP2;
аминокислотной замене в положении G34V в VP3.

С учетом перекрывающейся последовательности, кодирующей три белка капсида - VP1, VP2 и VP3, аминокислотная замена S2A в VP1 будет отсутствовать в VP2 и VP3.

С учетом перекрывающейся последовательности, кодирующей три белка капсида - VP1, VP2 и VP3, аминокислотная замена T711S в VP1 будет соответствовать

аминокислотной замене в положении T575S в VP2;
аминокислотной замене в положении T519S в VP3.

Заявитель также считает целесообразным указать окружение найденных мутаций путем указания краткой аминокислотной последовательности, включающей данные мутации в VP1/VP2/VP3:

для T614A в VP1 (T478A в VP2/ T422A в VP3) - IPEAGAHFHP;
для T614V в VP1 (T478V в VP2/ T422V в VP3) - IPEVGAHFHP;
для G226V в VP1 (G90V в VP2/ G34V в VP3) - TWMVDRV;
для S2A в VP1 (отсутствует в VP2 и в VP3) - MAFVDHP;
для T711S в VP1 (T575S в VP2/ T519S в VP3) - EYRSTRP.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены G34V и T519S и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T422A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T422A и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены T422A и T519S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены T422A и T519S и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T422V.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T422V и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены T422V и T519S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный капсид включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены T422V и T519S и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 40.

Выделенная нуклеиновая кислота.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует любой из вышеуказанных модифицированных белков VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа, используемых для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа с аминокислотной заменой G226V, которая представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 11 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой G226V" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 11, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 3. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа с аминокислотными заменами S2A, G226V и T711S и представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 12 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами S2A, G226V и T711S" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 12, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 4. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа с аминокислотной заменой T614A и представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 13 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой T614A" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтерна-

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует модифицированный белок VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой T422V и представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 47 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотной заменой T422V" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 47, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 39. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует модифицированный белок VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами T422V и T519S и представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 48 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

Под "другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность модифицированного белка VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) с аминокислотными заменами T422V и T519S" подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна нуклеиновой последовательности с SEQ ID NO: 48, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать аминокислотную последовательность, раскрытую в данном документе как SEQ ID NO: 40. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вышеуказанный капсид, включает любую из вышеуказанных последовательностей нуклеиновых кислот или их комбинацию.

Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5)

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5) для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

- 1) любой из вышеуказанных модифицированных белков VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) или любой из вышеуказанных капсидов и
- 2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5) для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

- 1) любой из вышеуказанных модифицированных белков VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) и
- 2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5) для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

- 1) любой из вышеуказанных капсидов, и
- 2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

Термины "вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа", "рекомбинантный вирус на основе AAV5", "вирусоподобная частица на основе AAV5", "рекомбинантный вирусный штамм AAV5", "рекомбинантный вектор AAV5" или "вектор на основе rAAV5" в контексте настоящего описания имеют одинаковое значение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор на основе rAAV5 включает гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, где продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.

Вектор на основе rAAV по изобретению не содержит нуклеотидные последовательности генов, ко-

дирующих последовательности белков (Rep), необходимых для обеспечения жизненного цикла вируса, а также последовательности перекрывающихся белков капсида (Cap).

Характеристика капсида подробно описана в вышеуказанном разделе описания.

Под "регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках" подразумевается в рамках данного изобретения полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они клонированы. Регулирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких регулирующих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролирующие последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролирующие последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин "регуляторные последовательности" включает, как минимум, все компоненты, наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, чье присутствие является полезным, например, последовательности лидерных пептидов.

В контексте настоящего описания термин "промотор" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который контролирует транскрипцию одной или нескольких кодирующих последовательностей, а также который структурно идентифицируется по наличию сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и других последовательностей ДНК, включающих, без ограничения, сайты связывания фактора транскрипции, сайты связывания репрессора и активатора белка, а также любые другие последовательности нуклеотидов, известные специалистам в данной области, которые непосредственно или опосредованно регулируют уровень транскрипции с данным промотором. "Конститутивный" промотор представляет собой такой промотор, который активен в большинстве тканей в обычных физиологических условиях и условиях развития. "Индукцибельный" промотор представляет собой промотор, который подвергается физиологической регуляции или регуляции в ходе развития, например, при воздействии химического индуктора. "Тканеспецифичный" промотор активен только в конкретных типах тканей или клеток.

Промоторы, которые используются для продукции высокого уровня полипептидов в эукариотических клетках и, в частности, в клетках млекопитающих, должны быть сильными и, предпочтительно, должны быть активными в широком диапазоне типов клеток. Сильные конститутивные промоторы, которые способны запускать экспрессию во многих типах клеток, хорошо известны в данной области и, поэтому, нет необходимости в их подробном описании в данном документе. В соответствии с идеей настоящего изобретения предпочтительно использовать промотор цитомегаловируса (CMV). Промотор или промотор/энхансер, полученные из немедленной ранней (IE) области цитомегаловируса (hCMV) человека, в особенности подходят в качестве промотора для вектора на основе gAAV5 по настоящему изобретению. Немедленная ранняя (IE) область цитомегаловируса (hCMV) человека и полученные из нее функциональные запускающие экспрессию фрагменты и/или функциональные усиливающие экспрессию фрагменты, например, описаны в EP 0173177 и EP 0323997, а также хорошо известны в данной области. Таким образом, несколько фрагментов немедленной ранней (IE) области hCMV могут использоваться в качестве промотора и/или промотора/энхансера.

Термины "энхансеры" или "энхансер", используемые в изобретении, могут относиться к последовательности ДНК, которая расположена как смежная с последовательностью ДНК, кодирующей рекомбинантный продукт. Энхансерные элементы обычно расположены в 5'-направлении от промоторного элемента или могут быть расположены ниже или в пределах кодирующей последовательности ДНК (например, последовательности ДНК, транскрибированной или транслированной в рекомбинантный продукт или продукты). Таким образом, энхансерный элемент может быть расположен на расстоянии 100 пар оснований, 200 пар оснований или 300 или больше пар оснований перед последовательностью ДНК, которая кодирует рекомбинантный продукт, или после этой последовательности. Энхансерные элементы могут увеличивать количество экспрессируемого рекомбинантного продукта от последовательности ДНК, превышая экспрессию, обусловленную одиночным промоторным элементом. Специалистам в данной области техники доступно множество энхансерных элементов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках может включать следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;

ния и дозировки. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их изготовления будут бесспорно очевидными для специалистов в этой области. Производство фармацевтических композиций предпочтительно должно соответствовать требованиям GMP (надлежащей производственной практики). Композиция может включать буферную композицию, тонические агенты, стабилизаторы и солибулизаторы.

"Фармацевтически приемлемым" считается материал, который не имеет биологических или других противопоказаний, например, материал можно вводить субъекту без каких-либо нежелательных биологических эффектов. Таким образом, такие фармацевтические композиции можно использовать, например, для трансфекции клетки *ex vivo* или для введения *in vivo* вирусной частицы или клетки непосредственно субъекту.

Термин "эксципиент" или "вспомогательное вещество" используется в данном документе для описания любого компонента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению. Это вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Под "стабилизатором" понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного агента.

Под термином "буфер", "буферная композиция", "буферный агент" понимается раствор, способный сохранять значение pH, благодаря взаимодействию кислотных и щелочных компонентов, входящих в его состав, который дает возможность препарату вектора на основе гAAV5, проявлять устойчивость к изменениям pH. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0. В качестве буферных агентов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и т.п. буферные растворы, но, не ограничиваясь ими.

Фармацевтическая композиция является "стабильной", если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2-8°C. Предпочтительно, чтобы активный агент сохранял и физическую, и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может изготавливаться, упаковываться или широко продаваться в виде единичной стандартной дозы или множества единичных стандартных доз в виде готовой лекарственной формы. Используемый в данном документе термин "единичная стандартная доза" означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, который будет вводиться субъекту, или удобной части такой дозировки, например, половине или трети такой дозировки.

Способ доставки генного продукта.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, который включает введение субъекту любого из вышеуказанных векторов на основе гAAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции.

Под субъектом подразумевают любой живой организм, который поддается воздействию способами, представленными в настоящем описании. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления субъект является человеком. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Любой способ введения вектора на основе гAAV5, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для вышеуказанного вектора на основе гAAV5, по данному изобретению.

Примеры способов введения включают в себя местное применение, интраназальное, ингаляционное, чрезслизистое, трансдермальное, энтеральное (например, пероральное, ректальное), парентеральное (например, внутривенное, подкожное, внутрикожное, внутримышечное) введения, а также инъекции непосредственно в ткань или в орган.

Инъекционные препараты могут быть приготовлены в общепринятых лекарственных формах: в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для приготовления растворов или суспензий в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Альтернативно, можно вводить вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV5 по данному изобретению локально, а не системно, например, в виде депо или в композиции с замедленным высвобождением.

Рекомбинантный вирус на основе AAV5 вводят в организм в эффективном количестве. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 предпочтительно вводят в организм в биологически эффективном количестве. "Биологически эффективное" количество рекомбинантного вируса представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать инфекцию (или трансдукцию) и экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты в клетке. Если вирус вводят в клетку *in vivo* (например, вирус вводят субъекту, как описано ниже), "биологически эффективное" количество вирусного вектора представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать трансдукцию и экспрессию последовательности нуклеиновой

кислоты в клетке-мишени.

Клетка для введения вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе AAV5 по изобретению может быть клеткой любого типа, включая в себя без ограничения, моторные нейроны или прочие ткани нервной системы, эпителиальные клетки (например, эпителиальные клетки кожи, дыхательных путей и кишечника), печеночные клетки, мышечные клетки, клетки селезенки, фибробласты, эндотелиальные клетки и тому подобное.

Вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV5 по изобретению не используется для модификации генетической целостности клеток зародышевой линии человека.

Применение.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных векторов на основе gAAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

В некоторых вариантах осуществления применения заболевания выбирают из группы: заболевания крови, заболевания центральной нервной системы, заболевания метаболизма, заболевания мышц, наследственные заболевания.

Под субъектом подразумевают любое животное, которое поддается воздействию способами, представленными в настоящем описании. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления субъект является человеком. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Введение вектора на основе gAAV5 по настоящему изобретению субъекту-человеку или животному, нуждающемуся в этом, можно проводить любым известным в данной области способом для введения вирусных векторов.

Примеры способов введения включают в себя местное применение, интраназальное, ингаляционное, чрезслизистое, трансдермальное, энтеральное (например, пероральное, ректальное), парентеральное (например, внутривенное, подкожное, внутрикожное, внутримышечное) введения, а также инъекции непосредственно в ткань или в орган.

Инъекционные препараты могут быть приготовлены в общепринятых лекарственных формах: в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для приготовления растворов или суспензий в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Альтернативно, можно вводить вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV5 по данному изобретению локально, а не системно, например, в виде депо или в композиции с замедленным высвобождением.

В некоторых вариантах применения заболевание выбирают из группы: заболевания крови; заболевания центральной нервной системы; заболевания метаболизма; заболевания мышц; наследственные заболевания.

В некоторых вариантах применения заболевание представляет собой заболевание крови.

В некоторых вариантах применения заболевание представляет собой заболевание мышц.

В некоторых вариантах применения заболевание представляет собой наследственное заболевание.

В некоторых вариантах осуществления применения продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой фактор IX или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления применения продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой фактор VIII или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления применения продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой белок SMN1 (белок выживаемости моторных (двигательных) нейронов).

В некоторых вариантах осуществления применения продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой полипептид RBD-S (рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S) вируса SARS-cov2 (коронавирус 2 типа, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром).

В некоторых вариантах осуществления применения любой из вышеуказанных векторов на основе gAAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции используются в терапевтически эффективном количестве.

Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевается количество, которое достаточно для облегчения (например, для смягчения, уменьшения, снижения) по меньшей мере одного из симптомов, связанных с патологическим состоянием. Другими словами, "терапевтически эффективное" количество представляет собой количество, которое достаточно для обеспечения некоторого улучшения состояния субъекта.

Дозировки вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе AAV5 по данному изобретению будут зависеть от способа введения, конкретного вирусного вектора и их можно определять рутинными способами. Примерными дозами для достижения терапевтического эффекта являются вирусные титры, составляющие по меньшей мере примерно 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} трансдуцирующих единиц или больше, предпочтительно приблизительно от 10^9 до 10^{15} трансдуцирующих единиц, еще более предпочтительно 10^{14} трансдуцирующих единиц на килограмм.

Таким образом, рекомбинантный вирус на основе AAV5, реагенты и способы по настоящему изобретению можно использовать для направления нуклеиновой кислоты в делящиеся или неделящиеся клетки и для стабильной экспрессии в этих клетках гетерологичной нуклеиновой кислоты. С использованием этой векторной системы стало возможно вводить в клетки в условиях *in vivo* гены, которые кодируют белки, влияющие на физиологию клеток. Таким образом, векторы по настоящему изобретению могут быть полезными в генной терапии при патологических состояниях.

Настоящее изобретение можно использовать для доставки любой чужеродной нуклеиновой кислоты с биологическим эффектом для лечения или ослабления симптомов, связанных с каким-либо расстройством, обусловленным генной экспрессией. Примеры патологических состояний включают в себя без ограничения кистозный фиброз (и другие заболевания легких), гемофилию А, гемофилию В, талассемию, анемию и другие нарушения свертываемости крови, СПИД, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, эпилепсию и другие неврологические расстройства, сахарный диабет, мышечные дистрофии (например, Дюшенна, Беккера, спинальная мышечная атрофия (SMA)), болезнь Гоше, болезнь Херлера, дефицит аденозиндеаминазы, болезни накопления гликогена и другие метаболические дефекты, заболевания солидных органов (например, мозга, печени, почек, сердца) и тому подобное.

Перенос генов обладает значительным потенциалом применения для понимания и создания способов лечения патологических состояний. Существует ряд наследственных заболеваний, для которых были изучены и клонированы дефектные гены. В некоторых случаях известна функция этих клонированных генов. В целом упомянутые выше патологические состояния делятся на два класса: дефицитные состояния, как правило, дефицит ферментов, которые обычно наследуются рецессивным образом, и состояния нарушения баланса, иногда с вовлечением по меньшей мере регуляторных или структурных белков, которые наследуются доминантным образом. При дефицитных заболеваниях можно использовать перенос генов, чтобы внести нормальный ген в пораженные ткани для заместительной терапии. При патологических состояниях нарушения баланса перенос генов можно использовать для создания патологического состояния в смоделированной системе, которую затем можно использовать для разработки мер против этого патологического состояния. Таким образом, способы по настоящему изобретению позволяют лечить генетические заболевания. Согласно изобретению, патологическое состояние лечится путем частичного или полного устранения дефекта или дисбаланса, который вызывает заболевание или усугубляет степень его тяжести. Также возможно использование сайт-специфичной интеграции нуклеиновых последовательностей для запуска мутаций или исправления дефектов.

Способ получения вектора на основе гAAV5.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения любого из вышеуказанных векторов на основе гAAV5, который включает трансфекцию клеток-продуцентов любой из вышеуказанных нуклеиновых кислот, кодирующей модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5), или вышеуказанной нуклеиновой кислотой, кодирующей капсид.

Белки капсида могут быть экспрессированы из рекомбинантного вируса, вектора экспрессии или из линии клеток, в которую стабильно интегрированы гены описанных модифицированных капсидов AAV или кодирующие последовательности. Кроме того, изобретение обеспечивает получение капсидов AAV с описанными мутациями *in vitro* из белков капсидов AAV и конструирование упакованных капсидов *in vitro*. Изобретение также обеспечивает получение модифицированных капсидов AAV, которые были генетически сконструированы для экспрессии гетерологичных эпитопов клинически важных антигенов, чтобы вызвать иммунный ответ.

Способ получения вектора на основе гAAV5 подробно описан в примерах.

Трансгенное животное.

Согласно некоторым аспектам раскрытия предоставляется способ создания модели соматических трансгенных животных. В некоторых вариантах реализации способ включает введение любого из вышеупомянутых гAAV не являющемуся человеком животному, где гAAV содержит по меньшей мере один трансген, и где гAAV инфицирует клетки ткани-мишени животного, не являющегося человеком.

В некоторых вариантах возможно использование описанных вариантов капсидов для создания модели соматических трансгенных животных, которые включают введение любого из вышеупомянутых гAAV не относящемуся к человеку животному, где гAAV содержит по меньшей мере один трансген. В некоторых вариантах реализации трансген представляет собой по меньшей мере один ген, кодирующий белок. В некоторых вариантах реализации трансген кодирует по меньшей мере одну небольшую нуклеиновую кислоту-ингибитор. В некоторых вариантах реализации трансген кодирует по меньшей мере одну репортерную молекулу.

Соматической трансгенной животной моделью может быть млекопитающее, такое как мышь, крыса, кролик, собака, кошка, овца, свинья, примат, не являющийся человеком.

В некоторых вариантах реализации предполагаемый терапевтический агент можно вводить модели соматического трансгенного животного для определения эффекта предполагаемого терапевтического агента на патологическое состояние животного.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения.

бретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы.

Методы рекомбинантной ДНК.

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов.

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 4000 п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК.

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сенгеру.

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях.

Применяли пакет программ SnapGene версии 5.1.4.1 для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Статистический анализ данных.

Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD), для сравнения результатов теста и контроля использовали дисперсионный анализ (ANOVA), и они были определены как статистически значимые.

Пример 1. Получение библиотек вариантов капсидов гAAV5.

Получение библиотек вариантов капсидов гAAV5 производили методом случайного мутагенеза последовательности гена Cap (Davidsson M. et al., 2016). Вкратце, последовательность гена Cap пятого серотипа содержащую мутации S2A и T711S в VP1 полученные в предыдущем раунде отбора (заявка на патент № RU2019126509), фрагментировали с использованием урацил-ДНК-гликозилазы, полученные фрагменты собирали в полноразмерный ген Cap с помощью ДНК-полимеразы, не обладающей корректирующей активностью (в результате в последовательности возникали случайные мутации). Полноразмерные мутантные варианты клонировали в плазмиду-носитель рAAV-linker (фиг. 1) по сайтам рестрикции AscI/EcoRI в общую рамку считывания с зеленым флуоресцентным белком (GFP), продуцируя многообразную случайную библиотеку капсидов гAAV5, которую затем использовали для отбора вариантов капсидов с повышенной трансдуцирующей активностью.

Положительный отбор вирусных частиц с повышенной трансдуцирующей активностью проводили *in vitro* на клетках линии CHO-K1-S. При этом для трансдукции использовали частицы, очищенные с помощью УЦФ в градиенте йодиксанола. Спустя 48 ч клетки собирали и выделяли геномную ДНК для последующей амплификации последовательностей геномов вирусов, способных к эффективной трансдукции. Полученные последовательности затем переклонировали и повторно нарабатывали для последующих итераций отбора с целью обогащения библиотеки вариантами с наибольшей эффективностью трансдукции. После 5 раундов отбора капсидные гены 100 клонов просеквенировали для определения наиболее успешных мутаций и их сочетаний. По результатам секвенирования преобладающими сочетаниями мутаций оказались S2A, T711S, T614V в VP1 AAV5 - порядка 30% клонов. Также были отобраны варианты капсидов, содержащие мутации S2A, T711S, T614A в VP1 AAV5 и S2A, T711S, G226V в VP1 AAV5. Данные варианты капсидов клонировали в вектора для наработки вирусных частиц и в дальнейшем использовали для визуализации и сравнения профилей трансдукции относительно AAV5 дикого типа.

Пример 2. Нарботка и последующий отбор рекомбинантных вирусных частиц из полученной библиотеки последовательностей.

Для наработки и последующего отбора рекомбинантных вирусных частиц из полученной библиотеки последовательностей была разработана серия плазмид: плазида-носитель, плазида, содержащая последовательность гена Rep, а также конструкция, содержащая аденовирусные гены, необходимые для репликации вирусных частиц.

Плазида-носитель рAAV-linker (фиг. 1) предназначенная для клонирования библиотек случайных вариантов гена капсида AAV пятого серотипа в одну рамку считывания с репортерным белком, была получена путем замены последовательности модифицированного зеленого флуоресцентного белка в исходной конструкции рAAV-GFP (фиг. 2), с помощью рестриктазно-лигазного метода клонирования по сайтам HindIII/EcoRI, на последовательность T2A-GFP, синтезированную *de novo* с добавлением сайтов

рестрикции EcoRI с 5'-конца и HindIII с 3'-конца.

Плазмида pAAV-Rep, содержащая последовательность гена Rep (фиг. 3), была получена путем клонирования *de novo* синтезированной последовательности гена Rep AAV второго серотипа (GenBank IDAF043303.1) по сайтам рестрикции PciI/PsiI с последующей обработкой T4 DNA Polymerase для получения "тупых" концов, в плазмиду pGem-T Easy (Promega, США) также обработанную рестриктазами PciI/PsiI.

В качестве источника аденовирусных генов для наработки рекомбинантных вирусных частиц была использована конструкция pHelper (фиг. 4), содержащая AmpR - ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину, Ori - ориджин репликации в бактериях, Adeno E2A - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК, Adeno E4 - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК, Adeno VARNA последовательность гена хелперного аденовируса отвечающая за стимуляцию трансляции как ранних, так и поздних вирусных генов.

Пример 3. Способ получения векторов на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (gAAV5).

Для получения частиц gAAV с модифицированным капсидом 5 серотипа, клетки-продуценты трансфицировали одновременно 3 плазмидами:

1) плазмидой, содержащей нуклеотидные последовательности аденовируса, кодирующие белки и РНК, необходимые для сборки частиц gAAV (хелперная плазмида);

2) плазмидой, содержащей нуклеотидную природную последовательность гена Rep аденоассоциированного вируса, а также последовательность модифицированного гена Cap, которую выбирают из группы: нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или любая другая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, и белки VP2 и VP3 с альтернативных рамок считывания используемой нуклеотидной последовательности, где

VP2 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24; а

VP3 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40;

3) плазмидой, содержащей гетерологичный геном частицы gAAV, кодирующий целевой ген, предназначенный для доставки в клетки пациента.

Данный набор генов обеспечивает сборку вирусных частиц gAAV и инкапсидирование в них целевого генома в течение 72 ч. Через 72 ч после трансфекции клетки-продуценты подвергают лизису с высвобождением частиц gAAV и очищают последовательными стадиями фильтрации и хроматографии. Титр очищенных частиц gAAV проверяют с помощью иммуноферментного анализа и количественной ПЦР.

Пример 4. Увеличение эффективности трансдукции клеток препаратами на основе gAAV5 при наличии мутаций S2A, T614V/T614A/G226V, T711S в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа.

Дизайн эксперимента.

В лунки 12-луночных планшетов были посеяны клетки линии CHO-K1-S. Посев проводили в ростовую среду: DMEM/F12 с глутамином, содержание глюкозы 4,5 г/л, 5% сыворотки крупного рогатого скота. Плотность посадки клеток составила 10000 клеток/см². При постановке трансдукции подготовленные заранее клетки были трансдуцированы при MOI 500, 1250 и 2500 вг/клетка. Все образцы были поставлены в трех повторностях. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

В роли контрольных препаратов были использованы препараты на основе gAAV5 с мутациями S2A и T711S в белке капсида VP1, а также препарат на основе gAAV5 с капсидом дикого типа. Ранее было показано (заявка на патент № RU 2019126509), что наличие в белке VP1 капсида AAV5 мутаций S2A и T711S приводит к достоверно большей эффективности трансдукции клеток CHO-K1-S по сравнению с капсидом дикого типа.

Анализ эффективности трансдукции проводили с помощью проточного цитометра Guava EasyCyte и программного обеспечения GuavaSoft.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, которые выбраны из группы T614V, T614A и G226V в белке VP1 капсида gAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида gAAV5, уже содержащего мутации S2A и T711S, приводило к существенному увеличению эффективности доставки трансгена векторами на основе gAAV с указанными мутациями (T614V, T614A и G226V). К примеру, при помощи метода проточной цитометрии удалось выявить изменение количества GFP позитивных клеток спустя 48 ч после трансдукции линии CHO-K1-S препаратами на основе gAAV5 с белком VP1 дикого типа, с белком VP1, содержащего мутации S2A и T711S или белком VP1, несущим мутации S2A, T711S и T614V или T614A или G226V (фиг. 5).

При наличии мутаций T614V, S2A и T711S (AAV5-02Mut-GFP) количество клеток, экспрессирующих GFP, увеличивалось в 1,31 раза с 24,92% до 32,84% при MOI 500, в 1,47 раза с 43,44% до 63,89% при MOI 1250 и в 1,17 раза с 65,56% до 78,01% при MOI 2500 вг/клетка по сравнению с контрольным

препаратом гAAV5 с белком VP1 капсида, содержащего только мутации S2A и T711S (AAV5-01Mut-GFP). При сравнении препарата гAAV5 с белком капсида VP1, содержащего мутации T614V, S2A и T711S (AAV5-02Mut-GFP), и капсида VP1 дикого типа (AAV5-NullMut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,74 раза с 11,97% до 32,84% при MOI 500, в 3,18 раза с 20,11% до 63,89% при MOI 1250 и в 1,85 раза с 42,26% до 78,01% при MOI 2500.

При наличии мутаций T614A, S2A и T711S (AAV5-03Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,18 раза с 24,92% до 29,62% при MOI 500, в 1,27 раза с 43,44% до 55,22% при MOI 1250 и в 1,1 раза с 65,56% до 72,05% при MOI 2500 вг/клетка по сравнению с контрольным препаратом гAAV5 с белком VP1 капсида, содержащего только мутации S2A и T711S (AAV5-01Mut-GFP). При сравнении препарата гAAV5 с белком капсида VP1, содержащего мутации T614A, S2A и T711S (AAV5-03Mut-GFP), и капсида VP1 дикого типа (AAV5-NullMut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,47 раза с 11,97% до 29,62% при MOI 500, в 2,74 раза с 20,11% до 55,22% при MOI 1250 и в 1,7 раза с 42,26% до 72,05% при MOI 2500.

При наличии мутаций G226V, S2A и T711S (AAV5-04Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, было ниже в 1,41 раза с 24,92% до 17,67% при MOI 500, в 1,09 раза с 43,44% до 39,69% при MOI 1250 и в 1,05 раза с 65,56% до 61,85% при MOI 2500 вг/клетка по сравнению с контрольным препаратом гAAV5 с белком VP1 капсида, содержащего только мутации S2A и T711S (AAV5-01Mut-GFP). При сравнении препарата гAAV5 с белком капсида VP1, содержащего мутации T614A, S2A и T711S (AAV5-03Mut-GFP), и капсида VP1 дикого типа (AAV5-NullMut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,48 раза с 11,97% до 17,67% при MOI 500, в 1,97 раза с 20,11% до 39,69% при MOI 1250 и в 1,46 раза с 42,26% до 61,85% при MOI 2500.

Пример 5. Эффективность упаковки вирусных геномов AAV препаратами на основе гAAV5 при наличии мутаций S2A, T614V/G226V, T711S в белке VP1 капсида AAV5 дикого типа.

В данном изобретении под понятиями "векторный геном" и "векторная ДНК" следует понимать оцДНК упакованную в капсид рекомбинантного аденоассоциированного вируса (далее гAAV). Такая оцДНК может быть как смысловой (далее плюс цепь ДНК), так и антисмысловой (далее минус цепь ДНК). Препарат гAAV является смесью капсидов часть из которых содержит плюс цепь оцДНК, а часть содержит минус цепь оцДНК. Векторный геном гAAV представляет собой нуклеотидную последовательность экспрессионной кассеты, окруженную последовательностью инвертированных концевых повторов - ITR (inverted terminal repeats, далее ITR).

В данном изобретении под понятием "образец" или "исследуемый образец" следует понимать оцДНК, экстрагированную из соответствующего препарата гAAV.

По данным литературы AAV капсиды эффективно упаковывают кассеты до 4.8 kb, кассеты же большего размера в процессе упаковки в капсид фрагментируются с 5'- или 3'-концов ДНК и в результате упаковываются с меньшей эффективностью, образуя неоднородную популяцию вирусных геномов гAAV. При этом чаще всего делетированию подвергается 5'-конец одноцепочечной ДНК (далее оцДНК) (Zhijian Wu, 2010.). Таким образом, значительная часть препаратов гAAV содержит фрагментированные цепи оцДНК, что в свою очередь приводит к снижению эффективности экспрессии. Для оценки эффективности упаковки оцДНК капсидами гAAV был использован метод саузерн-дот блота. Для проверки целостности 5'- и 3'-концов оцДНК в исследуемом образце на участки ДНК максимально близкие к последовательности 5' - ITR и 3' - ITR подбирали олигонуклеотидные зонды. Зонды должны строго специфично связываться с выбранными участками оцДНК. Также зонды были подобраны на участки ДНК, соответствующие середине экспрессионной кассеты (~2400-2500 по), такая точка детекции является контрольной для исследуемой цепи оцДНК, т.к. данная область реже подвергается фрагментации при упаковке в капсид (фиг. 6). Олигонуклеотидные зонды подбирали как для "плюс", так и для "минус" цепи ДНК экспрессионной кассеты. Зонды отличаются от обычных олигонуклеотидов тем, что на их 5'-конце последовательности находится молекула биотина.

В процессе выполнения работ, исследуемый образец - ДНК экстрагированная из анализируемых гAAV препаратов, наносили на предварительно смоченную в 20XSSC буфере нитроцеллюлозную мембрану и гибридизовали с выбранными зондами. Для каждого зонда использовалась отдельная мембрана с исследуемыми образцами, таким образом обработке подвергались 6 мембран, на каждой из которых находились исследуемые образцы ДНК, экстрагированные из 2.5×10^{10} вирусных частиц (измеренных как GC - genome copy) с предварительной обработкой вирусного препарата DNase I для удаления примесей не инкапсидированной ДНК и последующей обработкой протеиназой K согласно протоколу, описанному в статье (Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice Mariacarmela Allocca, J Clin Invest. 2008 May 1; 118(5): 1955-1964.)

Нанесение образцов на мембрану осуществлялось с помощью вакуумного коллектора Bio-Dot® Microfiltration Apparatus (Bio-Rad). Экстрагированную ДНК из $2,3 \times 10^9$ векторных геномов наносили в первую лунку коллектора. В оставшиеся шесть лунок коллектора наносили двукратные серийные разведения данного образца, получая таким образом ряд разведений, соответствующий 7, 3.5, 1.7, 0.86, 0.43, 0.21 и 0.11 нг векторной ДНК. Стандартную пДНК, полученную при расщеплении рAAV-GOI по сайтам SmaI, разбавляли таким же образом. Количество стандартной пДНК, в калибровочной кривой, составля-

ло 50, 25, 12.5, 6.25, 3.1, 1.6, 0.78 соответственно.

В данном изобретении под термином "Стандартная пДНК" следует понимать расщепленную по сайтам SmaI плазмидную ДНК (далее пДНК), нуклеотидная последовательность которой в точности соответствует нуклеотидной последовательности исследуемого векторного генома.

Зонды, используемые для гибридизации, синтезированы и помечены биотином. Гибридизацию проводили в течение ночи при температуре на 10°C ниже температуры плавления каждого зонда.

На следующий день мембраны отмывали сначала раствором 2 x SSC/0,1% SDS, а затем TBSTx1. Далее мембраны инкубировали с 1% BSA и TBSTx1 в течение 40 мин и снова отмывали TBSTx1. Затем, мембраны инкубировали с HRP-конъюгированным стрептавидином в течение 1 ч для связывания биотинилированного зонда с HRP-конъюгированным стрептавидином. После финальной отмывки мембран 1% BSA TBSTx1 добавляли субстрат для хемилюминесцентной детекции и детектировали люминесцентный сигнал на мембранах (фиг. 7). Дальнейшую обработку полученных изображений проводили с помощью ПО "Image Lab". Оценку интенсивности люминесцентного сигнала от зондов определяли по уровню интенсивности люминесцентного сигнала стандартной пДНК. Интенсивность люминесцентного сигнала разведений стандартной пДНК принимали за калибровочную кривую (далее стандартный образец).

Авторами изобретения было установлено, что подобранные биотинилированные зонды связываются с ДНК-матрицей, находящейся на мембране с одинаковой эффективностью, что очевидно из окрашивания разведений стандартной пДНК в каждой точке. Детекция фрагментов ДНК, соответствующих 5'- и 3'-концам плюс цепи и 5'- и 3'-концам минус цепи исследуемой ДНК наблюдалась для всех испытуемых образцов. При одинаковой нагрузке ДНК исследуемых образцов на мембраны наблюдались различия в интенсивности детектируемых сигналов люминесценции.

В области детекции зонда "Probe 1" интенсивность сигнала люминесценции в первой точке разведения образца vgDNA-04Mut-GFP соответствует интенсивности сигнала люминесценции третьего разведения стандартного образца pDNA-GFP. Предел детекции образца vgDNA-04Mut-GFP обнаруживается на шестом разведении, седьмое разведение данного образца детектируется на уровне фонового сигнала.

В области детекции зонда "Probe 1" интенсивность сигнала люминесценции в первой точке разведения образца vgDNA-02Mut-GFP находится в диапазоне интенсивности сигналов люминесценции третьего и четвертого разведений стандартного образца pDNA-GFP. Предел детекции образца vgDNA-02Mut-GFP обнаруживается на пятом разведении, шестое и седьмое разведения данного образца детектируются на уровне фонового сигнала.

В области детекции зонда "Probe 1" интенсивность сигнала люминесценции в первой точке разведения образца vgDNA-NullMut-GFP соответствует интенсивности сигнала люминесценции четвертого разведения стандартного образца pDNA-GFP. Предел детекции образца vgDNA-NullMut-GFP обнаруживается на четвертом разведении, пятое, шестое и седьмое разведения данного образца детектируются на уровне фонового сигнала.

При сравнении интенсивности сигналов люминесценции образцов в области детекции зонда "Probe 1", образцы vgDNA-04Mut-GFP и vgDNA-02Mut-GFP имеют большую силу сигнала люминесценции в сравнении с контрольным образцом vgDNA-NullMut-GFP. И детектируется на более поздних разведения относительно контрольного образца vgDNA-NullMut-GFP.

В области детекции зонда "Probe 3" интенсивность сигнала люминесценции в первой точке разведения образца vgDNA-04Mut-GFP находится за пределами разведения стандартного образца pDNA-GFP. Интенсивность сигнала люминесценции во второй точке разведения образца vgDNA-04Mut-GFP находится в диапазоне интенсивности сигналов люминесценции первого и второго разведений стандартного образца pDNA-GFP. Предел детекции образца vgDNA-04Mut-GFP обнаруживается на пятом разведении, шестое и седьмое разведения данного образца детектируются на уровне фонового сигнала.

В области детекции зонда "Probe 3" интенсивность сигнала люминесценции в первой точке разведения образца vgDNA-02Mut-GFP находится за пределами разведения стандартного образца pDNA-GFP. Интенсивность сигнала люминесценции во второй точке разведения образца vgDNA-02Mut-GFP находится в диапазоне интенсивности сигналов люминесценции первого и второго разведений стандартного образца pDNA-GFP. Предел детекции образца vgDNA-02Mut-GFP обнаруживается на пятом разведении, шестое и седьмое разведения данного образца детектируются на уровне фонового сигнала.

В области детекции зонда "Probe 3" интенсивность сигнала люминесценции в первой точке разведения образца vgDNA-NullMut-GFP находится за пределами разведения стандартного образца pDNA-GFP. Интенсивность сигнала люминесценции во второй точке разведения образца vgDNA-NullMut-GFP находится в диапазоне интенсивности сигналов люминесценции второго и третьего разведений стандартного образца pDNA-GFP. Предел детекции образца vgDNA-NullMut-GFP обнаруживается на четвертом разведении, пятое, шестое и седьмое разведения данного образца детектируются на уровне фонового сигнала.

При сравнении интенсивности сигналов люминесценции образцов в области детекции зонда "Probe 3", образцы vgDNA-04Mut-GFP и vgDNA-02Mut-GFP имеют большую силу сигнала люминесценции в сравнении с контрольным образцом vgDNA-NullMut-GFP. И детектируется на более поздних разведения относительно контрольного образца vgDNA-NullMut-GFP.

В области детекции зонда "Probe 6" интенсивность сигнала люминесценции в первой точке разведения образца vgDNA-02Mut-GFP соответствует интенсивности сигнала люминесценции четвертого разведения стандартного образца pDNA-GFP. Предел детекции образца vgDNA-02Mut-GFP обнаруживается на четвертом разведении, пятое, шестое и седьмое разведения данного образца детектируются на уровне фонового сигнала.

В области детекции зонда "Probe 6" интенсивность сигнала люминесценции в первой точке разведения образца vgDNA-NullMut-GFP соответствует интенсивности сигнала люминесценции четвертого разведения стандартного образца pDNA-GFP. Предел детекции образца vgDNA-NullMut-GFP обнаруживается на четвертом разведении, пятое, шестое и седьмое разведения данного образца детектируются на уровне фонового сигнала.

При сравнении интенсивности сигналов люминесценции образцов в области детекции зонда "Probe 6", образец vgDNA-02Mut-GFP не отличается от контрольного образца vgDNA-NullMut-GFP, а образец vgDNA-04Mut-GFP имеет большую силу сигнала люминесценции и детектируется на более поздних разведениях в сравнении с контрольным образцом vgDNA-NullMut-GFP.

При сравнении интенсивности сигналов люминесценции образца vgDNA-04Mut-GFP в точках детекции зонда "Probe 1" (3' область минус цепи ДНК) и "Probe5" (5' область минус цепи ДНК). Наибольшую интенсивность сигнала люминесценции имеет 3' - область минус цепи ДНК (Probe 1), которая соответствует интенсивности сигнала люминесценции третьего разведения стандартного образца pDNA-GFP, по сравнению с детектируемой 5' областью минус цепи ДНК (Probe5), которая соответствует интенсивности сигнала люминесценции пятого разведения стандартного образца pDNA-GFP.

При сравнении интенсивности сигналов люминесценции образца vgDNA-02Mut-GFP в точках детекции зонда "Probe 1" (3' область минус цепи ДНК) и "Probe5" (5' область минус цепи ДНК). Наибольшую интенсивность сигнала люминесценции имеет 3' - область минус цепи ДНК, которая находится в диапазоне интенсивности сигналов люминесценции третьего и четвертого разведений стандартного образца pDNA-GFP, по сравнению с детектируемой 5' областью минус цепи ДНК, которая соответствует интенсивности сигнала люминесценции четвертого разведения стандартного образца pDNA-GFP.

При сравнении интенсивности сигналов люминесценции контрольного образца vgDNA-NullMut-GFP в точках детекции зонда "Probe 1" (3' область минус цепи ДНК) и "Probe5" (5' область минус цепи ДНК). Наибольшую интенсивность сигнала люминесценции имеет 3' - область минус цепи ДНК, которая соответствует интенсивности сигнала люминесценции четвертого разведения стандартного образца pDNA-GFP, по сравнению с детектируемой 5' областью минус цепи ДНК, которая соответствует интенсивности сигнала люминесценции пятого разведения стандартного образца pDNA-GFP.

Для образцов vgDNA-04Mut-GFP, vgDNA-02Mut-GFP, vgDNA-NullMut-GFP эффективность упаковки минус цепей оценивалась по отличиям в интенсивности сигнала люминесценции в области детекции 3'-конца минус цепи ДНК и интенсивности сигнала люминесценции в области детекции 5'-конца минус цепи ДНК. Для всех исследуемых образцов показана тенденция к преобладанию интенсивности сигнала люминесценции в области детекции 3'-конца минус цепи ДНК над интенсивностью сигнала люминесценции в области детекции 5'-конца минус цепи ДНК. Однако при сравнении интенсивности сигналов люминесценции в области детекции 3'-конца минус цепи ДНК и интенсивностью сигналов люминесценции в области детекции 5'-конца минус цепи ДНК образцов выявлено, что образцы vgDNA-04Mut-GFP и vgDNA-02Mut-GFP имеют более эффективную упаковку минус цепи ДНК по сравнению с контрольным образцом vgDNA-NullMut-GFP, т.к. имеют большую силу сигнала люминесценции как для области детекции 3'-конца минус цепи ДНК, так и для области детекции 5'-конца минус цепи ДНК и детектируется на более поздних разведениях относительно контрольного образца vgDNA-NullMut-GFP. Образец vgDNA-02Mut-GFP имеет более эффективную упаковку минус цепи ДНК по сравнению с vgDNA-04Mut-GFP и контрольным образцом vgDNA-NullMut-GFP, т.к. в области детекции 3'-конца минус цепи ДНК интенсивность сигнала люминесценции находится в диапазоне интенсивности сигналов люминесценции третьего и четвертого разведений стандартного образца pDNA-GFP, а интенсивность сигнала люминесценции в области детекции 5'-конца минус цепи ДНК соответствует интенсивности сигнала люминесценции четвертого разведения стандартного образца pDNA-GFP, тогда как для образцов vgDNA-04Mut-GFP и vgDNA-NullMut-GFP интенсивность сигнала люминесценции в области детекции 5'-конца минус цепи ДНК значительно уступает интенсивности сигнала люминесценции в области детекции 3'-конца минус цепи ДНК этих образцов. Данный факт свидетельствует о более эффективной упаковке полноразмерных минус цепей ДНК в образце vgDNA-02Mut-GFP.

При сравнении интенсивности сигналов люминесценции образца vgDNA-04Mut-GFP в точках детекции зонда "Probe 6" (3' область плюс цепи ДНК) и "Probe 2" (5' область плюс цепи ДНК) различий не обнаружено, интенсивности люминесценции этих точек находятся в диапазоне интенсивности сигнала люминесценции четвертого и пятого разведений стандартного образца pDNA-GFP.

При сравнении интенсивности сигналов люминесценции образца vgDNA-02Mut-GFP в точках детекции зонда "Probe 6" (3' область плюс цепи ДНК) и "Probe 2" (5' область плюс цепи ДНК) различий не обнаружено, интенсивности люминесценции этих точек находятся в диапазоне интенсивности сигнала люминесценции четвертого и пятого разведений стандартного образца pDNA-GFP.

При сравнении интенсивности сигналов люминесценции образца vgDNA-NullMut-GFP в точках детекции зонда "Probe 6" (3' область плюс цепи ДНК) и "Probe 2" (5' область плюс цепи ДНК) различий не обнаружено, интенсивности люминесценции этих точек находятся в диапазоне интенсивности сигнала люминесценции четвертого и пятого разведений стандартного образца pDNA-GFP.

Для образцов vgDNA-04Mut-GFP, vgDNA-02Mut-GFP, vgDNA-NullMut-GFP эффективность упаковки плюс цепей оценивалась по интенсивности сигналов люминесценции в области детекции 3'-конца плюс цепи ДНК и в области детекции 5'-конца плюс цепи ДНК. Выявлено, что для всех образцов в области детекции 3'-конца плюс цепи ДНК сигнал люминесценции исследуемых образцов детектируется в диапазоне интенсивности сигнала люминесценции четвертого и пятого разведений стандартного образца pDNA-GFP также, как и сигнал люминесценции от детекции 5' области плюс цепи ДНК исследуемых образцов детектируется в диапазоне интенсивности сигнала люминесценции четвертого и пятого разведений стандартного образца pDNA-GFP. Таким образом упаковка плюс цепей ДНК в исследуемых образцах имеет равную эффективность.

Пример 6. Эффективность наработки векторов на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (gAAV5).

Для получения частиц gAAV с модифицированным капсидом 5 серотипа, клетки-продуценты HEK293 трансфецировали с использованием полиэтиленimina одновременно 3 плазмидами:

1) плазмидой, содержащей нуклеотидные последовательности аденовируса, кодирующие белки и РНК, необходимые для сборки частиц gAAV (хелперная плазида);

2) плазмидой, содержащей нуклеотидную природную последовательность гена Rep аденоассоциированного вируса, а также последовательность модифицированного гена Cap, которую выбирают из группы: нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или любая другая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, и белки VP2 и VP3 с альтернативных рамок считывания используемой нуклеотидной последовательности, где

VP2 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24; а

VP3 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40;

3) плазмидой, содержащей гетерологичный геном частицы gAAV, кодирующий целевой ген, предназначенный для доставки в клетки пациента.

Данный набор генов обеспечивает сборку вирусных частиц gAAV и инкапсидирование в них целевого генома в течение 72 ч. Через 72 ч после трансфекции клетки-продуценты подвергали лизису с высвобождением частиц gAAV, полученные вектора обрабатывали ДНКазой I в течение 2 ч при 37°C, затем еще 2 ч протеиназой K при 56°C. Титр полученных частиц gAAV определяли с помощью количественной ПЦР с использованием сета олигонуклеотидов состоящего из прямого праймера 5'-ACCATGGAAGCAGCAGCAGC-3', обратного праймера 5'-TCAGCTCGATGCGGTTAC-3', и зонда 5'-HEX-CATGCCCGAAGGCTACGTCCAG-BHQ1-3' специфичного к последовательности GFP.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, выбранных из группы, которая состоит из T614V, T614A или G226V, в белке VP1 капсида gAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида gAAV5, уже содержащего мутации S2A и T711S, приводило к существенному повышению выхода инкапсидированных вирусных частиц на основе gAAV5 с указанными мутациями (T614V, T614A и G226V) по сравнению с капсидом gAAV5 дикого типа. К примеру, при помощи метода количественной ПЦР удалось выявить изменение количества копий упакованного гетерологичного генома частицы gAAV, кодирующего целевой ген GFP (фиг. 9).

При наличии мутаций T614V, S2A и T711S (AAV5-02Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 7,09 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $1,78E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным препаратом gAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP). При сравнении препарата gAAV5 с белком капсида VP1, содержащего мутации T614V, S2A и T711S (AAV5-02Mut-GFP), и капсида VP1 содержащего только мутации S2A и T711S (AAV5-01Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,31 раза с $1,36E+10$ вг/мл до $1,78E+10$ вг/мл

При наличии мутаций T614A, S2A и T711S (AAV5-03Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 4,78 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $1,20E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным препаратом gAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP). При сравнении препарата gAAV5 с белком капсида VP1, содержащего мутации T614A, S2A и T711S (AAV5-03Mut-GFP), и капсида VP1 содержащего только мутации S2A и T711S (AAV5-01Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, статистически достоверно не изменялось.

При наличии мутаций G226V, S2A и T711S (AAV5-04Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 6,77 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $1,70E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным препаратом gAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP). При сравнении препарата gAAV5 с белком капсида VP1, содержащего мутации G226V, S2A и T711S (AAV5-04Mut-GFP), и капсида VP1 содержащего только мутации S2A и T711S (AAV5-01Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,25 раза с $1,36E+10$ вг/мл до $1,70E+10$ вг/мл.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа (AAV5) для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), содержащий аминокислотную последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа, кодируемую геном Cap, с одной или несколькими заменами, которые выбраны из группы

G226V,
S2A, G226V и T711S,
T614A,
S2A, T614A и T711S,
T614V или
S2A, T614V и T711S,

где аминокислотная последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1.

2. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.1, который включает замену в положении G226V.

3. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.2, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3.

4. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.1, который включает замены S2A, G226V и T711S.

5. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.4, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4.

6. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.1, который включает замену T614A.

7. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.6, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5.

8. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.1, который включает замены S2A, T614A и T711S.

9. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.8, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6.

10. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.1, который включает замену T614V.

11. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.10, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 7.

12. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.1, который включает замены S2A, T614V и T711S.

13. Выделенный модифицированный белок VP1 капсида AAV5 по п.12, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 8.

14. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа по любому из пп.1-13, который используется для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа.

15. Выделенная нуклеиновая кислота по п.14, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа с аминокислотной заменой G226V, которая представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 11 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

16. Выделенная нуклеиновая кислота по п.14, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа с аминокислотными заменами S2A, G226V и T711S, которая представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 12 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

17. Выделенная нуклеиновая кислота по п.14, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа с аминокислотной заменой T614A, которая представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 13 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

18. Выделенная нуклеиновая кислота по п.14, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа с аминокислотными заменами S2A, T614A и T711S, которая представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 14 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

19. Выделенная нуклеиновая кислота по п.14, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа с аминокислотной заменой T614V, которая представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 15 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

20. Выделенная нуклеиновая кислота по п.14, кодирующая модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа с аминокислотными заменами S2A, T614V и T711S, которая

представлена нуклеиновой последовательностью с SEQ ID NO: 16 или любой другой последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

21. Выделенный капсид для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа, который включает модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа по любому из пп.1-13.

22. Выделенный капсид по п.21, который включает модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа по любому из пп.1-13, белок VP2 капсида AAV5 или его модифицированный вариант и белок VP3 капсида AAV5 или его модифицированный вариант.

23. Выделенный капсид по п.22, который включает белок VP2 капсида AAV5 дикого типа.

24. Выделенный капсид по п.23, который включает белок VP2 капсида AAV5 дикого типа, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 17.

25. Выделенный капсид по п.22, который включает модифицированный белок VP2 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа.

26. Выделенный капсид по п.25, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену G90V.

27. Выделенный капсид по п.26, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену G90V, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 19.

28. Выделенный капсид по п.25, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены G90V и T575S.

29. Выделенный капсид по п.28, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены G90V и T575S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20.

30. Выделенный капсид по п.25, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T478A.

31. Выделенный капсид по п.30, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T478A, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 21.

32. Выделенный капсид по п.25, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены T478A и T575S.

33. Выделенный капсид по п.32, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены T478A и T575S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 22.

34. Выделенный капсид по п.25, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T478V.

35. Выделенный капсид по п.34, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замену T478V, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 23.

36. Выделенный капсид по п.25, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены T478V и T575S.

37. Выделенный капсид по п.36, который включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который содержит замены T478V и T575S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 24.

38. Выделенный капсид по п.22, который включает белок VP3 капсида AAV5 дикого типа.

39. Выделенный капсид по п.38, который включает белок VP3 капсида AAV5 дикого типа, который имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 33.

40. Выделенный капсид по п.22, который включает модифицированный белок VP3 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа.

41. Выделенный капсид по п.40, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену G34V.

42. Выделенный капсид по п.41, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену G34V, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 35.

43. Выделенный капсид по п.40, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены G34V и T519S.

44. Выделенный капсид по п.43, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены G34V и T519S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 36.

45. Выделенный капсид по п.40, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T422A.

46. Выделенный капсид по п.45, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T422A, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 37.

47. Выделенный капсид по п.40, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены T422A и T519S.

48. Выделенный капсид по п.47, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены T422A и T519S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 38.

49. Выделенный капсид по п.40, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T422V.

50. Выделенный капсид по п.49, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замену T422V, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 39.

51. Выделенный капсид по п.40, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены T422V и T519S.

52. Выделенный капсид по п.51, который включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который содержит замены T422V и T519S, и имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 40.

53. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая капсид по любому из пп.21-52, который используется для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа.

54. Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 5 серотипа для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

1) модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа по любому из пп.1-13 или капсид по любому из пп.21-52, и

2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

55. Вектор на основе гAAV5 по п.54, где продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.

56. Фармацевтическая композиция для доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, содержащая:

а) вектор на основе гAAV5 по любому из пп.54, 55 и

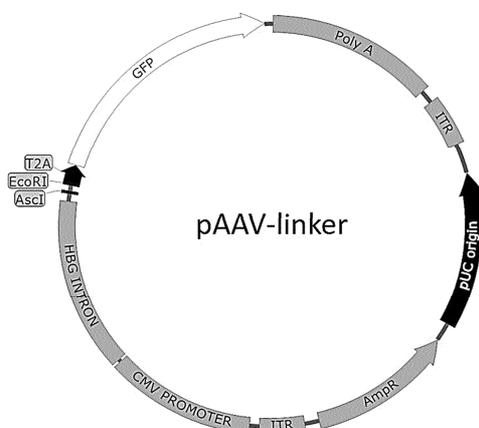
б) фармацевтически приемлемый эксципиент.

57. Способ доставки генного продукта нуждающемуся в этом субъекту, который включает введение субъекту вектора на основе гAAV5 по любому из пп.54, 55 или фармацевтической композиции по п.56.

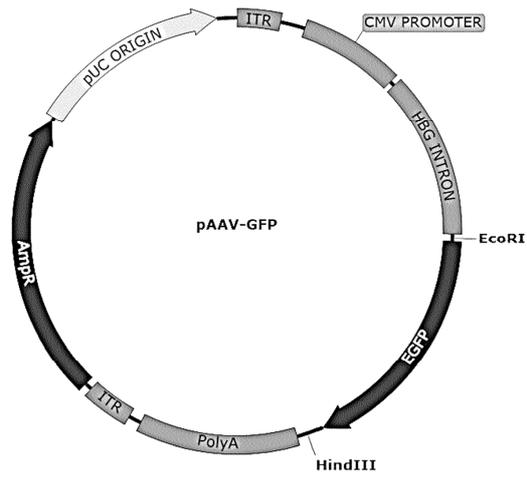
58. Применение вектора на основе гAAV5 по любому из пп.54, 55 или фармацевтической композиции по п.56 для лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

59. Применение по п.58, где заболевание выбирают из группы: заболевания крови; заболевания центральной нервной системы; заболевания метаболизма; заболевания мышц; наследственные заболевания.

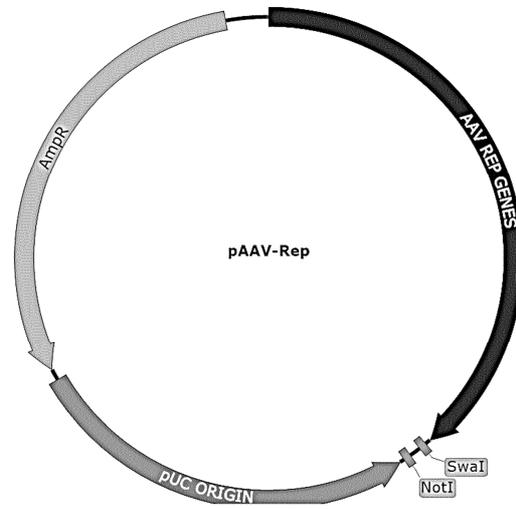
60. Способ получения вектора на основе гAAV5 по любому из пп.54, 55, который включает трансфекцию клеток-продуцентов нуклеиновой кислотой, кодирующей модифицированный белок VP1 капсида аденоассоциированного вируса 5 серотипа, по любому из пп.14-20 или нуклеиновой кислотой, кодирующей капсид, по п.53.



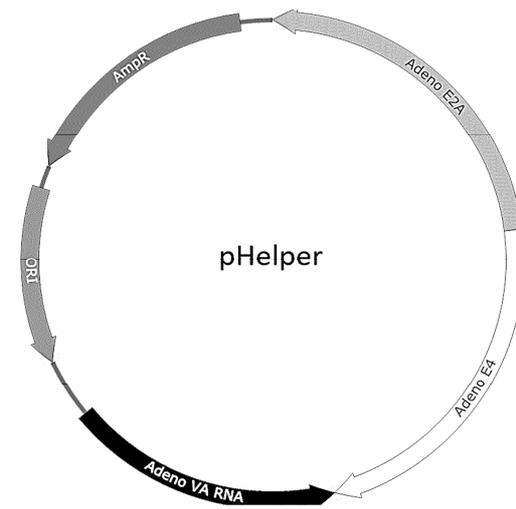
Фиг. 1



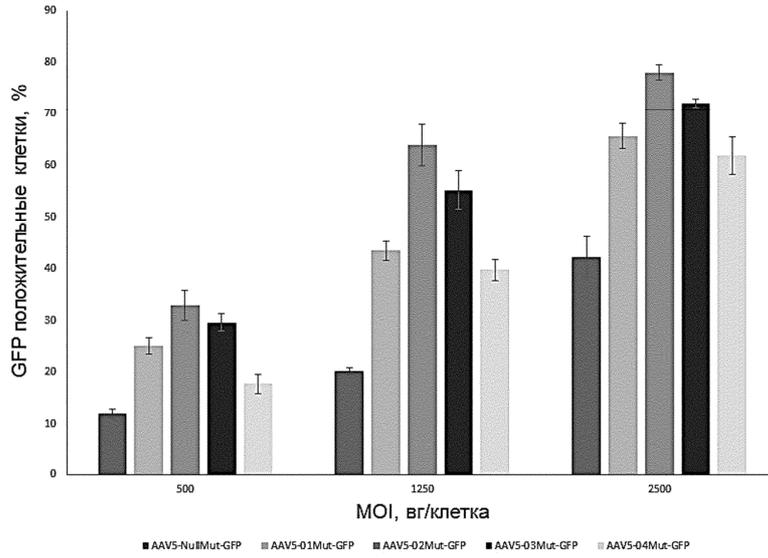
Фиг. 2



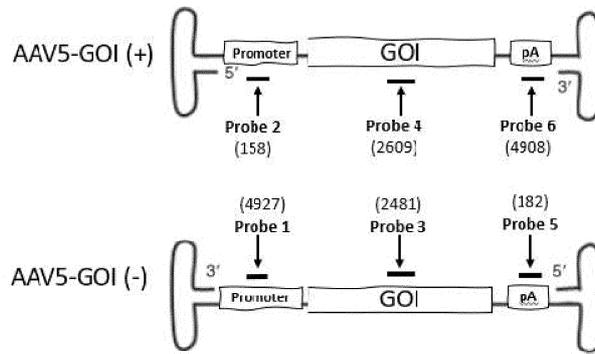
Фиг. 3



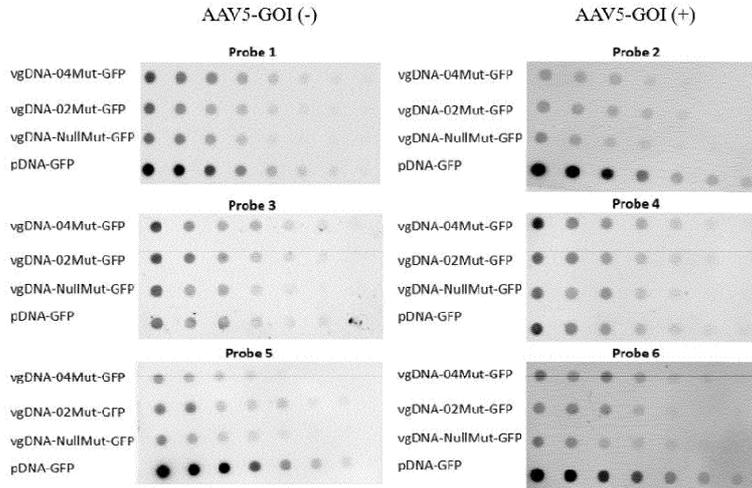
Фиг. 4



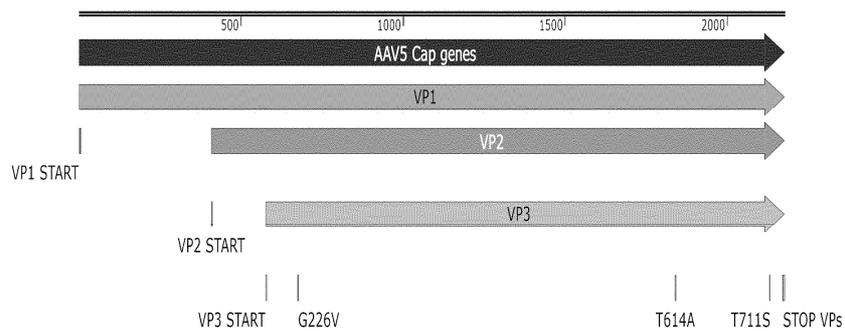
Фиг. 5



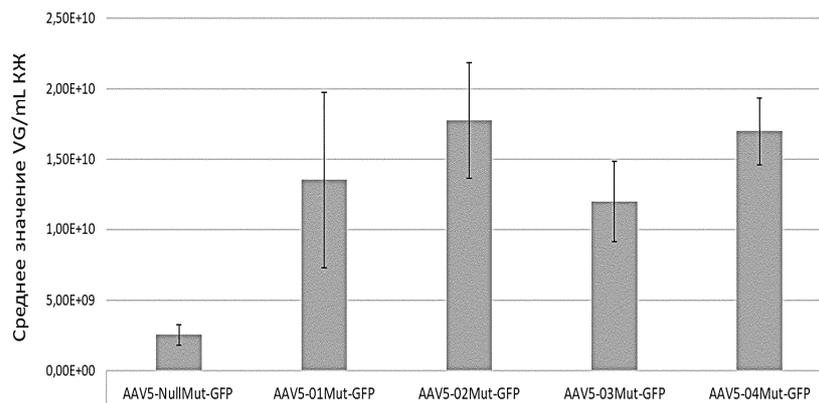
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

