

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392216 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.09

(22) Дата подачи заявки
2022.03.05

(51) Int. Cl. C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C07K 14/075 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) КОДОН-ОПТИМИЗИРОВАННАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОТОРАЯ КОДИРУЕТ БЕЛОК ФАКТОРА СвёрТЫВАНИЯ КРОВИ IX, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 2021105703

(32) 2021.03.05

(33) RU

(86) PCT/RU2022/050073

(87) WO 2022/186734 2022.09.09

(71) Заявитель:

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"БИОКАД" (RU)

(72) Изобретатель:

Прокофьев Александр Владимирович,
Гершович Павел Михайлович,
Стрелкова Анна Николаевна,
Спирина Наталья Александровна,
Шугаева Татьяна Евгеньевна,
Морозов Дмитрий Валентинович (RU)

(74) Представитель:

Мельчаева О.А. (RU)

(57) Изобретение относится к области генетики, генной терапии и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенной кодон-оптимизированной нуклеиновой кислоте, которая кодирует белок FIX (фактор свёртывания крови IX), экспрессионной кассете и вектору на ее основе, а также к рекомбинантному вирусу на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для увеличения экспрессии гена FIX в целевых клетках, и их применению.

A1

202392216

202392216

A1

Кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота, которая кодирует белок фактора свёртывания крови IX, и ее применение

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка относится к области генетики, генной терапии и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенной кодон-оптимизированной нуклеиновой кислоте, которая кодирует белок FIX (фактор свёртывания крови IX), экспрессионной cassette и вектору на ее основе, а также к рекомбинантному вирусу на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для увеличения экспрессии гена FIX в целевых клетках, и их применению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Генная терапия является одной из перспективных отраслей современной медицины. Ее основное направление – разработка эффективных решений для лечения наследственных заболеваний, поскольку только генотерапевтические методы позволяют воздействовать собственно на причину этих заболеваний. Из большого количества наследственных заболеваний одной из наиболее распространенных является группа патологий, связанных с нарушением гемостаза.

Гемофилия – это сцепленное с X-хромосомой заболевание, связанное с отсутствием или выраженным дефицитом плазменных факторов свертывания, характеризующееся нарушением свёртывания крови, клинически проявляющимся в виде спонтанных или спровоцированных, часто неконтролируемых, кровотечений в суставы, мышцы и внутренние органы и т.д.

Гемофилия В вызвана отсутствием или дефицитом плазменного фактора свертывания IX. В большинстве случаев заболевание имеет семейный анамнез, но в ряде случаев выявляются спорадические мутации. Подавляющее большинство больных гемофилией лица мужского пола, случаи гемофилии у женщин установлены, но крайне редки. Фактор IX свертывания крови (FIX, фактор Кристмаса) является проферментом сериновой протеазы, которая в присутствии Ca^{2+} и мембранных фосфолипидов гидролизует связь аргинин–изолейцин в молекуле фактора X с образованием активированного фактора X (FXa). Каталитическая эффективность фактора IXa возрастает при связывании кофактора – активированного фактора свертывания крови VIII (FVIIIa).

Фактор IX синтезируется в печени в виде неактивного белка-предшественника, который процессируется в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, где подвергается множественным посттрансляционным модификациям различных типов и секретруется в кровоток после протеолитического отщепления пропептида. В каскаде свертывания крови фактор IX активируется после протеолитического расщепления активированным фактором XI (внутренний путь) или активированным фактором VII (внешний путь) с образованием двух полипептидных цепей, связанных дисульфидной связью. Активированный фактор IX постепенно инактивируется, в основном путем медленного связывания с антитромбином III, нексином-2, белок Z зависимым

ингибитором протеаз и рецепторами эндоцитоза гепатоцитов, а также подвергается расщеплению эластазой нейтрофилов.

На данный момент используется заместительная терапия. После разработки метода криопреципитации в 1966 г. был зарегистрирован первый препарат фактора свертывания, который получали из плазмы крови доноров. В 1980-х годах было установлено, что препараты факторов свертывания крови, получаемые из плазмы, могут быть инфицированы вирусами (ВИЧ, гепатит С), что привело к заражению около 20 000 больных. Данное обстоятельство послужило импульсом для разработки методов элиминации и инактивации вирусов при производстве плазменных препаратов и создания новых препаратов, получаемых без использования плазмы. В производственный процесс получения препаратов из плазмы (plasma derived – pdFIX) был включен этап термической обработки, который позволил устранить инфицирование препаратов. Параллельно совершенствованию технологического процесса получения препаратов из плазмы проводили исследования по разработке факторов свертывания с использованием технологии рекомбинантных ДНК. На основе данной технологии получены и зарегистрированы препараты рекомбинантного фактора свертывания крови IX (rFIX) в 1997 г. Технология получения препаратов на основе рекомбинантной ДНК позволяет значительно снизить риск вирусной контаминации препаратов. В настоящее время препаратами заместительной терапии гемофилии являются плазменные и рекомбинантные препараты, однако они имеют ряд недостатков.

Основной проблемой производства плазменных препаратов является потребность в больших объемах плазмы. При этом, несмотря на то, что с конца 1980-х годов не было зарегистрировано случаев инфицирования больных при применении pdFIX, производители данных препаратов теоретически не могут исключить возможность их вирусного заражения.

Среди недостатков, применяемых в настоящее время для лечения гемофилии препаратов FIX, следует выделить следующие:

- теоретическая вероятность вирусного инфицирования больных плазменными препаратами;
- высокая иммуногенность плазменных и рекомбинантных препаратов;
- более низкая (в сравнении с плазменными препаратами) эффективность рекомбинантных препаратов;
- низкий период циркуляции в крови факторов свертывания крови;
- потребность в частых внутривенных инфузиях (2-3 раза в неделю);
- отсутствие широкой доступности пожизненной заместительной терапии.

Применение генотерапевтических лекарственных препаратов для трансдукции гена фактора IX являются принципиально новым и перспективным подходом в сравнении с существующими вариантами терапии: вводимый с помощью внутривенной инфузии генотерапевтический препарат восстанавливает продукцию фактора свертывания в организме пациента.

Один из основных методов генотерапии – это доставка целевого гена в клетки организма с помощью вирусных векторов, например, вектора на основе AAV.

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 из тканей множества типов, обеспечивая мощную и устойчивую трансгенную экспрессию. 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 кодон-оптимизация генов интереса в составе векторов для получения максимального уровня экспрессии генов интереса, что, в свою очередь, позволит использовать для достижения значимого эффекта более низкие дозы вектора.

Одним из свойств генетического кода является вырожденность - способность разных кодонов (тринуклеотидов) кодировать одну и ту же аминокислоту. Такие кодоны, которые дают одну и ту же аминокислоту в процессе трансляции, называются синонимичными. В природных последовательностях выбор одного из синонимичных кодонов осуществляется случайным образом в процессе эволюции, однако частоты использования синонимичных кодонов отличаются: для каждой аминокислоты есть более и менее предпочтительные. Кодон-оптимизация - это широко используемая в мире техника, направленная на повышение продуктивности наработки белковых молекул, которая заключается в рациональном сопоставлении каждой аминокислоте в белковой последовательности одного из подходящих синонимичных кодонов. Один из распространенных принципов кодон-оптимизации подразумевает использование наиболее частых кодонов, впоследствии были предложены и другие подходы, такие как гармонизация (воспроизведение распределения частот используемых кодонов), но и они не всегда дают увеличение продуктивности. Помимо частот кодонов на эффективность наработки может влиять GC-состав последовательности (отношение количества гуанинов и цитозинов к суммарной длине последовательности), в частности, было показано, что завышенный GC-состав ассоциирован с повышением количества мРНК в клетках млекопитающих Grzegorz Kudla ET AL., High Guanine and Cytosine Content Increases

mRNA Levels in Mammalian Cells, June 2006, Volume 4, Issue 6, e180, pp. 933-942). Также стоит отметить, что устойчивые элементы вторичной структуры мРНК, т.е. имеющие низкую свободную энергию фолдинга, могут снижать эффективность.

Различные варианты кодон-оптимизации последовательности гена интереса могут приводить к следующему (в сравнение с геном дикого типа):

- а) уровень экспрессии генов интереса будет незначительно увеличен;
- б) уровень экспрессии генов интереса будет значительно увеличен;
- в) уровень экспрессии генов интереса останется приблизительно на том же уровне;
- г) уровень экспрессии генов интереса будет понижен.

Таким образом, есть потребность в получении кодон-оптимизированной последовательности гена FIX для увеличения экспрессии гена FIX в целевых клетках и создании на его основе генотерапевтического препарата.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторами данной группы изобретений было установлено, что кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота по изобретению, которая кодируют белок FIX (фактор свёртывания крови IX), с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2 (hFIX_{co-v1}) или SEQ ID NO: 4 (hFIX_{co-v2}) неожиданно показывает увеличение уровня экспрессии гена FIX и увеличение уровня продукции белка фактора свёртывания крови IX в несколько раз по сравнению с геном дикого типа, кодирующим фактор свёртывания крови IX (hFIX-wt). Данные варианты кодон-оптимизированной нуклеиновой кислоты по изобретению с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2 (hFIX_{co-v1}) и SEQ ID NO: 4 (hFIX_{co-v2}) входят в состав экспрессионной кассеты и вектора на ее основе, а также в состав рекомбинантного вируса на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа).

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной кодон-оптимизированной нуклеиновой кислоте, которая кодирует белок FIX (фактор свёртывания крови IX) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, и которая включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете, которая включает вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

- левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);
- TTR промотор (промотор транскриптаза);
- интрон гена hBG1 (фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон);
- вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который включает вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту или любую из вышеуказанных экспрессионных кассет.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному вирусу на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для увеличения экспрессии гена FIX в целевых клетках, который включает вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту или любую из вышеуказанных экспрессионных кассет.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

TTR промотор (промотор транстиретина);

интрон гена hBG1 (фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон);

вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, представляет собой аминокислотную последовательностью SEQ ID NO: 14.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для доставки гена FIX в целевые клетки, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции для доставки гена FIX в целевые клетки.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции для обеспечения белком FIX субъекта, который имеет гемофилию В и/или не имеет полнофункциональных копий гена FIX.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции для лечения гемофилии В у субъекта, который имеет гемофилию В.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу обеспечения белком FIX субъекта с гемофилией В, включающий введение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта, нуждающегося в этом.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу доставки гена FIX в целевые клетки субъекта с гемофилией В, включающий введение любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения гемофилии В у субъекта, который включает ведение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции субъекту, который имеет гемофилию В.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет собой схему плазмид pAAV-hFIXco-v1 и pAAV-hFIXco-v2, предназначенных для получения AAV векторов с экспрессионной кассетой, которая содержит кодон-оптимизированные последовательности гена фактора свёртывания крови IX (FIX) человека hFIXco-v1 и hFIXco-v2 соответственно, где hFIXco-v1 – кодон-оптимизированная последовательность гена фактора свёртывания крови IX человека (вариант №1);

hFIX_{co-v2} – кодон-оптимизированная последовательность гена фактора свёртывания крови IX человека (вариант №2);

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

pUC origin- pUC ориджин репликации в бактериях;

ITR – инвертированные терминальные повторы;

TTR Promoter – промотор гена транстиретина (transferrin promoter);

Poly A - последовательность сигнала полиаденилирования, для повышения стабильности мРНК;

HBG Intron – (human beta globine intron), фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон.

Фигура 2 представляет собой график, показывающий уровень экспрессии гена FIX в клетках Huh7 спустя 7 дней после трансдукции клеток вирусным препаратом AAV5-FIX, несущим ген FIX дикого типа (AAV5-hFIX-wt), препаратом AAV5-FIX, несущим кодон-оптимизированный ген hFIX_{co-v1} (AAV5-hFIX_{co-v1}) и препаратом AAV5-FIX, несущим кодон-оптимизированный ген hFIX_{co-v2} (AAV5-hFIX_{co-v2}) (*все варианты генов FIX в препаратах AAV-FIX содержат природную мутацию Padua, R338L*). * - p-value < 0,05. Статистический анализ проведен с помощью two-way ANOVA с критерием Даннетта (Dunnett test).

Фигура 3 представляет собой график, показывающий концентрацию белка FIX в культуральной жидкости спустя 7 дней после трансдукции клеток Huh7 вирусным препаратом AAV5-FIX, несущим ген FIX дикого типа (AAV5-hFIX-wt), препаратом AAV5-FIX, несущим кодон-оптимизированный ген hFIX_{co-v1} (AAV5-hFIX_{co-v1}) и препаратом AAV5-FIX, несущим кодон-оптимизированный ген hFIX_{co-v2} (AAV5-hFIX_{co-v2}) (*все варианты генов FIX в препаратах AAV-FIX содержат природную мутацию Padua, R338L*). Контроль – нетрансдуцированные клетки Huh7. *** - p-value < 0,001. Статистический анализ проведен с помощью two-way ANOVA с критерием Даннетта (Dunnett test).

Фигура 4 представляет собой график, показывающий активность белка FIX в культуральной жидкости спустя 7 дней после трансдукции клеток Huh7 вирусным препаратом AAV5-FIX, несущим ген FIX дикого типа (AAV5-hFIX-wt), препаратом AAV5-FIX, несущим кодон-оптимизированный ген hFIX_{co-v1} (AAV5-hFIX_{co-v1}) и препаратом AAV5-FIX, несущим кодон-оптимизированный ген hFIX_{co-v2} (AAV5-hFIX_{co-v2}) (*все варианты генов FIX в препаратах AAV-FIX содержат природную мутацию Padua, R338L*). Контроль – нетрансдуцированные клетки Huh7. *** - p-value < 0,001. Статистический анализ проведен с помощью two-way ANOVA с критерием Даннетта (Dunnett test).

Фигура 5 представляет собой график, который показывает содержание белка фактора свёртывания крови IX в плазме крови экспериментальных животных после внутривенного введения препарата AAV5-FIX, несущего ген FIX дикого типа (AAV5- hFIX-wt) и препарата AAV5-FIX, несущего кодон-оптимизированный ген hFIX_{co-v1} (AAV5-hFIX_{co-v1}) (*все варианты генов FIX в препаратах AAV-FIX содержат природную мутацию Padua, R338L*). Средние значения ± стандартное отклонение (n=10). *** - p-value < 0,001; ** - p-value < 0,01; * - p-value < 0,05. Статистический анализ проведен с помощью one-way ANOVA с критерием Даннетта (Dunnett test).

Фигура 6 представляет собой график, который показывает содержание белка фактора свёртывания крови IX в плазме крови экспериментальных животных после внутривенного введения препарата AAV5-FIX, несущего ген FIX дикого типа (AAV5-hFIX-wt) и препарата AAV5-FIX, несущим кодон-оптимизированный ген hFIXco-v2 (AAV5-hFIXco-v2) (*все варианты генов FIX в препаратах AAV-FIX содержат природную мутацию Padua, R338L*). Средние значения \pm стандартное отклонение (n=10). *** - p-value < 0,001; ** - p-value < 0,01; * - p-value < 0,05. Статистический анализ проведен с помощью one-way ANOVA с критерием Даннетта (Dunnnett test).

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, 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 животном, 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 «имеющий», «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 ПЦР 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). 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 репликации неструктурных белков (Rep) и структурных белков (Cap). Ген Cap кодирует белки VP (VP1, VP2 и VP3), которые образуют капсид. Концевые 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

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. Используемый в данном документе, термин «облегчить» болезнь, заболевание или состояние, означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства или состояния. 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.

Терапевтически эффективным количеством» или «эффективным количеством» считается количество вводимого терапевтического агента, которое избавит в определенной степени от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится лечение.

Подробное описание изобретения

Нуклеиновая кислота

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной кодон-оптимизированной нуклеиновой кислоте, которая кодирует белок FIX (фактор свёртывания крови IX) с аминокислотной последовательностью

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECM
EEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCE
LDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPPFCGRVSVSQTSKLTRAE
TVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIV
NEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQKRN VIRIIPHHNYNA AINKYNHDIALLELD
EPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTK
FTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSR YV
NWIKEKTKLT (SEQ ID NO:1), и которая включает нуклеотидную последовательность, которую
выбирают из группы:

ATGCAGCGGGTCAACATGATCATGGCCGAGTCGCCGGCCTGATCACGATCTGCCTCCTCGG
GTACCTGCTCTCCGCCGAGTGCACCGTGTTCCTGGACCACGAGAACGCCAACAAAGATCCTCA
ACCGGCCCAAGCGCTACAACCTCCGGCAAGCTGGAGGAGTTCGTGCAGGGGAACCTCGAGCG
CGAGTGCATGGAGGAGAAGTGCTCGTTCGAGGAGGCGCGGGAGGTGTTTCGAGAACACCGAG
CGCACACGGAGTTCTGGAAGCAGTACGTGGACGGGGACCAGTGCGAGTCGAACCCGTGCC
TCAACGGGGGGTCTGTGCAAGGACGACATCAACTCGTACGAGTGCTGGTGCCCTTCGGCTTC
GAGGGCAAGAAGCTGCGAGCTGGACGTGACCTGCAACATCAAGAACGGGCGCTGCGAGCAGT
TCTGCAAGAACAGCGCCGACAACAAGGTGGTCTGCTCCTGCACCGAGGGGTACCGCCTCGC
GGAGAACCAGAAGTCCTGCGAGCCGGCCGTGCCCTTCCCCTGCGGCCGCGTGTCCGTCAGCC
AGACGTGCAAGCTGACGCGCGCCGAGACCGTCTTCCCGGACGTGGACTACGTGAACTCGAC
GGAGGCCGAGACCATCCTGGACAACATCACCCAGAGCACCCAGTCCTTCAACGACTTCACG
CGGGTGGTCGGCGGGCAGGACGCCAAGCCCGGGCAGTTCCTGTCGAGGTCGTCTCAACG
GGAAGGTCGACGCGTTCGCGGGCGGAGCATCGTGAACGAGAAGTGGATCGTGACCGCCGC
GCACTGCGTCGAGACGGGCGTGAAGATCACCGTGGTGGCCGGGGAGCACAAACATCGAGGAG
ACGGAGCACACCGAGCAGAAGCGGAACGTGATCCGCATCATCCCGCACCAACAACATAACG
CCGCCATCAACAAGTACAACCACGACATCGCGCTCCTCGAGCTGGACGAGCCGCTGGTCCTC
AACTCCTACGTACGCCGATCTGCATCGCCGACAAGGAGTACACGAACATCTTCTGAAGTT
CGGGAGCGGCTACGTCTCGGGCTGGGGCCGCGTGTTCACAAGGGGCGCAGCGCGCTCGTG
CTCCAGTACCTGCGGGTCCCCCTGGTTCGACCGCGCGACCTGCCTCCTCTCCACGAAGTTCAC
GATCTACAACAACATGTTCTGCGCGGGGTTCCACGAGGGCGGCCGGGACAGCTGCCAGGGC
GACAGCGGGGGCCCGCACGTGACGGAGGTGGAGGGCACGAGCTTCTGACCGGGATCATCT
CGTGGGGCGAGGAGTGCGCGATGAAGGGGAAGTACGGCATCTACACCAAGGTCAGCCGGTA
CGTGAACCTGGATCAAGGAGAAGACGAAGCTGACG (SEQ ID NO: 2)

или

ATGCAGCGGGTGAACATGATCATGGCCGAGTCCCAGGCCTGATTACCATCTGTCTGCTGGG
CTACCTGCTGAGCGCCGAATGCACCGTGTTCCTGGACCACGAGAACGCCAACAAAGATCCTGA
ACCGCCCTAAGCGGTACAACCTCCGGCAAGCTGGAGGAGTTTGTGCAGGGCAATCTGGAGCG
GGAGTGTATGGAGGAGAAGTGCAGCTTCGAGGAGGCCAGGGAGGTGTTTCGAGAACACCGA
GAGGACCACCGAGTTCTGGAAGCAGTATGTGGACGGCGACCAGTGCGAGTCTAATCCTTGTC

TGAATGGCGGGAGCTGCAAGGACGACATCAACAGCTACGAGTGCTGGTGCCCTTTTCGGCTTC
GAGGGCAAGAATTGCGAGCTGGACGTGACCTGCAACATCAAGAACGGCCGGTGTGAGCAGT
TCTGCAAGAACAGCGCCGACAACAAGGTGGTGTGCTCCTGCACCGAGGGATAACAGGCTGGC
CGAGAATCAGAAGAGCTGTGAGCCCGCCGTGCCATTCCCCTGTGGCAGAGTGTCTGTGAGCC
AGACCAGCAAGCTGACCAGAGCCGAGACCGTGTTCAGACGTGGACTACGTGAACAGCAC
CGAGGCCGAGACCATCCTGGATAATATCACCCAGTCCACCCAGAGCTTCAACGACTTCACCA
GAGTGGTGGGAGGCGAGGATGCCAAGCCAGGACAGTTTTCCCTGGCAGGTGGTGTGCTGAATGG
CAAGGTGGACGCCTTCTGCGGAGGCAGCATCGTGAACGAGAAGTGGATTGTGACCCGAGCC
CACTGCGTGGAGACTGGCGTGAAGATTACCGTGGTCGCCGGCGAGCACAATATCGAAGAGA
CCGAGCACACCGAGCAGAAGCGCAACGTGATCCGGATCATCCCTCACCACAACACTACAACGC
AGCCATCAACAAGTACAACCACGACATCGCCCTGCTGGAGCTGGACGAGCCACTGGTGTGCTG
AACTCTTACGTGACCCCTATCTGCATCGCCGACAAGGAGTACACCAACATCTTCCTGAAGTT
CGGCAGCGGCTACGTGAGCGGATGGGGCAGAGTGTTCACAAGGGCAGGAGCGCCCTGGTG
CTGCAGTATCTGAGAGTGCCACTGGTGGACAGAGCTACCTGCCTGCTGAGCACCAAGTTCAC
CATCTACAACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGGGGAAGAGACTCTTGCCAGGGC
GATTCCGGCGGACCACACGTGACCGAAGTGGAGGGCACCAGCTTCCTGACCGGCATCATCTC
CTGGGGCGAGGAATGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGCATCTACACCAAGGTGAGCAGGTAC
GTGAACTGGATCAAGGAGAAGACCAAGCTGACC (SEQ ID NO: 4).

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты нуклеазы. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, находящуюся в клетках, в которых в норме происходит экспрессия нуклеазы, например, в случае, если молекула нуклеиновой кислоты имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в клетках в естественных условиях.

Для получения вышеуказанной кодон-оптимизированной нуклеиновой кислоты была проведена кодон-оптимизация нуклеиновой кислоты дикого типа с нуклеотидной последовательностью

ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCCAGGCCTCATCACCATCTGCCTTTTAGG
ATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAATAATTCTGA
ATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAATTTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAG
AGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAA
AGAACAACCTGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTT
AAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTG
AAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTT

TTGTA AAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAG
AAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAA
ACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTTCCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAA
GCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGT
TGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAG
TTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCTGCCACTGT
GTTGAAACTGGTGTTAAAATTACAGTTGTTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAAC
ATACAGAGCAAAGCGAAATGTGATTCGAATTATTCCTCACCAACTACAATGCAGCTATT
AATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTA
CGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTG
GCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTAC
CTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAAC
AACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGG
GACCCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTTAGCTGGGGTGAA
GAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGA
TTAAGGAAAAACAAGCTCACT (SEQ ID NO: 17)

В результате кодон-оптимизации нуклеиновой кислоты дикого типа, которая кодирует белок FIX, с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 17 был получен ряд кодон-оптимизированных нуклеиновых кислот, которые были в дальнейшем протестированы на уровень продукции белка по сравнению с контролем (нуклеиновая кислота дикого типа с SEQ ID NO: 17).

Все кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты показали увеличение уровня продукции белка FIX по сравнению с диким типом, при этом кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота по изобретению с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2 (hFIX_{co-v1}) и кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота по изобретению с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4 (hFIX_{co-v2}) неожиданно показали самый лучший показатель, а именно увеличение уровня экспрессии гена FIX, увеличение уровня продукции белка FIX в несколько раз по сравнению с диким типом (см. примеры 2, 3 и 4).

Экспрессионная кассета. Экспрессионный вектор.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете, которая включает вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок FIX (фактор свёртывания крови IX).

Термин «кассета, которая экспрессирует» или «экспрессионная кассета» при использовании в данном документе, в частности, относится к фрагменту ДНК, который способен в соответствующей обстановке запускать экспрессию полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, который включен в указанную экспрессионную кассету. При введении в клетку-хозяина экспрессионная кассета помимо прочего способна задействовать клеточные механизмы для транскрипции полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес

В некоторых вариантах осуществления изобретения TTR промотор имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

tcgagcttgggctgcaggctcagggcactgggaggatgttgagtaagatggaaaactactgatgcccttcagagacagagtattaggacatgtttgaa
caggggcccggcatcagcaggtagctctagaggatccccgtctgtctgcacatttcgtagagcgagtgtccgatactctaattccctaggaaggttca
tattgttaggttacttattctctttttgactaagtaataatcagaatcagcaggtttggagtcagcttggcaggatcagcagcctgggttgaagga
gggggtataaaagccccctcaccaggagaagccgtcacacagatccacaagctcctgacaggaagct (SEQ ID NO: 7).

В некоторых вариантах осуществления изобретения интрон гена hBG1 имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

cgaatccccggccgggaacgggtgacgtggaacgcggattccccgtgccaagagtgacgtaagtaccgcctatagagtctataggcccaaaaaatgctt
tctctttaaataactttttgttatcttatttctaatactttccctaactctttcttcagggaataatgatacaatgatcatgctctttgaccattctaaagaat
aacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcataataatttctgcataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagct
acaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtcgaagctagccctttgctaatacatgttcatacctcttatctctc
ccacagctcctgggcaacgtgctgtgtgtgctggcccatcatttggcaagaattgggat (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнал полиаденилирования hGH1 имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

acgggtggcatccctgtgacctccccagtgccCctcctggccctggaagttgccaactccagtgcccaccagcctgtcctaataaaattaagttgcatc
atftgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggaggggggtgtaggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtaggcctgctggggg
tctattgggaaccaagctggagtgagtgagcacaatctggctcactgcaatctcgcctcctgggtcaagcgattctctgctcagcctcccaggtgtt
gggattccaggcatgcatgaccagctcagctaattttgttttttggtagagacggggttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaattctcagg
tgatctaccacctggcctcccaaatgctgggattacagcgctgaacctgctccctcctgtcctt (SEQ ID NO: 9).

В некоторых вариантах осуществления изобретения правый (второй) ITR имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

aggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgctgctcgtcactagggccggcgaccaaaaggtgcccagcggcggccttggcc
cgggcccctcagtgagcagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы:

cttcgaggcagctgcgctcgtcgtcactgagggccggggcgtcgggacacgttggctgcccggcctcagtgagcagcgagc
gagcagagagggagtgccaactccatcactaggggtcctgctgcccgcacgctgcccaccATGGtcgagcttgggctgcaggtcagggc
actgggaggtgtgagtaagatggaaaactactgatgaccttcagagacagagtattaggacatgttgaacaggggcccggcagcaggtagc
tctagaggatccccgtctgtctgcacatttcgtagagcgagtgtccgatactctaattccctaggaaggttcatattgtgtaggttacttattctctttgtt
gactaagtcaataatcagaatcagcaggtttggagtcagcttggcaggatcagcagcctgggttgaagaggggtataaaagccccctcaccagg
agaagccgtcacacagatccacaagctcctgacaggaagctctaggtgactctctaaggtagcctcccggttcgaatcccggcgggaacgggtgc
attggaacgcggattccccgtgccaagagtgacgtaagtaccgcctatagagtctataggcccaaaaaatgcttcttctttaaataactttttgttatctt
atttctaatactttccctaactcttcttccagggaataatgatacaatgatcatgctcttcttgcaccattctaagaataacagtgataatttctgggttaagg
caatagcaataatttctgcataaataatttctgcataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttta
ttttatggttgggataaggctgattattctgagtcgaagctagggccctttgctaatacatgttcatacctcttatcttctcccacagctcctgggcaacgtgct
ggctctgtgtgctggcccatcatttggcaagaattgggattcgaacatCGATATGCAGCGGGTCAACATGATCATGGCGG
AGTCGCCGGGCTGATCACGATCTGCCTCCTCGGGTACCTGCTCTCCGCCGAGTGCACCGTG

TTCCTGGACCACGAGAACGCCAACAAAGATCCTCAACCGGCCCAAGCGCTACAACCTCCGGCA
AGCTGGAGGAGTTCGTGCAGGGGAACCTCGAGCGCGAGTGCATGGAGGAGAAGTGCTCGTT
CGAGGAGGCGCGGGAGGTGTTTCGAGAACACCGAGCGCACACGGAGTTCTGGAAGCAGTAC
GTGGACGGGGACCAGTGCAGTTCGAACCCGTGCCTCAACGGGGGGTTCGTGCAAGGACGACA
TCAACTCGTACGAGTGTGGTGCCCTTCGGCTTCGAGGGCAAGAAGTGCAGGCTGGACGTG
ACCTGCAACATCAAGAACGGGGCGCTGCGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCGACAACAAGG
TGGTCTGCTCCTGCACCGAGGGGTACCGCCTCGCGGAGAACCAGAAGTCTGCGAGCCGGC
CGTGCCCTTCCCCTGCGGCCGCGTGTCCGTCAGCCAGACGTTCGAAGCTGACGCGCGCCGAGA
CCGTCTTCCCGGACGTGGACTACGTGAACTCGACGGAGCCGAGACCATCCTGGACAACATC
ACCCAGAGCACCCAGTCCTTCAACGACTTCACGCGGGTGGTTCGGCGGGCAGGACGCCAAGC
CCGGGCAGTTCCTGTGGCAGGTTCGTCCTAACGGGAAGGTTCGACGCGTTCTGCGGCGGGAG
CATCGTGAACGAGAAGTGGATCGTGACCGCCGCGCACTGCGTCGAGACGGGCGTGAAGATC
ACCGTGGTGGCCGGGGAGCACAACTCGAGGAGACGGAGCACACCGAGCAGAAGCGGAAC
GTGATCCGCATCATCCCGCACCAACTACAACGCCGCCATCAACAAGTACAACCACGACAT
CGCGTCTCTCGAGCTGGACGAGCCGCTGGTCTCAACTCTACGTACGCCGATCTGCATCG
CCGACAAGGAGTACACGAACATCTTCTGAAGTTCGGGAGCGGCTACGTCTCGGGCTGGGG
CCGCGTGTCCACAAGGGGCGCAGCGCGCTCGTGCTCCAGTACCTGCGGGTCCCCCTGGTCG
ACCGCGGACCTGCCTCCTCTCCACGAAGTTCACGATCTACAACAACATGTTCTGCGCGGGG
TTCCACGAGGGGCGGCCGGGACAGCTGCCAGGGCGACAGCGGGGGCCCGCACGTGACGGAG
GTGGAGGGCACGAGCTTCTGACCGGGATCATCTCGTGGGGCGAGGAGTGCGCGATGAAGG
GGAAGTACGGCATCTACACCAAGGTCAGCCGGTACGTGAACTGGATCAAGGAGAAGACGAA
GCTGACGTGATGAAgatctacgggtggcatcctgtgacctcccagtgccCctcctggccctggaagtggcactccagtggccacc
agccttgctcaataaaattaagttgcatcatttgtctgactaggtgtcctctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttg
ggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattggaaccaagctggagtgagtgccacaatctggctcactgcaatctccgctcctgggttaag
cgattctctgctcagcctcccagttgtgggattccaggcatgcatgaccaggctcagtaattttgtttttgtagagacggggttcacatattgg
ccaggctggtctcaactcctaatctcaggtgatctaccaccttgccctcccaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctccctcctctcctct
gattttgtaggtaaccacgtgcgagcgggacggcggcaggaaccctagtgatggagttggcactcctctctgcgctcgtcgtcactgaggcc
gggagcaaaaggtgccccgacgcccgggctttgcccgggcccctcagtgagcgagcgagcgagcagctgctgcagg (SEQ ID NO: 3)

или

cctgcaggcagctgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggctgaggcgacctttggtgcccggcctcagtgagcgagcgagc
gagcagagagggagtgccaactcctcactaggggttctgcgccgacgctgcccaccATGGtcgagctgggctgaggtcagggc
actgggaggtgttgagtaagatggaaaactactgatgaccttgacagagacagagtattaggacatgttgaacaggggcccgcgatcagcaggtagc
tctagaggatccccgtctgtctgcacattctgtagagcagtggtccgatacttaactccttaggcaaggtcatattgtgtaggttacttctcctttgtt
gactaagtcaataatcagaatcagcaggtttggagtcagctggcagggatcagcagcctgggttgaaggaggggtataaaagccccttcaccagg
agaagccgtcacacagatccacaagctcctgacaggaagcttaggtgactcttaagtagcctccgagattcgaatcccggccgggaacggtgc
attggaacgggattccccgtgccaagagtacgtaagtaccgctataggtctatagcccacaaaaatgctttcttttaataactttttgttatctt
atttctaactttccctaatctctttcttcagggaataatgatacaatgtatcatgctctttgcaccattctaaagaataacagtgataattctgggttaagg
caatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttta

ttttatggtgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggccctttgctaatacatgttcataccttctatcttctcccacagctcctgggcaacgtgct
ggtctgtgtgctggccatcactttggcaagaattgggattcgaacatcgatataaATGCAGCGGGTGAACATGATCATGGCC
GAGTCCCAGGCCTGATTACCATCTGTCTGCTGGGCTACCTGCTGAGCGCCGAATGCACCGT
GTTTCTGGACCACGAGAACGCCAACAAGATCCTGAACCGCCCTAAGCGGTACAACCTCCGGC
AAGCTGGAGGAGTTTGTGCAGGGCAATCTGGAGCGGGAGTGTATGGAGGAGAAGTGCAGCT
TCGAGGAGGCCAGGGAGGTGTTTCGAGAACACCGAGAGGACCACCGAGTTCTGGAAGCAGTA
TGTGGACGGCGACCAGTGCAGTCTAATCCTTGTCTGAATGGCGGGAGCTGCAAGGACGAC
ATCAACAGCTACGAGTGTGGTGCCTTTTCGGCTTCGAGGGCAAGAATTGCGAGCTGGACGT
GACCTGCAACATCAAGAACGGCCGGTGTGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCGACAACAAG
GTGGTGTGCTCCTGCACCGAGGGATACAGGCTGGCCGAGAATCAGAAGAGCTGTGAGCCCCG
CCGTGCCATTCCCCTGTGGCAGAGTGTCTGTGAGCCAGACCAGCAAGCTGACCAGAGCCGA
GACCGTGTTCAGACGTGGACTACGTGAACAGCACCGAGGCCGAGACCATCCTGGATAAT
ATCACCCAGTCCACCCAGAGCTTCAACGACTTCACCAGAGTGGTGGGAGGCGAGGATGCCA
AGCCAGGACAGTTTCCCTGGCAGGTGGTGTGAATGGCAAGGTGGACGCCTTCTGCGGAGG
CAGCATCGTGAACGAGAAGTGGATTGTGACCGCAGCCCCTGCGTGGAGACTGGCGTGAAG
ATTACCGTGGTCGCCGGCGAGCACAATATCGAAGAGACCGAGCACACCGAGCAGAAGCGCA
ACGTGATCCGGATCATCCCTCACCACAACCTACAACGCAGCCATCAACAAGTACAACCACGA
CATCGCCCTGCTGGAGCTGGACGAGCCACTGGTGTGAACCTTACGTGACCCCTATCTGCA
TCGCCGACAAGGAGTACACCAACATCTTCTGAAGTTCGGCAGCGGCTACGTGAGCGGATG
GGGCAGAGTGTTCACAAGGGCAGGAGCGCCCTGGTGTGCTGCAGTATCTGAGAGTGCCACTG
GTGGACAGAGCTACCTGCCTGCTGAGCACCAAGTTCACCATCTACAACAACATGTTCTGCGC
CGGCTTCCACGAGGGGGGAAGAGACTCTTGCCAGGGCGATTCCGGCGGACCACACGTGACC
GAAGTGGAGGGCACCAGCTTCTGACCGGCATCATCTCCTGGGGCGAGGAATGCGCCATGA
AGGGCAAGTACGGCATCTACCAAGGTGAGCAGGTACGTGAACCTGGATCAAGGAGAAGAC
CAAGCTGACCtgaagatctacgggtggcatccctgtgaccctcccagtgccCctcctggccctggaagtggcactccagtgcccaccagc
ctgtcctaataaaattaagtgcacatctttgtctgactaggtgtcctctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttggga
agacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatctggctcactgcaatctccgctcctgggtcaagcgt
tctcctgcctcagcctcccagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaattttgtttttgtagagacggggttccacatattggccag
gctggtctcaactcctaattcaggtgatctaccacctggcctccaaattgtgggattacaggcgtgaaccactgctccctccctgtcctctgattt
gtaggtaaccacgtgcgaccgagcggccgaggaaccctagtgtgaggtggcactccctctctgcgctcgtcctcactgaggccgggc
gaccaaaagtcgcccagcggcctttgcccggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 5).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который включает вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту или любую из вышеуказанных экспрессионных кассет.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двухцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «экспрессирующие векторы» («вектор экспрессии» или «экспрессионный вектор»)).

Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирусы табачной мозаики, космиды, YAC, EBV полученные эписомы и тому подобное. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать лидерный пептид (или сигнальный пептид), который облегчает выработку белка-интереса клеткой-хозяином. Ген белка-интереса может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид соединен с рамкой считывания аминоконца белка-интереса. Лидерным пептидом (или сигнальным пептидом) может быть лидерный пептид иммуноглобулина или иной лидерный пептид (то есть, лидерный пептид белка не иммуноглобулиновой природы).

Помимо гена FIX по данному изобретению, рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности, которые контролируют экспрессию гена FIX в клетке-хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки-хозяина млекопитающих включают вирусные элементы обеспечивающие высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотора/энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотора/энхансера), аденовируса, (например, большого позднего промотора аденовируса (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промоторов

млекопитающих, таких как TTR промотор, промотор нативных иммуноглобулинов или промотор актина.

Выражение «контролирующие последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в определенном организме-хозяине. Пригодные для прокариот контролирующие последовательности представляют собой, например, промотор, необязательно оператор и сайт связывания рибосомы. Как известно, в эукариотических клетках присутствуют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

В контексте настоящего описания термин «промотор» или «регуляторная последовательность транскрипции» или «регуляторная последовательность» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который контролирует транскрипцию одной или нескольких кодирующих последовательностей, и который расположен против направления считывания информации относительно направления транскрипции от сайта инициации транскрипции кодирующей последовательности, 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.

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 дополнение к вышеуказанным генам и регуливающим последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут нести дополнительные

последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селективируемого маркера. Ген селективируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017). Например, обычно ген селективируемого маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, ампициллин, гиромоцин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую вектор введен. Например, гены селективируемого маркера включают ген дигидрофолат редуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-клетках-хозяевах при селекции/амплификации метотрексата), ген нео (для селекции G418) и ген синтазы глутамата.

Термин «последовательность контроля экспрессии», используемый в данном описании, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они лигированы. Контролирующие 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 контролирующих 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 «контролирующие 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, лидирующие последовательности и последовательности слившихся клеток.

В контексте настоящего описания термин «функционально связанный» относится к связи полинуклеотидных (или полипептидных) элементов в функциональную связь. Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», если она находится в условиях функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, регуляторная последовательность транскрипции функционально связана с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию указанной кодирующей последовательности. Термин «функционально связанный» означает, что связанные последовательности ДНК являются, как правило, непрерывными, и при необходимости соединения двух участков, кодирующих белок, являются также непрерывными и находятся в рамке считывания.

В одном из вариантов настоящего изобретения «экспрессионный вектор» относится к вектору, содержащему одну или несколько интересующих полинуклеотидных

последовательностей, интересующих генов или «трансгенов», которые фланкированы парвовирусными или инвертированными концевыми повторяющимися последовательностями (ITR).

Ни кассета, ни вектор по изобретению не содержит нуклеотидные последовательности генов, кодирующих неструктурные белки (Rep) и структурные белки (Cap) аденоассоциированного вируса.

Рекомбинантный вирус на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа)

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному вирусу на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для увеличения экспрессии гена FIX в целевых клетках, который включает вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту или любую из вышеуказанных экспрессионных кассет.

Термин «рекомбинантный вирус на основе AAV» (или «вирусоподобная частица на основе AAV», или «рекомбинантный вирусный штамм AAV», или «рекомбинантный вектор AAV», или «вектор rAAV») в контексте настоящего описания относится к вышеуказанной экспрессионной кассете (или вышеуказанному экспрессионному вектору), которая заключена внутри капсида AAV.

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). Транскрипция этих генов начинается с одного промотора, p40. Молекулярная масса соответствующих белков (VP1, VP2 и VP3) 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 различной нуклеотидной длины.

При образовании рекомбинантного вируса на основе AAV (rAAV) кассета экспрессии, фланкированная ИКП (ITR), упаковывается в капсид AAV. Гены, необходимые для репликации AAV, как было указано выше, не входят в кассету.

ДНК экспрессионной кассеты упакована в вирусный капсид в виде одноцепочечной молекулы ДНК (оцДНК) длиной приблизительно 3000 нуклеотидов. После инфицирования клетки вирусом, одноцепочечную ДНК конвертируют в форму двухцепочечной ДНК (дцДНК). Только дцДНК могут использовать белки клетки, которые транскрибируют содержащийся ген или гены в РНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность

MSFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLPGNGGLDR

GEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFSGNLGKAVFQA
KKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQ
PASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSY
NNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLR
VKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQY
GYATLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPHSSFAPSQNLFLKLANP
LVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSA
FATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLI
TSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPiWA
KIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEME
WELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:
11).

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV5, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPL
GDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANA
YFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANN
LTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSFFCLEYF
PSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAG
RYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQ
GSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP
ATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPiWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPMMLIKNTPVP
GNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEY
RTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 12).

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV5, имеющий следующую аминокислотную последовательность

MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSYNNHQYREIKSG
SVDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTV
QDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTE
RSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGG
VQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQP
NGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMAT

NNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVY LQGPIWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPM
MLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNPQFVD
FAPDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 13).

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1, VP2 и VP3 AAV5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 11, VP2 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 12 и VP3 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотные замены в положениях S2A и T711S VP1 AAV5 дикого типа (SEQ ID NO: 11), и имеет аминокислотную последовательность
MAFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLG EAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNGNLD RGE P
VNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADA E FQEK LADDT SFGGNLGKAVFQA KKR VLE
PFGLVEE GAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAPASSLGADT
MSAGGGG PLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP SYN NHQYREIKSG
SVDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTV
QDSTTTIAN NLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTE
RSSFFCLEYFPSKMLRTGNNEFTYNFEEVPHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGG
VQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQP
NGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMAT
NNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVY LQGPIWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPM
MLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNPQFVD
FAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 14).

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотную замену в положении T575S VP2 AAV5 дикого типа (SEQ ID NO: 12), и имеет аминокислотную последовательность

TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAPASSLGADTMSAGGG
GPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP SYN NHQYREIKSGSVDG
SNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQD

STTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPT
ERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNN
TGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASY
QVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAY
NVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAM
GGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEI
QYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 15).

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотную замену в положении T519S VP3 AAV5 дикого типа (SEQ ID NO: 13), и имеет аминокислотную последовательность

MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSTNNHQQYREIKSG
SVDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTV
QDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTE
RSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNNTGG
VQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQP
NGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMAT
NNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPM
MLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVD
FAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 16).

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, VP2 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 12 с одной или несколькими точечными мутациями и VP3 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 13 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 14, VP2 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 15 и VP3 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 16.

Под «несколькими точечными мутациями» подразумеваются две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять точечных замен.

Особенно предпочтительные варианты включают замены (мутации), которые являются консервативными по природе, т.е. те замены, которые имеют место в семействе аминокислот, которые объединены по их боковым цепям. В частности, аминокислоты обычно делят на четыре

семейства: (1) кислые - аспарат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Например, достаточно обосновано предсказание о том, что выделенная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или схожая консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не окажет важного влияния на биологическую активность. Например, полипептид, представляющий интерес, может включать вплоть до приблизительно 5-10 консервативных или неконсервативных аминокислотных замен, при условии, что желаемая функция молекулы остается незатронутой.

Вариант точечных мутаций в последовательностях белков VP1, VP2 или VP3 AAV5 с помощью аминокислотных замен представляет собой замену, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в белке VP1, VP2 или VP3 AAV5 на другой аминокислотный остаток.

Консервативные замены показаны в таблице А под заголовком «предпочтительные замены».

Таблица А		
Исходный остаток	Примеры замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn(N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr

Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

TTR промотор (промотор транстиретины);

интрон гена hBG1 (фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон);

вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, белок VP2 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 и белок VP3 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

TTR промотор (промотор транстиретины);

интрон гена hBG1 (фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон);

вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, белок VP2 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 с одной или несколькими точечными мутациями и белок VP3 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

TTR промотор (промотор транстиретины);

интрон гена hBG1 (фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон);

вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту;
сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, белок VP2 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и белок VP3 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

TTR промотор (промотор транстиретина);

интрон гена hBG1 (фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон);

вышеуказанную кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12 и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, а экспрессионная кассета включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12 с одной или несколькими точечными мутациями и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15 и VP3 с аминокислотной

последовательность SEQ ID NO: 16, а экспрессионная кассета включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

Фармацевтическая композиция

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для доставки гена FIX в целевые клетки, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Действующее вещество в вышеуказанной композиции находится в эффективном количестве, например, в биологически эффективном количестве.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный вирус на основе AAV5 по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе или в других фармацевтических агентах, адъювантах, разбавителях и т.д. Носитель для инъекций обычно является жидким. Носитель для других способов введения может быть или твердым, или жидким, таким как стерильная апиrogenная вода или стерильный апиrogenный фосфатно-солевой буферный раствор. Для введения путем ингаляции носитель является вдыхаемым и предпочтительно находится в твердой или жидкой дисперсной форме. В качестве инъекционной среды предпочтительно использовать воду, содержащую добавки, общепринятые для инъекционных растворов, такие как стабилизирующие агенты, соли или солевые растворы и/или буферы.

«Фармацевтическая композиция» обозначает композицию, включающую в себя вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV5 по изобретению и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых эксципиентов, таких как наполнители, растворители, разбавители, носители, вспомогательные, распределяющие, средства доставки, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения 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 солюбилизаторы.

«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 рекомбинантного вируса на основе AAV5 по изобретению 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 rAAV5, 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 °С. 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.

Применение

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции для доставки гена FIX в целевые клетки.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции для обеспечения белком FIX субъекта, который имеет гемофилию В и/или не имеет полнофункциональных копий гена FIX.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции для лечения гемофилии В у субъекта, который имеет гемофилию В.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу обеспечения белком FIX субъекта с гемофилией В, включающий введение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта, нуждающегося в этом.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу доставки гена FIX в целевые клетки субъекта с гемофилией В, включающий введение любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения гемофилии В у субъекта, который включает ведение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной композиции субъекту, который имеет гемофилию В.

Под гемофилией В подразумевается наследственное нарушение свертывания крови, вызванное недостаточностью или полным отсутствием фактора свертывания крови IX (FIX). Частота встречаемости гемофилии В составляет около 1 случая на 40 000 новорожденных мальчиков. Дефицит фактора свертывания крови сопровождается спонтанными или индуцированными кровоизлияниями в суставы, мышцы и внутренние органы.

Под отсутствием полнофункциональных копий гена FIX подразумеваются инактивирующие мутации или делеции во всех копиях гена FIX в геноме, которые приводят к потере или дефекту функции гена FIX.

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.

Под субъектом, нуждающимся в доставке гена FIX в целевые клетки, или субъектом, нуждающимся в обеспечении белком FIX, подразумевается субъект, который имеет гемофилию В, или субъект, который имеет дефицит фактора свертывания крови IX, или субъект, который имеет инактивирующие мутации или делеции в гене FIX, которые приводят к потере или дефекту функции гена FIX.

Примеры способов введения включают в себя местное применение, интраназальное, ингаляционное, чрезслизистое, трансдермальное, энтеральное (например, пероральное, ректальное), парентеральное (например, внутривенное, подкожное, внутрικοжное, 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 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.

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.

Клетка для введения вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе AAV5 по изобретению может быть клеткой любого типа, включая в себя без ограничения, 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.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения 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, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей. Вкратце, плазмидную ДНК нарабатывали для дальнейших манипуляций в клетках *E. coli*, выращиваемых под селективным давлением с антибиотиками для того, чтобы плазмиды не терялись в клеточной популяции. Плазмидную ДНК выделяли из клеток коммерческими наборами, измеряли концентрацию и использовали для клонирования с помощью обработки эндонуклеазами рестрикции или методами ПЦР-амплификации. Фрагменты ДНК лигировали между собой с помощью лигаз и трансформировали в бактериальные клетки для отбора клонов и дальнейших работ. Все полученные генетические конструкции подтверждали по паттернам рестрикции и полным секвенированием по Сэнгеру.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 1000 п. н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем ренатурации олигонуклеотидов друг на друге с последующей ПЦР-амплификацией с крайних праймеров. В результате получали смесь фрагментов, включая нужный. Фрагменты клонировали по сайтам рестрикции в промежуточные векторы, после чего последовательности ДНК субклонированных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сэнгеру. Анализ последовательностей ДНК и белков и обработку данных о последовательностях осуществляли в программе SnapGene 4.2 и выше для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Культивирование клеточных культур

В экспериментах были использованы клеточные линии НЕК293 (Human Embryonic Kidney clone 293) и HUH7 (human hepatocellular carcinoma cell lines). Суспензионные клетки НЕК293, используемые для наработки AAV, культивировались в стандартных условиях при 37°С и 5% CO₂, на полной питательной среде без FBS и антибиотика. Адгезионные клетки HUH7, используемые для проверки эффективности препаратов AAV, культивировались в стандартных условиях при 37°С и 5% CO₂, на полной питательной среде DMEM добавлением 10% FBS, антибиотика/антимикотика. Пересев клеток HUH7 осуществлялся при достижении 80-90% конфлюентности. Для диссоциации клеточного монослоя использовался TrypLE Select enzyme (10x). Жизнеспособность клеток оценивалась с помощью окраски Трупан Blue и одноразовых камер для подсчета клеток с помощью автоматического счетчика Countess II.

Сборка и очистка вирусных частиц рекомбинантных векторов AAV

Для сборки вирусных частиц AAV, содержащих кодон-оптимизированные варианты гена FIX (hFIX_{co-v1} и hFIX_{co-v2}), использовали клетки-продуценты НЕК293, которые трансфецировали 3-мя плазмидами:

Плазмиды pAAV-hFIX_{co-v1} и pAAV-hFIX_{co-v2}, содержащие экспрессионную кассету AAV для экспрессии трансгенов hFIX_{co-v1} и hFIX_{co-v2} соответственно (Фиг. 1.);

Плазида для экспрессии гена Cap серотипа AAV5 и гена Rep серотипа AAV2. Каждый ген с помощью альтернативных рамок считывания кодирует несколько белковых продуктов;

Плазида для экспрессии генов аденовируса Ad5, необходимых для сборки и упаковки капсидов AAV.

Через 72 часа клетки лизировали и проводили очистку и концентрирование вирусных частиц с помощью методов фильтрации, хроматографии и ультрацентрифугирования. Титр вирусных частиц определяли с помощью количественной ПЦР с праймерами и пробой, специфичными к участку рекомбинантного вирусного генома и выражали в виде количества копий вирусных геномов на 1 мл.

Трансдукция клеточных культур

Клеточную линию HUH7 заранее заседали в лунки 12-луночных планшетов с плотностью 10 000 кл/см². После прикрепления клеток к адгезивной подложке, вносились препараты AAV при MOI 500 000 вг/кл. На 7 день после трансдукции определяли содержание белка FIX и его активность в культуральной жидкости методом ИФА, а также уровень экспрессии гена фактора свёртывания крови IX в клетках методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией, как описано выше. Работы по оценке уровня белка FIX в культуральной жидкости проводились в 6 независимых экспериментах. Работы по оценке активности секретируемого белка FIX и уровня экспрессии гена фактора свёртывания крови IX в клетках проводились в 3 независимых экспериментах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

Определение уровня экспрессии гена фактора свёртывания крови IX

Определение уровня экспрессии гена *FIX* в клеточных культурах после трансдукции (или трансфекции) проводили методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Вкратце, выделение РНК из клеточных осадков проводили при помощи набора RNeasy Plus mini kit (Qiagen) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили при помощи набора реагентов GoScript (Promega) согласно протоколу производителя, а именно на реакцию обратной транскрипции исходно брали 500нг РНК, кДНК получали при помощи рандомных и олиго-dT праймеров, после проведения обратной транскрипции объем кДНК доводился до 50 мкл стерильной водой. Количественную ПЦР проводили с использованием технологии TaqMan при помощи реакционной смеси qPCRMix-HS HighROX (Евроген), согласно протоколу производителя, на приборе StepOne (Applied Biosystems). Специфические праймеры и зонды были подобраны на целевой ген (*FIX*) и на ген домашнего хозяйства (*GAPDH*). Для построения стандартных кривых были использованы образцы плазмидных ДНК (плДНК), несущих соответствующий ген. Для построения каждой стандартной кривой были подготовлены по 7 стандартных образцов. Серия разведений: от 20 млн до 200 копий плДНК на реакцию (шаг разведения – 1:10). Для каждого исследуемого образца анализ проводился в трех технических повторах и сопровождался постановкой «RT-minus» контроля (для контроля отсутствия примеси ДНК в исследуемом образце РНК) и негативного контроля. Результаты определения уровня экспрессии мРНК были представлены в виде: количество копий мРНК целевого гена в образце, нормированное на количество копий мРНК гена *GAPDH*.

Определение уровня белка фактора свёртывания крови IX методом ИФА

Оценка содержания белка фактора свёртывания крови IX в культуральной жидкости после трансдукции HUH7 целевыми кандидатами AAV5-FIX, а также в плазме крови животных после введения целевых вирусных препаратов проводилась «сэндвич»-методом неконкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) коммерческим набором. Вкратце, разведенные в буфере для разведений образцы культуральной жидкости и плазмы крови, вносились в лунки 96-луночного планшета, сенсibiliзированные первичными специфическими к фактору свёртывания крови IX антителами. В этот же планшет вносились стандарты для построения калибровочной кривой, положительный и отрицательный контроля. Планшет инкубировался 2 часа при комнатной температуре. Производили отмывку лунок планшета отмывочным буфером перед внесением биотинилированных антител, раствора конъюгата стрептавидин-пероксидазы и ТМВ. Вносился раствор со специфическими биотинилированными детектирующими антителами к фактору IX и планшет инкубировался 1 час при комнатной температуре. Далее к образовавшемуся комплексу добавлялся раствор конъюгата стрептавидин-пероксидазы и планшет инкубировался 30 минут при комнатной температуре. Для визуализации ферментативной реакции вносился раствор ТМВ. По достижении нужной степени интенсивности окрашивания во все лунки добавляется стоп-раствор

для остановки реакции. Далее измерялась оптическая плотность растворов в лунках планшета. Концентрация фактора свёртывания крови IX в исследуемых образцах определялась по калибровочной кривой с учетом предварительного разведения образцов.

Определение активности белка фактора свёртывания крови IX

Фактор свёртывания крови IX является витамин К-зависимым и для синтеза клеточной культурой активной формы фактора IX необходимо наличие витамина К в ростовой среде. В связи с чем, при трансдукции HUH7 в состав полной ростовой среды добавляли витамин К1 в концентрации 500 нг/мл.

Оценка активности белка фактора свёртывания крови IX в культуральной жидкости после трансдукции HUH7 целевыми препаратами проводилась хромогенным методом коммерческим набором.

Вкратце, разведенные в реакционном буфере Трис-БСА образцы культуральной жидкости, стандарты и контрольные растворы вносились в лунки 96-луночного планшета. Далее к ним добавлялся реагент 1 (FX-FVIII). После 2 минутной инкубации при температуре 37°C, вносился реагент 2 (активирующий агент). Планшет инкубировался в течение 3 минут при температуре 37°C. Далее в лунки планшета вносили реагент 3 (хромогенный субстрат) и инкубировали планшет в течение 2 минут. Затем добавляли раствор 20% уксусной кислоты для остановки реакции. Образующийся в результате FXa гидролизует хромогенный субстрат, что приводит к высвобождению паранитроанилина, количество которого (детектируемое по оптической плотности) прямо пропорционально концентрации фактора IX (FIX) в образце.

Проведение *in vivo* исследования на лабораторных животных

Для экспериментов были использованы мыши линии C57BL/6 (самцы возрастом 6-8 недель). Препараты вводили животным однократно путем внутривенного введения в хвостовую вену. Группе животных отрицательного контроля вводился буферный раствор, не содержащий AAV. Отбор плазмы крови производился в день инъекции до введения препаратов, далее – на 7, 14, 21, 28, 35 и 42 дни после введения препаратов.

Пример 1. Модификация последовательности гена FIX с помощью алгоритма кодон-оптимизации

Разработанный нами препарат представляет собой суспензию модифицированных рекомбинантных капсидов аденоассоциированного вируса 5-го серотипа (AAV5) несущих экспрессионную кассету, кодирующую ген человеческого фактора свёртывания крови IX (hFIX) под контролем тканеспецифичного к печени промотора транстиретины (TTR).

В качестве нуклеиновой кислоты дикого типа использовалась нуклеиновая кислота, которая кодирует белок человеческого фактора свёртывания крови IX дикого типа с природной мутацией

R338L (так называемая мутация Padua), и включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17. Данная нуклеиновая кислота дикого типа используется в качестве контроля.

Дополнительно с целью повышения эффективности экспрессии природная последовательность гена фактора свёртывания крови IX была модифицирована с помощью алгоритма кодон-оптимизации.

В результате кодон-оптимизации нуклеиновой кислоты дикого типа фактора свёртывания крови IX с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 17 был получен ряд кодон-оптимизированных нуклеиновых кислот, которые были в дальнейшем протестированы на уровень экспрессии белка фактора свёртывания крови IX и его активности по сравнению с контролем (нуклеиновая кислота дикого типа с SEQ ID NO: 17) в составе препарата на основе AAV5.

Все кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты показали увеличение уровня продукции белка фактора свёртывания крови IX по сравнению с диким типом, при этом большинство кодон-оптимизированных нуклеиновых кислот показали незначительное увеличение уровня продукции белка фактора свёртывания крови IX по сравнению с диким типом и только два кодон-оптимизированных варианта нуклеиновой кислоты по изобретению с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2 (hFIX_{co-v1}) и SEQ ID NO: 4 (hFIX_{co-v2}) неожиданно показали самый лучший показатель, а именно увеличение уровня экспрессии гена фактора свёртывания крови IX и увеличение уровня продукции белка фактора свёртывания крови IX в несколько раз, что, в свою очередь, приводило к увеличению активности препарата на основе AAV5, который содержал SEQ ID NO: 2 (hFIX_{co-v1}) или SEQ ID NO: 4 (hFIX_{co-v2}) (см Примеры 2, 3 и 4).

Кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 характеризуется повышенным индексом адаптации кодонов (стандартная метрика для оценки последовательности на предмет частот использованных кодонов) для клеток млекопитающих по сравнению с нуклеиновой кислотой дикого типа с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 17.

Кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 обозначаются далее в примерах, соответственно, как hFIX_{co-v1} и hFIX_{co-v2}.

Пример 2. Сборка генетической конструкции, содержащей экспрессионную кассету AAV с вариантами рекомбинантного кодон-оптимизированного гена фактора свёртывания крови IX (hFIX_{co-v1} и hFIX_{co-v2}).

Целевые плазмиды pAAV-hFIX_{co-v1} или pAAV-hFIX_{co-v2} (Фиг. 1.), предназначенные для получения вирусных векторов AAV5 с экспрессионной кассетой, включающей кодон-оптимизированный вариант гена фактора свёртывания крови IX (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4), были получены путем последовательной замены последовательности модифицированного зеленого флуоресцентного белка и промотора CMV в исходной конструкции pAAV-GFP с помощью рестриктазно-лигазного метода клонирования на кодон-оптимизированные последовательности

гена фактора свёртывания крови IX и промотора TTR соответственно, синтезированные *de novo* из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза.

Конечный вектор содержит все необходимые элементы для экспрессии гена и сборки в составе генома рекомбинантного AAV:

- 1) терминальные повторы ITR на концах последовательности, которая инкапсулируется в вирусный капсид;
- 2) элементы для экспрессии целевого гена (промотор, энхансер, интрон, последовательность Kozak, трансген, сайт полиаденилирования);
- 3) ориджин бактериальной репликации и ген устойчивости к антибиотику для наработки плазмидной ДНК в бактериальных клетках.

Пример 3. Создание вирусных препаратов, экспрессирующих фактор свёртывания крови IX

Целевые плазмиды pAAV-hFIXco-v1 и pAAV-hFIXco-v2 (Фиг 1.) вместе с остальными плазмидами, необходимыми для получения вирусных частиц рекомбинантного AAV (см. выше), были использованы для наработки препаратов AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2, несущих, соответственно, кодон-оптимизированные версии гена фактора свёртывания крови IX (*hFIXco-v1* и *hFIXco-v2*). В результате биопроцесса были получены рекомбинантные вирусные частицы AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2, содержащие экспрессионные кассеты с кодон-оптимизированным вариантом гена фактора свёртывания крови IX (*hFIXco-v1* и *hFIXco-v2*). Очищенные препараты AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2, используемые для проведения *in vitro* и *in vivo* исследований были подготовлены с применением стандартным буферов и эксципиентов, которые являются безопасными и не изменяют свойств AAV. В качестве препарата сравнения с использованием описанной выше технологии был наработан препарат AAV5-hFIX-wt, содержащие экспрессионную кассету с природным геном фактора свёртывания крови IX (ген дикого типа, включающий природную мутацию R338L, см. Пример 1).

Пример 4. Проверка работоспособности препаратов AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2 *in vitro*

Перед проведением исследований на животных очищенные препараты AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2 был протестированы *in vitro*. Данные эксперименты были проведены с использованием адгезионной клеточной линии HUH7 (Фиг 2, 3 и 4). В лунки 12-луночных планшетов были посеяны клетки линии с плотностью 10 000 кл/см². После прикрепления клеток к адгезивной подложке, вносились препараты AAV при MOI 500 000 вг/кл. На 7 день после трансдукции определяли содержание белка FIX и его активность в культуральной жидкости методом ИФА, а также уровень экспрессии гена фактора свёртывания крови IX в клетках методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией, как описано выше. Все образцы были поставлены в трипликатах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

Было показано, что разработанные нами препараты AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2, несущие кодон-оптимизированные версии гена фактора свёртывания крови IX (*hFIXco-v1* и *hFIXco-v2*), позволяют эффективно доставить трансген фактора свёртывания крови IX в клетки и обеспечить продукцию целевого белка, что подтверждается данными количественной ПЦР в реальном времени, ИФА и анализом активности белка фактора свёртывания крови IX (Фиг 2, 3 и 4.). Так при использовании препаратов AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2, содержащих кодон-оптимизированную последовательность гена фактора свёртывания крови IX наблюдается уровень экспрессии гена фактора свёртывания крови IX в 1.8 раз выше в случае препарата AAV5-hFIXco-v1 и в 2.8 раз выше в случае препарата AAV5-hFIXco-v2 по сравнению с использованием препарата с природной версией гена фактора свёртывания крови IX (AAV5-hFIX-wt) (Фиг 2). Кроме того, при использовании препаратов AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2, содержащих кодон-оптимизированную последовательность гена фактора свёртывания крови IX наблюдается уровень продукции белка фактора свёртывания крови IX в 1.6 раз выше в случае препарата AAV5-hFIXco-v1 и в 2.1 раза выше в случае препарата AAV5-hFIXco-v2 по сравнению с использованием препарата с природной версией гена фактора свёртывания крови IX (AAV5-hFIX-wt) (Фиг. 3). Также важно отметить, что при использовании препаратов AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2, содержащих кодон-оптимизированную последовательность гена фактора свёртывания крови IX, наблюдается уровень активности белка фактора свёртывания крови IX в 2.1 раза выше в случае препарата AAV5-hFIXco-v1 и в 2.9 раза выше в случае препарата AAV5-hFIXco-v2 по сравнению с использованием препарата с природной версией гена фактора свёртывания крови IX (AAV5-hFIX-wt) (Фиг. 4).

Пример 5. Проверка работоспособности препарата AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2 *in vivo*

Для проведения *in vivo* исследований препаратов AAV5-hFIXco-v1 и AAV5-hFIXco-v2 были использованы лабораторные мыши линии C57BL/6. В исследовании использовали дозу AAV препаратов равную 4×10^{11} VG/мышь. В качестве негативного контроля был использованы контрольный раствор без AAV. Препараты вводили животным однократно путем внутривенного введения в хвостовую вену. Отбор плазмы крови производился в день инъекции до введения препаратов, далее – на 7, 14, 21, 28, 35 и 42 дни после введения препаратов. В образцах плазмы крови определяли уровень белка фактора свёртывания крови IX методом ИФА, как было описано выше.

В результате проведенных *in vivo* исследований было показано, что в случае использования препарата AAV5-hFIXco-v1, содержащего кодон-оптимизированную последовательность гена фактора свёртывания крови IX *hFIXco-v1*, наблюдается достоверно более высокий уровень белка фактора свёртывания крови IX в крови животных (в 2.2 – 2.3 раза) на 21 и 28 дни после введения препарата, чем в случае использования препарата с природной версией гена фактора свёртывания крови IX (AAV5-hFIX-wt) (Фиг 5). В случае использования препарата AAV5-hFIXco-v2, содержащего кодон-оптимизированную последовательность гена фактора свёртывания крови IX

hFIX_{co-v2}, наблюдается достоверно более высокий уровень белка фактора свёртывания крови IX в крови животных (в 1.8 – 2.5 раза) на 14, 21, 28, 35 и 42 дни после введения препарата, чем в случае использования препарата с природной версией гена фактора свёртывания крови FIX (AAV5-hFIX-wt) (Фиг 5).

Таким образом, разработанные рекомбинантный вирусы на основе AAV5, несущие кодон-оптимизированные версии гена фактора свёртывания крови IX (AAV5-hFIX_{co-v1} или AAV5-hFIX_{co-v2}) обладают преимуществом по сравнению с вектором AAV5 с природной версией гена фактора свёртывания крови IX и обладают высоким потенциалом для генной терапии Гемофилии.

Формула изобретения

1. Выделенная кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота, кодирующая белок FIX (фактор свёртывания крови IX) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, которая включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

2. Экспрессионная кассета, которая включает кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту по п. 1.

3. Экспрессионная кассета по п.2, включающая следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

TTR промотор (промотор транстиретина);

интрон гена hBG1 (фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон);

кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту по п. 1;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

4. Экспрессионная кассета по п.3, которая включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

5. Экспрессионный вектор, который включает кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту по п. 1 или экспрессионную кассету по любому из пп. 2-4.

6. Выделенный рекомбинантный вирус на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для увеличения экспрессии гена FIX в целевых клетках, который включает нуклеиновую кислоту по п. 1 или экспрессионную кассету по любому из пп. 2-4.

7. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по п. 6, где капсид включает белок VP1 AAV5.

8. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по п. 7, где капсид включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

9. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по п. 7, где капсид включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями.

10. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по п. 9, где капсид включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

11. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по любому из пп. 6-10, где капсид включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

TTR промотор;
интрон гена hBG1 (фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон);
кодон-оптимизированную нуклеиновую кислоту по п. 1;
сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);
правый (второй) ITR.

12. Рекombинантный вирус на основе AAV5 по п. 11, где капсид включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

13. Рекombинантный вирус на основе AAV5 по любому из пп. 11-12, где белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 с одной или несколькими точечными мутациями, представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

14. Фармацевтическая композиция для доставки гена FIX в целевые клетки, включающая рекombинантный вирус на основе AAV5 по любому из пп. 6-13 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

15. Применение рекombинантного вируса на основе AAV5 по пп. 6-13 или композиции по п. 14 для доставки гена FIX в целевые клетки.

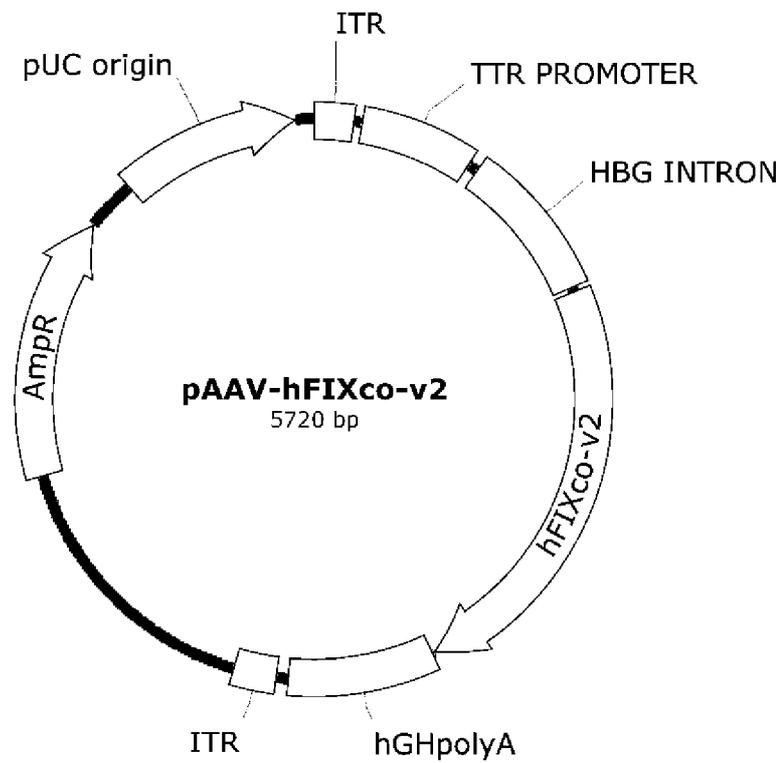
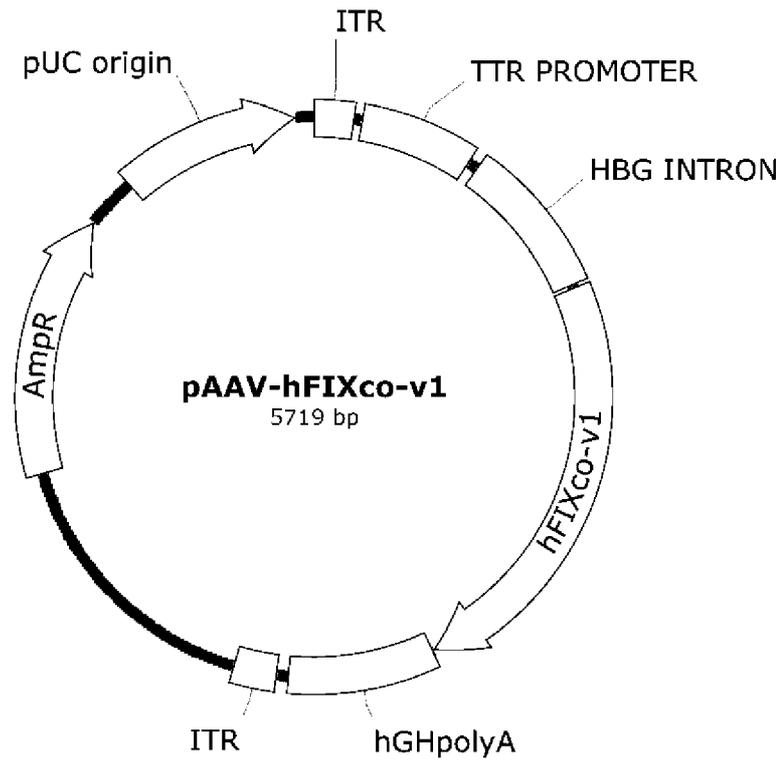
16. Применение рекombинантного вируса на основе AAV5 по любому из пп. 6-13 или композиции по п. 14 для обеспечения белком FIX субъекта, который имеет гемофилию В и/или не имеет полнофункциональных копий гена FIX.

17. Применение рекombинантного вируса на основе AAV5 по любому из пп. 6-13 или композиции по п. 14 для лечения гемофилии В у субъекта, который имеет гемофилию В.

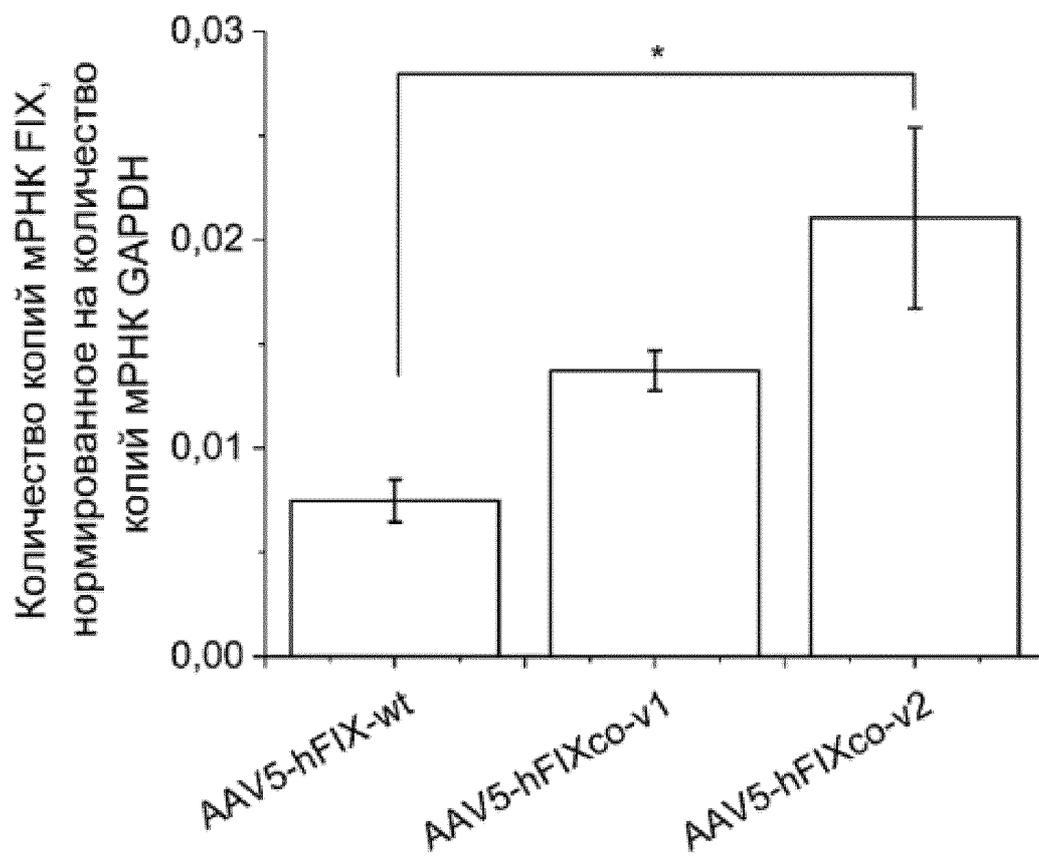
18. Способ обеспечения белком FIX субъекта с гемофилией В, включающий введение терапевтически эффективного количества рекombинантного вируса на основе AAV5 по пп. 6-13 или композиции по п. 14 в клетки субъекта, нуждающегося в этом.

19. Способ доставки гена FIX в целевые клетки субъекта с гемофилией В, включающий введение рекombинантного вируса на основе AAV5 по любому из пп. 6-13 или композиции по п. 14 в клетки субъекта.

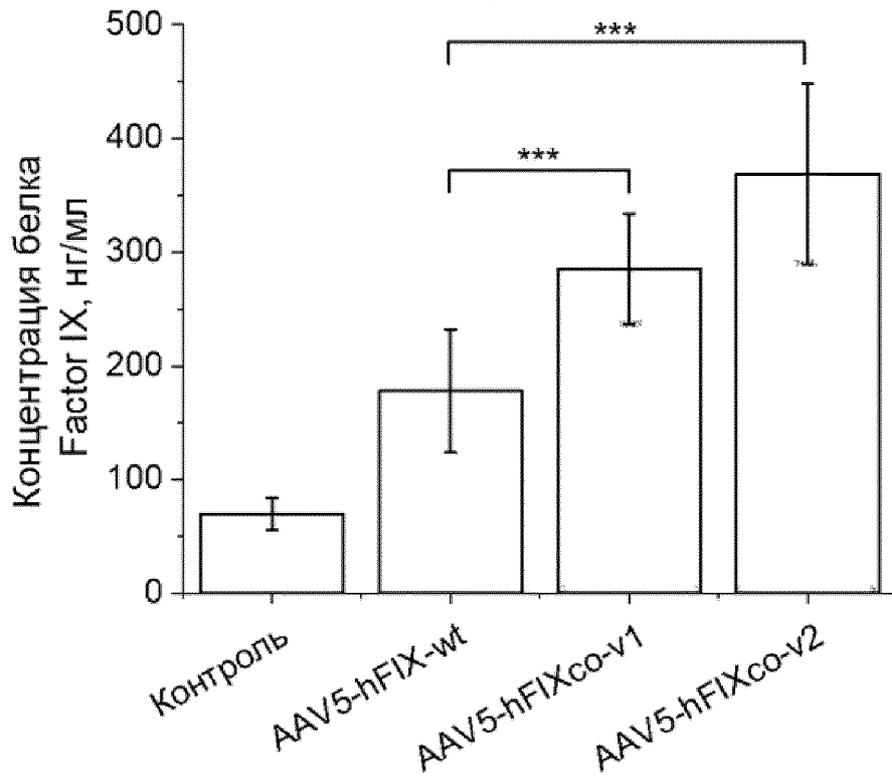
20. Способ лечения гемофилии В у субъекта, который включает ведение терапевтически эффективного количества рекombинантного вируса на основе AAV5 по любому из пп. 6-13 или композиции по п. 14 субъекту, который имеет гемофилию В



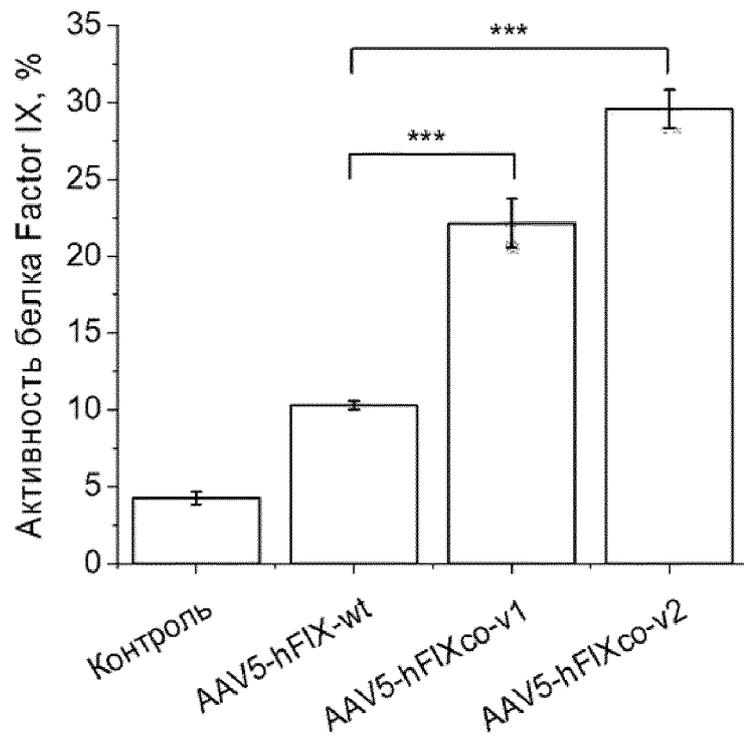
Фиг. 1



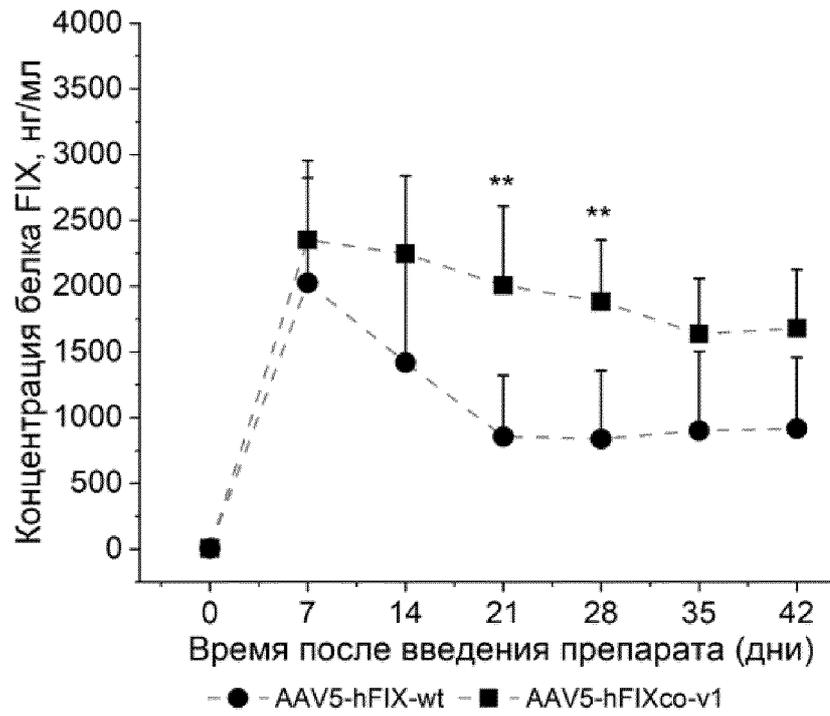
Фиг.2



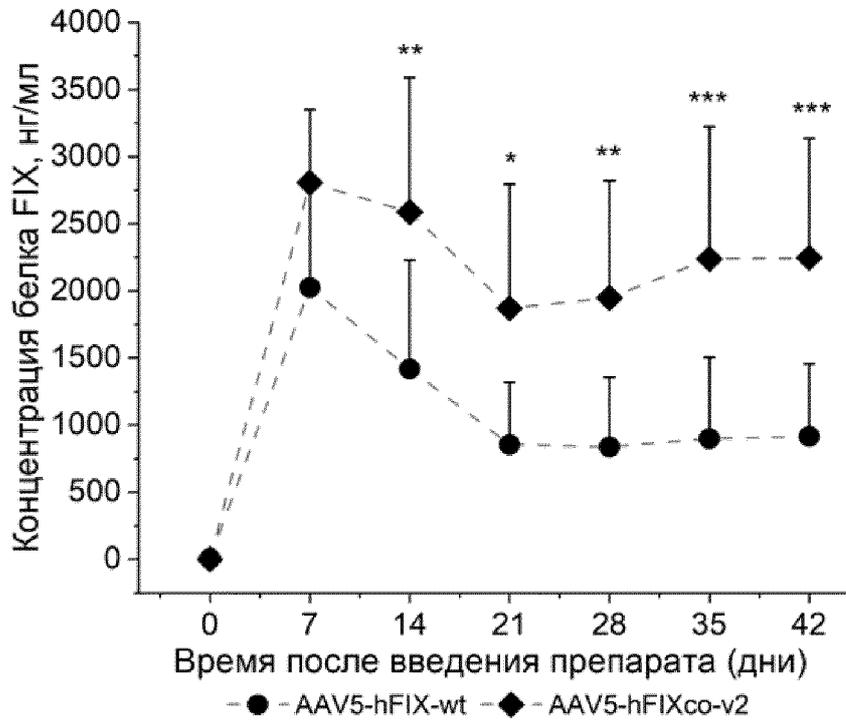
Фиг.3



Фиг.4



Фиг.5



Фиг.6