

ГЕНОТЕРАПИЯ AQP1 ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ГИПОФУНКЦИИ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ОБЛУЧЕНИЕМ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [0001] Данная патентная заявка заявляет приоритет по первоначальной патентной заявке США № 63/229279, поданной 4 августа 2021 года, которая включена посредством ссылки. Данная патентная заявка также заявляет приоритет по первоначальной патентной заявке США № 63/297342, поданной 7 января 2022 года, которая включена посредством ссылки.

10

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОЙ ФОРМЕ

15 [0002] В данный документ посредством ссылки во всей своей полноте включен машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, поданный наряду с этим и идентифицированный следующим образом: один файл, размером 6274 байт, с названием «763111.xml», датированный 4 августа 2022 года.

20 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Традиционное лечение пациентов с раком головы и шеи включает ионизирующее облучение (IR – от англ. ionizing radiation). Однако, проведение IR данным пациентам повреждает слюнные железы, которые испытывают необратимое повреждение, негативно влияющее на качество жизни пациентов.

25 [0004] Для данного состояния не существует общепринятой терапии. Однако, обнаружили, что введение вектора, кодирующего аквапорин-1 (AQP1), после лучевой терапии может влиять на заживление и восстановление слюнных желез. Будучи эффективным в некоторых аспектах, данный способ может приводить к значительной боли и страданию пациента, а также значимым проблемам со здоровьем ротовой полости. Соответственно, остается необходимость в
30 улучшенном способе лечения пациентов, подлежащих IR-лечению, таких как пациенты с раком головы и шеи, для борьбы с негативным воздействием IR-терапии на слюнные железы.

35 КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Согласно настоящему изобретению неожиданно обнаружили, что посредством введения вектора, кодирующего AQP1 перед облучением, пагубные воздействия IR-терапии могут быть уменьшены или предупреждены. Введение комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) AQP1 в слюнную железу
5 пред лечением посредством IR предупреждает последующую потерю функции, вызываемую IR. Введение AQP1 (например, человеческого AQP1; hAQP1) до IR-лечения (например, у пациентов с раком головы и шеи) может уменьшать или предупреждать гипofункцию слюнной железы, вызываемую IR, приводя к
улучшенному функциональному состоянию слюнной железы.

[0006] Соответственно, согласно одному аспекту изобретения предложен вектор (например, вектор AAV) и вирион, содержащий такой вектор (например, вирион AAV), который кодирует белок AQP1, для предупреждения или уменьшения дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением (например, гипofункции), у
15 субъекта. Также предложено применение данного вектора или вириона для получения лекарственного средства для предупреждения или уменьшения у субъекта дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением. В одном аспекте такой вектор или вирион полезен для защиты субъекта от дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением.

[0007] Согласно одному аспекту изобретения предложен способ предупреждения или уменьшения дисфункции слюнных желез, вызываемой
20 облучением, у субъекта. Способ включает (a) введение субъекту вектора, кодирующего белок аквапорин (AQP), и (b) проведение субъекту ионизирующего облучения после (a), с предотвращением или уменьшением, таким образом, у субъекта дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением. В одном аспекте
25 функцию слюнных желез можно поддерживать на уровне, эквивалентном или по меньшей мере эквивалентном функции слюнных желез до проведения ионизирующего облучения.

[0008] Белок AQP может представлять собой любой подходящий белок AQP, включающая белок AQP1, но не ограничиваясь им. Например, в одном аспекте
30 белок AQP1 представляет собой или включает человеческой белок AQP1 (hAQP1).

[0009] Вектор, кодирующий AQP (например, hAQP1), может представлять собой или включать любой подходящий вектор, включая вирусный вектор, но, не ограничиваясь им. Например, в одном аспекте вирусный вектор представляет собой
35 или включает аденовирусный вектор (например, аденовирусный вектор серотипа 2 или серотипа 5). В еще одном аспекте вирусный вектор представляет собой или

включает вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV – от англ. adeno-associated viral) (например, AAV2, AAV5, AAV6, AAV44.9 или BAAV).

5 [0010] Вирусный вектор (например, вектор AAV) можно вводить субъекту в виде вектора или вириона, содержащего вектор (например, вектор AAV). В одном аспекте, вирион представляет собой или включает вирион AAV. Вектор или вирион можно вводить субъекту в любое подходящее место и любым подходящим путем введения. В аспекте вектор или вирион вводят в слюнную железу субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ 10 ГРАФИЧЕСКОГО(ИХ) МАТЕРИАЛА(ОВ)

[0011] **Фиг. 1** представляет собой график, демонстрирующий слюнотечение у мышей, обрабатываемых AQP1. Слюнотечение представлено в виде микролитров/г массы тела.

15 [0012] **Фиг. 2** представляет собой график, демонстрирующий слюнотечение у мышей, обрабатываемых AQP1. Слюнотечение представлено в виде микролитров/г массы тела.

[0013] **Фиг. 3** представляет собой график, демонстрирующий слюнотечение у мышей, обрабатываемых AQP1. Слюнотечение представлено в виде микролитров/г массы тела.

20 [0014] **Фиг. 4** представляет собой тепловую карту клеток слюнной железы, как анализируется посредством секвенирования РНК одиночных клеток. Данные секвенирования РНК одиночных клеток мышей без IR или мышей с IR, обработанных GFP (от англ. green fluorescent protein - зеленый флуоресцентный белок), или мышей, обработанных AQP1 до (AQP1 B) или после (AQP1A),
25 использовали для получения UMAP и идентификации 16 отличных кластеров клеток (у-ось). Сравнение распределения клеток между разными кластерами в каждом из 4 условий использовали для получения тепловой карты.

[0015] **Фиг. 5A-D** представляет собой изображения гистологии мышечных подчелюстных желез. Данные изображения сделаны с полностью отсканированных
30 препаратов обычно одной и той же области каждой железы рядом с воротами. Пунктирные рамки на 5X ограничивают вставленные изображения для выделения признаков, включая изменения, вызываемые облучением, фиброз, атрофию и воспаление. **Фиг. 5A** соответствует AAV-GFP до облучения. **Фиг. 5B** соответствует AAV-AQP1 до облучения. **Фиг. 5C** соответствует AAV-GFP после облучения. **Фиг.**
35 **5D** соответствует AAV-AQP1 после облучения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0016] Согласно изобретению предложен способ, включающий предварительное лечение субъекта (например, пациента, являющегося человеком), подвергающегося IR-лечению, воздействующему на слюнные (например, околоушные, подчелюстные или подъязычные) железы, вектором, кодирующим белок аквапорин (AQP). Например, способ можно применять для субъекта, подвергающегося IR-лечению раковых заболеваний, таких как рак головы и шеи. Таким образом, согласно первому аспекту изобретения предложен способ предупреждения или уменьшения дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением, у субъекта, включающий: (а) введение субъекту вектора, кодирующего белок аквапорин (AQP), и (b) проведение субъекту ионизирующего облучения после (а), с предупреждением или уменьшением, таким образом, дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением, у субъекта.

[0017] В контексте данного документа белок аквапорин, также называемый белком AQP, может представлять собой или включать любой белок, который демонстрирует активность иллюстративного белка-аквапорина (например, человеческий аквапорин («hAQP»)), такого рода способность образовывать канал, который делает возможным прохождение воды. Белки AQP, нуклеиновая кислота и ассоциированные векторы известны специалистам в данной области и описаны в качестве неограничивающего примера, в Патенте США 10166299, полнота которого включена в данный документ посредством ссылки.

[0018] Белок AQP в контексте настоящего изобретения может иметь или содержать последовательность AQP дикого типа (wt) (то есть он имеет такую же аминокислотную последовательность, как и природный белок AQP), представлять собой или содержать любую часть белка AQP wt или представлять собой или содержать вариант природного белка AQP, при условии, что такая часть или вариант сохраняет способность образовывать канал, который делает возможным прохождение воды. Анализы для определения способности белка AQP по настоящему изобретению образовывать канал, который делает возможным прохождение воды, известны специалистам в данной области (см., например, Lui et al., *Journal of Biological Chemistry*, 281, 15485-15495 (2006), полнота которой включена в данный документ посредством ссылки).

[0019] В одном аспекте белок, полезный в способах по настоящему изобретению, представляет собой белок AQP1, содержащий полную аминокислотную последовательность встречающегося в природе белка AQP1. Примеры человеческих белков AQP1 включают, но не ограничиваются следующим:

референсный № NCBI NP_932766.1 (SEQ ID NO: 1), референсный № NCBI NP_001171989.1 (SEQ ID NO: 2) и референсный № NCBI NP_001171990.1 (SEQ ID NO: 3) и NP_001171991.1 (SEQ ID NO: 4). Пример мышинового белка AQP1 включает, но не ограничивается SEQ ID NO: 5.

5 [0020] Примеры белка AQP, нуклеиновой кислоты и ассоциированных векторов для применения в изобретении описаны в данном документе в Патенте США 10166299, полнота которого включена посредством ссылки.

[0021] В одном аспекте белок AQP1 содержит часть аминокислотной последовательности белка AQP1, где такая часть белка AQP1 сохраняет
10 способность образовывать канал в клеточной мембране, который делает возможным прохождение воды. Существует несколько изоформ белка AQP1. Таким образом, в одном аспекте белок AQP1 представляет собой или включает изоформу AQP-белка, где такая изоформа сохраняет способность образовывать канал, который делает возможным прохождение воды. В одном аспекте белок AQP1
15 представляет собой или включает часть изоформы или другого встречающегося в природе варианта белка AQP1, где такая часть сохраняет способность образовывать канал в мембране, который делает возможным прохождение воды. Способы получения функциональных частей и вариантов белков AQP1, таких как консервативные варианты белка AQP1, известны специалистам в данной области.

20 [0022] Также в настоящем изобретении охвачены варианты белка AQP1, которые изменены посредством манипуляций с генами. В отношении таких вариантов, любой тип изменения в аминокислотной последовательности является допустимым при условии, что данный вариант сохраняет активность по меньшей мере одного белка AQP1, описанную в данном документе. Примеры таких
25 разновидностей включают делеции аминокислот, вставки аминокислот, замены аминокислот и их комбинации, но не ограничиваются ими. Например, специалистам в данной области хорошо известно, что одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) аминокислот часто можно удалять с N- и/или C-концов белка без значимого влияния на активность того белка.

30 Аналогично, одна или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) аминокислот могут быть часто вставлены в белок без значимого влияния на активность белка.

[0023] Как указано, выделенные варианты белков по настоящему изобретению также могут содержать замены аминокислот, по сравнению с белком
35 AQP1 дикого типа, раскрытым в данном документе. Любая замена аминокислоты допустима при условии, что активность белка значимо не изменена. В данном

отношении в данной области следует принимать во внимание, что аминокислоты могут быть подразделены на группы, в зависимости от их физических свойств. Примеры таких групп включают заряженные аминокислоты, незаряженные аминокислоты, полярные незаряженные аминокислоты и гидрофобные аминокислоты, но не ограничиваются ими. Предпочтительные варианты, которые могут содержать замены, представляют собой варианты, в которых аминокислота заменяется аминокислотой из той же группы. Такие замены называются консервативными.

[0024] Желательные замены аминокислот (будь то консервативные или неконсервативные) могут быть определены специалистами в данной области в тот момент, когда такие замены желательны. Например, замены аминокислот можно использовать для идентификации важных остатков белка AQP1 или для увеличения или уменьшения аффинности белков AQP1, описанных в данном документе. Таким образом, в одном аспекте вариант белка AQP1 содержит по меньшей мере одну (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или любые диапазоны из вышеуказанного) замену аминокислот (например, консервативную замену), по сравнению с белками AQP1, описанными в данном документе (например, SEQ ID NO: 1-5). В одном аспекте белок AQP1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична белкам AQP1, описанным в данном документе (например, SEQ ID NO: 1-5).

[0025] В то время как белки по настоящему изобретению могут состоять полностью из последовательностей, раскрытых в данном документе, и их раскрытые варианты, такие белки могут дополнительно содержать аминокислотные последовательности, которые не придают активность AQP1, но которые имеют другие полезные функции. Любая полезная дополнительная аминокислотная последовательность может быть добавлена к выделенной последовательности белка, при условии, что дополнительные последовательности не оказывают нежелательного действия на способность белка образовывать канал, который делает возможным прохождение воды. Например, выделенные белки по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные последовательности,

которые полезны для визуализации или очистки пептида. Такие последовательности действуют как метки (например, ферменты) или теги (например, антителосвязывающие сайты). Примеры таких меток и тегов включают бета-галактозидазу, люциферазу, глутатион-s-трансферазу, тиоредоксин, HIS-метки, биотиновые метки и флуоресцентные метки, но не ограничиваются ими. Другие полезные последовательности для мечения и введения тегов в белки известны специалистам в данной области.

[0026] Помимо модификаций, описанных выше, выделенные белки по настоящему изобретению могут быть дополнительно модифицированы, при условии, что такая модификация не значительно влияет на способность белка образовывать канал, который обеспечивает прохождение воды. Такие модификации могут быть сделаны, например, для увеличения стабильности, растворимости или способности к поглощению данного белка. Примеры таких модификаций включают пегилирование, гликозилирование, фосфорилирование, ацетилирование, миристилирование, пальмитоилирование, амидирование и/или другую химическую модификацию пептида, но не ограничиваются ими.

[0027] Белок AQP1 может происходить из любого вида, который экспрессирует функциональный белок AQP1. Белок AQP1 может содержать последовательность белка AQP1 человека или другого млекопитающего или его части. Дополнительные примеры включают белки AQP1 мыши, представителей семейства кошачьих, представителей семейства собачьих, представителей семейства лошадиных, представителей крупного рогатого скота, овец, представителей семейства свиных или другого животного-компаньона, другого животного зоопарка или других животных, относящихся к домашнему скоту, но не ограничиваются ими. В одном аспекте белок AQP1 содержит аминокислотную последовательность человеческого белка AQP1 или его части. В еще одном аспекте белок AQP1 содержит аминокислотную последовательность мышинового белка AQP1 или его части.

[0028] В одном аспекте белок AQP1 соединен со слитым сегментом; такой белок называется слитым белком AQP1. Такой белок содержит домен белка AQP1 (также называемый в данном документе доменом AQP1) и слитый сегмент. Слитый сегмент представляет собой сегмент из аминокислот любого размера, который может усиливать свойства белка AQP1. Например, слитый сегмент по изобретению может повышать стабильность слитого белка AQP1, добавлять гибкость или усиливать или стабилизировать мультимеризацию слитого белка AQP1. Примеры слитых сегментов включают слитый сегмент иммуноглобулина, слитый сегмент

альбумина и любой другой слитый сегмент, который увеличивает биологический период полувыведения белка, обеспечивает белку гибкость и/или делает возможной или стабилизирует мультимеризацию, не ограничиваясь ими. Применение одного или более слитых сегментов находится в пределах объема данного раскрытия.

5 Слитые сегменты могут быть соединены с N-концом и/или C-концом белка AQP1 по изобретению. В контексте данного документа термин «соединение» относится к объединению посредством присоединения с использованием методик генной инженерии. В таком аспекте молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок AQP1, физически связана с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый
10 сегмент, таким образом, что данные две кодирующие последовательности находятся в рамке, и продукт транскрипции образует непрерывный слитый белок. В одном аспекте белок AQP1 может быть соединен непосредственно со слитым сегментом, или белок AQP1 может быть соединен со слитым сегментом линкером из одной или более аминокислот.

15 [0029] Молекулы нуклеиновой кислоты (полинуклеотиды), которые кодируют белки AQP1 (например, слитые белки AQP1), описанные в данном документе, также предложены как аспект настоящего изобретения. Молекулы нуклеиновых кислот могут содержать ДНК, кДНК и/или РНК, могут быть одно- или двуцепочечными и могут быть встречающимися в природе, синтетическими и/или рекомбинантными.

20 [0030] Полинуклеотид может содержать аналоги или производные нуклеотидов (например, инозиновые или фосфоритоат-нуклеотиды и т.п.). Молчащие мутации в кодирующей последовательности происходят в результате вырожденности (а именно, избыточности) генетического кода, в соответствии с которой более чем один кодон может кодировать один и тот же аминокислотный
25 остаток. Таким образом, например, лейцин может кодироваться СТТ, СТС, СТА, СТГ, ТТА или ТТГ; серин может кодироваться ТСТ, ТСС, ТСА, ТСГ, АГТ или АГС; аспарагин может кодироваться ААТ или ААС; аспарагиновая кислота может кодироваться ГАТ или ГАС; цистеин может кодироваться ТГТ или ТГС; аланин может кодироваться ГСТ, ГСС, ГСА или ГСГ; глутамин может кодироваться САА
30 или САГ; тирозин может кодироваться ТАТ или ТАС; и изолейцин может кодироваться АТТ, АТС или АТА.

[0031] Полинуклеотид может быть предложен в виде части конструкции, содержащей данный полинуклеотид и элементы, которые делают возможной доставку полинуклеотида в клетку и/или экспрессию данного полинуклеотида в
35 клетке. Например, полинуклеотидная последовательность, кодирующая AQP1, может быть функционально связана с последовательностями контроля экспрессии.

Последовательность контроля экспрессии, функционально связанная с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, чтобы экспрессия кодирующей последовательности достигалась в условиях, совместимых с последовательностями контроля экспрессии. Последовательности контроля экспрессии включают

5 соответствующие промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции, старт-кодон (а именно, ATG) перед геном, кодирующим белок, сигнал сплайсинга для интронов, сохранение правильной рамки считывания того гена для обеспечения правильной трансляции мРНК и стоп-кодоны, но не ограничиваются ими. Подходящие промоторы включают ранний промотор SV40, промотор RSV, аденовирусный

10 главный поздний промотор, промежуточный ранний промотор CMV (от англ. Cytomegalovirus - цитомегаловирус) I человека, промотор поксвируса, промотор 30K, промотор I3, промотор sE/L, промотор 7.5K, промотор 40K и промотор C1, но не ограничиваются ими.

[0032] Полинуклеотид, кодирующий AQP1 или слитый белок, может быть

15 клонирован или амплифицирован способами *in vitro*, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР), лигазная цепная реакция (ЛЦР), система опосредованной транскрипцией амплификации (TAS - от англ. transcription-based amplification system), система самоподдерживающейся репликации последовательностей (3SR – от англ. self-sustained sequence replication system) и система амплификации с

20 репликазой QCE \leq (QB). Например, полинуклеотид, кодирующий белок, содержащий цинковые пальцы, может быть выделен посредством полимеразой цепной реакции кДНК с использованием праймеров на основе ДНК-последовательности молекулы. Большое множество методик клонирования и амплификации *in vitro* хорошо известны специалистам в данной области.

[0033] Вектор для применения в изобретении включает плазмиды (например, ДНК-плазмиды), бактериальные векторы и вирусные векторы, такие как аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), поксвирусные векторы, ретровирусные векторы, векторы вируса герпеса, полиовирусные векторы и альфавирусные векторы. Когда вектор представляет

30 собой плазмиду (например, ДНК-плазмиду), плазида может образовывать комплекс с хитозаном.

[0034] В одном аспекте вектор представляет собой или включает вирусный вектор, такой как аденовирусный вектор (например, серотипа 2 или серотипа 5) или вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Такой вектор AAV может

35 быть выбран из вектора AAV1, вектора AAV2, вектора AAV3, вектора AAV4, вектора AAV5, вектора AAV6, вектора AAV7, вектора AAV8, вектора AAV9, вектора AAV10,

вектора AAV11, вектора AAV12, вектора AAV44.9 (как описано в публикации патентной заявки США № 2018/0355376, которая включена в данный документ в своей полноте, и в упомянутом выше Патенте США 10166299), вектора AAV и вектора BAAV, где любой из таких векторов кодирует белок AQP1, как описано в
5 данном документе.

[0035] В одном аспекте вектор AAV представляет собой или включает вектор AAV2, вектор AAV5, вектор AAV6, вектор BAAV, где соответствующий вектор кодирует белок AQP1, как описано в данном документе. В одном аспекте вектор AAV содержит ITR (от англ. inverted terminal repeat - инвертированный концевой повтор)
10 AAV и промотор CMV, функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей белок AQP1.

[0036] Также предложены плазмидные векторы, которые кодируют белок AQP1. Такие плазмидные векторы также могут включать области контроля, такие как ITR AAV, промотор, функционально связанный с молекулой нуклеиновой
15 кислоты, кодирующей белок AQP1, один или более сайтов сплайсинга, сайт полиаденилирования и сайт терминации транскрипции. Такие плазмидные векторы также обычно включают целый ряд сайтов рестрикции, узнаваемых рестриктазами, а также молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует лекарственную устойчивость.

[0037] Согласно настоящему изобретению также предложен вирион AAV. В контексте данного документа, вирион AAV включает вектор AAV, кодирующий белок AQP1 по изобретению, заключенный в капсид AAV. Примеры капсидов AAV включают капсиды AAV1, капсиды AAV2, капсиды AAV3, капсиды AAV4, капсиды AAV5, капсиды AAV6, капсиды AAV7, капсиды AAV8, капсиды AAV9, капсиды AAV10,
20 капсиды AAV11, капсиды AAV12, капсид AAV44.9, капсиды AAV, капсиды BAAV и капсиды из AAV других серотипов, известных специалистам в данной области. В одном аспекте капсид представляет собой химерный капсид, а именно, капсид, содержащий белки VP из более чем одного серотипа. В контексте данного документа серотип вириона AAV по изобретению представляет собой серотип, обеспеченный капсидными белками VP. Например, вирион AAV2 представляет собой вирион, содержащий белки VP1, VP2 и VP3 AAV2. Любой вирион AAV можно использовать для осуществления на практике способов по изобретению при
25 30 условии, что данный вирион способен эффективно преобразовывать протоковые клетки и ациноциты слюнных желез.

[0038] В одном аспекте вирион AAV выбран из вириона AAV2, вириона AAV5, вириона AAV6 и вириона BAAV, где вектор AAV в пределах вириона кодирует белок AQP1.

[0039] Способы, полезные для получения векторов AAV и вирионов AAV, раскрытых в данном документе, известны специалистам в данной области. Кратко, вектор AAV по настоящему изобретению может быть получен с использованием методик на основе рекомбинантных ДНК или РНК для выделения интересующих последовательностей нуклеиновых кислот и соединения их вместе, как описано в данном документе, например, посредством использования методик, известных специалистам в данной области, таких как расщепление рестриктазами, лигирование, ПЦР-амплификация и т.д. Способы получения вириона AAV по изобретению обычно включают (а) введение вектора AAV по изобретению в хозяина, (б) введение вектора-помощника в клетку-хозяина, где вектор-помощник содержит вирусные функциональные элементы, отсутствующие у вектора AAV, и (с) введение вируса-помощника в клетку-хозяина. Все функциональные элементы для репликации и упаковки вириона AAV должны присутствовать для достижения репликации и упаковки вектора AAV в вирионы AAV. В некоторых случаях по меньшей мере один из вирусных функциональных элементов, кодируемых вектором-помощником, может экспрессироваться клеткой-хозяином. Введение векторов и вирусов-помощников можно проводить, используя стандартные методики, и оно может происходить одновременно или последовательно. Клетки-хозяева затем культивируют с получением вирионов AAV, которых затем очищают, используя стандартные методики, такие как градиенты CsCl. Остаточная активность вируса-помощника может быть инактивирована, используя известные способы, такие как инактивация нагреванием. Такие способы обычно приводят к получению высоких титров высоко очищенных вирионов AAV, которые готовы к применению.

[0040] Вектор AAV указанного серотипа может быть упакован в капсид того же серотипа. Например, вектор AAV2 может быть упакован в капсид AAV2. В других примерах вектор AAV указанного серотипа упакован в капсид отличного серотипа для модификации тропизма полученного вириона. Комбинации серотипов вектора AAV и серотипов капсида AAV могут быть определены специалистами в данной области.

[0041] Вектор для применения в изобретении может включать последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующей последовательностью, таким образом, что экспрессия данной кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с последовательностями

контроля экспрессии. Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции, старт-кодон (а именно, ATG) перед геном, кодирующим белок, сигнал сплайсинга для интронов, сохранение правильной рамки считывания того гена для обеспечения правильной трансляции мРНК и стоп-кодона, но не ограничиваются ими.

[0042] Термин «энхансер» в контексте данного документа относится к последовательности ДНК, которая усиливает транскрипцию, например, нуклеотидной последовательности, с которой она функционально связана. Энхансеры могут быть расположены на расстоянии многих тысяч пар нуклеотидов от кодирующей области нуклеотидной последовательности и может опосредовать связывание регуляторных факторов, паттерны метилирования ДНК или изменения в структуре ДНК. Большое число энхансеров из множества разных источников хорошо известно в данной области и доступно в виде или в пределах клонированных полинуклеотидов (например, из банков-депозитариев, как например, ATCC, а также других коммерческих или индивидуальных источников). Целый ряд полинуклеотидов, включающий промоторы (такие как обычно используемый промотор CMV, также включает последовательности энхансеров. Энхансеры могут быть расположены до, в пределах или после кодирующих последовательностей. Например, нуклеотид, кодирующий полипептид, может быть функционально связан с энхансером CMV/промотором β -актина курицы (также называемым «промотором CAG»). Кроме того, вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую репортер, для идентификации эффективности трансфекции/трансдукции вектора.

[0043] Также предложены композиции, содержащие вектор (например, вектор AAV), кодирующий белок AQP. Также предложены композиции, содержащие вирион AAV, содержащий вектор AAV, кодирующий белок AQP1. Такие композиции могут содержать носитель (например, фармацевтически или физиологически приемлемый носитель). Например, такие композиции могут включать водный раствор, такой как физиологически совместимый буфер. Примеры вспомогательных веществ, подлежащих включению в композиции, включают воду, физиологический раствор, раствор Рингера и другие водные физиологически уравновешенные солевые растворы. В некоторых аспектах вспомогательные вещества добавляют, например, для поддержания стабильности частиц или для предупреждения агрегирования. Примеры таких вспомогательных веществ включают магний для сохранения стабильности частиц, плюрониловую кислоту для уменьшения прилипания, маннит

для уменьшения агрегирования и т.п., известные специалистам в данной области, но не ограничиваются ими.

[0044] Композиции удобным образом изготавливаются в форме, подходящей для введения субъекту. Методики изготовления таких композиций известны 5 специалистам в данной области. Например, вектор (например, вектор AAV) или вирион по изобретению можно объединять с физиологическим или другим фармацевтически приемлемым раствором. В некоторых аспектах также добавляют вспомогательные вещества. В другом аспекте композицию, содержащую вектор (например, вектор AAV) или вирион, сушат, и физиологический раствор или другой 10 фармацевтически приемлемый раствор можно добавлять к композиции перед введением.

[0045] Кроме того, вектор или вирион можно использовать в способах, описанных в данном документе, отдельно или как часть фармацевтической композиции.

[0046] Композиция (например, фармацевтическая композиция) может 15 содержать один или более других дополнительных терапевтических агентов. Примеры таких дополнительных терапевтических агентов, которые могут быть подходящими для применения в композиции, включают генотерапии, противовоспалительные средства, ловушки свободных радикалов, противолучевые 20 средства и агенты или лекарственные средства, которые увеличивают слюноотделение.

[0047] Вирусный вектор (например, вектор AAV) можно вводить субъекту в виде вектора или вириона, содержащего вектор (например, вектор AAV). В одном аспекте вирион представляет собой вирион AAV. Вектор или вирион можно вводить 25 субъекту в любое подходящее место и любым подходящим путем введения. В аспекте вектор или вирион вводят в слюнную железу субъекта.

[0048] В контексте данного документа, способность вектора или вириона предупреждать или уменьшать дисфункцию слюнных желез, вызываемую облучением, относится к способности такого вектора или вириона полностью или 30 частично исключать дисфункцию слюнных желез, вызываемую облучением. Например, в отношении слюнотечения, способы по настоящему изобретению могут вызывать обратное движение такого потока до 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% величины, наблюдаемой у нормального индивида (то есть индивида, которому не проводили облучение).

[0049] Согласно раскрытию предложен способ, включающий введение 35 субъекту вектора или вириона, где такое введение поддерживает функцию слюнной

железы у такого субъекта после облучения. В контексте данного документа поддержание функции слюнной железы у субъекта, которому был введен вектор или вирион, означает, что функция слюнной железы после проведения облучения эквивалентна (или по меньшей мере эквивалентна) функции слюнной железы у данного субъекта перед проведением облучения. Например, после облучения субъекта, которому вводили вектор или вирион, функция слюнной железы у данного субъекта не ухудшается, а является эквивалентной (или по меньшей мере эквивалентной) функции до облучения. В одном аспекте изобретения способ включает (а) введение вектора, кодирующего белок AQP, субъекту, который не подвергался ионизирующему облучению, и (b) проведение ионизирующего облучения субъекту после (а), с предупреждением, таким образом, или уменьшением у субъекта дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением.

[0050] В контексте данного документа, термин «субъект» включает человека и других млекопитающих, таких как мыши, крысы, хомяки, кошки, собаки, свиньи, коровы, лошади, другие животные-компаньоны, другие животные зоопарка, лабораторные животные (например, мыши) и крупный рогатый скот.

[0051] Вектор или вирион можно вводить множеством путей. В некоторых аспектах вектор или вирион вводят посредством распыления. В некоторых аспектах вектор или вирион вводят в слизистую оболочку. В некоторых аспектах вектор или вирион вводят непосредственно в ткань или орган. В некоторых аспектах вектор или вирион вводят в слюнную железу (например, околоушную, подчелюстную или подъязычную железу).

[0052] Согласно изобретению также предложены способы *ex vivo* предупреждения или уменьшения дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением. Такие способы могут включать введение вектора или вириона в клетку, ткань или орган вне организма субъекта, и затем помещение данной клетки, ткани или органа в организм. Такие способы известны специалистам в данной области.

[0053] В аспектах изобретения предложена клетка (например, клетка слюнной железы), ткань или орган, трансфицированные вектором AAV, который кодирует белок AQP1. Клетка (например, клетка слюнной железы), ткань или орган (например, слюнная железа, такая как околоушная, подчелюстная или подъязычная железа) может представлять собой клетку, ткань или орган субъекта, который собирается пройти или прошел облучение, или клетку, ткань или орган *ex vivo*.

[0054] Вектор, вирион или их композицию (например, фармацевтическую композицию) можно вводить отдельно или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами. Примеры таких дополнительных

терапевтических агентов, которые могут быть подходящими, включают генотерапии, противовоспалительные средства, ловушки свободных радикалов, противолучевые средства и агенты или лекарственные средства, которые увеличивают слюноотделение.

5 [0055] Эффективная доза композиций, раскрытых в данном документе, подлежащая введению субъекту (а именно, для предупреждения или уменьшений дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением), будет зависеть от состояния субъекта, способа введения и мнения лечащего врача. Иллюстративная доза может находиться в интервале от примерно 10^4 частиц вириона на килограмм до примерно
 10 10^{12} частиц вириона на килограмм субъекта (например, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} и их интервалы). Предпочтительная доза находится в интервале от примерно 10^6 частиц вириона на килограмм до примерно 10^{12} частиц вириона на килограмм. Более предпочтительная доза находится в интервале от примерно 10^8 частиц вириона на килограмм до примерно 10^{12} частиц вириона на килограмм.

15 [0056] Альтернативная иллюстративная доза может находиться в интервале от примерно 10^4 частиц вириона на грамм железа до примерно 10^{12} частиц вириона на грамм железа (например, примерно 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{11} , 10^{12} или их интервалы).

[0057] В некоторых аспектах доза определяется количеством жидкости, необходимым для заполнения железы. Для того, чтобы происходил контакт вектора с клеткой, железа должна быть заполнена жидкостью для введения вектора в клетку. У пациентов с IR объемы находятся в интервале от примерно 500 мкл до примерно 2,5 мл (например, 500 мкл, 600 мкл, 700 мкл, 800 мкл, 900 мкл, 1 мл, 1,1 мл, 1,2 мл, 1,3 мл, 1,4 мл, 1,5 мл, 1,6 мл, 1,7 мл, 1,8 мл, 1,9 мл, 2 мл, 2,1 мл, 2,2 мл,
 25 2,3 мл, 2,4 мл, 2,5 мл или их интервалы), в зависимости от атрофии и фиброза.

[0058] Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но, конечно, не должны считаться ограничивающими каким-либо образом его объем.

ПРИМЕР 1

30 [0059] Данный пример демонстрирует, что введение вектора (вектора AAV), кодирующего AQP1 до и после лечения IR, активирует функцию слюнной железы.

[0060] Все эксперименты с мышами были одобрены Национальным институтом стоматологических и черепно-лицевых исследований (NIDCR – от англ. National Institute of Dental and Craniofacial Research), комитетом по уходу за животными и их использованию. Использовали самок мышей C3H в возрасте
 35 восьми недель (Национальный институт онкологии, область животноводства).

Группы из 7-8 мышей С3Н обрабатывали векторами AAV2, кодирующими или GFP, или AQP1 или нейротурин или комбинацию AAV2-AQP1+ AAV2-нейротурин, за 10 суток до или через 2 месяца после облучения (IR).

[0061] В частности, группы обработки включали инъекцию AAV2-GFP (10^{10} вирусных частиц/г) или AAV2-hAQP1 (10^{10} или 10^7 вирусных частиц/г) или AAV2NRTN (10^6 , 10^8 или 10^{10} вирусных частиц/г) за 10 суток до IR или через 60 суток после IR. Слюну исходного уровня (без IR) собирали перед доставкой вектора или IR. Для облучения слюнных желез каждое животное помещали в специально построенное фиксирующее приспособление из люцита. Данное фиксирующее приспособление иммобилизует животных без использования анестезирующих средств и делает возможным осуществлять IR только области головы и шеи.

[0062] Мышей облучали за 5 раз (6 Гр (Грей)/сутки на протяжении 5 суток), используя рентгеновский облучатель Therapax DXT300 (Pantak). После IR животных вынимали из фиксирующего приспособления, помещали (5 животных/клетка) в среду с контролем климата и освещения и давали им свободный доступ к пище и воде. Для доставки вирусных векторов в подчелюстные железы, мышей подвергали действию наркоза с помощью кетамина (60 мг/кг) и ксилазина (8 мг/кг) внутривенно, после чего векторы доставляли в обе подчелюстные железы посредством ретропроточной инфузии. Во время канюляции 0,5 мг/кг атропина внутримышечно применяли для ингибирования выделения слюны для увеличения эффективности трансдукции.

[0063] Для сбора слюны мышам давали наркоз, как упомянуто выше, с последующей подкожной инъекцией пилокарпина в количестве 0,25 мг/кг массы тела для активации выделения слюны. Всю слюну собирали посредством гематокритного капилляра, 75 мм (Drummond), в предварительно взвешенные пробирки Eppendorf, объемом 1,5 мл, в течение 20 мин и сразу же замораживали. Спустя 10 месяцев, мышей умерщвляли в камере с диоксидом углерода, и железы удаляли для анализа. Слюну собирали у мышей до начала эксперимента (исходный уровень/без IR). Результаты представлены на Фиг. 1-3.

[0064] Результаты показывают, что по сравнению с AAV2-GFP-обработанными мышами, обработка AAV2-AQP1 могла предупредить потерю слюнотечения, при введении до IR, или инициировать восстановление слюнотечения после IR ($p < 0,01$) (см. Фиг. 1-3). Напротив, нейротурин мог лишь предупреждать потерю слюнотечения и по существу не мог инициировать восстановления. Кроме того, комбинация данных двух векторов не была

синергетической и существенно не увеличивала слюноотечение за пределы уровней, достигаемых только с вектором AAV2APQ1, вводимым до или после IR.

[0065] Данные результаты подтверждают тот факт, что введение AAV-AQP1 до и после лечения IR активирует функцию слюнной железы.

5 [0066] До данного изобретения традиционное понимание заключалось в том, что для генотерапии AQP1 требовались стабильные эпителиальные клетки для экспрессии AQP1 для создания облегченного пути для движения жидкости. В клинических испытаниях AQP1 требовалось, чтобы у пациентов прошло по меньшей мере 2 года после IR-лечения. Поскольку имеется значительное обновление клеток и ремоделирование после IR-лечения, ожидается, что ДНК AQP1 AAV будет потеряна из трансдуцированных клеток после IR-лечения (а именно, не сохранится) и, вследствие этого, не сможет создавать облегченный путь для движения жидкости. Например, Malik et al., *J. Virol.*, 71(3): 1776-1783 (1997)), указывают на то, что AAV может только продолжать существовать в неделящихся клетках и теряется в 10
15
20
25
30
35
делящейся популяции со временем. Li et al., *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 62(5): 1510-1516 (2005)), сообщают о том, что имеется значительное ремоделирование в железе, которое происходит после IR, и за данными изменениями следует потеря функции. Кроме того, в Vitolo et al., *Oral Diseases*, 8: 183-191 (2002)) сообщается, что генотерапия AQP1 предназначена для восстановления железы, тогда как другие подходы предназначены для предупреждения повреждения железы под действием IR. Vitolo с соавт. также раскрывают, что слюнные железы представляют собой популяцию медленно делящихся клеток и что трансдукция AAV может продолжать существовать в слюнной железе.

[0067] Таким образом, до изобретения генотерапию AQP1 не имели в виду в качестве профилактического подхода в отношении гипофункции, вызываемой IR, поскольку генотерапия AQP1 не продолжала бы изменять и ремоделировать среду подобно слюнной железе после IR. Однако, как описано в данном документе, изобретение, раскрытое в данном документе, - о том, что введение AAV-AQP1 до и 30
35
после лечения IR активирует функцию слюнной железы – является удивительным и неожиданным.

ПРИМЕР 2

[0068] Данный пример характеризует механизм слюноотечения до и после IR.

35 [0069] Данные секвенирования РНК одиночных клеток или мышей без IR или мышей с IR, обработанных GFP, или мышей, обработанных AQP1, до (AQP1B) или

после (AQP1), использовали для получения UMAP и идентификации 16 отличных кластеров клеток. Сравнение распределения клеток между разными кластерами в каждом из 4 условий использовали для создания тепловой карты Фиг. 4.

[0070] AQP1B можно обнаружить в той же кладе, что и группу без IR, в то время как GFP и AQP1A находятся в отдельных друг от друга кладах и от клады AQP1B/без IR. Данный результат дает основание полагать, что популяции клеток различаются у AQP1A и AQP1B. Кроме того, организация клад распределения на основе типа клеток в AQP1 наиболее похожа на группу без IR, в то время как AQP1A образует кладу, отличную от данной группы и группы с IR GFP.

[0071] Данные результаты подтверждают, что слюнотечение является результатом защиты железы, если введение проводилось до IR; однако, восстановление слюнотечения возможно в отличной популяции клеток и окружающей среде, если введение проводилось после IR.

ПРИМЕР 3

[0072] Данный пример демонстрирует, что введение AAV-AQP1 до облучения приводило к менее патологическим изменениям, по сравнению с введением AAV-AQP1 после облучения.

[0073] Оценивали гистологию мышины подчелюстной железы. Изображения от мышей, которым вводили AAV-GFP до облучения (Фиг. 5A), AAV-AQP1 до облучения (Фиг. 5B), AAV-GFP после введения (Фиг. 5C) и AAV-AQP1 после облучения (Фиг. 5D), получали с полностью отсканированных препаратов обычно одной и той же области каждой железы рядом с воротами. Всеобщие морфологические изменения в железе оценивали посредством окраски H & E (гематоксилином и эозином).

[0074] Используя шкалу оценивания 0-3, срезы оценивали в отношении атрофии, фиброза и иммунной инфильтрации. В совокупности везде увеличилась атрофия и фиброз. У них также повысился уровень воспаления с образованием внутрижелезистого зародышевого центра и реактивными лимфоузлами, находящимися в пределах капсулы железы. Имелось увеличенное число многоядерных ациноцитов и некоторые области проточной гиперплазии.

[0075] Однако, средняя балльная оценка для группы обработки после лечения составляла $2,2 \pm 0,75$ и для группы обработки до лечения составляла $1,5 \pm 0,54$ ($p > 0,05$). Таким образом, группа обработки после лечения IR имела тенденцию демонстрировать более заметные патологические изменения, по сравнению с группой обработки до лечения IR (Фиг. 5A-D).

[0076] Данные результаты подтверждают, что введение вектора, кодирующего AQP1, до облучения уменьшает пагубные эффекты, наблюдаемые, когда вектор, кодирующий AQP1, вводят после облучения.

5 [0077] Все ссылки, включая публикации, патентные заявки и патенты, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в равной мере, как если бы каждая ссылка была отдельно и конкретно указана включенной посредством ссылки и была изложена в данном документе во всей своей полноте.

10 [0078] Применение терминов в единственном числе и «по меньшей мере один» и похожих объектов ссылки в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее и термины в единственном числе и термины во множественном числе, если в данном документе не указано иное или оно явно не противоречит контексту. Применение термина «по меньшей мере один» с последующим
15 перечислением одного или более пунктов (например, «по меньшей мере один из А и В») следует истолковывать как означающее один пункт, выбранный из перечисленных пунктов (А или В), или любую комбинацию двух или более из перечисленных пунктов (А и В), если в данном документе не указано иное или оно явно не противоречит контексту. Термины «содержащий», «имеющий»,
20 «включающий» и «содержащий» следует истолковывать как открытые термины (то есть, означающие «включающий, но не ограниченный...»), если не указано иное. Раскрытие диапазонов значений в данном документе предназначено только для того, чтобы служить в качестве сокращенного способа ссылки в отдельности на
25 каждое отдельное значение, попадающее в данный диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание изобретения, как если бы оно было по отдельности перечислено в данном документе. Все способы, описанные в данном документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или иначе нет явных противоречий контексту. Применение всех возможных примеров или
30 вводных слов перед примером (например, «такой как»), предоставленных в данном документе, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Язык в описании изобретения не следует истолковывать как указывающий на какой-либо незаявленный элемент в качестве существенного для практического осуществления
35 изобретения.

[0079] Предпочтительные воплощения данного изобретения описаны в данном документе, включая наилучший способ, известный авторам изобретения, для осуществления изобретения. Изменения данных предпочтительных воплощений могут стать очевидными обычным специалистам в данной области при чтении изложенного выше описания. Авторы изобретения ожидают, что специалисты в данной области будут использовать такие изменения в соответствующих случаях, и авторы изобретения намерены осуществлять на практике данное изобретение иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, данное изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета, перечисленные в формуле изобретения, приложенной к данному документу, как разрешено применяемым законом. Кроме того, любая комбинация описанных выше элементов во всех их возможных вариантах охвачена изобретением, если в данном документе не указано иное или она иначе явно не противоречит контексту.

15

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

[0080] В данном документе ссылаются на следующие последовательности:

SEQ ID NO: 1:

1 masefkkklf wravvaefla ttfvfigsig salgfkyvpg nnqtavqdnv kvslafglsi
 61 atlaqsvghi sgahlnpavt lgllscqis ifralmyiia qcvgaivata ilsgitssl
 121 gnsigrndla dgvnsgqglg ieiigtqlvl cvlattdrr rrdlggsapl aiglsvalgh
 181 llaidytcg inparsfgsa vithfnshw ifwvpgfigg alavliydfi laprssltd
 241 rvkwvtsgqv eeylddaddi nsrvemkpk

20

SEQ ID NO: 2:

1 mpgarplplv lvpqntlawm qldakapahp rplqlgrvg pgsrqladgv nsgqglgiei
 61 igtlqlvclv lattdrrrd lggsaplaig lvalghlla idytcgcinp arsfgsavit
 121 hfnshwifw vgpfiggala vliydfilap rssltdrvk vwtsgqveey dldaddinsr
 181 vemkpk

25

SEQ ID NO: 3:

1 mfwfgyeav spagpshfa slllgvllti tfmpgarplp lvpqntla wmqldakapa
 61 hprplqlgr vpgsrqlad gvnsqgglgi eiigtqlvl cvlattdrr rrdlggsapla
 121 iglvalghl laidytcgi nparsfgsav ithfnshwi fwvpgfigga lavliydfil
 181 aprssltdr vkwvtsgqve eylddaddin srvemkpk

30

SEQ ID NO: 4:

1 mqsqgmgnvl dfwladgvns gqglgieiig tlqlvclva ttdrrrdlg gsaplaigls
 61 valghllaid ytcgcinpar sfgsavithn fshwifwvg pfiggalavl iydfilaprs

35

121 sdltdrvkw tsgqveeydl daddinsrve mkpk

SEQ ID NO: 5

1 maseikkkkf wravvaefla mtlfvfisig salgfnyple rnqtlvqdnv kvslafglsi

61 atlaqsvghi sgahlnpavt lgllscqis ilravmyia qcvgaivata ilsgitsslv

5 121 dnslgrndla hgvnsgqglg ieiigtqlv lcvlattdrr rrdlggsapl aiglsvalgh

181 llaidytgcs inparsfgsa vltrnfsnhw ifwvpgfigg alavliydfi laprssdftd

241 rmkvwtsgqv eeylddaddi nsrvemkpk

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ предупреждения или уменьшения дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением, у субъекта, включающий стадии, на которых:

(а) вводят указанному субъекту вектор, кодирующий белок аквапорин (AQP),
и

(b) проводят указанному субъекту ионизирующее облучение после стадии (а), предупреждая или уменьшая таким образом дисфункцию слюнных желез, вызываемой облучением, у указанного субъекта.

2. Применение вектора, кодирующего белок аквапорин (AQP), в способе предупреждения или уменьшения дисфункции слюнных желез, вызываемой облучением, у субъекта, где указанный способ включает стадии, на которых:

(а) вводят указанному субъекту вектор, кодирующий белок аквапорин (AQP),
и

(b) проводят указанному субъекту ионизирующее облучение после стадии (а), предупреждая или уменьшая таким образом дисфункцию слюнных желез, вызываемой облучением, у указанного субъекта.

3. Способ по п. 1 или применение по п. 2, в котором вектор вводят в слюнную железу субъекта.

4. Способ или применение по любому из п.п. 1-3, в котором белок AQP включает белок AQP1.

5. Способ или применение по п. 4, в котором белок AQP1 включает человеческий белок AQP1.

6. Способ или применение по любому из п.п. 1-5, в котором вектор включает вирусный вектор.

7. Способ или применение по п. 6, в котором вирусный вектор включает аденовирусный вектор.

8. Способ или применение по п. 7, в котором аденовирусный вектор включает серотип 2 или серотип 5.

9. Способ или применение по п. 6, в котором вирусный вектор включает вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

10. Способ или применение по п. 9, в котором вектор AAV включает AAV2, AAV5, AAV6, AAV44.9 или BAAV.

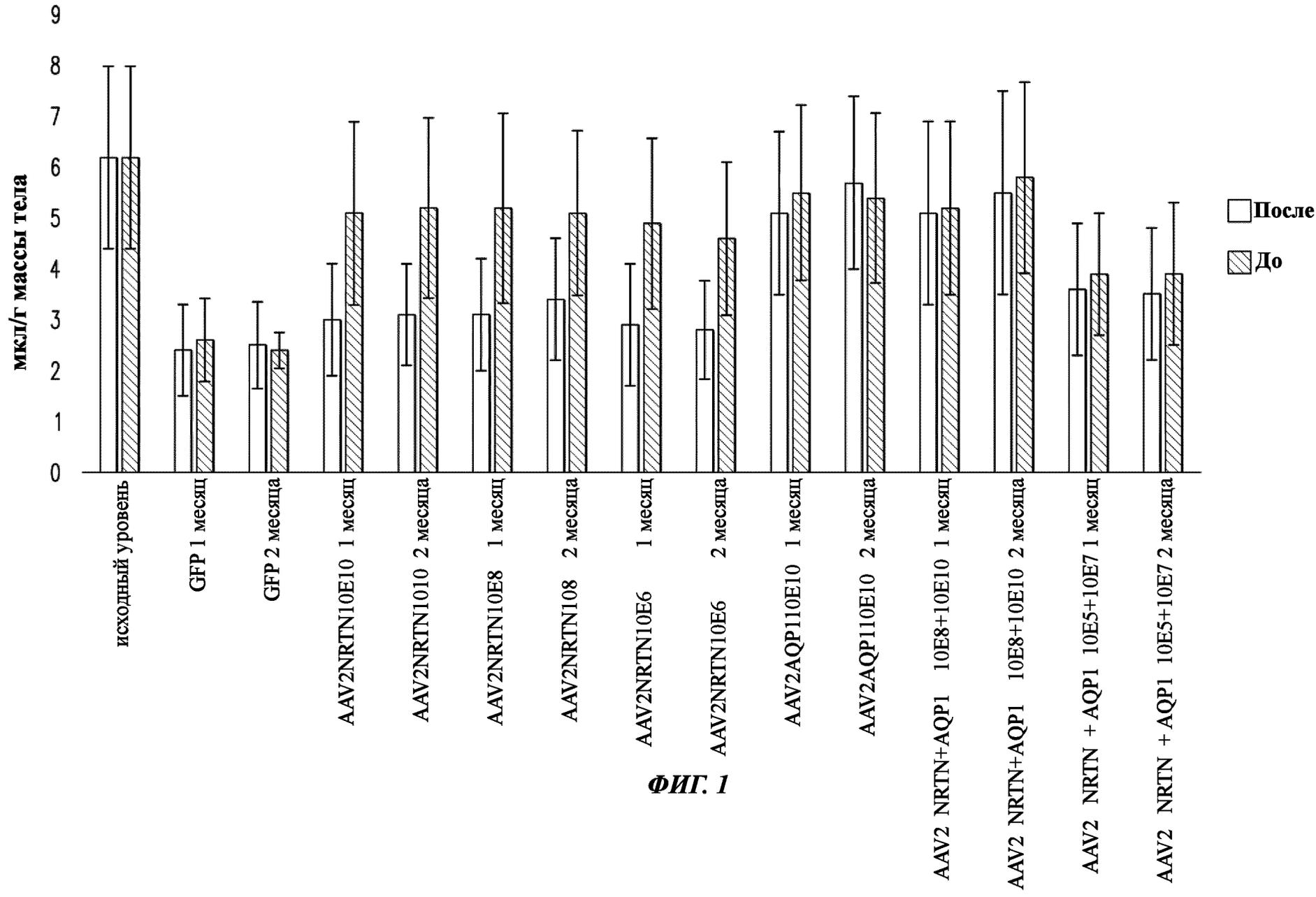
11. Способ или применение по п. 9 или п. 10, в котором вектор AAV вводят в виде вириона, содержащего вектор AAV.

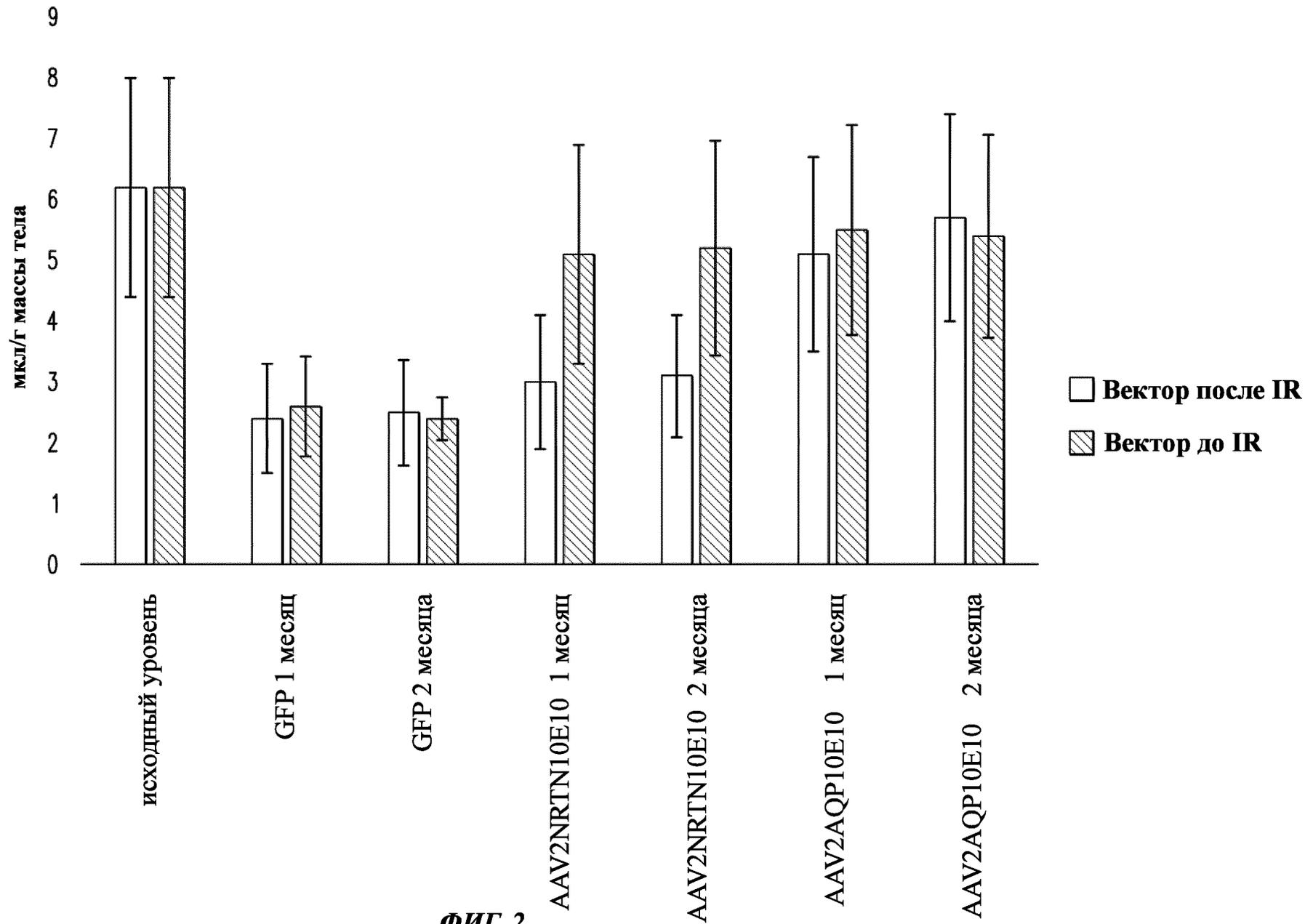
12. Способ или применение по п. 11, в котором вирион включает вирион AAV.

13. Способ или применение по любому из п.п. 1-12, в котором функцию слюнных желез поддерживают на уровне, эквивалентном или по меньшей мере эквивалентном функции слюнных желез до проведения ионизирующего облучения.

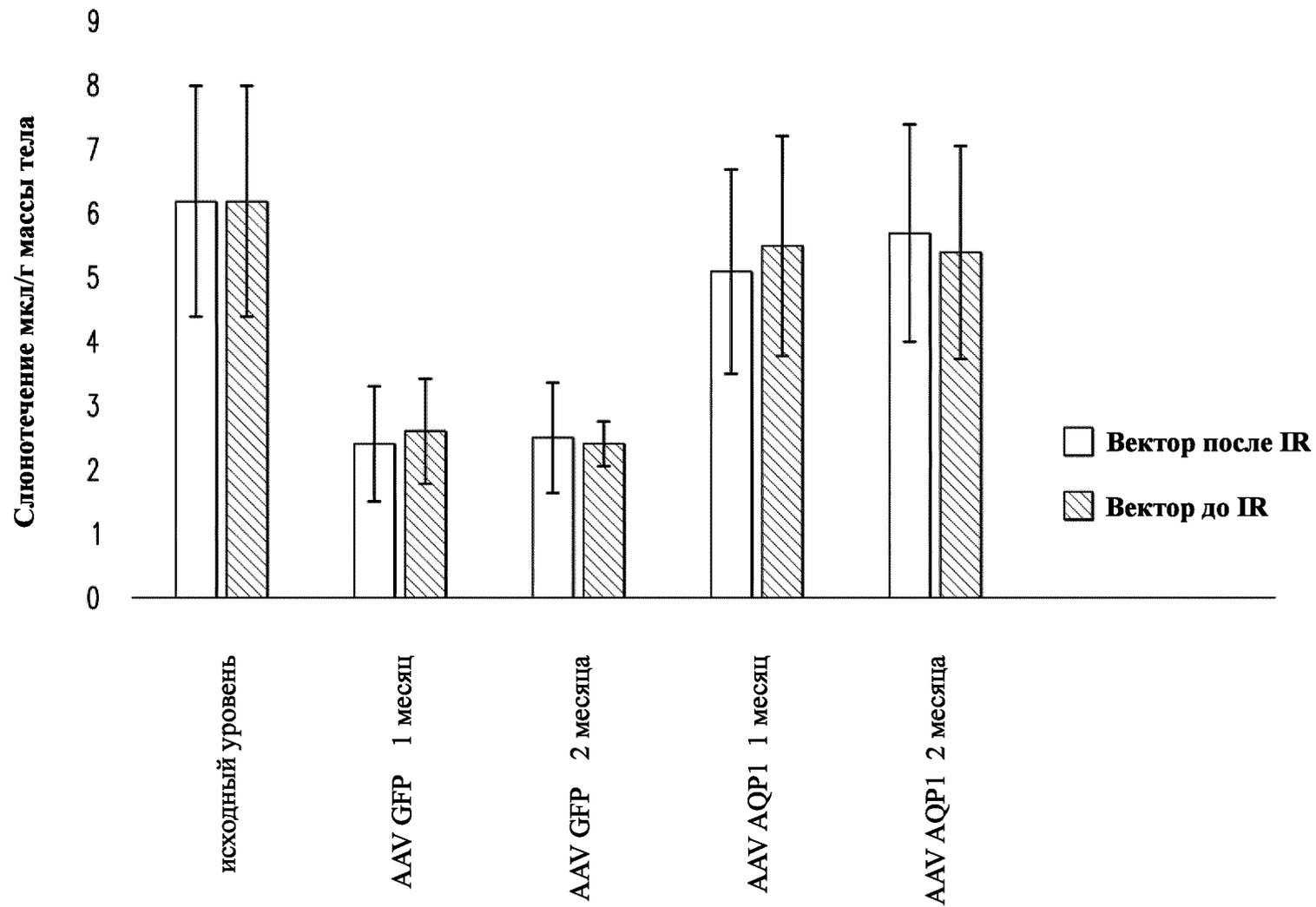
14. Способ или применение по любому из п.п. 1-13, в котором субъект представляет собой пациента, являющегося человеком.

15. Способ или применение по п. 14, в котором пациент страдает раком головы и шеи.

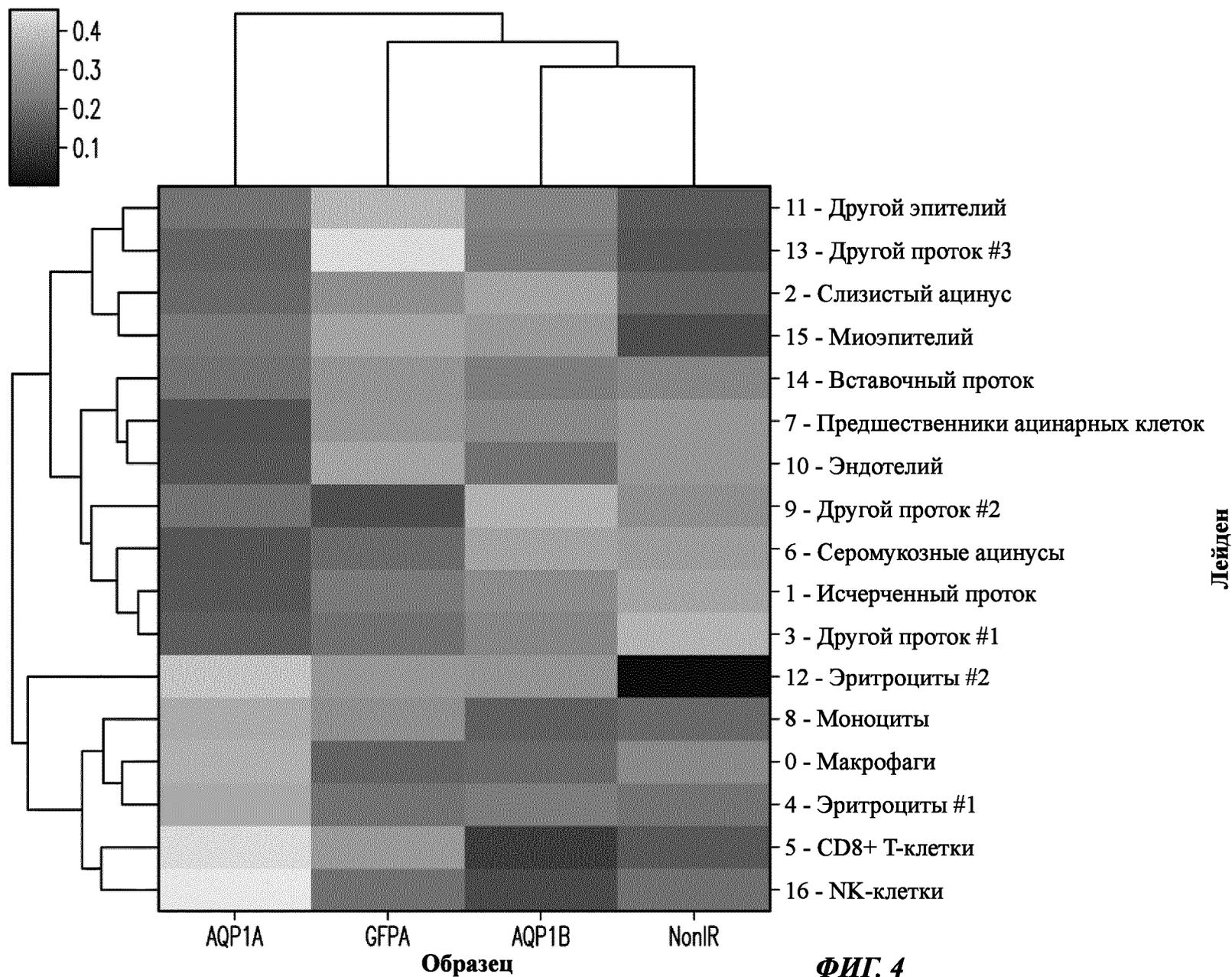




ФИГ. 2



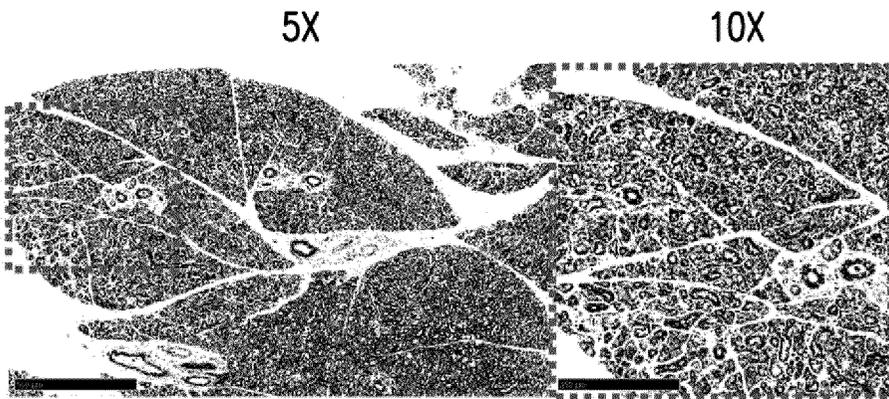
ФИГ. 3



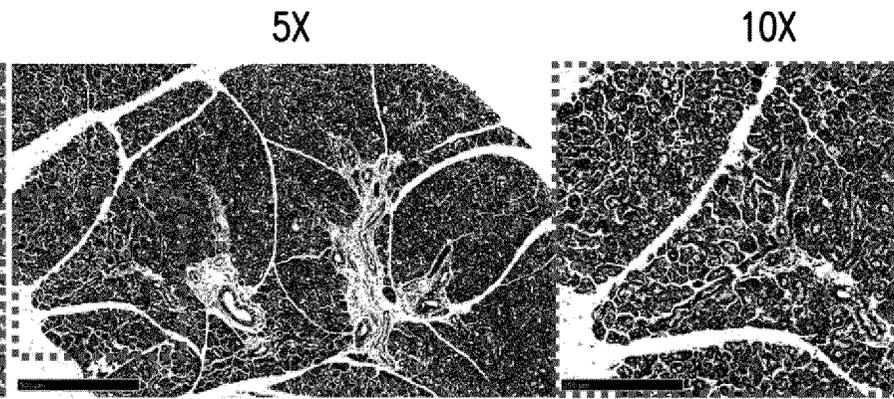
4

Лейден

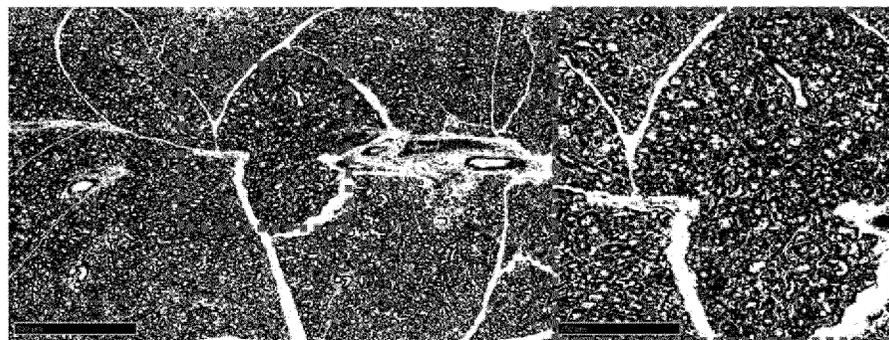
ФИГ. 4



ФИГ. 5А



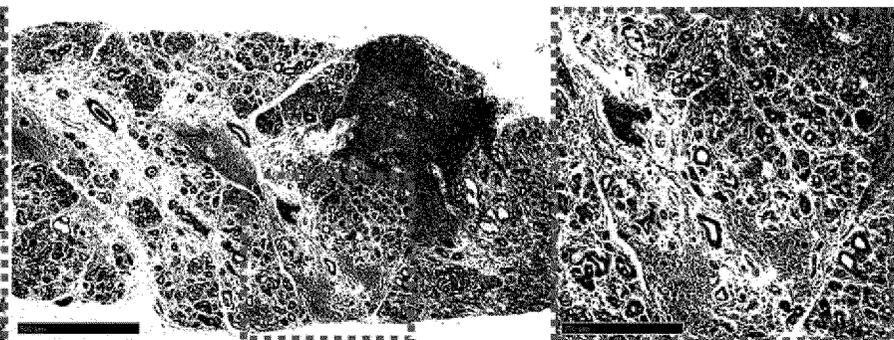
ФИГ. 5В



5X

10X

ФИГ. 5С



5X

10X

ФИГ. 5D