



(51) МПК
C12N 15/86 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/86 (2020.02); *C07K 7/06* (2020.02); *C07K 14/005* (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2018120736, 09.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 09.12.2016

Дата регистрации:
 22.07.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 11.12.2015 US 62/266,184;
 14.11.2016 US 62/421,891

(43) Дата публикации заявки: 13.01.2020 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 22.07.2020 Бюл. № 21

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 11.07.2018

(86) Заявка РСТ:
 US 2016/065969 (09.12.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2017/100671 (15.06.2017)

Адрес для переписки:
 190000, Санкт-Петербург, ВОХ-1125,
 ПАТЕНТИКА

(72) Автор(ы):

ДЕВЕРМАН Бенджамин Е. (US),
 ГРАДИНАРУ Вивиана (US),
 ЧАНЬ Кен Ю. (US)

(73) Патентообладатель(и):

КАЛИФОРНИЯ ИНСТИТЮТ ОФ
 ТЕКНОЛОДЖИ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: US 20150079038 A1, 19.03.2015. EP
 1290205 B1, 01.03.2006. RU 2457252 C2,
 27.07.2012.

(54) НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ПЕПТИДЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ
 АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ (AAV)

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описаны пептидные последовательности, способные направлять доставку аденоассоциированных вирусов (AAV) для их нацеливания на определенные окружения, например нервную систему и сердце, в организме субъекта. Настоящее изобретение также

относится к AAV, содержащим неприродные капсидные белки, содержащие раскрытые пептидные последовательности, и способам применения указанных AAV для лечения заболеваний. Изобретение расширяет арсенал средств для лечения заболеваний нервной системы и сердца. 5 н. и 67 з.п. ф-лы, 25 ил., 5 табл., 23 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/86 (2020.02); C07K 7/06 (2020.02); C07K 14/005 (2020.02)(21)(22) Application: **2018120736, 09.12.2016**(24) Effective date for property rights:
09.12.2016Registration date:
22.07.2020

Priority:

(30) Convention priority:
11.12.2015 US 62/266,184;
14.11.2016 US 62/421,891(43) Application published: **13.01.2020 Bull. № 2**(45) Date of publication: **22.07.2020 Bull. № 21**(85) Commencement of national phase: **11.07.2018**(86) PCT application:
US 2016/065969 (09.12.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/100671 (15.06.2017)Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, VOKH-1125,
PATENTIKA

(72) Inventor(s):

DEVERMAN Bendzhamin E. (US),
GRADINARU Viviana (US),
CHAN Ken YU. (US)

(73) Proprietor(s):

KALIFORNIYA INSTITYUT OF
TEKNOLODZHI (US)(54) **TARGETING PEPTIDES FOR TARGETED DELIVERY OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS (AAV)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: described are peptide sequences capable of directing the delivery of adeno-associated viruses (AAV) for targeting them to certain environments, e.g. the nervous system and heart, in the subject's body. Present invention also relates to AAV

containing non-natural capsid proteins containing disclosed peptide sequences, and methods of using said AAV for treating diseases.

EFFECT: invention extends the range of products for treating diseases of the nervous system and heart.

72 cl, 25 dwg, 5 tbl, 23 ex

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с §119 (е) главы 35 Свода законов США согласно предварительной заявке на патент США №62/266184, поданной 11 декабря 2015 года, и предварительной заявке на патент США №62/421891, поданной 14 ноября 2016 года. Настоящая заявка также является родственной заявке на патент США №14/485024, поданной 12 сентября 2014 года. Содержание указанных родственных заявок явным образом полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОБ ИССЛЕДОВАНИЯХ И РАЗРАБОТКАХ, ФИНАНСИРУЕМЫХ ФЕДЕРАЛЬНЫМИ ОРГАНАМИ США

[0002] Настоящее изобретение было выполнено при государственной поддержке в рамках грантов №№5R01AG047664, IDP2NS087949, 5U01NS090577 и 1R21MH103824-01, присужденных Национальными институтами здравоохранения США. Правительство США обладает определенными правами на настоящее изобретение.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Настоящая заявка подана совместно с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла, озаглавленного SEQLISTING.TXT, созданного 9 декабря 2016 года, размер которого составляет 40 Кб. Информация, предоставленная в электронном формате в Перечне последовательностей, полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Настоящая заявка относится в целом к области доставки генов. Более конкретно настоящая заявка относится к пептидным последовательностям, способным направлять аденоассоциированные вирусы (AAV) для нацеливания к тканям или органам, новым рекомбинантным AAV и способам применения указанных AAV для лечения различных заболеваний.

Описание предшествующего уровня техники

[0005] Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV) представляют собой векторы, используемые для переноса генов в условиях *in vivo* для осуществления разных видов генной терапии и облегчения переноса генов, важных для широкого круга фундаментальных научных исследований. Несколько характеристик делают rAAV привлекательными в качестве носителей для доставки генов: (i) они обеспечивают долгосрочную экспрессию трансгена, (ii) они не связаны с каким-либо известным заболеванием человека, (iii) они вызывают относительно слабые иммунные ответы, (iv) они способны к трансдукции различных типов делящихся и не делящихся клеток, и (v) геном rAAV может быть упакован в различные капсиды, или белковые оболочки вируса, которые имеют разные характеристики трансдукции и тропизма в отношении тканей. Виды генной терапии, в которых применяют векторы rAAV, были успешными в клинических исследованиях, включая лечение врожденного амавроза Лебера, гемофилии, связанной с дефицитом фактора IX и дефицитом липопротеинлипазы. Помимо этого генная терапия на основе rAAV была успешной в доклинических моделях при различных заболеваниях, включая синдром Ретта, врожденный боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и спинальную мышечную атрофию. Терапия на основе rAAV также была успешной при доставке нейтрализующих антител для лечения инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ и грипп. rAAV также являются популярными векторами для доставки трансгенов в условиях *in vivo* для нетерапевтических научных исследований, таких как оптогенетические исследования. Однако успешное применение rAAV для лечения

заболеваний и доставки генов в научных исследованиях для многих вариантов применения было ограничено отсутствием серотипов капсида, которые могут обеспечивать эффективную трансдукцию некоторых сложных типов клеток, а также отсутствием серотипов, которые могут обеспечивать эффективное и селективное

нацеливание к желаемому типу клетки/органа после системной доставки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Настоящее изобретение относится к вектору на основе аденоассоциированного вируса (AAV-вектору), содержащему аминокислотную последовательность, которая содержит по меньшей мере 4 смежные аминокислоты в последовательности QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). Аминокислотная последовательность может быть, например, частью

капсидного белка AAV-вектора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) вставлена между

аминокислотами (AA) 588-589 последовательности AAV вектора (SEQ ID NO: 45).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

последовательность QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) вставлена между AA586-592

последовательности AAV вектора (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам

реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность дополнительно содержит по меньшей мере две из аминокислот 587, 588, 589 или 590 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

[0007] Настоящее изобретение также относится к AAV-вектору, содержащему последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$, где

X_1 представляет собой D, A, E, Q, N, G или S;

X_2 представляет собой G, N, S, T, Q или V;

X_3 представляет собой T, S или N;

X_4 представляет собой L или V;

X_5 представляет собой A, S, Q, P или T;

X_6 представляет собой V, T, Q, N, L или M;

X_7 представляет собой P;

X_8 представляет собой F, Y, V, L, C или S;

X_9 представляет собой K, R или S;

X_{10} представляет собой A или N; и

X_{11} представляет собой Q или P, причем указанный AAV-вектор не содержит

аминокислотную последовательность AQT LAVP FKAQ (SEQ ID NO: 1). Согласно

некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот является частью нацеливающего пептида или содержит его.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет

собой D, X_2 представляет собой G, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L,

X_6 представляет собой V или T, X_8 представляет собой F или любую их комбинацию.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет

собой D, X_2 представляет собой G, X_3 представляет собой T, представляет собой L, X_6

представляет собой V или T и X_8 представляет собой F. Согласно некоторым вариантам

реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой D, X_2 представляет собой

G, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L, X_6 представляет собой V или T

и X_8 представляет собой F. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения X_4 представляет собой L, X_5 представляет собой A, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой P, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT или ART. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты X_1X_2 представляют собой AQ, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой P, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_3 представляет собой T и X_4 представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_5 представляет собой A. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой A, X_2 представляет собой Q, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_5X_6X_7$ представляют собой AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ представляют собой AQTLAV и $X_{10}X_{11}$ представляют собой AQ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_7X_8X_9$ представляют собой PFK. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ представляют собой AQTLAVPF. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой KAP, KAP или SNP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот является частью капсидного белка AAV-вектора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот вставлена между AA586-589 последовательности капсидного белка AAV, например, SEQ ID NO: 45, вектора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой одну из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-36.

[0008] Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей один или более AAV-векторов, описанных в настоящем документе, и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

[0009] Настоящее изобретение также относится к пептиду, причем указанный пептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в одной из SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 и 80-93. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пептид конъюгирован с наночастицей, второй молекулой, вирусным капсидным белком или их комбинацией. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пептид является частью AAV. Например, пептид может быть капсидным белком AAV.

[00010] Согласно некоторым вариантам реализации, описанным в настоящем документе, предложена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая все из пептидов, включая нацеливающие пептиды и их фрагменты.

[00011] Настоящее изобретение также относится к капсидному белку, содержащему

еще один нацеливающий пептид, описанный в настоящем документе. Например, капсидный белок может содержать аминокислотную последовательность, которая содержит по меньшей мере 4 смежные аминокислоты из последовательности QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

капсидный белок содержит последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$, где

X_1 представляет собой D, A, E, Q, N, G или S;

X_2 представляет собой G, N, S, T, Q или V;

X_3 представляет собой T, S или N;

X_4 представляет собой L или V;

X_5 представляет собой A, S, Q, P или T;

X_6 представляет собой V, T, Q, N, L или M;

X_7 представляет собой P;

X_8 представляет собой F, Y, V, L, C или S;

X_9 представляет собой K, R или S;

X_{10} представляет собой A или N; и

X_{11} представляет собой Q или P, причем указанный капсидный белок не содержит аминокислотную последовательность AQT LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой D,

X_2 представляет собой G, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L, X_6 представляет собой V либо T или X_8 представляет собой F. Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения X_4 представляет собой L, X_5 представляет собой A, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой P, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11}

представляет собой Q. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT или ART. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты X_1X_2 представляют собой AQ, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой P, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K,

X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_3 представляет собой T и X_4 представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_5 представляет собой A. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1

представляет собой A, X_2 представляет собой Q, X_3 представляет собой T, X_4

представляет собой L, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10}

представляет собой A и X_{11} представляет собой Q. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_5X_6X_7$ представляют собой AVP,

ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ представляют собой AQT LAV и $X_{10}X_{11}$ представляют собой AQ. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения $X_7X_8X_9$ представляют собой PFK. Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ представляют собой AQT LAVPF. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой K AQ, K AP или SNP. Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим капсидные белки и их фрагменты, описанные в настоящем документе.

[00012] Настоящее изобретение также относится к способу доставки нуклеиновой кислоты в целевое окружение в организме субъекта, нуждающегося в этом. Способ, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, включает: обеспечение композиции, содержащей AAV, причем указанный AAV содержит капсидный белок, который содержит последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$, и при этом указанный AAV содержит нуклеиновую кислоту, которая должна быть доставлена в целевое окружение в организме субъекта,

где

X_1 представляет собой D, A, E, Q, N, G или S;

X_2 представляет собой G, N, S, T, Q или V;

X_3 представляет собой T, S или N;

X_4 представляет собой L или V;

X_5 представляет собой A, S, Q, P или T;

X_6 представляет собой V, T, Q, N, L или M;

X_7 представляет собой P;

X_8 представляет собой F, Y, V, L, C или S;

X_9 представляет собой K, R или S;

X_{10} представляет собой A или N; и

X_{11} представляет собой Q или P, причем указанный капсидный белок не содержит аминокислотную последовательность AQT LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1); и введение композиции субъекту. Способ, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, включает: обеспечение композиции, содержащей AAV, причем указанный AAV содержит капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, которая содержит по меньшей мере 4 смежные аминокислоты из последовательности QAVRTSL (SEQ ID NO: 37), и при этом указанный AAV содержит нуклеиновую кислоту, которая должна быть доставлена в целевое окружение в организме субъекта; и введение композиции субъекту. Целевое окружение может, например, являться сердце, нервная система или их комбинация. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевое окружение представляет собой центральную нервную систему, периферическую нервную систему, сердце или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевое окружение представляет собой нейроны, астроциты, кардиомиоциты или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, которая должна быть доставлена в нервную систему, содержит одно или более из: а) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей трофический фактор, фактор роста или растворимый белок; б) кДНК, которая восстанавливает функцию белка у человека или животных, несущих генетическую мутацию (мутации) указанного гена; с) кДНК, которая кодирует белок, который может

быть использован для контроля или изменения активности или состояния клетки; d) кДНК, которая кодирует белок или нуклеиновую кислоту, используемую для оценки состояния клетки; e) кДНК и/или связанную с ней направляющую РНК для модификации генома; f) последовательности для редактирования генома посредством гомологичной рекомбинации; g) последовательности ДНК, кодирующей терапевтическую РНК; h) системы доставки короткой шпилечной РНК (кшРНК) или искусственной микроРНК (миРНК); и i) последовательности ДНК, которая влияет на сплайсинг эндогенного гена. Субъектом, который нуждается в этом, может быть, например, субъект, страдающий или подверженный риску развития одного или более из хронической боли, сердечной недостаточности, сердечной аритмии, атаксии Фридрейха, болезни Хантингтона (БХ), болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП), бокового амиотрофического склероза (БАС), спинальной мышечной атрофии I и II (СМА I и II), атаксии Фридрейха (ФА), спиноцеребеллярной атаксии, лизосомальных болезней накопления, которые поражают клетки в ЦНС. Лизосомальные болезни накопления могут включать, например, болезнь Краббе, болезнь Сандхоффа, болезнь Тея-Сакса, болезнь Гоше (типа I, II или III), болезнь Ниманна-Пика (дефицит NPC1 или NPC2), синдром Гурлера, болезнь Помпе или болезнь Баттена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AAV вводят субъекту посредством внутривенного введения или системного введения. Нервная система может представлять собой, например, центральную нервную систему. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновую кислоту доставляют в ганглии задних корешков спинного мозга, висцеральные органы или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновую кислоту доставляют в астроциты, нейроны или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъектом является взрослое животное.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00013] На ФИГ. 1 представлена схема стратегии диверсификации, которую применяли для получения библиотеки AAV-RNPВ-XXX. Капсид AAV, содержащий 7-членный AAV-RNPВ, был диверсифицирован в положениях 3 смежных аминокислот, обозначенных с помощью XXX, начиная с 2 аминокислот (далее называемых «АА») от вставки 7-членной последовательности и до +9 АА. Каждая библиотека XXX была сдвинута на 2АА. Всего было получено 5 библиотек XXX, чтобы охватить 11 АА. Затем фрагменты ПЦР AAV-RNPВ-XXX собирали в акцепторную плазмиду rAAV-Cap-in-cis, описанную в публикации заявки на патент США 2015/0079038. Полученный геном rAAV применяли для создания библиотеки AAV, которую затем вводили в дозе 1×10^{11} векторных геномов (в.г.)/мышь взрослым мышам GFAP-Cre, Vgat-IRES-Cre и Vglut-IRES-Cre для отбора вариантов, которые трансдуцируют астроциты, ГАМКергические нейроны и глутаматергические нейроны, соответственно. После двух раундов отбора было обнаружено, что многочисленные варианты обогащены последовательностями, выделенными из одной или более линий, несущих Cre. Одна из этих последовательностей, AAV-RNPН (DGTЛАVPFKAQ (SEQ ID NO: 4)), была выбрана для характеристики в качестве индивидуального варианта. Три аминокислоты AAV-RNPН, которые отличались от AAV-RNPВ, представляют собой DGT, и последовательность, отличная от AAV-RNPВ, представляет собой DG.

[00014] На ФИГ. 2 представлены результаты, свидетельствующие о том, что AAV-RNPН более эффективно трансдуцирует нейроны ЦНС, чем AAV-RNPВ. Изображения получали через 2 недели после внутривенной инъекции низкой дозы ($3,3 \times 10^{10}$ в.г./мышь) AAV-CAG-mNeonGreen, упакованного в AAV-RNPВ (верхняя панель) или AAV-RNPН

(нижняя панель). Яркие пятна указывают на экспрессию белка mNeonGreen (и, следовательно, трансдукцию AAV). Изображения показывают более высокий уровень экспрессии AAV-PHP.N в коре головного мозга, мозжечке и зубчатой извилине по сравнению с экспрессией AAV-PHP.B. Следовательно, по сравнению с AAV-PHP.B, AAV-PHP.N обеспечивает более эффективную трансдукцию клеток с морфологией нейронов в нескольких областях мозга. Масштабные метки - 200 мкм.

[00015] На ФИГ. 3А-3D представлены результаты, свидетельствующие об улучшенной трансдукции AAV-PHP.S в сердце и периферических нервах мышей по сравнению с AAV9. На ФИГ. 3А показаны сенсорные волокна, входящие в дорсальную часть

спинного мозга у мышей через 3 недели после внутривенной инъекции 2×10^{12} в.г./мышь ssAAV9:CAG-NLS-GFP или ssAAV-PHP.S:CAG-NLS-GFP (NLS, сигнал ядерной локализации) взрослым мышам. AAV-PHP.S обеспечивает более сильную экспрессию GFP в сенсорных волокнах, чем AAV9, о чем свидетельствует более интенсивное окрашивание образца, обработанного AAV-PHP.S, по сравнению с образцом,

обработанным AAV9. На ФИГ. 3В представлены изображения нативной флуоресценции в результате экспрессии белка GFP, о которой свидетельствуют интенсивные сигналы,

в сердце через 3 недели после внутривенного введения 1×10^{12} векторных геномов (в.г.) /мышь рекомбинантных одноцепочечных (ss)AAV9:CAG-GFP-2A-Luc или ssAAV-PHP.S:CAG-GFP-2A-Luc. На ФИГ. 3С представлено трехмерное проекционное изображение, показывающее нативную флуоресценцию в ганглии заднего корешка спинного мозга

мышы через 4 недели после инъекции смеси 1×10^{12} в.г. ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen и 1×10^{12} в.г. ssAAV-PHP.S:CAG-mTurquoise. Изображения, зарегистрированные на обоих каналах, совмещены на изображении в оттенках серого цвета. На ФИГ. 3D представлены изображения AAV-PHP.S-трансдуцированных клеток в кишечной нервной системе после внутривенной инъекции. Яркие пятна отмечают клетки, трансдуцированные AAV-PHP.S. На изображениях представлены результаты суммирования максимальной интенсивности флуоресценции (MIP) в кишечнике взрослой мыши, которую оценивали через 3 недели

после внутривенного введения 1×10^{12} в.г./мышь ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen. Яркие пятна показывают экспрессию mNeon-Green из вектора AAV-PHP.S (см. левую панель и верхнюю правую панель). Нейроны из мышечно-кишечного сплетения помечены антителом к pgr9.5, и ядра, помеченные DAPI, показаны на нижней правой панели.

[00016] На ФИГ. 4А-4G представлено Cre-зависимое выделение капсидных последовательностей AAV из трансдуцированных клеток-мишеней. На ФИГ. 4А представлен обзор способа отбора CREATE. ПЦР использовали для введения разнообразия (вертикальная полоса полного видимого спектра) во фрагмент гена капсида. Фрагмент клонируют в геном gAAV, несущий оставшийся капсидный ген, и применяют для получения библиотеки вариантов вирусов. Библиотеку вводят Cre-трансгенным животным, и ПЦР применяют для селективного выделения капсидных последовательностей из клеток Cre⁺.

На ФИГ. 4В представлен геном gAAV, gAAV-Cap-in-cis-lox. Cre инвертирует последовательность полиаденилирования (pA), фланкированную сайтами lox71 и lox66. Праймеры для ПЦР (полустрелки) применяют для селективной амплификации Cre-рекомбинированных последовательностей. На ФИГ. 4С представлены продукты ПЦР зависимой от Cre-рекомбинации (верхняя панель) и независимой от Cre-рекомбинации (нижняя панель) амплификации последовательностей библиотеки капсидов, выделенных из двух мышей Cre⁺ или Cre⁻. Стратегии ПЦР-амплификации представлены на схемах (нижняя панель) (подробности см. на ФИГ. 8А-

8В). На ФИГ. 4D представлена схематическая иллюстрация генов AAV во вспомогательной плазмиде AAV, Rep-AAP, и белков, кодируемых геном сар. Стоп-кодоны, вставленные в ген сар, устраняют экспрессию капсидного белка VP1, VP2 и VP3. На ФИГ. 4Е представлены устойчивые к ДНКазе геномы AAV-векторов (в.г.), полученные с помощью разделенного генома AAV2/9 rep-AAP и rAAV-Cap-in-cis-lox (верхняя панель), по сравнению с в.г., полученным с помощью стандартной вспомогательной плазмиды AAV2/9 rep-sar и генома rAAV-UBC-mCherry (средняя панель) или с помощью генома AAV2/9 rep-AAP и rAAV-UBCmCherry (нижняя панель). N=3 независимых исследования на группу; среднее значение $\pm$ станд. откл. среднего; **p<0,01, ***p<0,001; однофакторный дисперсионный анализ и критерий множественных сравнений Тьюки. На ФИГ. 4F представлены результаты клонирования библиотеки 7-членных капсидных белков в вектор rAAV- Δ Cap-in-cis. На ФИГ. 4G представлена модель поверхности AAV9. На ФИГ. 4F-4G показано расположение 7-членной последовательности, вставленной между AA588-589.

[00017] На ФИГ. 5A-5G представлены результаты AAV-PHPB-опосредуемой доставки генов во всей ЦНС после внутривенной инъекции у взрослых мышей. На ФИГ. 5A-5F представлены результаты, полученные при внутривенном введении ssAAV9:CAG-GFP или ssAAV-PHPB:CAG-GFP в дозе 1×10^{12} в.г./мышь или 1×10^{11} в.г./мышь взрослым мышам. На ФИГ. 5A представлены изображения экспрессии GFP (указывающие на экспрессию с геномов ssAAV, доставленных с помощью указанного капсида) у мышей, которым вводили AAV9 (левая панель), и мышей, которым вводили AAV-PHPB (средняя и правая панель), соответственно, через три недели после инъекции. Интенсивные сигналы свидетельствуют об экспрессии GFP. На ФИГ. 5B представлены конфокальные изображения, полученные путем суммирования максимальной интенсивности флуоресценции (MIP) при оптической толщине сечения 50 мкм, указывающие на экспрессию GFP (о которой свидетельствуют интенсивные сигналы) в коре головного мозга или полосатом теле. На ФИГ. 5C показана экспрессия белка GFP (о которой свидетельствуют интенсивные сигналы) в PARS-очищенном поясничном отделе спинного мозга. На ФИГ. 5D показана экспрессия белка GFP (о которой свидетельствуют интенсивные сигналы) в сетчатке (слева: 20 мкм MIP, поперечное сечение, справа: MIP общего препарата). На ФИГ. 5E-5F показана экспрессия белков GFP (о которой свидетельствуют интенсивные сигналы) в трехмерных MIP-изображениях PARS-очищенной ткани из AAV-PHPB-трансдуцированной коры головного мозга и полосатого тела и указанных органов мышей, трансдуцированных AAV9 (верхняя панель) и AAV-PHPB (нижняя панель). На ФИГ. 5F стрелками выделены нервы, которые экспрессируют капсидные белки. Звездочки на изображении поджелудочной железы указывают на островковые клетки, экспрессирующие GFP. Основные отметки в трехмерных проекциях составляют 100 мкм. На ФИГ. 5G представлены результаты исследования биораспределения AAV в указанных областях ЦНС и органах через 25 дней после внутривенной инъекции 1×10^{11} в.г. взрослым мышам. N=3 для AAV-PHPB и N=4 для AAV9; среднее значение $\pm$ станд. откл. среднего; **p<0,01, ***p<0,001, непарные t-тесты, скорректированные для множественных сравнений методом Холма-Сидака. Масштабные метки: 1 мм (ФИГ. 5A и 5C (слева)); 50 мкм (ФИГ. 5B, 5C (справа), 5D и 5E). Основные отметки в трехмерных проекциях на ФИГ. 5C, 5E и 5F составляют 100 мкм.

[00018] На ФИГ. 6A-6I представлены результаты, свидетельствующие о том, что AAV-PHPB более эффективно трансдуцирует несколько типов клеток ЦНС, чем AAV9. На ФИГ. 6A-6E представлены изображения, свидетельствующие о том, что AAV-PHPB

трансдуцирует астроциты, олигодендроциты и нейроны: экспрессия белков GFP через 3 недели после внутривенной инъекции 1×10^{11} (ФИГ. 6А) или 1×10^{12} (ФИГ. 6В-6Е) ssAAV-RNPВ:СAG-GFP взрослым мышам. На ФИГ. 6А представлено МР-изображение окрашивания в гиппокампе. Интенсивные сигналы указывают на экспрессию конструкции AAV-RNPВ и слабые сигналы указывают на экспрессию GFAP. На ФИГ. 6В представлены результаты иммуногистохимического (ИГХ) исследования для определения экспрессии AAV-RNPВ и маркера СС1 в коре головного мозга. Пронумерованные блоки указывают на примеры двойных положительных клеток. Представлены соответствующие одноканальные изображения (справа). Звездочки указывают на клетки без детектируемой экспрессии GFP. На ФИГ. 6С представлены результаты иммуногистохимического исследования для детектирования трансдукции AAV-RNPВ и маркера NeuN в указанной области головного мозга. На ФИГ. 6D представлены МР-изображения флуоресценции GFP, свидетельствующие о трансдукции AAV-RNPВ, и ИГХ-окрашивания ТН в среднем мозге. На ФИГ. 6Е представлены результаты, свидетельствующие о трансдукции AAV-RNPВ, и результаты иммуногистохимического исследования кальбиндина (Calb) в мозжечке. На ФИГ. 6F-6H представлены результаты количественной оценки процента клеток, положительных в отношении трансдукции AAV-RNPВ, в указанной области мозга через 3 недели после инъекции. На ФИГ. 6I показаны AAV-RNPВ-трансдуцированные спинальные моторные нейроны, содержащие холинацетилтрансферазу (ChAT). Яркие пятна свидетельствуют об экспрессии AAV-RNPВ. Более темные пятна характерны для иммуногистохимического окрашивания ChAT. Представлены изображения поперечных сечений целого спинного мозга (левая панель) или МР-изображение вентрального рога (правая панель). Представлен процент ChAT в поперечных сечениях целого спинного мозга (левая панель) или на МР-изображении вентрального рога (правая панель).

Процент ChAT⁺ нейронов, которые экспрессировали AAV-RNPВ в каждой области спинного мозга, представлен $\pm 95\%$ доверительный интервал (ДИ). Для количественной оценки N=5 на группу; среднее значение $\pm$ станд. откл. среднего. Было обнаружено, что все пары средних значений для AAV9 по сравнению с AAV-RNPВ статистически достоверно различаются ($***p < 0,001$), как установлено с помощью непарных t-тестов, скорректированных для множественного сравнения методом Холма-Сидака.

Масштабные метки: 20 мкм (ФИГ. 6А-6В и ФИГ. 6D), 50 мкм (ФИГ. 6С и 6I (правая панель)), 200 мкм (ФИГ. 6Е) и 1 мм (ФИГ. 6I (левая панель)).

[00019] На ФИГ. 7А-7F представлены результаты исследования трансдукции с применением AAV-RNPА астроцитов ЦНС и снижения тропизма в отношении периферических органов. На ФИГ. 7А-7С и 7Е показана экспрессия AAV-RNPА через 3 недели после внутривенной инъекции 3×10^{11} ssAAV9:СAG-GFP или ssAAV-RNPА:СAG-GFP взрослым мышам. На ФИГ. 7А-7В представлены типичные изображения ИГХ для ssAAV9:СAG-GFP и AAV-RNPА:СAG-GFP. На ФИГ. 7С представлены результаты ИГХ-окрашивания белков GFP в гиппокампе. Слабые сигналы характерны для иммуногистохимического окрашивания GFAP в гиппокампе. Пронумерованные вставки указывают на примеры клеток, экспрессирующих белки GFP и GFAP. Соответствующие одноканальные изображения показаны справа. На ФИГ. 7D представлены результаты, полученные у взрослых мышей после внутривенного введения $2,5 \times 10^{11}$ в.г. ssAAV-RNPА:СAG-NLS-GFP. На графиках представлены результаты количественного определения процента клеток Aldhl1 и NeuN, положительных в отношении присутствия NLS-GFP. На ФИГ. 7Е показана экспрессия AAV-RNPА

(интенсивные сигналы) в печени (слабые сигналы характерны для аутофлуоресценции ткани). На ФИГ. 7F показано биораспределение AAV в области ЦНС и периферических органах через 25 дней после внутривенной инъекции 1×10^{11} в.г. взрослым мышам. На ФИГ. 7E-7F, N=4 на группу; среднее значение $\pm$ станд. откл. среднего: $**p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, непарные t-тесты, скорректированные для множественных сравнений методом Холма-Сидака. Масштабные метки: 1 мм (ФИГ. 7A); 100 мкм (ФИГ. 7B); и 50 мкм (ФИГ. 1C).

[00020] На ФИГ. 8A-8B представлены схематические иллюстрации продуктов ПЦР и геном rAAV-Cap-in-cis. На ФИГ. 8A представлена схематическая иллюстрация продуктов ПЦР с 7 аминокислотами (обозначенными в настоящем документе «7AA») рандомизированной последовательности (представленной вертикальным столбиком полного видимого спектра), вставленной после аминокислоты 588. Праймеры, использованные для получения библиотеки, обозначены по имени и с помощью полустрелок. ПЦР-матрицу модифицировали, чтобы устранить природный сайт рестрикции EarI внутри фрагмента гена капсида (xE) (подробности см. в примерах). На ФИГ. 8B представлена схематическая иллюстрация генома rAAV-Cap-in-cis и праймеров, использованных для количественного определения векторных геномов и выделения последовательностей, которые трансдуцировали клетки, экспрессирующие Cre. Выделение на основе ПЦР выполняют в два этапа. Этап 1 обеспечивает выделение последовательности, специфичной для клеток-мишеней, путем селективной амплификации последовательностей Cap из геномов, которые подверглись Cre-зависимой инверсии последовательности полиаденилирования (pA), расположенной в направлении 3'-конца. Для выполнения этапа 1 9CapF использовали в качестве прямого праймера, и праймер CDF использовали в качестве обратного праймера на матрицах, рекомбинированных Cre. На этапе 2 применяли праймеры XF и AR для получения продукта ПЦР, который клонировали в плазмиду rAAV-ΔCap-in-cis (восстановление библиотеки) или в плазмиду AAV2/9 her-cap-trans (характеристика вариантов). В таблице 1 приведены неограничивающие примеры последовательностей праймеров, которые можно применять в ПЦР, проиллюстрированной на ФИГ. 8A-8B.

[00021] На ФИГ. 9A-9B представлены характеристики капсидов и эффективность выработки трех наиболее обогащенных вариантов (т.е. AAV-RHPB, AAV-RHPB2 и AAV-RHPB3) из каждого раунда отбора. На ФИГ. 9A представлено изображение типичных сагиттальных срезов головного мозга мышей, которые оценивали через 2 недели после инъекции $3,3 \times 10^{10}$ в.г./мышь ssAAV-CAG-фарнезилированный mNeonGreen (mNeGreen-f), упакованного в AAV-RHPB или второй или третий наиболее обогащенные варианты, AAV-RHPB2 и AAV-RHPB3. Интенсивные сигналы указывают на экспрессию белков GFP. Данные являются типичными для 2 (AAV-RHPB) и 3 (AAV-RHPB2 и AAV-RHPB3) мышей на группу. На ФИГ. 9B представлено количество устойчивых к ДНКазе в.г., полученных из препаратов отдельных вариантов, выделенных из отборов GFAP-Cre. Данные по выходу приведены как количество очищенных копий векторного генома на 150 мм чашку вырабатывающих клеток; среднее значение $\pm$ станд. откл. среднего. $*p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ и критерий множественных сравнений Тьюки. Количество независимых препаратов для каждого капсида представлено в столбике.

[00022] На ФИГ. 10A-10G представлены изображения, свидетельствующие о том, что AAV-RHPB трансдуцирует несколько типов интернейронов и эндотелиальных клеток, но не трансдуцирует микроглию. На ФИГ. 10A-10D представлены результаты

оценки экспрессии белка GFP у взрослых мышей через 3 недели после введения 1×10^{12} в.г. AAV-PHP.B.CAG-GFP путем инъекции. На типичном изображении представлены результаты ИГХ-окрашивания для выявления экспрессии AAV-PHP.B (ФИГ. 10А-10С) или нативной флуоресценции в результате экспрессии белка GFP (ФИГ. 10D) совместно с ИГХ-окрашиванием указанного антигена и области мозга. На ФИГ. 10Е представлены результаты, полученные у взрослых мышей через 2 недели после введения $3,3 \times 10^{10}$ мкг ssAAV-PHP.B:CAG-mNeGrn-f путем инъекции. Нативная флуоресценция mNeGrn-f колокализована с CD31, экспрессируемым некоторыми эндотелиальными клетками. На ФИГ. 10F-10G представлены результаты оценки, полученные у взрослых мышей через 3 недели после введения 2×10^{12} в.г. ssAAV-PHP.B:CAG-NLS-GFP путем инъекции. Интенсивные сигналы указывают на экспрессию AAV-PHP.B, и слабый сигнал указывает на экспрессию Iba1. Звездочки указывают на клетки, которые экспрессируют указанный антиген, но не имеют детектируемой экспрессии AAV-PHP.B. Парвальбумин (PV), кальбиндин (Calb) и кальретинин (CR). Масштабные метки: 20 мкм (ФИГ. 10А-10D); 50 мкм (ФИГ. 10Е-10F) и 500 мкм (ФИГ. 10G).

[00023] На ФИГ. 11 представлены результаты оценки долгосрочной экспрессии AAV-PHP.B в головном мозге после переноса генов с применением AAV-PHP.B. Взрослым мышам вводили внутривенно указанную дозу ssAAV-CAG-GFP, упакованного в AAV9 или AAV-PHP.B, и нативную флуоресценцию eGFP оценивали через 377 дней. Интенсивные сигналы указывают на экспрессию eGFP. N=1 на вектор/дозу.

[00024] На ФИГ. 12А-12D представлены типичные изображения нативной флуоресценции в результате экспрессии белка GFP и результаты ИГХ-окрашивания для нескольких типов нейронов и глиальных клеток после трансдукции AAV-PHP.B:CAG-NLS-GFP. На ФИГ. 12А-12D представлены результаты оценки, полученные у взрослых мышей через 3 недели после введения 2×10^{12} в.г. ssAAV-PHP.B:CAG-NLS-GFP путем инъекции. На изображениях представлена интенсивность нативной флуоресценции в результате экспрессии белка GFP совместно с ИГХ-окрашиванием указанного антигена в указанной области мозга. На всех панелях стрелки указывают на колокализацию экспрессии GFP с ИГХ-окрашиванием указанного антигена. На ФИГ. 12В-12С представлены одноплоскостные конфокальные изображения. На ФИГ. 12А и 12D представлены МР-изображения. Мозолистое тело (сс), компактная часть черного вещества (SNc), вентральная область покрышки (VTA). Масштабные метки: 50 мкм.

[00025] На ФИГ. 13А-С представлены результаты исследования трансдукции с применением AAV-PHP.A и AAV-PHP.B кортикальных нейронов, происходящих из иПСК человека, и астроцитов в ассоциированных культурах и интактных трехмерных кортикальных культурах. На ФИГ. 13А представлены результаты, свидетельствующие о том, что AAV-PHP.B обеспечивает более эффективную трансдукцию нейронов и астроцитов человека в ассоциированных монослойных культурах. На типичных изображениях показана экспрессия кДНК GFP, доставленной с использованием капсидов AAV9, AAV-PHP.A и AAV-PHP.B, через пять дней после вирусной трансдукции (ssAAV-CAG-NLS-GFP, упакованный в AAV9, AAV-PHP.A или AAV-PHP.B; 1×10^9 в.г./лунку) диссоциированных кортикальных сфероидов, происходящих из иПСК человека, дифференцированных в условиях *in vitro*. Клетки, экспрессирующие белки GFP, колокализованы с астроцитами, окрашенными с использованием иммунной метки для GFAP, или нейронами, окрашенными с использованием иммунной метки для MAP2, как указано белыми стрелками. На ФИГ. 13В представлены результаты количественной

оценки процента GFAP⁺ или MAP2⁺ клеток, инфицированных AAV9, AAV-PHP.A или AAV-PHP.B (n=3 дифференцировки в кортикальные сфероиды двух линий и ПСК человека, полученных от двух субъектов, двухфакторный дисперсионный анализ, критерий множественных сравнений Тьюки, среднее значение $\pm$ станд. откл. среднего).
 5 На ФИГ. 13С представлены результаты, свидетельствующие о том, что AAV9, AAV-PHP.A и AAV-PHP.B трансдуцируют интактные трехмерные кортикальные культуры человека (кортикальные сфероиды, дифференцированные из и ПСК человека). На изображениях криосрезов кортикальных сфероидов, происходящих из и ПСК человека (205 день дифференцировки в условиях *in vitro*), трансдуцированных с применением
 10 ssAAV-CAG-NLS-GFP, упакованного в AAV9, AAV-PHP.A или AAV-PHP.B, показана нативная флуоресценция в результате экспрессии белка GFP совместно с иммунным окрашиванием GFAP и MAP2. Вставки показывают совместное мечение белка GFP с GFAP⁺ астроцитами (голубой) или MAP2⁺ нейронами. Масштабные метки: 40 мкм (ФИГ. 13А); и 100 мкм (ФИГ. 13С).

15 [00026] На ФИГ. 14А-14D представлены капсиды AAV-PHP.B и AAV-PHP.A, локализованные в сосудистой сети мозга после внутривенной инъекции и трансдукции клеток вдоль сосудистой сети через 24 часа после введения. Взрослым мышам вводили 1×10^{11} в.г. ssAAV-CAG-NLS-GFP, упакованного в AAV9, AAV-PHP.A или AAV-PHP.B,
 20 как указано. На ФИГ. 14А-14В представлены типичные изображения иммунного окрашивания капсидов (интенсивное окрашивание) с использованием антитела к VP3 AAV, В1, которое распознает общий внутренний эпитоп в мозжечке (ФИГ. 14А) или полосатом теле (ФИГ. 14В) в мозге мышей, которые получили внутривенную инъекцию за 1 час до фиксации с помощью перфузии сердца. Иммунное окрашивание капсидов
 25 детектировали в мозге всех мышей, получивших инъекцию AAV-PHP.A и AAV-PHP.B, но редко наблюдали в мозге мышей, которые получили аналогичную дозу AAV9. Ядра клеток были помечены DAPI (темное окрашивание). Автофлуоресценцию липофусцина можно отличить от окрашивания капсидов по ее присутствию как на зеленом, так и на красном канале. Вставка на ФИГ. 14А показывает трехмерное MIP-изображение
 30 области, выделенной на изображении AAV-PHP.B. Стрелки указывают на ИГХ-окрашивание капсида; звездочки указывают на просветы сосудов. Данные являются типичными для 2 (без вируса и AAV-PHP.A) или 3 (AAV9 и AAV-PHP.B) мышей на группу. На ФИГ. 14С представлено типичное изображение экспрессии GFP (яркое окрашивание) с DAPI (окрашивание в белый цвет) и CD31 (темное окрашивание) через
 35 24 часа после введения AAV-PHP.B. Стрелки указывают на клетки, экспрессирующие GFP. На ФИГ. 14D представлены результаты оценки количества клеток, экспрессирующих GFP, присутствующих вдоль сосудистой сети в указанных областях мозга. N=3 на группу; среднее значение $\pm$ станд. откл. среднего: AAV-PHP.B по сравнению с AAV9 и AAV-PHP.A, *** $p < 0.001$ для всех областей; AAV9 по сравнению
 40 с AAV-PHP.A, недостоверно; двухфакторный дисперсионный анализ, масштабные метки: 200 мкм (ФИГ. 14А); 50 мкм (ФИГ. 14В-14С); основные метки составляют 50 мкм во вставке с большим увеличением (ФИГ. 14А).

[00027] На ФИГ. 15А-15В представлены результаты оценки экспрессии репортера из трех лучших вариантов, выделенных из мышей GFAP-Cre. На ФИГ. 15А представлены
 45 изображения типичных сагиттальных срезов мозга мышей, которые оценивали через 2 недели после инъекции $3,3 \times 10^{10}$ мкг/мышь ssAAV-CAG-фарнезилированный mNeon-Green (mNeGrn-f), упакованного в AAV-PHP.B или второй или третий наиболее обогащенные варианты, AAV-PHP.B2 и AAV-PHP.B3. Интенсивные сигналы указывают

на экспрессию mNeGrn-f из кДНК, доставленной с помощью трех обогащенных вариантов: AAV-PHPB (левая панель), AAV-PHPB2 (средняя панель) и AAV-PHPB3 (правая панель). На ФИГ. 15В представлены изображения в оттенках серого цвета с большим увеличением (40×) экспрессии NLS-GFP в срезах мозга, которые оценивали

5 через 3 недели после инъекции 2×10^{12} в.г./мышь ssAAV-CAG-NLS-GFP, упакованного в AAV-PHPB, AAV-PHPB2 или AAV-B3.

[00028] На ФИГ. 16 представлены изображения, свидетельствующие об экспрессии репортера из вариантов AAV-PHPB. Яркие пятна указывают на экспрессию репортера из вариантов AAV-PHPB. Одноплоскостные конфокальные изображения участков

10 мозга у мышей оценивали через 2 недели после внутривенной инъекции 1×10^{11} в.г. (всего)/мышь AAV-PHPB или указанного варианта AAV-PHPB. Каждый вариант применяли для упаковки смеси репортеров: ssAAV-CAG-mTurquoise2, mNeonGreen и mKate 2.5. Следует отметить, что mKate2.5, по-видимому, образует агрегаты в некоторых

15 типах клеток, особенно в нейронах и эндотелиальных клетках.

[00029] На ФИГ. 17 представлены изображения, свидетельствующие об экспрессии репортера из вариантов AAV-PHPB. Яркие пятна указывают на экспрессию репортера из вариантов AAV-PHPB. Одноплоскостные конфокальные изображения участков

20 мозга у мышей оценивали через 3 недели после инъекции 3×10^{11} в.г. (всего)/мышь указанного варианта AAV-PHPB. Каждый вариант применяли для упаковки смеси репортеров: ssAAV-CAG-mTurquoise2, mNeonGreen и mRuby 2.

[00030] На ФИГ. 18 представлены изображения, свидетельствующие об экспрессии репортера из вариантов AAV-PHPB. Яркие пятна указывают на экспрессию репортера из вариантов AAV-PHPB. Одноплоскостные конфокальные изображения участков

25 мозга у мышей оценивали через 11 дней после внутривенной инъекции 1×10^{11} в.г. (всего)/мышь указанного варианта AAV-PHPB. Каждый вариант применяли для упаковки смеси репортеров: ssAAV-CAG-mTurquoise2, mNeonGreen и mRuby2.

[00031] На ФИГ. 19А-19С представлены результаты, свидетельствующие о том, что трансдукция ЦНС с применением AAV-PHPB-DGT более эффективна, чем с применением

30 AAV-PHPB, после внутривенного введения взрослым мышам. На ФИГ. 19А представлены изображения цельного мозга (с дорсальной стороны), свидетельствующие об экспрессии ssAAV-CAG-NLS-GFP через 3 недели после в/в введения 1×10^{11} в.г./мышь ssAAV-CAG-NLS-GFP, упакованного в указанный капсид. Интенсивный сигнал,

35 представленный на изображении в оттенках серого цвета, свидетельствует об экспрессии ssAAV-CAG-NLS-GFP. На ФИГ. 19В представлены графики, показывающие долю общего количества ядер (DAPI⁺) в моторной коре (левая панель) или полосатом теле (правая панель), которые экспрессируют GFP. На ФИГ. 19С представлены графики, показывающие среднюю экспрессию ssAAV-CAG-NLS-GFP на GFP⁺ ядро. N=4 животных

40 на группу.

[00032] На ФИГ. 20А-20D представлены результаты оценки трансдукции периферических нервов с применением AAV-PHPB по сравнению с AAV9. На ФИГ. 20А представлены изображения цельного мозга (дорсальная сторона, левая панель, и

45 вентральная сторона, правая панель), свидетельствующие об экспрессии AAV-PHPB через три недели после в/в введения 1×10^{12} в.г./мышь ssAAV-CAG-NLS-GFP, упакованного в указанный капсид. Экспрессия GFP показана в оттенках серого цвета. Следует отметить, что, несмотря на использование ядерно-локализованного GFP, экспрессия GFP достаточно сильна в аксонах периферических нейронов, входящих в

спинной мозг и ствол мозга, чтобы быть видимой на представленных изображениях цельного мозга. На ФИГ. 20В представлено изображение поперечного среза спинного мозга после трансдукции с применением 3×10^{12} в.г. (всего) ssAAV-PHPS:CAG-XFPmix. На ФИГ. 20С представлено трехмерное суммированное изображение нативной флуоресценции в ганглии заднего корешка спинного мозга мыши через 4 недели после инъекции смеси 1×10^{12} в.г. ssAAV-PHPS:CAG-mNeonGreen и 1×10^{12} ssAAV-PHPS:CAGmTurquoise. На ФИГ. 20D представлено изображение AAV-PHPS-трансдуцированных клеток в кишечной нервной системе после внутривенной инъекции. Нативная флуоресценция mNeonGreen (интенсивный сигнал) отмечает клетки, трансдуцированные AAV-PHPS. На изображениях представлены результаты суммирования максимальной интенсивности флуоресценции в кишечнике взрослой мыши, которую оценивали через 3 недели после внутривенного введения 1×10^{12} в.г./мышь ssAAV-PHPS:CAG-mNeonGreen. Нейроны помечены антителом к pgr9.5 (серое окрашивание), и ядра, помеченные DAPI, показаны с помощью темного окрашивания. Справа показаны отдельные каналы. Верхнее правое изображение показывает экспрессию mNeonGreen в кишечной нервной системе, которая свидетельствует о трансдукции вектором AAV-PHPS:CAG-mNeonGreen.

[00033] На ФИГ. 21 показана разработка 7-членного пептида AAV-PHPS и фланкирующих последовательностей. 7-членный пептид PHPS был вставлен между AA588-589 капсида AAV9. Пять библиотек насыщения сайта (XXX_1 - XXX_5) были получены с помощью ПЦР, смешаны в равных количествах и использованы для получения ДНК. Затем ДНК применяли для получения библиотек капсидов AAV.

[00034] На ФИГ. 22А-22В представлены аминокислотные последовательности капсида VP1 AAV-PHPN (ФИГ. 22А) и капсида VP1 AAV-PHPS (ФИГ. 22В). ФИГ. 22А: подчеркнута вставка 7-членного AAV-PHPS, и выделены две аминокислоты, отличные от 7-членного AAV-PHPN. ФИГ. 22В: подчеркнут 7-членный AAV-PHPS.

[00035] На ФИГ. 23А-23Е представлены результаты, свидетельствующие о том, что два капсида AAV, AAV-PHPS и AAV-PHPN, эффективно переносят гены в периферическую и центральную нервную систему, соответственно. Взрослым мышам внутривенно вводили указанную дозу вируса. На ФИГ. 23А представлены изображения, свидетельствующие об экспрессии GFP во всем мозге. На ФИГ. 23В-23С представлены изображения, свидетельствующие об экспрессии GFP в сагиттальном срезе мозга. На ФИГ. 23D-23Е представлены изображения, свидетельствующие об экспрессии GFP в поперечных срезах спинного мозга. Интенсивные сигналы указывают на экспрессию GFP.

[00036] На ФИГ. 24А-24Г представлены результаты, свидетельствующие о том, что AAV-PHPN более эффективно трансдуцирует несколько групп нейронов, чем AAV-PHPN. На ФИГ. 24А-24С представлены изображения нативной флуоресценции GFP в результате экспрессии белка GFP в срезах мозга взрослых мышей, которым путем инъекции вводили AAV-PHPN (вверху) или AAV-PHPN (внизу), в коре головного мозга (ФИГ. 24А), полосатом теле (ФИГ. 24В) и мозжечке (ФИГ. 24С). Интенсивный сигнал указывает на экспрессию GFP. На ФИГ. 24D представлен процент ядер клеток ($DAPI^+$), которые экспрессировали GFP после инъекции AAV-PHPN или AAV-PHPN. На ФИГ. 24Е представлен процент $NeuN^+$ нейронов (кора головного мозга или полосатое тело) или кальбиндин⁺ (Calb) нейронов Пуркинье в мозжечке, которые экспрессируют GFP. На ФИГ. 24F представлен процент $S100b^+$ клеток, которые экспрессируют GFP. На

ФИГ. 24G представлены значения средней интенсивности флуоресценции отдельных GFP⁺ ядер в указанной области мозга. Данные были получены путем вычисления среднего значения интенсивности флуоресценции для каждого ядра. *p<0,05, **p<0,01, непарный t-тест Стьюдента.

[00037] На ФИГ. 25A-25D представлены результаты, свидетельствующие о том, что AAV-PHP.S более эффективно трансдуцирует сенсорные нейроны, чем AAV9. На ФИГ. 25A представлены изображения нативной флуоресценции GFP после трансдукции 1×10¹² в.г. ssAAV-CAG-NLS-GFP, упакованного в AAV9 или AAV-PHP.S. Интенсивный сигнал указывает на экспрессию GFP. На ФИГ. 25B представлен процент PGP9.5⁺ нейронов DRG, которые экспрессируют ядерный GFP. На ФИГ. 25C представлено среднее значение медианы интенсивности флуоресценции GFP⁺ клеток, трансдуцированных указанным вектором. На ФИГ. 25D представлены изображения AAV-PHP.S-трансдуцированных сердечных ганглиев и сердечной мышцы. Интенсивный сигнал свидетельствует об экспрессии AAV-PHP.S. **p<0,01, ****p<0,0001, непарный t-тест Стьюдента.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00038] В приведенном ниже подробном описании делается ссылка на сопровождающие чертежи, которые являются частью данного описания. На чертежах аналогичные символы обычно указывают аналогичные компоненты, если из контекста не следует иное. Иллюстративные варианты реализации, описанные в подробном описании, чертежах и формуле изобретения, не являются ограничивающими. Могут быть использованы другие варианты реализации, и могут быть сделаны другие изменения, не отступая от сущности или объема объекта настоящего изобретения, раскрытого в настоящем документе. Следует понимать, что аспекты настоящего изобретения, описанные в настоящем документе в общих чертах и проиллюстрированные на фигурах, могут быть сгруппированы, заменены, объединены, отделены и сконструированы в самых разных конфигурациях, все из которых явным образом включены в настоящую заявку и являются частью настоящего изобретения.

[00039] Настоящая заявка относится к AAV, способным доставлять нуклеиновые кислоты в целевое окружение, например, клетку, популяцию клеток, ткань, орган или их комбинацию, у субъекта, которого трансдуцируют с применением AAV. Например, AAV можно применять для доставки нуклеиновых кислот в нервную систему, например, в центральную нервную систему (ЦНС) и/или периферическую нервную систему (ПНС) субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AAV можно применять для доставки нуклеиновых кислот в сердце субъекта. Настоящее изобретение также относится к пептидам, способным направлять AAV в целевое окружение (например, нервную систему, сердце или их комбинацию) у субъекта, капсидным белкам AAV, содержащим указанные пептиды, композициям (например, фармацевтическим композициям), содержащим AAV-векторы, имеющие капсидные белки, содержащие указанные пептиды, и последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим указанные пептиды и капсидные белки AAV. Помимо этого настоящее изобретение также относится к способам получения и применения AAV-векторов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AAV-векторы применяют для предотвращения и/или лечения одного или более заболеваний и расстройств, например, заболеваний и расстройств, связанных с нервной системой и/или сердцем.

Определения

[00040] Если не указано иное, технические и научные термины, используемые в

настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. См., например, Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989) Для целей настоящего изобретения следующие термины определены ниже.

[00041] В настоящем документе термин «вектор» может относиться к носителю для переноса или передачи нуклеиновой кислоты. Неограничивающие примеры векторов включают плазмиды и вирусы (например, AAV).

[00042] В настоящем документе термин «конструкция» относится к рекомбинантной нуклеиновой кислоте, которая была получена для экспрессии специфичной нуклеотидной последовательности (ей) или которая должна быть применена при конструировании других рекомбинантных нуклеотидных последовательностей.

[00043] В настоящем документе термин «плазида» относится к нуклеиновой кислоте, которая может быть использована для репликации рекомбинантных последовательностей ДНК в организме-хозяине. Последовательность может представлять собой двухцепочечную ДНК.

[00044] В настоящем документе термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» являются взаимозаменяемыми и относятся к любой нуклеиновой кислоте, независимо от того, состоит она из фосфодиэфирных связей или модифицированных связей, таких как фосфотриэфир, фосфоамидат, силоксан, карбонат, карбоксиметилэфир, ацетамидат, карбамат, тиоэфир, мостиковый фосфоамидат, мостиковый метиленфосфонат, мостиковый фосфоамидат, мостиковый метиленфосфонат, фосфотиоат, метилфосфонат, фосфодитиоат, мостиковый фосфотиоат или султоновые связи и комбинаций указанных связей. Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» также конкретно включают нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличных от пяти природных биологических оснований (аденина, гуанина, тимина, цитозина и урацила).

[00045] В настоящем документе термин аминокислота «X_n» или «В_n» пептидной последовательности из двух или более смежных аминокислот относится к аминокислоте в положении nth (n является положительным целым числом) пептидной последовательности. Например, в пептидной последовательности из 11 смежных аминокислот X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ X₁ представляет собой аминокислоту в положении 1 (т.е. в 1 положении) пептидной последовательности, X₂ представляет собой аминокислоту в положении 2 (т.е. во 2 положении) пептидной последовательности, X₃ представляет собой аминокислоту в положении 3 (т.е. в 3 положении) пептидной последовательности, X₄ представляет собой аминокислоту в положении 4 (т.е. в 4 положении) пептидной последовательности, X₅ представляет собой аминокислоту в положении 5 (т.е. в 5 положении) пептидной последовательности, X₆ представляет собой аминокислоту в положении 6 (т.е. в 6 положении) пептидной последовательности, X₇ представляет собой аминокислоту в положении 7 (т.е., в 7 положении) пептидной последовательности, X₈ представляет собой аминокислоту в положении 8 (т.е. в 8 положении) пептидной последовательности, X₉ представляет собой аминокислоту в положении 9 (т.е. в 9 положении) пептидной последовательности, X₁₀ представляет собой аминокислоту в положении 10 (т.е. в 10 положении) пептидной последовательности и X₁₁ представляет собой аминокислоту в положении 11 (т.е. в 11 положении) пептидной

последовательности. Например, если в пептидной последовательности в положении 9 присутствует А, в положении 10 присутствует G и в положении 11 присутствует Q, описано, что аминокислоты $X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой AGQ. В другом примере, в пептидной последовательности QAB₃B₄TSL B₃ представляет собой аминокислоту в
 5 положении 3 пептидной последовательности, B₄ представляет собой аминокислоту в положении 4 пептидной последовательности.

[00046] Термин «последовательность распознавания рекомбиназы» или «сайт распознавания рекомбиназы» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая распознается рекомбиназой и может служить в качестве субстрата для
 10 рекомбинации, катализируемой указанной рекомбиназой. Последовательность может представлять собой, например, двухцепочечную ДНК.

[00047] Термин «вирусный геном» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая фланкирована цис-действующими последовательностями нуклеиновых кислот, которые опосредуют упаковку нуклеиновой кислоты в вирусный капсид. Для
 15 AAV и парвовирусов, например, известно, что «инвертированные концевые повторы» (ITR), которые расположены на 5'- и 3'-конце вирусного генома, имеют эту функцию и что ITR могут опосредовать упаковку гетерологичных геномов, например, геномов вируса не дикого типа, в вирусный капсид.

[00048] Термин «элемент» относится к отдельной или отличающейся части чего-либо, например, последовательности нуклеиновой кислоты с отдельной функцией в более
 20 длинной последовательности нуклеиновой кислоты. Термины «регуляторный элемент» и «элемент, контролирующий экспрессию» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к молекулам нуклеиновых кислот, которые могут влиять на экспрессию функционально соединенной кодирующей последовательности в
 25 конкретном организме-хозяине. Упомянутые термины широко используются и охватывают все элементы, которые способствуют или регулируют транскрипцию, включая промоторы, элементы ядра, необходимые для основного взаимодействия РНК-полимеразы и факторов транскрипции, элементы, расположенные против хода транскрипции, энхансеры и элементы ответа (см., например, Lewin, "Genes V" (Oxford
 30 University Press, Oxford) p. 847-873). Типичные регуляторные элементы у прокариот включают промоторы, последовательности операторов и сайты связывания рибосом. Регуляторные элементы, которые применяют в эукариотических клетках, могут включать, но не ограничиваются ими, последовательности, контролирующие
 35 транскрипцию и трансляцию, такие как промоторы, энхансеры, сигналы сплайсинга, сигналы полиаденилирования, терминаторы, сигналы разрушения белка, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), последовательности 2A, и т.п., которые обеспечивают и/или регулируют экспрессию кодирующей последовательности и/или выработку кодируемого полипептида в клетке-хозяине.

[00049] В настоящем документе термин «вариант» относится к полинуклеотиду или полипептиду, имеющему последовательность, которая по существу аналогична
 40 эталонному полинуклеотиду или полипептиду. В случае полинуклеотида вариант может содержать делеции, замены, добавления одного или более нуклеотидов на 5'-конце, 3'-конце и/или одном или более внутренних сайтах по сравнению с эталонным полинуклеотидом. Сходства и/или различия последовательностей варианта и эталонного полинуклеотида могут быть детектированы с использованием общепринятых методик,
 45 известных в данной области техники, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и методик гибридизации. Варианты полинуклеотидов также включают

синтетические полинуклеотиды, такие как те, которые получены, например, с использованием сайт-направленного мутагенеза. Обычно последовательность варианта полинуклеотида, включая, но не ограничиваясь этим, ДНК, может быть по меньшей мере приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%,
 5 приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более
 10 идентична последовательности эталонного полинуклеотида, согласно результатам определения с использованием программ сопоставления последовательностей, известных специалистам в данной области техники. В случае полипептида вариант может иметь делеции, замены, добавления одной или более аминокислот по сравнению с эталонным полипептидом. Сходства и/или различия последовательностей варианта и эталонного
 15 полипептида могут быть детектированы с использованием стандартных методик, известных в данной области техники, например, Вестерн-блоттинга. Обычно последовательность варианта полипептида может быть по меньшей мере приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%,
 20 приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более идентична последовательности эталонного полипептида, согласно результатам определения с помощью программ сопоставления
 25 последовательностей, известных специалистам в данной области техники.

[00050] Термин «AAV» или «аденоассоциированный вирус» относится к Dependoparvovirus в роду вирусов Parvoviridae. Например, AAV может представлять собой AAV, происходящий из природного вируса «дикого типа», AAV, происходящий из генома гAAV, упакованного в капсид, полученный из капсидных белков, кодируемых
 30 природным геном сар, и/или генома гAAV, упакованного в капсид, полученный из капсидных белков, кодируемых геном сар неприродного капсида, например, AAV-RHPN и AAV-RHPS. Как раскрыто в настоящем документе, термины «AAV-RHP.eB», «AAV-RHPN» и «AAV-RHP.B-DGT» используются взаимозаменяемо для обозначения варианта AAV, имеющего неприродный капсидный белок, содержащий 11-членную
 35 аминокислотную последовательность DGT LAVP FKAQ (SEQ ID NO: 4, которая называется в настоящем документе последовательность «RHP.eB», «RHPN» «RHP.B-DGT», соответственно).

[00051] Термин «гAAV» относится к «рекомбинантному AAV». Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рекомбинантный AAV имеет геном
 40 AAV, в котором часть или все гены гер и сар заменены гетерологичными последовательностями.

[00052] Термин «вспомогательная плаزمида гер-сар» относится к плазмиде, которая обеспечивает функции вирусных генов гер и сар. Такую плазмиду можно применять для получения AAV из геномов гAAV, не имеющих функциональных
 45 последовательностей гена гер и/или капсида.

[00053] Термин «вектор» определяется как носитель для переноса или передачи нуклеиновой кислоты. Неограничивающие примеры векторов включают плазмиды и вирусы.

[00054] Термин «ген сар» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют капсидные белки, которые образуют или способствуют образованию, капсида, или белковой оболочки, вируса. В случае AAV капсидный белок может представлять собой VP1, VP2 или VP3. Для других парвовирусов названия и нумерация белков капсида могут отличаться.

[00055] Термин «ген гер» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют неструктурные белки (гер78, гер68, гер52 и гер40), необходимые для репликации и выработки вируса.

[00056] «Библиотека» может быть в виде множества линейных нуклеиновых кислот, плазмид, вирусных частиц или вирусных векторов. Библиотека будет включать по меньшей мере две линейные нуклеиновые кислоты.

[00057] В случае если вставленные последовательности нуклеиновых кислот получены случайным образом, N=A, C, G или T; K=G или T; M=A или C.

[00058] Если не указано иное, левый конец любой одноцепочечной полинуклеотидной последовательности, обсуждаемой в настоящем документе, является 5'-концом; левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей называется 5'-направлением.

[00059] В настоящем документе термин «природный» относится к материалам, которые встречаются в природе, или к форме материалов, которая встречается в природе.

[00060] Стандартные методики могут быть использованы для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования и трансформации тканей (например, электропорации, липофекции). Ферментативные реакции и методики очистки могут быть выполнены в соответствии с техническими описаниями изготовителя или как общепринято в данной области техники, или как описано в настоящем документе. Вышеупомянутые методики и процедуры обычно могут быть выполнены в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, руководство Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), которое включено в настоящий документ посредством ссылки для любых целей. Если не предоставлены конкретные определения, номенклатура, а также лабораторные процедуры и методики, используемые в отношении способов аналитической химии, синтетической органической химии и лекарственной и фармацевтической химии, описанные в настоящем документе, хорошо известны и обычно используются в данной области техники. Стандартные методики могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического препарата, состава и доставки, а также для лечения пациентов.

[00061] В настоящем документе термин «субъект» относится к животному, которое является объектом лечения, наблюдения или эксперимента. «Животное» включает холоднокровных и теплокровных позвоночных и беспозвоночных, таких как рыбы, моллюски, рептилии и, в частности, млекопитающие. В настоящем документе термин «млекопитающее» относится к индивиду, принадлежащему к классу Mammalia, и включает, но не ограничивается ими, человека, домашних и сельскохозяйственных животных, зоопарковых животных, спортивных и домашних животных.

Неограничивающие примеры млекопитающих включают мышей; крыс; кроликов; морских свинок; собак; кошек; овец; коз; коров; лошадей; приматов, таких как обезьяны, шимпанзе и человекообразные обезьяны, и, в частности, человека. Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения млекопитающее является человеком. Однако согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения млекопитающее не является человеком.

[00062] В настоящем документе термин «лечение» относится к вмешательству, 5
 сделанному в ответ на заболевание, нарушение или физиологическое состояние, проявляемое пациентом, особенно пациентом, страдающим одним или более 10
 заболеваниями, связанными с серотонином. Цель лечения может включать, но не ограничивается ими, одно или более из ослабления или предотвращения симптомов, замедления или остановки прогрессирования или ухудшения заболевания, расстройства 15
 или состояния и ремиссию заболевания, расстройства или состояния. Термин «лечить» и «лечение» включает, например, терапевтическое лечение, виды профилактического лечения и способы применения, которые приводят к снижению риска возникновения у субъекта расстройства или другого фактора риска. Лечение не требует полного 20
 излечения расстройства и включает варианты, в которых симптомы или первопричинные факторы риска уменьшаются. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения «лечение» относится как к терапевтическому лечению, так и к 25
 профилактическим или превентивным мерам. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже поражен заболеванием или расстройством, или имеет нежелательное физиологическое состояние, а также тех, у кого необходимо предотвратить развитие 30
 заболевания или расстройства, или нежелательного физиологического состояния. Например, в некоторых вариантах лечение может повышать или понижать уровень серотонина у субъекта, тем самым снижая, облегчая или устраняя симптом (симптомы) заболевания (заболеваний). В настоящем документе термин «предотвращение» относится к любой активности, которая уменьшает нагрузку на индивидуума, у которого позднее 35
 проявляются такие симптомы заболевания, связанного с серотонином. Это может происходить на уровнях первичной, вторичной и/или третичной профилактики, при этом: а) первичная профилактика предотвращает развитие симптомов/расстройства/состояния; б) виды вторичной профилактической активности направлены на ранние 40
 стадии лечения состояния/расстройства/симптома, увеличивая тем самым возможности для вмешательства для предотвращения прогрессирования состояния/расстройства/симптома и появления симптомов; и с) третичная профилактика снижает негативное 45
 влияние уже присутствующего состояния/расстройства/симптома, например, путем восстановления функции и/или снижая тяжесть любого состояния/расстройства/симптома или связанных с ними осложнений. Термин «предотвращать» не требует 100% устранения возможности явления. Этот термин скорее означает, что вероятность возникновения явления была снижена в присутствии соединения или способа.

[00063] В настоящем документе термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для осуществления благоприятных или желаемых биологических и/или клинических результатов.

[00064] «Фармацевтически приемлемые» носители представляют собой те, которые 40
 нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергнутого их воздействию в применяемых дозах и концентрациях. «Фармацевтически приемлемые» носители могут представлять собой, но не ограничиваются ими, органические или неорганические твердые или жидкие вспомогательные вещества, которые являются подходящими для 45
 выбранного способа применения, такого как пероральное введение или инъекция, и могут быть введены в форме стандартного фармацевтического препарата, например, в твердой форме, такой как таблетки, гранулы, порошки, капсулы, и жидкой форме, такой как раствор, эмульсия, суспензия и тому подобное. Часто физиологически

приемлемый носитель представляет собой водный раствор с контролируемым рН, такой как фосфатный буфер или цитратный буфер. Физиологически приемлемый носитель также может содержать один или более из следующих агентов: антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, низкомолекулярные (менее приблизительно 10
 5 остатков) полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, сахарные спирты, такие как маннит или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, и неионные поверхностно-активные
 10 вещества, такие как твин™, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и плуроновые кислоты™. К носителям также могут быть добавлены вспомогательные агенты, стабилизатор, эмульгатор, смазывающий агент, связывающий агент, регулятор рН или вещество для доведения рН, изотонический агент и другие обычные добавки.

Нацеливающие последовательности

15 [00065] Настоящее изобретение относится к нацеливающим пептидам, способным направлять AAV (например, направлять AAV для доставки одной или более нуклеиновых кислот) в целевое окружение в организме субъекта. Целевым окружением может, например, являться клетка, популяция клеток, одна или более тканей, один или более органов или их комбинация у субъекта. Согласно некоторым вариантам
 20 реализации настоящего изобретения целевое окружение представляет собой центральную нервную систему (ЦНС). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевое окружение представляет собой периферическую нервную систему (ПНС). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевое окружение представляет собой сердце. Согласно некоторым вариантам реализации
 25 настоящего изобретения нацеливающий пептид способен направлять AAV в или преимущественно в ЦНС субъекта (называемый в настоящем документе «пептид, нацеливающий к ЦНС»). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид способен направлять AAV в или преимущественно в ПНС субъекта (называемый в настоящем документе «пептид, нацеливающий к ПНС»).
 30 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид способен направлять AAV в или преимущественно в сердце субъекта (называемый в настоящем документе «пептид, нацеливающий к сердцу»). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид представляет собой пептид, нацеливающий к ЦНС. Согласно некоторым вариантам реализации
 35 настоящего изобретения нацеливающий пептид представляет собой пептид, нацеливающий к ПНС. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид представляет собой пептид, нацеливающий к сердцу. Например, пептид, нацеливающий к ЦНС, может, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, направлять AAV для доставки нуклеиновых кислот
 40 в нейроны, глию, эндотелиальные клетки, астроциты, клетки Пуркинье мозжечка или их комбинацию в ЦНС. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид способен направлять AAV для доставки нуклеиновой кислоты в ЦНС, сердце (например, кардиомиоциты в сердце), периферические нервы или их комбинацию у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего
 45 изобретения субъект является взрослым, например, является субъектом в возрасте трех лет и старше.

[00066] Нацеливающий пептид (например, пептид, нацеливающий к ЦНС, пептид, нацеливающий к ПНС, и пептид, нацеливающий к сердцу) может иметь различную

длину. Например, нацеливающий пептид может содержать или содержит по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, пятнадцать, восемнадцать, двадцать, двадцать пять, тридцать аминокислот или любое количество аминокислот в пределах указанного диапазона. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид содержит или содержит приблизительно семь аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид содержит или содержит приблизительно одиннадцать аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид содержит или содержит приблизительно от семи до одиннадцати аминокислот.

[00067] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид содержит или состоит из последовательности из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$, где

X_1 представляет собой D, A, E, Q, N, G или S;

X_2 представляет собой G, N, S, T, Q или V;

X_3 представляет собой T, S или N;

X_4 представляет собой L или V;

X_5 представляет собой A, S, Q, P или T;

X_6 представляет собой V, T, Q, N, L или M;

X_7 представляет собой P;

X_8 представляет собой F, Y, V, L, C или S;

X_9 представляет собой K, R или S; и

каждый из X_{10} и X_{11} независимо представляет собой любую аминокислоту.

[00068] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид не является или не содержит аминокислотную последовательность AQTLPVFPKQAQ (SEQ ID NO: 1). Согласно некоторым вариантам реализации нацеливающего пептида X_{10} и X_{11} могут независимо представлять собой любые аминокислоты, например, любую из стандартных аминокислот. В настоящем документе стандартные аминокислоты включают аланин (сокращенно обозначаемый «Ala» или «A»), аргинин (сокращенно обозначаемый «Arg» или «R»), аспарагин (сокращенно обозначаемый «Asn» или «N»), аспарагиновую кислоту (сокращенно обозначаемую «Asp» или «D»), цистеин (сокращенно обозначаемый «Cys» или «C»), глутаминовую кислоту (сокращенно обозначаемую «Glu» или «E»), глутамин (сокращенно обозначаемый «Gln» или «Q»), глицин (сокращенно обозначаемый «Gly» или «G»), гистидин (сокращенно обозначаемый «His» или «H»), изолейцин (сокращенно обозначаемый «Ile» или «I»), лейцин (сокращенно обозначаемый «Leu» или «L»), лизин (сокращенно обозначаемый «Lys» или «K»), метионин (сокращенно обозначаемый «Met» или «M»), фенилаланин (сокращенно обозначаемый «Phe» или «F»), пролин (сокращенно обозначаемый «Pro» или «P»), серин (сокращенно обозначаемый «Ser» или «S»), треонин (сокращенно обозначаемый «Thr» или «T»), триптофан (сокращенно обозначаемый «Trp» или «W»), тирозин (сокращенно обозначаемый «Tyr» или «Y»), валин (сокращенно обозначаемый «Val» или «V»). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_{10} представляет собой A или N. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_{11} представляет собой Q или P. X_{10} и X_{11} могут представлять собой одинаковые или различные аминокислоты.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой D. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_2 представляет собой G. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_3 представляет собой T. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_4 представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_6 представляет собой V или T. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_8 представляет собой F.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 80). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_1X_2X_3$ представляет собой DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT или ART. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X_1X_2 представляет собой AQ и аминокислоты $X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой VPFKAQ (SEQ ID NO: 81). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_3 представляет собой T и X_4 представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_5 представляет собой A. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X_1X_2 представляет собой AQ, аминокислотная последовательность X_3X_4 представляет собой TL, и аминокислотная последовательность $X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой FKAQ (SEQ ID NO: 82). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_5X_6X_7$ представляет собой AVP, ATP, AQP, QQP, PQR, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ представляет собой AQTLAV (SEQ ID NO: 83), и аминокислотная последовательность $X_{10}X_{11}$ представляет собой AQ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты $X_7X_8X_9$ представляют собой PFK. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ представляет собой AQTLAVPF (SEQ ID NO: 84). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой KAP или SNP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой DGTLATPFKXX (X может быть любой аминокислотой, SEQ ID NO: 68). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой GGTLATPFKAQ (SEQ ID NO: 10). Различные комбинации вариантов реализации, описанных в настоящем документе, включены в объем настоящего изобретения. Например, если X_{10} представляет собой A, X_{11} может представлять собой Q или P; и если X_1 представляет собой D, X_2 может быть любой аминокислотой из G, N, S, T и V. В качестве другого примера, если X_3 представляет собой T и X_4 представляет собой L, X_5 может представлять собой A.

[00069] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_4 , X_5 ,

X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀ и X₁₁ представляют собой L, A, V, P, F, K, A и Q, соответственно; и X₃ представляет собой T, S или N. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предпочтительно X₃ представляет собой T. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X₁X₂X₃ представляет собой AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT или ART.

[00070] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₁ представляет собой A и X₂ представляет Q; X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀ и X₁₁ представляют собой V, P, F, K, A, Q, соответственно; и X₃ представляет собой T и X₄ представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X₃X₄X₅ представляет собой TLA.

[00071] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, X₃ представляет собой T, X₄ представляет собой L, X₈ представляет собой F, X₉ представляет собой K, X₁₀ представляет собой A и X₁₁ представляет собой Q, и аминокислотная последовательность X₅X₆X₇ представляет собой AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP.

[00072] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой AQT LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1).

[00073] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, X₃ представляет собой T, X₄ представляет собой L, X₅ представляет собой A, X₆ представляет собой V, X₇ представляет собой P и X₈ представляет собой F, и аминокислотная последовательность X₉X₁₀X₁₁ представляет собой KAQ, KAP или SNP.

[00074] Нацеливающий пептид также может содержать или состоит из по меньшей мере 4 смежных аминокислот любого из нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе, например, нацеливающего пептида, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1-44, 48-53 и 65-68. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид содержит или состоит из 4, 5 или 6 смежных аминокислот одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 37-44 и 65-68. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид содержит или состоит из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-36.

[00075] Нацеливающий пептид также может содержать или состоит из по меньшей мере 4 смежных аминокислот последовательности QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид содержит или состоит из 4, 5 или 6 смежных аминокислот последовательности QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). Например, нацеливающий пептид может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, выбранной из QAVR (SEQ ID NO: 85), AVRT (SEQ ID NO: 86), VRTS (SEQ ID NO: 87), RTSL (SEQ ID NO: 88), QAVRT (SEQ ID NO: 89), AVRTS (SEQ ID NO: 90), VRTSL (SEQ ID NO: 91), QAVRTS (SEQ ID NO: 92) и AVRTSL (SEQ ID NO: 93). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

нацеливающий пептид также может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, которая имеет одно или два несоответствия с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 37. Например, нацеливающий пептид может содержать аминокислотную последовательность или состоять из аминокислотной

последовательности QAB₃B₄TSL, где B₃ и B₄ могут независимо представлять собой любую из стандартных аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения B₃ не является V, B₄ не является R, или и то, и другое. В качестве еще одного примера, нацеливающий пептид может содержать или состоять из аминокислотной последовательности QAVRB₅SL, где B₅ может представлять собой любую из стандартных аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения B₅ не является T.

[00076] Нацеливающий пептид, описанный в настоящем документе, может представлять собой отдельный пептид, или может быть конъюгирован или являться частью наночастицы, второй молекулы, вирусного капсидного белка или их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид вставлен между аминокислотами 588 и 589 последовательности капсидного белка AAV9 (SEQ ID NO: 45).

[00077] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид содержит или состоит из четырех или более смежных аминокислот одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53 и 65-68. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пептид, нацеливающий к ЦНС, содержит или состоит из 4, 5 или 6 аминокислот любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53 и 65-68. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 2 или меньше аминокислот могут быть заменены любой аминокислотой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53 и 65-68. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения изменение представляет собой консервативное изменение (в любой из нацеливающих последовательностей согласно настоящему изобретению). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения изменение представляет собой делецию или вставку одной или двух аминокислот (в любой из нацеливающих последовательностей согласно настоящему изобретению). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нацеливающего пептида может быть по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентична одной из нацеливающих последовательностей согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид может отличаться от одной из нацеливающих последовательностей, раскрытых в настоящем документе, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более аминокислотами.

[00078] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид содержит, состоит или состоит по существу из любой одной или более из вышеуказанных последовательностей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид вводят в более длинный пептид, описанный в настоящем документе. В таблице 1 приведены неограничивающие примеры нацеливающих пептидов.

Таблица 1. Типичные примеры нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе (X может быть любой из стандартных аминокислот)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Нацеливающие пептиды	SEQ ID NO.
AQTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 1
AQSVSKPFLAQ	SEQ ID NO: 2
DGTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 3
ESTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 4
ESTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 5
GGTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 6
AQTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 7
ATTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 8
DGTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 9
GGTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 10
SGSLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 11
AQTLAQPFKAQ	SEQ ID NO: 12
AQTLQQPFKAQ	SEQ ID NO: 13
AQTLSPPFKAQ	SEQ ID NO: 14
AQTLAVPFSNP	SEQ ID NO: 15
QGTAVPFKAQ	SEQ ID NO: 16
NQTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 17
EGSLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 18
SGNLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 19
EGTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 20
DSTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 21
AVTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 22
AQTLSTPFKAQ	SEQ ID NO: 23
AQTLPPPFKAQ	SEQ ID NO: 24
AQTLSPPFKAQ	SEQ ID NO: 25
AQTLQLPFKAQ	SEQ ID NO: 26
AQTLTMPFKAQ	SEQ ID NO: 27
AQTLTPPFKAQ	SEQ ID NO: 28
AQYTLSPGWAQ	SEQ ID NO: 29
AQMNAATKNVAQ	SEQ ID NO: 30
AQVSGGHSAQ	SEQ ID NO: 31
AQTLPPPFKAQ	SEQ ID NO: 32
AQTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 33
AQTLTMPFKAQ	SEQ ID NO: 34
AQTLTAPFKAQ	SEQ ID NO: 35
AQTLSPPFKAQ	SEQ ID NO: 36

	QAVRTSL	SEQ ID NO: 37
	YTLSQGW	SEQ ID NO: 38
5	LAKERLS	SEQ ID NO: 39
	LAKERLS	SEQ ID NO: 40
	SVSKPFL	SEQ ID NO: 41
	FTLTTPK	SEQ ID NO: 42
10	MNSTKNV	SEQ ID NO: 43
	VSGGHHS	SEQ ID NO: 44
	SAQTLAVPFKAQAQ	SEQ ID NO: 48
	SXXXLAVPFKAQAQ	SEQ ID NO: 49
15	SAQXXXVPFKAQAQ	SEQ ID NO: 50
	SAQTLXXXFKAQAQ	SEQ ID NO: 51
	SAQTLAVXXXAQAQ	SEQ ID NO: 52
	SAQTLAVPFXXXAQAQ	SEQ ID NO: 53

[00079] Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, которые кодируют один или более нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе.

[00080] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид является частью AAV, например, частью капсидного белка AAV (SEQ ID NO: 45). Настоящее изобретение относится к капсидным белкам AAV, содержащим один или более нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе. Например, капсидный белок AAV может содержать часть нацеливающего пептида, содержащую по меньшей мере 4 смежные аминокислоты из последовательности QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV содержит часть нацеливающего пептида, содержащую или состоящую из 4, 5 или 6 смежных аминокислот из последовательности QAVRTSL (SEQ ID NO: 37).

[00081] Настоящее изобретение также относится к капсидным белкам AAV, содержащим часть нацеливающего пептида, которая содержит последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$, где

X_1 представляет собой D, A, E, Q, N, G или S;

X_2 представляет собой G, N, S, T, Q или V;

X_3 представляет собой T, S или N;

X_4 представляет собой L или V;

X_5 представляет собой A, S, Q, P или T;

X_6 представляет собой V, T, Q, N, L или M;

X_7 представляет собой P;

X_8 представляет собой F, Y, V, L, C или S;

X_9 представляет собой K, R или S; и

каждый из X_{10} и X_{11} независимо представляет собой любую аминокислоту.

[00082] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

нацеливающий пептид не является или не содержит аминокислотную последовательность AQTЛАVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV не содержит аминокислотную последовательность AQTЛАVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). Как описано в настоящем документе, X₁₀ и X₁₁ могут

5 независимо представлять собой любые аминокислоты, например, любую из стандартных аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₁₀ представляет собой A или N. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₁₁ представляет собой Q или P. Согласно некоторым вариантам

10 реализации настоящего изобретения X₁ представляет собой D. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₂ представляет собой G. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₃ представляет собой T. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₄ представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₆

15 представляет собой V или T. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₈ представляет собой F. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ представляет собой LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 80). Согласно некоторым вариантам

20 реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X₁X₂X₃ представляет собой DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT или ART. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q и аминокислотная последовательность

25 X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ представляет собой VPFKAQ (SEQ ID NO: 81). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₃ представляет собой T и X₄ представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₅ представляет собой A. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, X₃

30 представляет собой T, X₄ представляет собой L, и аминокислотная последовательность X₈X₉X₁₀X₁₁ представляет собой FKAQ (SEQ ID NO: 82). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X₅X₆X₇ представляет собой AVP, ATP, AQP, QQP, PQR, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP.

35 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆ представляет собой AQTЛАV (SEQ ID NO: 83), X₁₀ представляет собой A и X₁₁ представляет собой Q. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X₇X₈X₉

40 представляет собой PFK. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ представляет собой AQTЛАVPF (SEQ ID NO: 84). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность X₉X₁₀X₁₁ представляет собой KAQ, KAP или SNP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот

45 X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ представляет собой DGTЛАTPFKXX (X может быть любой аминокислотой, SEQ ID NO: 68). Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой GGTLATPFGKAQ (SEQ ID NO: 10).

Различные комбинации вариантов реализации, описанных в настоящем документе, включены в объем настоящего изобретения. Например, если X_{10} представляет собой A, X_{11} может представлять собой Q или P; и если X_1 представляет собой D, X_2 может представлять собой любую из G, N, S, T и V. В качестве другого примера, если X_3 представляет собой T и X_4 представляет собой L, X_5 может представлять собой A.

[00083] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} и X_{11} представляют собой L, A, V, P, F, K, A и Q, соответственно; и X_3 представляет собой T, S или N. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предпочтительно X_3 представляет собой T. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_1X_2X_3$ представляет собой AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT или ART.

[00084] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой A и X_2 представляет собой Q; X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} и X_{11} представляют собой V, P, F, K, A, Q, соответственно, и X_3 представляет собой T и X_4 представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_3X_4X_5$ представляет собой TLA.

[00085] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой A, X_2 представляет собой Q, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q, и аминокислотная последовательность $X_5X_6X_7$ представляет собой AVP, ATP, AQP, QQP, PQR, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP.

[00086] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой AQTLAVPFGKAQ (SEQ ID NO: 1).

[00087] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой A, X_2 представляет собой Q, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L, X_5 представляет собой A, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой P и X_8 представляет собой F, и аминокислотная последовательность $X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой KAQ, KAP или SNP.

[00088] Часть нацеливающего пептида капсидного белка может содержать или состоять из последовательности любого из нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе, или по меньшей мере 4 смежных аминокислот любого из нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV содержит часть нацеливающего пептида, которая содержит или состоит из по меньшей мере 4 смежных аминокислот любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53 и 65-68. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV содержит часть нацеливающего пептида, которая содержит или состоит из 4, 5 или 6 смежных аминокислот из последовательностей, представленных в SEQ ID

NO: 37-44 и 65-68. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV содержит часть нацеливающего пептида, которая содержит или состоит из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-36.

5 [00089] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид является частью последовательности капсидного белка AAV9, представленной в SEQ ID NO: 45. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид может быть соединен с любой молекулой, которая должна быть нацелена желаемым образом. Согласно некоторым
10 вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид может быть соединен или конъюгирован, но не ограничиваясь перечисленными, с рекомбинантным белком, антителом, клеткой, диагностическим агентом, терапевтическим агентом, наномолекулой или их комбинацией. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок содержит или состоит из последовательности
15 SEQ ID NO: 46 или SEQ ID NO: 47.

[00090] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид может быть вставлен в любой желаемый участок белка. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид может быть вставлен в капсидный белок. Согласно некоторым вариантам реализации
20 настоящего изобретения нацеливающий пептид вставлен на поверхность желаемого белка. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид вставлен в первичную последовательность белка. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид соединен с белком. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
25 нацеливающий пептид ковалентно соединен с белком. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид вставлен в неструктурированную петлю желаемого белка. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения неструктурированная петля может быть идентифицирована с помощью структурной модели белка.

30 [00091] Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, которые кодируют один или более капсидных белков AAV, описанных в настоящем документе.

Аденоассоциированные вирусы (AAV) и рекомбинантные AAV

[00092] Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой парвовирус
35 дефицитный по репликации, одноцепочечный ДНК-геном которого составляет приблизительно 4,7 т.п.н., включая 145 нуклеотидов инвертированного концевового повтора (ITR). ITR участвуют в интеграции ДНК AAV в геном клетки-хозяина. Когда AAV инфицирует клетку-хозяина вирусный геном интегрируется в хромосому хозяина, что приводит к скрытой инфекции клетки. В природной системе вспомогательный вирус
40 (например, аденовирус или герпесвирус) обеспечивает гены, которые делают возможной выработку вируса AAV в инфицированной клетке. В случае аденовируса гены E1A, E1B, E2A, E4 и VA обеспечивают вспомогательные функции. При инфицировании вспомогательным вирусом AAV-провирус восстанавливается и амплифицируется, что приводит к выработке обоих вирусов, AAV и аденовируса. В случае рекомбинантных
45 AAV-векторов, не имеющих генов Rep и/или Cap, AAV может быть не способен к интеграции.

[00093] Настоящее изобретение относится к векторам AAV, которые содержат кодирующие области одного или более представляющих интерес белков. AAV-вектор,

может содержать 5'-концевой инвертированный концевой повтор (ITR) из AAV, 3'-концевой ITR AAV, промотор и сайт рестрикции, расположенный в 3'-направлении относительно промотора, чтобы обеспечить вставку полинуклеотида, кодирующего один или более представляющих интерес белков, причем промотор и сайт рестрикции
 5 расположены в 3'-направлении относительно 5'-ITR AAV и в 5'-направлении относительно 3'-ITR AAV. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AAV-вектор содержат посттранскрипционный регуляторный элемент, расположенный в 3'-направлении относительно сайта рестрикции, и в 5'-направлении относительно 3'-ITR AAV. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего
 10 изобретения AAV-векторы, описанные в настоящем документе, можно применять в качестве AAV-векторов для переноса, несущих трансген, кодирующий представляющий интерес белок, для выработки рекомбинантных AAV, которые могут экспрессировать представляющий интерес белок в клетке-хозяине.

[00094] Настоящее изобретение относится к геномам rAAV. Геном может, например,
 15 содержать по меньшей мере один инвертированный концевой повтор, сконструированный для обеспечения упаковки в вектор, и ген сар. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения геном может дополнительно содержать последовательность в гене гер, необходимую для экспрессии и сплайсинга гена сар. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения геном может
 20 дополнительно содержать последовательность, способную экспрессировать VP3. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения единственным белком, который экспрессируется, является VP3 (самый маленький из структурных белков капсида, который составляет большую часть собранного капсида - собранный капсид состоит из 60 звеньев белков VP, ~50 из которых представляют собой VP3).
 25 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения экспрессия VP3 по отдельности является достаточной, чтобы обеспечить надлежащий способ скрининга.

[00095] Получение вирусного вектора можно осуществлять с использованием любых подходящих методик генной инженерии, хорошо известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, стандартные методики расщепления
 30 рестрикционными эндонуклеазами, лигирования, трансформации, очистки плазмиды и секвенирования ДНК, например, как описано в Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)).

[00096] Вирусный вектор может содержать последовательности из генома любого известного организма. Последовательности могут быть встроены в их нативной форме
 35 или могут быть модифицированы любым способом для получения желаемой активности. Например, последовательности могут содержать вставки, делеции или замены.

[00097] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вирусные векторы могут содержать дополнительные последовательности, которые делают векторы пригодными для репликации и интеграции у эукариот. Согласно другим
 40 вариантам реализации настоящего изобретения вирусные векторы, описанные в настоящем документе, могут включать элемент для переноса, который делает векторы пригодными для репликации и интеграции как у прокариот, так и у эукариот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вирусные векторы могут содержать дополнительные последовательности инициации транскрипции и трансляции,
 45 такие как промоторы и энхансеры; и дополнительные терминаторы транскрипции и трансляции, такие как сигналы полиаденилирования. Различные регуляторные элементы, которые могут быть включены в AAV-вектор, были подробно описаны в публикации патента США 2012/0232133, которая полностью включена в настоящий документ

посредством ссылки.

[00098] Настоящее изобретение относится к AAV-векторам, которые содержат нацеливающие пептиды, способные направлять AAV в целевое окружение (например, ЦНС, ПНС и сердце) у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающий пептид является частью капсидного белка AAV-вектора. AAV-вектор может, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, содержать белок, содержащий по меньшей мере 4 смежные аминокислоты из последовательности QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсид AAV может содержать аминокислотную последовательность, которая содержит по меньшей мере 4 смежные аминокислоты из последовательности QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность является частью капсидного белка AAV-вектора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) вставлена между AA588-589 последовательности AAV вектора (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) вставлена между AA586-592 последовательности AAV вектора (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) дополнительно содержит по меньшей мере две из аминокислот 587, 588, 589 и 590 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45.

[00099] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AAV-вектор, например, капсидный белок AAV-вектора, содержит последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$, где

X_1 представляет собой D, A, E, Q, N, G или S;

X_2 представляет собой G, N, S, T, Q или V;

X_3 представляет собой T, S или N;

X_4 представляет собой L или V;

X_5 представляет собой A, S, Q, P или T;

X_6 представляет собой V, T, Q, N, L или M;

X_7 представляет собой P;

X_8 представляет собой F, Y, V, L, C или S;

X_9 представляет собой K, R или S; и

каждый из X_{10} и X_{11} независимо представляет собой любую аминокислоту.

[000100] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот не является или не содержит аминокислотную последовательность AQTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок не содержит аминокислотную последовательность AQTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). Как описано в настоящем документе, X_{10} и X_{11} могут независимо представлять собой любые аминокислоты, например, любую из стандартных аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_{10} представляет собой A или N. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_{11} представляет собой Q или P. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой D. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения X_2 представляет собой G. Согласно некоторым вариантам реализации
 настоящего изобретения X_3 представляет собой T. Согласно некоторым вариантам
 реализации настоящего изобретения X_4 представляет собой L. Согласно некоторым
 5 вариантам реализации настоящего изобретения X_6 представляет собой V или T. Согласно
 некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_8 представляет собой F.
 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислоты
 $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 80). Согласно
 некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная
 10 последовательность $X_1X_2X_3$ представляет собой DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT,
 SGS, SGN, ATT, AVT или ART. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего
 изобретения X_1 представляет собой A, X_2 представляет собой Q и аминокислотная
 последовательность $X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой VPFKAQ. Согласно
 15 некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_3 представляет собой T
 и X_4 представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего
 изобретения X_5 представляет собой A. Согласно некоторым вариантам реализации
 настоящего изобретения X_1 представляет собой A, X_2 представляет собой Q, X_3
 20 представляет собой T, X_4 представляет собой L, и аминокислотная последовательность
 $X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой FKAQ. Согласно некоторым вариантам реализации
 настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_5X_6X_7$ представляет
 собой AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP. Согласно некоторым
 25 вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность
 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ представляет собой AQT LAV (SEQ ID NO: 83), X_{10} представляет собой
 A и X_{11} представляет собой Q. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего
 изобретения аминокислотная последовательность $X_7X_8X_9$ представляет собой PFK.
 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная
 30 последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ представляет собой AQT LAVPF (SEQ ID NO:
 84). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
 аминокислотная последовательность $X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой KAP или SNP.
 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
 35 последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$
 представляет собой DGTLATPFKXX (X может быть любой аминокислотой, SEQ ID NO:
 68). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
 последовательности из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$
 40 представляет собой GGTLATPFKAQ (SEQ ID NO: 10). Различные комбинации вариантов
 реализации, описанных в настоящем документе, включены в объем настоящего
 изобретения. Например, если X_{10} представляет собой A, X_{11} может представлять собой
 Q или P; и если X_1 представляет собой D, X_2 может представлять собой любую
 аминокислоту из G, N, S, T и V. В качестве другого примера, если X_3 представляет собой
 45 T и X_4 представляет собой L, X_5 может представлять собой A.

[000101] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_4 ,
 X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} и X_{11} представляют собой L, A, V, P, F, K, A и Q, соответственно;
 и X_3 представляет собой T, S или N. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения предпочтительно X_3 представляет собой Т. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_1X_2X_3$ представляет собой AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT или ART.

[000102] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой А и X_2 представляет собой Q; $X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}$ и X_{11} представляют собой V, P, F, K, A, Q, соответственно; и X_3 представляет собой Т и X_4 представляет собой L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность $X_3X_4X_5$ представляет собой TLA.

[000103] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X_1 представляет собой А, X_2 представляет собой Q, X_3 представляет собой Т, X_4 представляет собой L, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой А и X_{11} представляет собой Q, и аминокислотная последовательность $X_5X_6X_7$ представляет собой AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP.

[000104] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой AQT LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1).

[000105] X_1 представляет собой А, X_2 представляет собой Q, X_3 представляет собой Т, X_4 представляет собой L, X_5 представляет собой А, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой Р и X_8 представляет собой F, и аминокислотная последовательность $X_9X_{10}X_{11}$ представляет собой KAQ, KAP или SNP.

[000106] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность является частью капсидного белка AAV-вектора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот вставлена между AA586 и 589 последовательности капсидного белка AAV, представленной в SEQ ID NO: 45, вектора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот дополнительно содержит по меньшей мере две из аминокислот 587, 588, 589 или 590 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой одну из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-36. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AAV-вектор содержит по меньшей мере 4 смежные аминокислоты из одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53 и 65-68.

[000107] Как описано в настоящем документе, гAAV могут быть идентифицированы из библиотек капсидов, состоящих из вариантов, полученных путем вставки 7 аминокислот (AA) рандомизированной последовательности между AA588 и AA589 капсидного белка AAV. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV может содержать различные замены по сравнению с капсидным белком AAV дикого типа, включая, но не ограничиваясь ими, замену K449R, замену A587D, замену Q588G, замену A587G, замену Q588G, замену V592T, замену K595S, замену A595N, замену Q597P и любую их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV

содержит последовательность, идентичную последовательности капсида AAV9 дикого типа, но с заменой K449R. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV9 содержит аминокислотные замены A587D и Q588G. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV9 содержит аминокислотные замены A587G и Q588G. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV9 содержит аминокислотную замену V592T. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсидный белок AAV9 содержит аминокислотные замены K595S, A595N и Q597P.

[000108] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более нацеливающих пептидов можно применять в одной системе (например, в одном AAV-векторе, одном капсидном белке AAV или одном гAAV). Например, можно применять одну или более нацеливающих последовательностей, а также модифицировать другие сайты, чтобы уменьшить распознавание AAV уже существующими антителами, присутствующими у субъекта, такого как человек. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения AAV-вектор может включать капсид, который влияет на тропизм/нацеливание, скорость экспрессии и возможный иммунный ответ. Вектор также может включать гAAV, геном которого переносит трансген/терапевтические агенты (например, последовательности) вместе с регуляторными последовательностями. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор может содержать последовательность, нацеливающую в/на субстрат, которая представляет собой или переносит желаемую молекулу (терапевтическую молекулу, диагностическую молекулу и т.д.).

[000109] Нацеливающие пептиды, описанные в настоящем документе, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, могут повысить эффективность трансдукции гAAV в целевое окружение (например, ЦНС, ПНС, сердце или их комбинацию) у субъекта по сравнению с AAV, который не содержит нацеливающие пептиды. Например, встраивание одного или более нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе, в гAAV, может повысить эффективность трансдукции на или по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 1,5 раза, в 2 раза, в 2,5 раза, в 3 раза, в 3,5 раза, в 4 раза, в 4,5 раза, в 5 раз, в 5,5 раза, в 6 раз, в 6,5 раза, в 7 раз, в 7,5 раза, в 8 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз, в 100 раз, или на величину, которая находится в диапазоне между любыми двумя из указанных значений, по сравнению с AAV, который не содержит нацеливающий пептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения увеличение составляет по меньшей мере 2 раза. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения увеличение составляет 40-90 раз. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффективность трансдукции увеличивается в отношении трансдукции гAAV в ЦНС. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффективность трансдукции увеличивается в отношении трансдукции гAAV в ПНС. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффективность трансдукции увеличивается в отношении трансдукции гAAV в сердце. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффективность трансдукции увеличивается в отношении трансдукции гAAV в кардиомиоциты, сенсорные нейроны, ганглии задних корешков спинного мозга, висцеральные органы или любую их комбинацию.

[000110] Согласно некоторым вариантам реализации предложена библиотека капсидных белков, которая содержит геномы AAV, содержащие полные

последовательности гер и сар, которые были модифицированы так, чтобы не предотвратить репликацию вируса в условиях, при которых он обычно способен реплицироваться (совместное инфицирование клетки млекопитающего вспомогательным вирусом, таким как аденовирус). Геном псевдо-дикого типа («wt») может представлять собой геном, который содержит модифицированный ген сар в геноме «wt» AAV.

[000111] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения библиотеку капсидных белков получают в геноме AAV «псевдо-дикого типа», содержащем вирусный ген репликации (rep) и ген капсида (cap), фланкированные инвертированными концевыми повторами (ITR). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения библиотеку капсидных белков получают без применения генома AAV «псевдо-дикого типа», содержащего ген репликации вируса (rep) и ген капсида (cap), фланкированные инвертированными концевыми повторами (ITR).

[000112] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения геном rAAV содержит ген сар и только те последовательности в гене гер, которые необходимы для экспрессии и сплайсинга продуктов гена сар. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность распознавания рекомбиназы капсидного гена обеспечена совместно с инвертированными концевыми повторами, фланкирующими указанные последовательности.

[000113] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения систему можно применять для разработки капсидов, которые проявляют повышенное нацеливание к специфичным клеткам/органам, отбора капсидов, которые уклоняются от иммунного надзора, отбора геномов, которые являются более многочисленными при гомологичной рекомбинации, отбора элементов генома, повышающих эффективность превращения одноцепочечного генома AAV в двухцепочечный ДНК-геном в клетке, и/или отбора элементов генома, которые увеличивают превращение генома AAV в постоянную кольцевую форму внутри клетки.

Варианты применения AAV-векторов и rAAV

[000114] AAV-векторы, описанные в настоящем документе, могут быть эффективно трансдуцированы в целевое окружение (например, ЦНС, ПНС, сердце, любую их комбинацию, и другую желаемую систему (системы)) субъекта, например, для доставки нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ доставки последовательности нуклеиновой кислоты в нервную систему. Способ может включать обеспечение белка, содержащего любую одну или более из нацеливающих последовательностей согласно настоящему изобретению. Белок может быть частью капсида AAV. AAV может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая должна быть доставлена в нервную систему. AAV затем может быть введен субъекту.

[000115] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, которая будет доставлена в целевое окружение (например, нервную систему), содержит одну или более последовательностей, которые могут обеспечить определенную пользу или преимущество для нервной системы и/или места доставки или окружающей ткани или окружения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящая нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует представляющий интерес белок, включая, но не ограничиваясь ими, трофический фактор, фактор роста или другие растворимые факторы, которые могут быть высвобождены из трансдуцированных клеток и влияют на выживание или функцию таких клеток и/или

окружающих клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящая нуклеиновая кислота может представлять собой кДНК, которая восстанавливает функцию белка у человека или животных, несущих генетическую мутацию (мутации) этого гена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящая нуклеиновая кислота может представлять собой кДНК, которая кодирует белок, который может быть использован для контроля или изменения активности или состояния клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящая нуклеиновая кислота может представлять собой кДНК, которая кодирует белок или нуклеиновую кислоту, используемую для оценки состояния клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящая нуклеиновая кислота может представлять собой кДНК и/или ассоциированную РНК для выполнения модификации генома. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящая нуклеиновая кислота может представлять собой последовательность для редактирования генома посредством гомологичной рекомбинации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящая нуклеиновая кислота может представлять собой последовательность ДНК, кодирующую терапевтическую РНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящая нуклеиновая кислота может представлять собой систему доставки кшРНК или искусственной миРНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящая нуклеиновая кислота может представлять собой последовательность ДНК, которая влияет на сплайсинг эндогенного гена.

[000116] В настоящей заявке «представляющий интерес белок» может представлять собой любой белок, включая природные и неприродные белки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий один или более представляющих интерес белков, может присутствовать в одном из AAV-векторов, описанных в настоящем документе, в которых полинуклеотид функционально соединен с промотором. В некоторых случаях промотор может контролировать экспрессию белка (белков), представляющего интерес, в клетке-хозяине (например, нейроне человека). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения представляющий интерес белок является антителом к тау, антителом к Аβ, антителом к изоформе ApoE.

[000117] Примеры белка, представляющего интерес, включают, но не ограничиваются ими, люциферазы; флуоресцентные белки (например, GFP); гормоны роста (ГР) и их варианты; инсулиноподобные факторы роста (ИФР) и их варианты; гранулоцитарные колониестимулирующие факторы (Г-КСФ) и их варианты; эритропоэтин (ЭПО) и его варианты; инсулин, такой как проинсулин, препроинсулин, инсулин, аналоги инсулина и тому подобное; антитела и их варианты, такие как гибридные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, моноклональные антитела; антигенсвязывающие фрагменты антитела (фрагменты Fab), одноцепочечные вариабельные фрагменты антитела (фрагменты scFV); дистрофии и его варианты; факторы свертывания и их варианты; регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) и его варианты; и интерфероны и их варианты.

[000118] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения представляющий интерес белок представляет собой терапевтический белок или его вариант. Неограничивающие примеры терапевтических белков включают факторы крови, такие как β-глобин, гемоглобин, активатор тканевого плазминогена и факторы свертывания; колониестимулирующие факторы (КСФ); интерлейкины, такие как ИЛ-

1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9 и т.д.; факторы роста, такие как фактор роста кератиноцитов (KGF), фактор стволовых клеток (SCF), фактор роста фибробластов (FGF, такой как основной FGF и кислый FGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобные факторы роста (IGF), костный морфогенетический белок (BMP), фактор роста эпидермиса (EGF), фактор роста и дифференцировки 9 (GDF-9), фактор роста, происходящий из гепатомы (HDGF), миостатин (GDF-8), фактор роста нервов (NGF), нейротрофины, фактор роста тромбоцитов (PDGF), тромбопоэтин (TPO), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) и тому подобное; растворимые рецепторы, такие как растворимые рецепторы TNF- α , растворимые рецепторы VEGF, растворимые рецепторы интерлейкинов (например, растворимые рецепторы ИЛ-1 и растворимые рецепторы ИЛ-1 типа II), растворимые рецепторы Т-клеток типа γ/δ , лигандсвязывающие фрагменты растворимого рецептора и тому подобное; ферменты, такие как α -глюкозидаза, имиглукараза, β -глюкоцереброзидаза и альглюцераза; активаторы ферментов, такие как активатор тканевого плазминогена; хемокины, такие как IP-10, монокин, индуцированный интерфероном-гамма (Mig), Gro α /IL-8, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, PF-4 и тому подобное; ангиогенные агенты, такие как факторы роста эндотелия сосудов (VEGF, например, VEGF 121, VEGF 165, VEGF-C, VEGF-2), трансформирующий фактор роста-бета, основной фактор роста фибробластов, фактор роста, происходящий из глиомы, ангиогенин, ангиогенин-2; и тому подобное; антиангиогенные агенты, такие как растворимый рецептор VEGF; белковая вакцина; нейроактивные пептиды, такие как фактор роста нервов (NGF), брадикинин, холецистокинин, гастин, секретин, окситоцин, гонадотропин-высвобождающий гормон, бета-эндорфин, энкефалин, вещество Р, соматостатин, пролактин, галанин, гормон, высвобождающий гормон роста, бомбезин, динофин, варфарин, нейротензин, мотилин, тиротропин, нейропептид Y, лютеинизирующий гормон, кальцитонин, инсулин, глюкоагоны, вазопрессин, ангиотензин II, тиреотропин-высвобождающий гормон, вазоактивный кишечный пептид, пептид сна и тому подобное; тромболитические агенты; предсердный натрийуретический пептид; релаксин; глиальный фибриллярный кислый белок; фолликулостимулирующий гормон (ФСГ); антитрипсин альфа-1 человека; ингибирующий лейкемию фактор (LIF); трансформирующие факторы роста (TGF); тканевые факторы, лютеинизирующий гормон; факторы активации макрофагов; фактор некроза опухоли (TNF); фактор хемотаксиса нейтрофилов (NCF); фактор роста нервов; тканевые ингибиторы металлопротеиназ; вазоактивный кишечный пептид; ангиогенин; ангиотропин; фибрин; гирудин; антагонисты рецептора ИЛ-1; и тому подобное.

Некоторые другие неограничивающие примеры белка, представляющего интерес, включают цилиарный нейротрофический фактор (CNTF); нейротрофический фактор головного мозга (BDNF); нейротрофины 3 и 4/5 (NT-3 и 4/5); нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF); декарбоксилазу ароматических аминокислот (AADC); связанные с гемофилией белки свертывания, такие как фактор VIII, фактор IX, фактор X; дистрофии или мини-дистрофин; лизосомальную кислую липазу; фенилаланингидроксилазу (ПАН); ферменты, связанные с гликогенозами, такие как глюкозо-6-фосфатаза, кислая мальтаза, фермент, линеаризующий гликоген, мышечная гликогенфосфорилаза, гликогенфосфорилаза печени, мышечная фосфофруктокиназа, киназа фосфорилазы (например, PFKA2), переносчик глюкозы (например, GLUT2), альдолаза, β -энолаза и гликогенсинтаза; лизосомальные ферменты (например, бета-N-ацетилгексозаминидаза А); и любые их варианты.

[000119] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

представляющий интерес белок является активным фрагментом белка, такого как любой из вышеупомянутых белков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения представляющий интерес белок является гибридным белком, содержащим некоторые или все из двух или более белков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гибридный белок может содержать все или часть любого из вышеупомянутых белков.

[000120] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вирусный вектор содержит полинуклеотид, содержащий кодирующие области для двух или более белков, представляющих интерес. Два или более представляющих интерес белков могут быть одинаковыми или различными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения два или более представляющих интерес белков представляют собой родственные полипептиды, например, легкую цепь (цепи) и тяжелую цепь (цепи) одного и того же антитела.

[000121] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения представляющий интерес белок является мультисубъединичным белком. Например, представляющий интерес белок может содержать две или более субъединиц или две или более независимых полипептидных цепей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения представляющий интерес белок может быть антителом. Примеры антител включают, но не ограничиваются ими, антитела различных изотипов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE и IgM); моноклональные антитела, полученные любыми способами, известными специалистам в данной области техники, включая антигенсвязывающий фрагмент моноклонального антитела; гуманизированные антитела; химерные антитела; одноцепочечные антитела; фрагменты антител, такие как Fv, F(ab')₂, Fab', Fab, Facb, scFv и тому подобное; при условии, что антитело способно связываться с антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения представляющий интерес белок не является иммуноадгезином.

[000122] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полученные нацеливающие молекулы можно применять в способах и/или способах лечения, связанных с вариантами применения переноса генов в популяции долгоживущих клеток в условиях *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающие молекулы можно применять для любой генной терапии на основе гAAV, включая, например, спинальную мышечную атрофию (СМА), боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Паркинсона, атаксию Фридрейха, болезнь Помпе, болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера, болезнь Баттена, лизосомальные болезни накопления, мультиформную глиобластому, синдром Ретта, врожденный амавроз Лебера, хроническую боль, инсульт, травму спинного мозга, травматическое повреждение головного мозга и лизосомальные болезни накопления. Помимо этого гAAV также можно применять для доставки трансгенов в условиях *in vivo* для нетерапевтических научных исследований, таких как оптогенетика, гиперэкспрессия генов, подавление генов с помощью кшРНК или миРНК, модуляция эндогенных миРНК с использованием губок или ловушек миРНК, доставка рекомбиназы для условной делеции генов, условной (зависимой от рекомбиназы) экспрессии, или редактирование гена с помощью CRISPR, TALEN и нуклеаз с цинковыми пальцами.

[000123] Настоящее изобретение относится к способам лечения и/или предотвращения болезни Хантингтона с применением способов и композиций, описанных в настоящем документе. Способ лечения и/или предотвращения болезни Хантингтона может включать

выявление субъекта (субъектов), путем обеспечения вектора для доставки полинуклеотида в нервную систему субъекта, как предусмотрено в настоящем изобретении, введение вектора в эффективной дозе субъекту, обеспечивая тем самым лечение и/или предотвращение болезни Хантингтона у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы лечения субъекта с болезнью Хантингтона включают композиции, в которых вектор доставляет полинуклеотидную композицию, содержащую белок с цинковым пальцем (ZFP), модифицированный для подавления транскрипции гена хантингтина (НТТ). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ZFP селективно подавляет транскрипцию аллеля гена НТТ, который вовлечен в развитие болезни Хантингтона у субъекта, посредством связывания с областью повтора CAG гена НТТ путем, который зависит от длины повтора CAG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ZNFTR селективно репрессирует транскрипцию обоих аллелей гена НТТ.

[000124] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит короткую шпилечную РНК (кшРНК) или микроРНК (миРНК), которая подавляет экспрессию хантингтина путем индукции селективной деградации молекул РНК или путем ингибирования трансляции с молекул РНК, транскрибируемых с аллеля НТТ, вызывающего заболевание, путем связывания с повтором CAG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ лечения пациентов с болезнью Хантингтона включает встраивание в геном гAVV кассеты для экспрессии миРНК, специфичной в отношении хантингтина. Такой геном затем может быть упакован в один из описанных вариантов последовательностей для доставки через сосудистую сеть.

[000125] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит короткую шпилечную РНК (кшРНК) или микроРНК (миРНК), которая подавляет экспрессию хантингтина путем индукции деградации молекул РНК или ингибирования трансляции с молекул РНК, транскрибированных с одного или обоих аллелей гена НТТ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит короткую шпилечную РНК (кшРНК) или микроРНК (миРНК), которая подавляет экспрессию хантингтина путем индукции селективной деградации молекул РНК или ингибирования трансляции с молекул РНК, транскрибируемых с аллеля НТТ, вызывающего заболевание, путем селективного распознавания одного или более полиморфизмов нуклеотидов, присутствующих в аллеле, вызывающем заболевание. Нуклеотидные полиморфизмы могут быть применены специалистом в данной области техники для того чтобы отличить нормальный аллель от вызывающего заболевание аллеля.

[000126] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит полинуклеотид, который кодирует РНК или белок, который изменяет сплайсинг или выработку РНК НТТ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит полинуклеотид, который кодирует одну или более полипептидаз и/или РНК для редактирования генома с использованием эффекторной нуклеазы, сходной с активатором транскрипции (TALEN), нуклеазы с цинковыми пальцами или системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами - гена cas9 (CRISPR/Cas9), модифицированной специалистом в данной области техники для индукции разрыва одной цепи ДНК или разрыва двухцепочечной ДНК внутри или рядом с геном НТТ, чтобы вызвать изменение

последовательности гена НТТ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, который связывается с полипептидом, кодируемым геном НТТ, изменяет конформацию полипептида, кодируемого геном НТТ, или изменяет сборку в агрегаты полипептида, кодируемого геном НТТ, или изменяет период полужизни полипептида, кодируемого геном НТТ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит полинуклеотид, который кодирует РНК или полипептид, который вызывает или предотвращает посттранскрипционную модификацию полипептида, кодируемого геном НТТ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит полинуклеотид, который кодирует полипептид из белка-шаперона, известного специалистам в данной области техники, для влияния на конформацию и/или стабильность полипептида, кодируемого геном НТТ.

[000127] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит регуляторные элементы, известные специалисту в данной области техники, чтобы влиять на экспрессию РНК и/или белковых продуктов, кодируемых полинуклеотидом, в желаемых клетках субъекта.

[000128] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для введения субъекту содержит терапевтический продукт, применимый для любого выбранного заболевания или расстройства. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный терапевтический продукт может включать композиции для лечения и/или предотвращения болезни Альцгеймера с применением способов и композиций, описанных в настоящем документе, например ApoE2 или ApoE3 для лечения болезни Альцгеймера; SMN для лечения СМА; доставку фратаксина для лечения атаксии Фридрейха; и/или кшРНК или миРНК для лечения БАС.

[000129] В некоторых вариантах реализации варианты согласно настоящему изобретению можно применять в качестве эффективного средства для переноса гена в сердечную мышцу. Такой перенос можно применять при исследовании и лечении многих различных заболеваний и повреждений, включая атаксию Фридрейха, сердечную недостаточность, ишемическую болезнь сердца, гипертрофию сердца, хроническую боль и повреждение периферических нервов. В некоторых вариантах реализации варианты согласно настоящему изобретению можно применять для трансдукции периферических нервов при введении через сосудистую сеть.

[000130] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтический продукт для доставки представляет собой белок (кодирует белок) или стратегию на основе РНК для снижения агрегации синуклеина для лечения болезни Паркинсона. Например, настоящее изобретение относится к доставке полинуклеотида, который кодирует вариант синуклеина, который устойчив к агрегации, и тем самым разрушает агрегацию эндогенного синуклеина.

[000131] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансген, кодирующий трофический фактор для лечения БА, БП, БАС, СМА или БХ, может представлять собой терапевтический продукт, вовлеченный в патофизиологию указанных заболеваний. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно применять трофический фактор, который может включать, например, BDNF, GDNF, NGF, LIF и/или CNTF.

[000132] Дозировки вирусного вектора могут зависеть в первую очередь от таких

факторов как состояние, которое лечат, возраст, масса тела и состояние здоровья пациента, и, соответственно, могут изменяться у разных пациентов. Например, терапевтически эффективная доза вирусного вектора у человека обычно находится в диапазоне от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 100 мл раствора, содержащего

концентрации от приблизительно 1×10^9 до 1×10^{16} геномов вирусного вектора.

Предпочтительная доза у человека может составлять приблизительно от 1×10^{13} до 1×10^{16} геномов AAV. Доза будет скорректирована, чтобы сбалансировать терапевтическую пользу с любыми побочными эффектами, и подходящие дозы могут варьироваться в зависимости от терапевтического применения, для которого применяют рекомбинантный вектор. Уровни экспрессии трансгена можно контролировать, чтобы определить частоту дозирования для конкретного вектора.

[000133] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор также может содержать регуляторные контрольные элементы, известные специалистам в данной области техники, чтобы влиять на экспрессию РНК и/или белковых продуктов, кодируемых полинуклеотидом в желаемых клетках субъекта.

[000134] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, функционально, экспрессия полинуклеотида поддается, по меньшей мере частично, контролю с помощью функционально соединенных регуляторных элементов так, что элемент (элементы) модулирует транскрипцию полинуклеотида, транспорт, процессинг и стабильность РНК, кодируемой полинуклеотидом, и, при необходимости, трансляцию транскрипта. Конкретным примером элемента, контролирующего экспрессию, является промотор, который обычно расположен в 5'-направлении относительно транскрибируемой последовательности. Другим примером элемента, контролирующего экспрессию, является энхансер, который может быть расположен в направлении 5'-конца или 3'-конца относительно транскрибируемой последовательности или внутри транскрибируемой последовательности. Другим примером регуляторного элемента является последовательность распознавания для микроРНК. Другим примером регуляторного элемента является интрон, а также донорные и акцепторные последовательности сплайсинга, которые регулируют сплайсинг указанного интрона. Другим примером регуляторного элемента является сигнал терминации транскрипции и/или последовательности полиаденилирования.

[000135] Элементы, контролирующие экспрессию, и промоторы включают те, которые активны в конкретной ткани или типе клеток, называемые в настоящем документе «тканеспецифичные элементы/промоторы, контролирующие экспрессию»

Тканеспецифичные элементы, контролирующие экспрессию, обычно активны в определенной клетке или ткани (например, в печени, головном мозге, центральной нервной системе, спинном мозге, глазу, сетчатке или легком). Элементы, контролирующие экспрессию, обычно активны в указанных клетках, тканях или органах, поскольку они распознаются белками активатора транскрипции или другими регуляторами транскрипции, которые являются уникальными для определенной клетки, ткани или органа.

[000136] Элементы, контролирующие экспрессию, включают также повсеместные или смешанные промоторы/энхансеры, которые способны контролировать экспрессию полинуклеотида во многих различных типах клеток. Подходящие элементы включают, но не ограничиваются ими, последовательности немедленного раннего промотора/энхансера цитомегаловируса (ЦМВ), последовательности промотора/энхансера вируса саркомы (RSV) и другие вирусные промоторы/энхансеры, активные в различных типах

клеток млекопитающих; последовательности промотора/энхансера из повсеместно или смешанно экспрессируемых генов млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, бета-актин, убиквитин или EF1- α ; или синтетические элементы, которые не обнаруживаются в природе.

- 5 [000137] Элементы, контролирующие экспрессию, также могут обеспечивать экспрессию регулируемым способом, т.е. сигнал или стимулы увеличивают или уменьшают экспрессию функционально соединенного полинуклеотида. Регулируемый элемент, который увеличивает экспрессию функционально соединенного полинуклеотида в ответ на сигнал или стимулы, также называется «индуцируемый элемент» (т.е. он индуцируется сигналом). Конкретные примеры включают, но не ограничиваются ими, индуцируемый гормоном (например, стероидом) промотор. Регулируемый элемент, который уменьшает экспрессию функционально соединенного полинуклеотида в ответ на сигнал или стимулы, называется «подавляемый элемент» (т.е. сигнал уменьшает экспрессию так, что при удалении или отсутствии сигнала экспрессия увеличивается).
- 10 Как правило, степень увеличения или уменьшения в результате действия указанных элементов, пропорциональна интенсивности присутствующих сигналов или стимулов; чем более интенсивный сигнал или стимулы, тем больше степень увеличения или уменьшения экспрессии.

- [000138] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV, содержащий капсидный белок, содержащий один или более нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе, можно применять для эффективной трансдукции нервной системы. В этой связи гAAV является подходящим для доставки терапевтических средств для лечения, например, болезни Хантингтона (БХ), болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, спинальной мышечной атрофии типов I и II, атаксии Фридрейха, спиноцеребеллярной атаксии и любой из лизосомальных болезней накопления, которые поражают клетки в ЦНС, включая, но не ограничиваясь ими, болезнь Краббе, болезнь Сандхоффа, болезнь Тея-Сакса, болезнь Гоше (типа I, II или III), болезнь Ниманна-Пика (дефицит NPC1 или NPC2), синдром Гурлера, болезнь Помпе и/или болезнь Баттена.
- 20 25

- [000139] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV, содержащий капсидный белок, содержащий один или более нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе, можно применять для эффективной трансдукции сердечной мышцы, периферических нервов или любой их комбинации. Соответственно, гAAV является подходящим для доставки терапевтических средств для лечения, например, атаксии Фридрейха, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, гипертрофии сердца, хронической боли и/или повреждения периферических нервов.
- 30 35

- [000140] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV, содержащий капсидный белок, содержащий один или более нацеливающих пептидов, описанных в настоящем документе, можно применять для доставки генов в конкретные типы клеток в целевом окружении субъекта. Например, гAAV можно применять для доставки генов в нейроны и глию в нервной системе (включая ПНС, ЦНС или обе системы) субъекта (например, млекопитающего). Нацеливающий пептид может представлять собой, например, AAV-RHPN (SEQ ID NO: 46). Композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно применять, например, (i) при снижении экспрессии мутированного хантингтина у пациентов с болезнью Хантингтона путем, например, встраивания кассеты для экспрессии мРНК, специфичной в отношении хантингтина, в геном гAAV и упаковки генома гAAV в вариант гAAV (например, AAV-
- 40 45

RHPN) для доставки через, например, сосудистую сеть, (ii) при доставке функциональной копии гена фратаксина пациентам с атаксией Фридрейха, (iii) при восстановлении экспрессии фермента, существенного для нормальной функции лизосом у пациентов, лишенных экспрессии фермента вследствие генетической мутации (например, пациентов с болезнью Ниманна-Пика, мукополисахаридозом типа III и/или болезнью Гоше), (iv) при использовании гAAV (например, AAV-RHPN) для получения моделей заболевания у животных или их комбинации.

Фармацевтические композиции и способы введения

[000141] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим один или более из гAAV, описанных в настоящем документе, и один или более фармацевтически приемлемых носителей. Композиции также могут содержать дополнительные ингредиенты, такие как разбавители, стабилизаторы, вспомогательные вещества и адъюванты. В настоящем документе «фармацевтически приемлемые» носители, вспомогательные вещества, разбавители, адъюванты или стабилизаторы являются нетоксичными (предпочтительно инертными) по отношению к клетке или субъекту, который подвергся их воздействию, в применяемых дозах и концентрациях, или которые имеют приемлемый уровень токсичности, определенный специалистами в данной области техники.

[000142] Носители, разбавители и адъюванты могут включать буферы, такие как фосфат, цитрат или другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные полипептиды (например, содержащие менее 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как твинTM, плуроновые кислотыTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения физиологически приемлемый носитель представляет собой водный раствор с контролируемым pH.

[000143] Титры гAAV для введения будут варьироваться в зависимости, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивидуума и типа (типов) клетки-мишени, и могут быть определены с помощью способов, стандартных в данной области техники.

[000144] Специалист в данной области техники поймет, что доза рекомбинантного вируса для введения, которую можно применять в условиях *in vivo*, и конкретный способ введения будут изменяться в зависимости от возраста, массы тела, степени тяжести недуга и вида животного, которое лечат, конкретного рекомбинантного вируса, экспрессирующего белок, представляющий интерес, конкретного использованного рекомбинантного вируса, экспрессирующего представляющий интерес белок, а также конкретного способа применения, в котором применяют рекомбинантный вирус. Определение эффективных уровней доз, т.е. уровней доз, необходимых для достижения желаемого результата, может быть выполнено специалистом в данной области техники с использованием стандартных фармакологических способов. Как правило, клиническое применение продуктов у человека начинают с более низких доз, при этом уровень доз увеличивают до момента достижения желаемого действия. В другом варианте, приемлемые исследования в условиях *in vitro* можно применять для установления подходящих доз и путей введения композиций, выявленных с помощью способов

согласно настоящему изобретению, с использованием общепринятых фармакологических способов.

[000145] Несмотря на то, что точная доза будет определена в зависимости от конкретного лекарственного препарата, в большинстве случаев могут быть сделаны некоторые обобщения, касающиеся дозировки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV для доставки нуклеиновой кислоты в нервную систему (например, ЦНС) субъекта можно вводить субъекту, например, путем инъекции, в дозе от 1×10^{10} копий генома (к.г.) рекомбинантного вируса на кг массы тела субъекта до 2×10^{14} копий генома на кг, например, от 5×10^{11} копий генома/кг до 5×10^{12} копий генома/кг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения доза гAAV, введенная субъекту, не превышает 2×10^{14} копий генома/кг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения доза гAAV, введенная субъекту, не превышает 5×10^{12} копий генома/кг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения доза гAAV, введенная субъекту, не превышает 5×10^{11} копий генома/кг.

[000146] Рекомбинантные вирусы, описанные в настоящем документе, могут быть введены субъекту (например, человеку), нуждающемуся в этом. Путь введения не ограничен конкретными путями. Например, терапевтически эффективное количество рекомбинантных вирусов может быть введено субъекту посредством путей, стандартных в данной области техники. Неограничивающие примеры пути включают внутримышечный, внутривагинальный, внутривенный, внутрибрюшинный, подкожный, надкожный, внутрикожный, ректальный, внутриглазной, легочной, внутричерепной, внутрикостный, пероральный, буккальный, системный или назальный путь введения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рекомбинантный вирус вводят субъекту посредством системной трансдукции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рекомбинантный вирус вводят субъекту путем внутримышечной инъекции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рекомбинантный вирус вводят субъекту путем интравагинальной инъекции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV вводят субъекту парентеральным путем (например, путем внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции), путем поверхностной скарификации или путем инокуляции в полость тела субъекта. Путь (пути) введения и серотип (серотипы) компонентов AAV в гAAV могут быть легко определены специалистом в данной области техники с учетом инфекции и/или патологического состояния, которое лечат, и целевых клеток/ткани (тканей), которые должны экспрессировать представляющий интерес белок. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения введение гAAV посредством внутривенной инъекции может быть предпочтительным.

[000147] Фактическое введение гAAV может быть достигнуто с помощью любого физического способа, который будет транспортировать гAAV в ткань-мишень субъекта. Например, гAAV может быть введен внутривенно. Как описано в настоящем документе, капсидные белки гAAV могут быть модифицированы так, что гAAV нацелен к конкретному целевому окружению, представляющему интерес, такому как центральная нервная система, и для повышения тропизма в отношении целевого окружения, которое представляет интерес (например, тропизма в отношении ЦНС). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV доставляет нуклеиновую кислоту в сердце, периферические нервы или их комбинацию. Фармацевтические композиции

могут быть получены, например, в виде составов для инъекций.

[000148] Рекомбинантный вирус для применения может быть использован в жидкой или лиофилизированной форме (в комбинации с одним или более подходящими консервантами и/или защитными агентами для защиты вируса в процессе лиофилизации).

5 Для генной терапии (например, неврологических расстройств, которые могут быть облегчены с помощью специфичного генного продукта) терапевтический эффективную дозу рекомбинантного вируса, экспрессирующего терапевтический белок, вводят хозяину, нуждающемуся в таком лечении. Применение рекомбинантного вируса, описанного в настоящем документе, при изготовлении лекарственного средства для
10 индукции иммунитета у хозяина или обеспечения генной терапии хозяину включено в объем настоящей заявки.

[000149] В тех случаях, когда дозы гAAV у человека были установлены для по меньшей мере некоторых состояний, могут быть использованы те же дозы, или дозы, которые находятся в диапазоне от приблизительно 0,1% до 500%, более предпочтительно
15 от приблизительно 25% до 250% от установленной дозы у человека. В тех случаях, когда доза у человека не установлена, как в случае недавно обнаруженных фармацевтических композиций, подходящая доза у человека может быть определена на основании значений ЭД₅₀ или ИД₅₀ или других подходящих значений, полученных из исследований в условиях *in vitro* или в условиях *in vivo*, согласно результатам
20 исследований токсичности и исследований эффективности у животных.

[000150] Терапевтически эффективное количество гAAV может быть введено субъекту в различных временных точках. Например, гAAV может быть введен субъекту до, во время или после возникновения у субъекта заболевания или расстройства. гAAV также может быть введен субъекту до, во время или после возникновения заболевания или
25 расстройства (например, болезни Хантингтона (БХ), болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, спинальной мышечной атрофии типа I и II, атаксии Фридрейха, спиноцеребеллярной атаксии и любых лизосомальных болезней накопления, которые поражают клетки в ЦНС, включая, но не ограничивается ими, болезнь Краббе, болезнь Санхоффа, болезнь Тея-Сакса, болезнь Гоше (типа I, II
30 или III), болезнь Ниманна-Пика (дефицит NPC1 или NPC2), синдром Гурлера, болезнь Помпе, болезнь Баттена или любую их комбинацию), хронической боли, сердечной недостаточности, сердечных аритмий или их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV вводят субъекту во время ремиссии заболевания или расстройства. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV вводят до начала заболевания или расстройства у субъекта. Согласно
35 некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV вводят субъекту, подверженному риску развития заболевания или расстройства.

[000151] Частота дозирования гAAV может варьироваться. Например, гAAV можно вводить субъекту приблизительно один раз каждую неделю, приблизительно один раз
40 каждые две недели, приблизительно один раз каждый месяц, приблизительно один раз каждые шесть месяцев, приблизительно один раз каждый год, приблизительно один раз каждые два года, приблизительно один раз каждые три года, приблизительно один раз каждые четыре года, приблизительно один раз каждые пять лет, приблизительно один раз каждые шесть лет, приблизительно один раз каждые семь лет, приблизительно
45 один раз каждые восемь лет, приблизительно один раз каждые девять лет, приблизительно один раз каждые десять лет или приблизительно один раз каждые пятнадцать лет. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гAAV вводят субъекту не чаще приблизительно одного раза каждую неделю, не чаще

приблизительно одного раза каждые две недели, не чаще приблизительно одного раза каждый месяц, не чаще приблизительно одного раза каждые шесть месяцев, не чаще приблизительно одного раза каждый год, не чаще приблизительно одного раза каждые два года, не чаще приблизительно одного раза каждые три года, не чаще приблизительно одного раза каждые четыре года, не чаще приблизительно одного раза каждые пять лет, не чаще приблизительно одного раза каждые шесть лет, не чаще приблизительно одного раза каждые семь лет, не чаще приблизительно одного раза каждые восемь лет, не чаще приблизительно одного раза каждые девять лет, не чаще приблизительно одного раза каждые десять лет или не чаще приблизительно одного раза каждые пятнадцать лет.

ПРИМЕРЫ

[000152] Некоторые аспекты вариантов реализации, описанных выше, описаны более подробно в следующих примерах, которые не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом.

Пример 1

Разработка AAV-PHPB для создания вариантов

[000153] Для разработки вариантов AAV-PHPB, которые обеспечивают более эффективную трансдукцию ЦНС и более селективную трансдукцию нейронов, 7-членную последовательность AAV-PHPB (SEQ ID NO: 40), описанную в публикации патента США 2015/0079038 (содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки), частично рандомизировали путем замены с перекрыванием 3 аминокислот 7-членной последовательности и 2 аминокислот, фланкирующих 7-членную последовательность, случайными аминокислотами. Обзор данной стратегии разработки AAV-PHPB представлен на ФИГ. 1 (X представляет собой одну из 20 стандартных

AAV-PHPN

[000154] После двух раундов отбора было установлено, что многочисленные варианты обогащены в последовательностях, выделенных из одной или более из линий Cre. Одну из указанных последовательностей, AAV-PHPN (DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4)), отбирали для характеристики в качестве индивидуального варианта.

[000155] Последовательность DGTLAVPFKAQ представляла 8,1% от общего количества последовательностей, выделенных у мышей Vgat-IRES-Cre, 4,4% от общего количества последовательностей, выделенных у мышей Vglut2-IRES-Cre, 0% от общего количества последовательностей, выделенных у мышей GFAP-Cre, и 0% от общего количества последовательностей, выделенных из печени (выделение, не зависящее от Cre). Исходя из полученных данных, полагали, что DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4) будет более эффективной при селективной трансдукции нейронов по сравнению с астроцитами. Аминокислотную последовательность DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4) независимо отбирали из 2 различных нуклеотидных последовательностей: (i)

GAT GGG ACT TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (SEQ ID NO: 54), (ii)

GAT GGG ACG TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (SEQ ID NO: 55). Обе

последовательности с консенсусной последовательностью D/E S/G-TLAVPFK (SEQ ID NO: 40) составляли 18,9% от общего количества последовательностей, выделенных у мышей Vgat-IRES-Cre, 15,6% от общего количества последовательностей, выделенных у мышей Vglut2-IRES-Cre, 8,3% от общего количества последовательностей, выделенных у мышей GFAP-Cre, и 0% от общего количества последовательностей, выделенных из печени (выделение, не зависящее от Cre) после двух раундов отбора.

[000156] Данные для AAV-PHPN (DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4)) представлены на ФИГ. 2. Идентификация капсида, содержащего последовательность AAV-PHPN (SEQ ID NO: 46), была возможной за счет применения способа CREATE, описанного в настоящем документе, чтобы одновременно выполнять отборы в нескольких линиях трансгенных мышей, несущих рекомбиназу Cre. В совокупности полученные результаты, свидетельствующие о том, что (i) последовательность AAV-PHPN (SEQ ID NO: 46) селективно выделяли из нейронов ЦНС, но не из астроцитов ЦНС или печени, и (ii) капсид AAV-PHPN обеспечивал селективное усиление трансдукции нейронов, но не глиии и клеток печени (по сравнению с AAV-PHPB), указывают на полезность осуществления отборов в нескольких типах клеток в условиях *in vivo* для разработки новых векторов с более желательными характеристиками трансдукции.

AAV-PHPS

[000157] Вариант AAV-PHPS (SEQ ID NO: 47) обнаружили путем отбора капсидов AAV, которые обеспечивали более эффективное нацеливание к GFAP-клеткам, экспрессирующим Cre. Вариант идентифицировали из библиотеки, в которой 7AA (7-членная последовательность) рандомизированной последовательности вставляли между аминокислотами 588-589 капсидного белка (нумерация VP1). AAV-PHPS содержал 7-членную последовательность QAVRTSL (SEQ ID NO: 37), кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты

CAG GCG GTT AGG ACG TCT TTG (SEQ ID NO: 56) .

[000158] AAV9 является основным вектором-кандидатом для переноса генов в сердечную мышцу, а также обеспечивает трансдукцию периферических нервов при введении через сосудистую систему. Данные, представленные на ФИГ. 3А-3D, указывают на то, что системно доставленный AAV-PHPS (SEQ ID NO: 47) обеспечивал значительно более высокую экспрессию в сердце и сенсорных нервах, чем AAV9 (SEQ ID NO: 45), не содержащий нацеливающий пептид AAV-PHPS.

Пример 2

Выделение новых последовательностей капсидного белка AAV с помощью нацеленной эволюции AAV на основе Cre-рекомбинации (CREATE)

[000159] Направленную эволюцию применяли для получения AAV, которые уклоняются от нейтрализующих антител (Maheshri et al 2006) и более эффективно нацелены к клеткам глиомы (McGuire et al. 2010), эпителию дыхательных путей (Excoffon et al. 2009) и фоторецепторам в сетчатке после интравитреальной инъекции (Dalkara et al 2013). Помимо этого, с помощью химерной модели печени человека/мыши Lisowski et al. разработали rAAV, который специфично и эффективно нацелен к гепатоцитам человека (2013). Согласно некоторым вариантам реализации, описанным в настоящем документе, предложены способы обогащения и селективного выделения последовательностей с желаемыми признаками из библиотек вариантов последовательностей с помощью стратегии выделения, зависящей от рекомбинации.

[000160] Один из подходов, который применяли для разработки rAAV с улучшенным нацеливанием к типу ткани/клетки, заключался в осуществлении направленной эволюции гена капсида AAV. Как правило, это осуществляют путем создания библиотеки компетентных по репликации AAV, которые модифицируют для введения случайных мутаций в ген *cap* AAV, который кодирует капсидные белки, определяющие тканевой тропизм. Затем библиотеку капсидов вируса AAV вводят животному или доставляют в клетки в культуре. Спустя определенный период времени выделяют капсидные последовательности, которые присутствуют в клетках/тканях, представляющих интерес. Полученные выделенные последовательности затем применяют для создания нового

пула вирусов, и затем процесс повторяют. С помощью повторных раундов отбора/ выделения последовательностей, те последовательности, которые обеспечивают капсиды с более предпочтительными функциями (т.е. те, которые многократно проходят процесс отбора), будут обогащены. Капсиды, которые проявляют улучшенную способность к

трансдукции мишени, затем могут быть выделены и оценены как индивидуальные клоны или дополнительно мутированы и подвергнуты дополнительным раундам отбора.

[000161] В данном примере описаны способы и материалы, использованные в стратегии отбора, называемой нацеленной эволюцией AAV, основанной на Cre-рекомбинации (CREATE), которая позволяет разрабатывать капсиды AAV, которые более эффективно трансдуцируют определенные Cre-экспрессирующие популяции клеток в условиях *in vivo*. Как описано в настоящем документе, CREATE применяли для получения вариантов AAV, которые эффективно и повсеместно трансдуцируют центральную нервную систему (ЦНС) взрослых мышей после внутривенного введения. Варианты, полученные с помощью указанного способа, могут переносить гены во всей ЦНС с эффективностью, которая иногда в 40 раз превышает эффективность действующего стандарта, AAV914-17, и могут трансдуцировать большую часть астроцитов и нейронов в нескольких областях ЦНС. При применении в условиях *in vivo* варианты могут трансдуцировать нейроны и астроциты человека более эффективно, чем AAV9, это свидетельствует о способности CREATE обеспечивать получение оптимизированных AAV-векторов для вариантов биомедицинского применения.

Экспериментальные материалы и методы

Способ модификации плазмиды, несущей геном gAAV-Cap-in-cis-lox

[000162] Плазида, несущая геном gAAV-Cap-in-cis-lox, содержит три основных элемента, фланкированных ITR AAV2: (i) кассету экспрессии mCherry, которая состоит из фрагмента, содержащего 398 п.н., из гена UBC человека, который расположен в 5'-направлении относительно кДНК mCherry, за которой расположена синтетическая последовательность полиаденилирования SV40; (ii) ген капсида AAV9 и регуляторные последовательности, которые состоят из последовательности промотора p41 AAV5 (1680-1974 GenBank AF085716.1) и последовательностей сплайсинга, взятых из гена *grip* AAV2; и (iii) Cre-зависимый переключатель, который состоит из последовательности полиаденилирования SV40 (pA), фланкированной инвертированными участками lox71 и lox66. Плазмиду, несущую геном gAAV-Cap-in-cis-lox, дополнительно модифицировали для введения двух уникальных сайтов рестрикции, XbaI и AgeI, в пределах последовательности капсида. Эти сайты фланкировали область (AA450-592), которую заменяли фрагментом рандомизированной библиотеки. Вставка сайта XbaI вводила мутацию K449R, которая не оказывала явного влияния на выработку или трансдукцию вектора. Мутации, необходимые для вставки сайта AgeI, являются молчащими. В случае акцепторной плазмиды gAAV-ΔCap-in-cis, использованной для клонирования библиотеки капсидов, удаляли кодирующую область между сайтами XbaI и AgeI, чтобы предотвратить выработку вируса из акцепторной плазмиды, не содержащей фрагмент библиотеки.

[000163] В качестве матрицы для фрагмента библиотеки область, охватывающую сайты XbaI и AgeI модифицированного AAV9, амплифицировали с помощью ПЦР. Указанную последовательность модифицировали для удаления уникального сайта рестрикции EarI и вставки уникального сайта KpnI (обе мутации являются молчащими) для создания фрагмента xE. Модифицированный фрагмент xE клонировали с помощью ТА-стратегии в pCRII (Life Technologies) для получения pCRII-9Cap-xE. Устранение сайта EarI обеспечило второй способ, который можно применять, если необходимо, для

селективного расщепления загрязняющих капсидных последовательностей (AAV9), выделенных с помощью ПЦР, без расщепления последовательностей, полученных из библиотеки. Использование акцептора гAAV-ΔCap-in-cis для клонирования библиотек и принятие стандартных мер предосторожности для ПЦР (например, УФ-обработка

5 реагентов и пипеток) в достаточной степени предотвращало загрязнение.

[000164] Вспомогательную плазмиду AAV2/9 REP-AAP конструировали путем введения пяти стоп-кодонов в кодирующую последовательность открытой рамки считывания гена VP AAV9 в положениях аминокислот VP1: 6, 10, 142, 148 и 216. Стоп-кодон в AA216 был сконструирован так, чтобы не нарушить кодирующую

10 последовательность белка AAP, которая кодируется альтернативной открытой рамкой считывания.

[000165] В данном исследовании использовали несколько геномов гAAV. Каждый из геномов конструировали с использованием одноцепочечного (оц) генома гAAV с использованием репортера, контролируемого повсеместным гибридным промотором ЦМВ-β-актин-интрон-β-глобин (CAG). Для упрощения описания векторов в тексте были сокращены. ssAAV-CAG-GFP относится к ssAAV-CAG-eGFP-2A-Luc-WPRE-SV40 polyA. ssAAV-CAG-NLS-GFP относится к ssAAV-CAG-NLSGFP-WPRE-SV40 polyA, который конструировали путем вставки последовательности ядерной локализации PKKKRKV на N-конце и C-конце GFP. ssAAV-CAG-mNeonGreen-f относится к ssAAV-CAGmNeonGreen-f-WPRE с сигналом полиаденилирования гормона роста человека. mNeonGreen модифицировали с использованием последовательности, нацеливающей к мембране (сигналы фарнезилирования и пальмитоилирования), из c-Ha-Ras.

Способ получения библиотеки капсидов

[000166] Случайный 7-членный фрагмент библиотеки (вставленный между аминокислотами 588 и 589) получали с помощью ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Q5 Hot Start High-Fidelity (NEB; M0493), праймеров XF и 7xMNN и pCRII-9Cap-xE в качестве матрицы. Схемы, на которых представлены примерные сайты связывания праймеров, приведены на ФИГ. 8А-8В, и последовательности праймеров приведены в таблице 1. Для получения библиотеки на основе гAAV продукты ПЦР, содержащие библиотеку, и акцепторную плазмиду гAAV-ΔCap-in-cis, расщепленную

30 XbaI и AgeI, собирали с использованием сборки по Гибсону (NEB; E2611). Затем продукты реакции обрабатывали ДНКазой Plasmid Safe (PS) (Epicenter; E3105K) для расщепления любых несобранных фрагментов и очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Выход данной реакции, как правило, составлял более 100 нг собранной плазмиды (определенный по количеству ДНК, оставшемуся после расщепления ДНКазой PS). 100 нг достаточно для трансфекции десяти 150 мм чашек для культивирования ткани при концентрации 10 нг/чашку. Следует отметить, что библиотеки также могут быть сконструированы путем лигирования или сборки по Гибсону, и затем амплифицированы в E. coli, однако

40 бактериальная трансформация уменьшает разнообразие библиотек. При непосредственной трансфекции собранных продуктов реакции разнообразие библиотек ограничено количеством успешно трансфицированных клеток-продуцентов НЕК293.

Таблица 2. Последовательности праймеров

Праймер	Цель	Последовательность
9CapF	Этап 1: прямой	CAGGTCTTCACGGACTCAGACTATCAG (SEQ ID NO: 57)
CDF	Этап 1: инвертируемый Cre	CAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCG (SEQ ID NO: 58)
XF	Этап 2: прямой	ACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCTAGAAC (SEQ ID NO: 59)
AR	Этап 2: обратный	GGAAGTATTCCTTGGTTTTGAACCA (SEQ ID NO: 60)
TF	Прямой для кПЦР	GGTCGCGGTTCTTGTTTTGTGGAT (SEQ ID NO: 61)
TR	Обратный для кПЦР	GCACCCTTGAAGCGCATGAACTCCT (SEQ ID NO: 62)
7xMNNN	588i получение библиотеки обратный	GTATTCCTTGGTTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGT GCMNN MNNMNNMNNMNNMNNMNNNTTGGGCACTCTGGTGGT TTGTC (SEQ ID NO: 63)

Способы получения и очистки вирусов

[000167] Рекомбинантные AAV получали с помощью тройной трансфекции клеток 293Т (АТСС) с использованием полиэтиленимина (PEI). Вирусные частицы собирали из среды через 72 часа после трансфекции и через 120 часов из клеток и среды. Клеточные осадки ресуспендировали в 10 мМ Трис с 2 мМ $MgCl_2$, pH=8, замораживали-размораживали три раза и обрабатывали 100 Ед./мл бензоназы (Epicentre) при 37°C в течение по меньшей мере 1 часа. Вирусные среды концентрировали путем осаждения с помощью 8% полиэтиленгликоля 8000 (Sigma-Aldrich) с 500 мМ хлорида натрия, ресуспендировали в трис- $MgCl_2$ и затем добавляли к лизатам. Затем объединенные исходные суспензии корректировали 500 мМ NaCl, инкубировали при 37°C в течение 30 минут и осветляли центрифугированием при 2000 g. Далее осветленные исходные суспензии очищали с использованием ступенчатых градиентов йодиксанола (Optiprep, Sigma, D1556), (15%, 25%, 40% и 60%). Вирусы концентрировали и готовили в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ФСБ). Титры вируса определяли путем измерения количества резистентных к ДНКазе вирусных геномов с помощью кПЦР, используя линейаризованную геномную плазмиду в качестве стандарта.

[000168] Для получения библиотеки вирусных капсидов две модификации вносили в вышеупомянутый протокол получения вируса, чтобы снизить выработку мозаичных капсидов, которые могут возникать вследствие присутствия множества последовательностей капсида в одной и той же клетке. Во-первых, для того чтобы увеличить вероятность того, что большинство трансфецированных клеток получили только один вариант последовательности капсида трансфецировали только 10 нг плазмиды, несущей библиотеку gAAV-Cap-in-cis (на 150 мм чашку). Во-вторых, вирус собирали через 48 часов (среды) и 60 часов (клетки и среды), а не через 72 часа и 120 часов, как описано выше, чтобы уменьшить до минимума вторичную трансдукцию клеток-продуцентов gAAV, несущим библиотеку, который высвобождается в среду.

Животные

[000169] Мышей линии GFAP-Cre, экспрессирующих Cre под контролем промотора GFAP мыши (012886), и мышей линии C57BL/6J (000664) приобрели в Jackson Laboratory (JAX). Внутривенное введение rAAV-векторов осуществляли путем инъекции вируса в

ретроорбитальный синус. Мышей случайным образом распределяли в группы с заданным размером выборки. Данные ни одной из мышей не были исключены из анализов. Экспериментаторы были осведомлены о распределении мышей по группам выборок.

5 Отбор в условиях *in vivo*

[000170] Для проведения отборов у мышей GFAP-Cre по 1×10^{11} в.г. библиотек капсидов вводили внутривенно взрослым Cre⁺ мышам обоего пола. Через 7-8 дней после инъекции мышей подвергали эвтаназии и собирали головной мозг и спинной
10 мозг. Векторную ДНК выделяли из одного полушария головного мозга и половины спинного мозга с использованием 4-5 мл Trizol (Life Technologies, 15596). Для очистки вирусной ДНК верхнюю водную фракцию собирали в соответствии с протоколом экстракции производителя. Было установлено, что водная фракция содержит
15 значительную часть геномов вирусной ДНК, а также РНК. РНК затем расщепляли путем обработки 1 мкл РНКазы А (Qiagen) при 37°C в течение ночи. Затем для селективного выделения последовательностей Cap из Cre-рекомбинированных геномов использовали двухступенчатую стратегию амплификации с помощью ПЦР. Первый этап амплификации обеспечивал преимущественную амплификацию Cre-
рекомбинированных последовательностей rAAV-Cap-in-cis-lox с использованием праймеров 9CapF и CDF (см. ФИГ. 8А-8В). ПЦР проводили в течение 20-26 циклов при
20 95°C в течение 20 с, 60°C в течение 20 секунд и 72°C в течение 30 с с использованием ДНК-полимеразы Q5 Hot Start High-Fidelity. Продукт ПЦР затем разбавляли в соотношении 1:10 или 1:100 и использовали в качестве матрицы для второй Cre-независимой реакции ПЦР с использованием праймеров XF и AR (ФИГ. 8А-8В и таблица
25 2). Второй этап ПЦР позволил получить фрагмент, который клонировали обратно в акцепторную плазмиду rAAV-ΔCap-in-cis, как описано выше. По 1 мкл реакционных продуктов сборки по Гибсону затем разбавляли в соотношении 1:10 и трансформировали в компетентные клетки SURE2 (Agilent, 200152) для получения индивидуальных клонов для секвенирования.

[000171] Варианты, которые проявили признаки обогащения, клонировали в плазмиду AAV Rep-Cap и трансформировали в компетентные клетки DH5α (NEB). Новые варианты AAV Rep-Cap или AAV2/9 Rep-Cap в качестве контроля затем оценивали с помощью
30 одного из репортерных геномов, описанных выше.

Биораспределение вектора

[000172] Самкам мышей C57BL/6 в возрасте 6 недель внутривенно вводили 1×10^{11} в.г. вектора ssAAV-CAG-GFP, упакованного в указанный капсид AAV. Животных случайным образом распределяли в группы. Через 25 дней после инъекции мышей подвергали эвтаназии, и ткани указанных областей мозга собирали и замораживали при -80°C. ДНК выделяли из образцов ткани с использованием набора DNeasy Blood
40 and Tissue (Qiagen). Векторные геномы детектировали с использованием праймеров для ПЦР, которые связываются с элементом WPRE, и нормировали к геномам мыши с использованием праймеров, специфичных для гена глюкогона мыши. Определение абсолютного количества проводили с использованием серийных разведений
линеаризованных стандартных плазмид с известной концентрацией⁴⁶. Данные одного
45 случайно выбранного животного, которому вводили AAV-PHP.B путем инъекции, удаляли из гистологического анализа в исследовании биораспределения.

Получение образцов ткани, иммуногистохимические исследования и визуализация

[000173] Мышей анестезировали с использованием нембутала и транскардиально

перфузировали с использованием 0,1 М фосфатного буфера (ФБ) при комнатной температуре (RT) при pH=7,4, и затем свежеприготовленным ледяным 4% параформальдегидом (ПФА) в ФБ. Головной мозг животных фиксировали в 4% ПФА в течение ночи и затем нарезали на срезы с помощью вибратора или обрабатывали криопротектором и нарезали на срезы с помощью криостата. ИГХ-исследование проводили на плавающих срезах с использованием первичных и вторичных антител в ФСБ, содержащем 10% сыворотки козы или осла и 0,5% тритона X-100 (детергент не использовали для окрашивания GAD67). Использованные первичные антитела включали мышинное антитело к капсиду AAV (1:20, American Research Products, 03-65158, клон B1), кроличье антитело к GFP (1:1000, Invitrogen, A11122), куриное антитело к GFP (1:1000, Abcam, ab13970), мышинное антитело к CC1 (1:200, Calbiochem, OP80), кроличье антитело к GFAP (1:1000, Dako, Z0334), мышинное антитело к NeuN (1:500, Millipore, MAB377), кроличье антитело к Iba1 (1:500, Biocare Medical, CP290), мышинное антитело к кальбиндину, D28K (1:200, Sigma, CB-955), кроличье антитело к кальретинину (1:1000, Chemicon, AB5054), мышинное антитело к GAD67 (1:1000, Millipore, MAB5406), антитело морской свинки к MAP2 (1:1000, Synaptic Systems, 188004), мышинное антитело к парвальбумину (1:1000, Sigma), антитело к тирозингидроксилазе (1:1000, Aves) и кроличье антитело к CD31 (1:50, Abcam, ab28364). Инкубации первичных антител осуществляли в течение 16-24 часов при комнатной температуре. Срезы затем промывали и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с Alexa (1:1000, Invitrogen), в течение 2-16 часов. Для детектирования капсида с использованием антитела B1, которое распознает внутренний эпитоп, плавающие срезы обрабатывали 2 М HCl в течение 15 минут при 37°C и затем интенсивно промывали ФСБ перед инкубацией с первичным антителом. Для получения некоторых изображений гамму 16-битного зеленого канала (GFP) корректировали, чтобы визуализировать (без перенасыщения) клетки, экспрессирующие GFP как с низкими уровнями, так и с высокими уровнями, присутствующие в одном поле зрения. Во всех случаях изменения гаммы или контраста, а также настроек микроскопа и лазера оставались одинаковыми для серий изображений. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 780, оснащенного следующими объективами: Fluor 5×/0,25 M27 Plan-Apochromat 10×/0,45 M27 (рабочее расстояние 2,0 мм), Plan-Apochromat 25×/0,8 Imm Corr DIC M27 для различных иммерсионных сред и LD CApochromat 40×/1,1 W Corr и масляно-иммерсионным объективом Plan-Apochromat 100×/1,46 DIC. Трехмерные MIP-изображения и дополнительные фильмы создавали с помощью Imaris (Bitplane).

Количественная оценка трансдукции, специфичной в отношении типа клеток [000174] Самок мышей в возрасте 6 недель случайным образом распределяли в группы и внутривенно вводили 2×10^{12} в.г. ssAAV-CAG-NLS-GFP, упакованного в AAV9, AAV-PHPB или AAV-PHPA. Через три недели мышей перфузировали, и головной мозг обрабатывали и окрашивали иммунными агентами против указанного антигена, как описано выше. Количество животных на группу было установлено заранее; данные ни одного из животных не были исключены из анализа. Получали конфокальные одноплоскостные изображения специфичного для типа клеток иммунного окрашивания и нативной флуоресценции NLS-GFP. Чтобы предотвратить систематические ошибки оценки, изображения получали из указанных согласованных областей, идентифицированных путем просмотра только канала иммунного окрашивания, специфичного в отношении типа клеток, а не экспрессии GFP, до получения изображения. Аналогичным образом, подсчет клеток выполняли сначала путем подсчета и маркировки каждой клетки, окрашенной антигеном, специфичным для клетки, просматривая канал

ИГХ. Затем подсчитывали те меченые ИГХ⁺ клетки, которые проявляли наивную флуоресценцию GFP. Вследствие резких различий эффективности трансдукции для различных капсидов подсчет осуществляли без маскировки группы животных.

Просветление тканей

[000175] Мышей перфузировали, как описано выше, с использованием 60-80 мл ледяного 4% ПФА в ФБ при скорости потока 14 мл/мин. Скорость потока затем уменьшали до 2-3 мл/мин и продолжали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем мышей помещали в отдельные оптимизированные камеры и перфузировали с использованием 200 мл рециркулирующего 4% акриламида в ФБ со скоростью 2-3 мл/мин при комнатной температуре в течение ночи с последующим двухчасовым перфузионным промыванием с использованием ФБ для удаления остаточных полимеров/мономеров из сосудистой сети. Процесс полимеризации инициировали путем помещения камер в водяную баню с температурой 42°C с последующей перфузией (2-3 мл/мин) 200 мл рециркулирующего дегазированного ФБ, содержащего 0,25% инициатора полимеризации VA-044, в течение 2-4 часов. Затем мышей перфузировали 8% ДСН в ФБ, pH=7,5 в течение 7 дней. Раствор, содержащий ДСН, обновляли два раза в течение 7 дней, и затем промывали путем перфузии с использованием 2 л нерциркулирующего ФБ в течение ночи. Просветленные образцы тканей закрепляли в растворе RIMS (показатель преломления 1,46) для визуализации.

Получение кортикальных сфероидов из иПСК человека

[000176] Кортикальные сфероиды человека получали из иПСК, как описано ранее. В общих чертах, линии иПСК, полученные от двух здоровых контрольных индивидуумов, размножали на поддерживающих слоях инактивированных эмбриональных фибробластов мыши в следующей среде: DMEM/F12, Knockout Serum™ 20%, 1 mM незаменимых аминокислот (1:100), GlutaMax™ (1:200), β-меркаптоэтанол (0,1 mM), пенициллин и стрептомицин (1:100) (Life Technologies). Культуры регулярно проверяли и поддерживали без микоплазмы. Колонии иПСК отделяли от подложки без повреждения с помощью диспазы (0,35 мг/мл, Invitrogen) и переносили в планшеты с низкой степенью прикрепления в среду для иПСК, дополненную дорсоморфином (5 мкМ, Sigma) и SB-431542 (10 мкМ, Tocris), среду заменяли ежедневно. На шестой день дифференцировки в условиях *in vitro* нейронные сфероиды переносили в среду NPC (Neurobasal A, B27 без витамина A, GlutaMax (1:100), пенициллин и стрептомицин, Life Technologies), которая была дополнена EGF (20 нг/мл) и FGF2 (20 нг/мл), и культивировали до 24 дня, и затем добавляли BDNF (20 нг/мл) и NT3 (20 нг/мл) с 25 дня по 42 день. С 43 дня и далее кортикальные сфероиды поддерживали в среде NPC, которую заменяли каждые 4 дня.

Диссоциация и вирусная инфекция кортикальных сфероидов

[000177] Для ферментативной диссоциации и культивирования в монослое кортикальные сфероиды на 170-200 день дифференцировки в условиях *in vitro* (две независимые нейронные дифференцировки одной линии иПСК от одного человека и одна дифференцировка линии иПСК от другого индивидуума) инкубировали с аккутазой (Innovative Cell Technologies) в течение 25 мин при 37°C, промывали три раза средами NPC и осторожно размельчали пипеткой Р-200. Клетки высевали на покрытые полиорнитинном и ламинином стеклянные покровные стекла (15 мм) в плотности ~300000 клеток/лунку и поддерживали в среде NPC, дополненной BDNF (20 нг/мл) и NT3 (20 нг/мл), в течение первых 24 часов, и затем поддерживали в средах NPC без факторов роста.

[000178] Культуры, выращенные на покровных стеклах, инфицировали каждым из вирусов при титре 1×10^9 в.г./лунку и фиксировали через 5 дней с помощью 4%

параформальдегида (ПФА) в течение 10 мин. Для иммуоцитохимического исследования клетки пермеабилizировали 0,2% тритоном X-100 в течение 10 мин и блокировали 10% козьей сывороткой в ФСБ в течение 1 часа. Затем покровные стекла инкубировали с антителами, разведенными в блокирующем растворе, в течение 2 часов. Ядра

визуализировали с помощью Hoechst 33258 (Life Technologies, 1:10000).

[000179] Изображения клеток получали с помощью микроскопа Zeiss M1 Axioscope с использованием 40х объектива. Долю клеток GFP⁺, имеющих также окрашивание GFAP или MAP2, определяли количественно на изображениях 10 случайных полей на покровное стекло для каждого экспериментального состояния. Представленные

результаты являются средним значением для двух отдельных экспериментов по диссоциации и инфицированию.

[000180] Чтобы инфицировать AAV интактные трехмерные культуры, отдельные кортикальные сфероиды человека на 197 день дифференцировки в условиях *in vitro* переносили на 24 часа в 1,5 мл пробирки (Eppendorf), содержащие 6×10^9 в.г./400 мкл, в среды NPC и фиксировали через 7 дней в 4% ПФА в течение ночи. Фиксированные сфероиды затем переносили в 30% сахарозу в течение 24 часов, фиксировали в О.С.Т. (Fisher Scientific) и разрезали на срезы толщиной 14 мкм. Для иммуогистохимических исследований срезы блокировали с использованием 10% козьей сыворотки в ФСБ, содержащей 0,3% тритона X-100, в течение 1 часа. Изображения получали с помощью

конфокального микроскопа Leica TCS SP8.

Получение вариантов гAAV с помощью CREATE

[000181] Система CREATE основана на использовании генома капсида гAAV (гAAV-Cap-in-cis-lox), в котором полноразмерный ген Cap AAV, контролируемый регуляторными элементами гена Rep AAV (ФИГ. 4B), соединен с инвертируемым Cre-переключателем (ФИГ. 4B). Система обеспечивает селективную амплификацию и выделение последовательностей, которые трансдуцировали целевую популяцию, за счет создания библиотек капсидов на основе остова гAAV-Cap-in-cis-lox и доставки вирусных библиотек животным с экспрессией Cre в определенной популяции клеток (ФИГ. 4C). Поскольку в геноме гAAV-Cap-in-cis-lox отсутствует функциональный ген Rep, Rep должен быть предоставлен в транс-форме для выработки вирусов. Для этой цели плазида AAV2/9 гер-сар может быть модифицирована, чтобы исключить экспрессию белка капсида путем вставки стоп-кодонов в пределах открытой рамки считывания для каждого капсидного белка, VP1-3 (ФИГ. 4D). Такие стоп-кодоны не изменяют аминокислотную последовательность белка, активирующего агрегацию (AAR), который экспрессируется с альтернативной рамки считывания в гене Cap. Упомянутое разделение генома гAAV-Cap-in-cis-lox и вспомогательной системы Rep-AAR AAV обеспечивает эффективное получение гAAV (ФИГ. 4E) и представляет собой основу платформы для отбора CREATE, которая позволяет выделять последовательности капсидных белков из генетически определенных Cre-экспрессирующих клеточных популяций в образцах гетерогенных тканей (см. ФИГ. 8A-8B).

[000182] В случае акцепторного генома гAAV-Cap-in-cis-lox библиотеку вариантов AAV получали путем вставки 7 аминокислот (AA) рандомизированной последовательности (7-членной) между AA588-589 (положение VP1) капсида AAV9 (ФИГ. 4F-4G). Для отбора векторов, которые пересекали ГЭБ и трансдуцировали клетки по всей ЦНС, библиотеку капсидов вводили внутривенно взрослым мышам GFAP-Cre, которые экспрессировали Cre в астроцитах. Через одну неделю ДНК выделяли из ткани головного и спинного мозга и выделяли капсидные последовательности из вирусных

геномов, которые подверглись Cre-опосредуемой рекомбинации, с помощью ПЦР. Полную библиотеку выделенных последовательностей Сар клонировали обратно в акцепторный геном rAAV-Sar-in-cis-lox для получения библиотеки GFAP1 и случайным образом выбирали 13 клонов для секвенирования. Все проверенные последовательности, выделенные из библиотеки GFAP1, были уникальными и, следовательно, плазмидную библиотеку GFAP1 использовали для получения второй вирусной библиотеки и проведения дополнительного раунда отбора у мышей GFAP-Cre. После второго раунда отбора несколько вариантов были обогащены (см. таблицу 3) и проявили повышенную трансдукцию ЦНС (ФИГ. 9А). Наиболее обогащенный вариант, AAV-RHPB, отбирали для дальнейшей оценки тропизма в условиях *in vivo*. AAV-RHPB представлял собой 25% выделенных последовательностей библиотеки и кодировал 7-членную последовательность TLAVPFK (SEQ ID NO: 40).

[000183] Капсиды AAV-RHPB и AAV9 использовали для упаковки одноцепочечного (оц) вектора, несущего репортер GFP, контролируемый повсеместным промотором CAG (ssAAV-CAG-GFP). Оба вектора AAV-RHPB и AAV9 обеспечивали выработку вируса с аналогичной эффективностью (ФИГ. 9В). Векторные геномы (в.г.) любого вектора вводили мышам в возрасте 6 недель в количестве 1×10^{12} путем внутривенной инъекции. Трансдукцию оценивали на основании экспрессии GFP через три недели. Полученные данные указывают на то, что AAV-RHPB с высокой эффективностью трансдуцировал всю ЦНС взрослых мышей, согласно результатам иммуногистохимического окрашивания (ИГХ) GFP (ФИГ. 5А) или на основании нативной флуоресценции eGFP в нескольких областях головного мозга (ФИГ. 5В), спинного мозга (ФИГ. 5С) и сетчатки (ФИГ. 5D). Благодаря использованию методики CLARITY на основе PARS для просветления тканей всего тела²⁴ нативную флуоресценцию eGFP детектировали через просветленные участки ткани из спинного мозга (ФИГ. 5С), коры головного мозга и полосатого тела (ФИГ. 5Е). Полученные трехмерные изображения указывают на повсеместную и эффективную трансдукцию ЦНС вектором AAV-RHPB. За пределами центральной нервной системы тропизм AAV-RHPB и AAV9 на клеточном уровне оказался сходным в нескольких органах, за исключением поджелудочной железы, где эффективность трансдукции AAV-RHPB была снижена по сравнению с AAV9 (ФИГ. 5F).

[000184] Для того чтобы количественно определить эффективность переноса генов в ЦНС и периферические органы с помощью AAV-RHPB по сравнению с AAV9, ряд присутствующих вирусных геномов измеряли в нескольких областях головного мозга и органах через 25 дней после инъекции (ФИГ. 5G). AAV-RHPB обеспечивал значительно более эффективный перенос генов, чем AAV9, в каждую из исследованных областей ЦНС: кору головного мозга (40 раз), полосатое тело (92 раза), таламус (76 раз), мозжечок (41 раз) и спинной мозг (75 раз). Биораспределение векторного генома за пределами центральной нервной системы выявило, что AAV-RHPB менее эффективно переносил гены в поджелудочную железу и надпочечники, чем AAV9 (ФИГ. 5G). Не было обнаружено существенных различий эффективности двух векторов в печени, сердце, скелетных мышцах и почках. При рассмотрении совместно с данными о биораспределении в ЦНС было установлено, что во всех областях ЦНС, за исключением мозжечка, количество вирусных геномов, обнаруженных у мышей, получавших AAV-RHPB, было сходно с таковым, измеренным в печени, т.е. в органе, который был эффективно трансдуцирован AAV9^{21,25}, и больше, чем наблюдали в других органах. Напротив, AAV9-опосредуемый перенос генов в каждую из исследованных областей

ЦНС был по меньшей мере в 120 раз ниже, чем в печени. Следовательно, несмотря на то, что тропизм AAV-RNPВ не является специфичным в отношении ЦНС, улучшенные характеристики переноса генов указанного вектора специфичны в отношении ЦНС.

[000185] AAV9 преимущественно трансдуцирует астроциты при внутривенной доставке взрослым мышам и приматам, отличным от человека, однако он также трансдуцирует нейроны в нескольких областях. Для того чтобы исследовать типы клеток, которые могут быть трансдуцированы AAV-RNPВ, исследовали совместную локализацию GFP с несколькими маркерами, специфичными для разных типов клеток. Благодаря высокой эффективности трансдукции отдельные экспрессирующие GFP

астроциты было трудно различить у мышей, которые получили 1×10^{12} в.г. AAV-RNPВ (ФИГ. 5А), но они могли быть более легко идентифицированы морфологически на основании компактных, сильно разветвленных отростков у животных, которые получили в 10 раз меньше вируса (ФИГ. 5А-5В), и по совместной локализации с ИГХ-окрашиванием GFAP (ФИГ. 6А). Помимо астроцитов исследовали AAV-RNPВ-

трансдуцированные $CC1^+$ олигодендроциты (ФИГ. 6В) и все подтипы нейронов, включая $NeuN^+$ во всем головном мозге (ФИГ. 6С), а также содержащие тирозингидроксилазу (ТН) $^+$ дофаминергические нейроны среднего мозга (ФИГ. 6D), кальбиндин $^+$ клетки Пуркинье мозжечка (ФИГ. 6Е.) и несколько популяций интернейронов (ФИГ. 10А-10D). AAV-RNPВ также трансдуцировал $CD31^+$ эндотелиальные клетки (ФИГ. 10Е), однако, по-видимому, не трансдуцировал $Iba1^+$ микроглию (ФИГ. 10F-10G). Небольшое количество GFP $^+$ микроглии, наблюдаемое после внутривенного введения AAV-RNPВ, согласуется с предыдущими сообщениями о редкой или несуществующей экспрессии генов, опосредуемой AAV, в этой популяции клеток^{14,27-30}. Нативную флуоресценцию GFP в результате экспрессии белка GFP наблюдали во всем мозге в течение года после введения AAV-RNPВ, это указывает на то, что AAV-RNPВ может обеспечить длительную, ЦНС-направленную экспрессию трансгена (ФИГ. 11).

[000186] Затем количественно оценивали фракцию из нескольких типов клеток, трансдуцированных AAV-RNPВ, в сравнении с AAV9. Чтобы облегчить надежный подсчет отдельных клеток конструировали вектор, экспрессирующий локализованный в ядре GFP (NLS-GFP) под контролем промотора CAG, ssAAV-CAG-NLS-GFP.

Однократная инъекция 2×10^{12} в.г./мышь ssAAV-RNPВ:CAG-NLS-GFP приводила к трансдукции большинства $Aldh1L1^+$ астроцитов (ФИГ. 6F и 12А) и $NeuN^+$ нейронов (ФИГ. 6G и 12В), а также небольшой фракции $Olig2^+$ клеток олигодендроцитарной линии дифференцировки (ФИГ. 6H и 12С) во всех исследованных областях головного мозга. Во всех случаях AAV-RNPВ обеспечивал значительно повышенную трансдукцию по сравнению с аналогичной дозой AAV9. Следует отметить, что AAV-RNPВ также трансдуцировал более 94% $Chat^+$ двигательных нейронов во всем спинном мозге (ФИГ. 3I), $91,4 \pm 1,6\%$ ТН $^+$ дофаминергических нейронов среднего мозга (ФИГ. 12D) и $91,7 \pm 5,8\%$ кальбиндин-положительных клеток Пуркинье (n=5). Подытоживая, следует отметить, что внутривенное введение AAV-RNPВ взрослым животным обеспечивало эффективное нацеливание ко многим типам нейронов и глиальных клеток у взрослых мышей.

[000187] Способ, использованный для идентификации AAV-RNPВ, позволял проводить отбор только на основании трансдукции популяции клеток-мишеней; он необязательно позволял проводить отбор на основании специфичности. Тем не менее,

в отдельном исследовании у мышей GFAP-Cre (после двух раундов отбора в условиях *in vivo*) идентифицировали другой вариант капсида AAV, AAV-PHP.A. AAV-PHP.A содержал 7-членную последовательность, YTLSQGW (SEQ ID NO: 38), которая проявляла более эффективную и селективную трансдукцию астроцитов в ЦНС (ФИГ. 7A-7D), а также сниженный тропизм в отношении печени (ФИГ. 7E-7F) и других периферических органов (ФИГ. 7F) по сравнению с AAV9. Увеличение специфичности переноса генов в ЦНС, по сравнению с печенью, обеспечиваемое AAV-PHP.A по сравнению с AAV9, составляло от 400 до 1200 раз, что обусловлено комбинацией улучшенного переноса генов в ЦНС у взрослых субъектов (в 2,6-8 раз выше в зависимости от конкретной области) и сниженным переносом генов в печень (в 152 раза). Два других варианта, обогащенных в данном исследовании (ФИГ. 9A), не проявили повышенной экспрессии GFP в нейронах ЦНС или глии по сравнению с AAV9.

[000188] Для того чтобы определить возможность трансдукции нервных клеток человека векторами AAV-PHP.A и AAV-PHP.B, указанные варианты проверяли на кортикальных нейронах и астроцитах, происходящих из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК человека) с использованием способа трехмерной дифференцировки. Линии иПСК человека от двух индивидуумов дифференцировали в трехмерные структуры, сходные с корой головного мозга (кортикальные сфероиды) и поддерживали в условиях *in vitro* вплоть до 200 дней. Взрослые кортикальные сфероиды содержат поверхностные и глубокие кортикальные возбуждающие нейроны и до 20% астроцитов³¹. В диссоциированных кортикальных сфероидедах, которые были подвергнуты воздействию трех вирусов в монослое, AAV-PHP.B более эффективно трансдуцировал как GFAP-экспрессирующие астроциты, так и MAP2-экспрессирующие нейроны по сравнению с AAV9 или AAV-PHP.A (ФИГ. 12; двухфакторный дисперсионный анализ, $p < 0,01$, $n = 3$). Помимо этого все три вируса были способны трансдуцировать интактные трехмерные кортикальные сфероиды (ФИГ. 5C).

[000189] В двух исследованиях нацеливания к астроцитам идентифицировали варианты AAV-PHP.B, B2 и B3 (ФИГ. 9). Указанные варианты обеспечивали повсеместную трансдукцию как нейронов, так и глии в ЦНС, причем AAV-PHP.A обеспечивал селективно более эффективную трансдукцию астроцитов. Выявление капсидов с различными свойствами из одной и той же схемы отбора было ожидаемым, учитывая, что использованный способ выделения обеспечивал отбор вариантов, трансдуцирующих астроциты, а не любого конкретного промежуточного этапа (этапов), например, связь с сосудистой сетью мозга, транзитоз через ГЭБ или связывание/интернализацию астроцитами. Следовательно, варианты капсидов, которые более эффективны на любом из указанных промежуточных этапов, должны быть выделены в процессе отбора.

[000190] С помощью иммунного окрашивания капсидов было установлено, что AAV-PHP капсиды, в отличие от AAV9, легко локализуются в сосудистой сети мозга вскоре после внутривенного введения (ФИГ. 14A-14B). Помимо этого через 24 ч после введения значительно больше GFP-экспрессирующих клеток наблюдали вдоль сосудистой сети головного мозга у мышей, получивших AAV-PHP.B, по сравнению с теми, которые получили AAV9 или AAV-PHP.A (ФИГ. 14C-14D). При рассмотрении совместно с характеристиками трансдукции AAV-PHP.B и AAV-PHP.A в условиях *in vivo* (ФИГ. 5A-5G, 6A-6I и 7A-7F) и в культурах нейронов человека (ФИГ. 13A-C), полученные данные указывают на то, что хотя векторы AAV-PHP более эффективно связываются с сосудистой сетью мозга, они могут различаться на последующих этапах проникновения или транспорта в разных типах клеток.

Таблица 3

Вариант	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность	% от общего кол-ва	Характеристики в условиях <i>in vivo</i>	Выработка
AAV-RHP.B	TLAVPFK (SEQ ID NO: 40)	ACTTTGGCGGTGCC TTTAAAG (SEQ ID NO: 74)	25,00%	Повсеместная трансдукция ЦНС	Хорошая
AAV-RHP.B2	SVSKPFL (SEQ ID NO: 41)	AGTGTGAGTAAGCC TTTTTTG (SEQ ID NO: 75)	11,76%	Повсеместная трансдукция ЦНС	Хорошая
AAV-RHP.B3	FTLTTPK (SEQ ID NO: 42)	TTTACGTTGACGAC GCCTAAG (SEQ ID NO: 76)	7,35%	Повсеместная трансдукция ЦНС	Хорошая
AAV-RHP.A	YTLSQGW (SEQ ID NO: 38)	TATACTTTGTGCGA GGGTTGG (SEQ ID NO: 77)	40,00%	Повышенная селективность для астроцитов	Слабая
G2A12	QAVRTSL (SEQ ID NO: 37)	CAGGCGGTTAGGA CGTCTTTG (SEQ ID NO: 78)	33,33%	Сходно с AAV9 в головном мозге	Превосходная
G2A15	LAKERLS (SEQ ID NO: 39)	CTTGCGAAGGAGC GGCTTTCG (SEQ ID NO: 79)	20,00%	Сходно с AAV9 в головном мозге	Превосходная

[000191] С помощью CREATE разрабатывали новые варианты AAV, которые обеспечивали эффективный повсеместный перенос генов в ЦНС взрослых мышей после внутривенного введения. Важным преимуществом упомянутой системы является то, что она создает селективное давление для капсидов, которые опосредуют эффективный внутриклеточный перенос и превращение одноцепочечного вирусного генома в устойчивые двухцепочечные ДНК (дцДНК), необходимые для долгосрочной трансдукции (только геномы дцДНК должны быть использованы в качестве субстратов для Cre). Такое дополнительное селективное давление для функциональных капсидов могло способствовать выявлению вариантов AAV-RHP.A и AAV-RHP.B (описанных в настоящем документе) в независимых исследованиях после двух раундов отбора в условиях *in vivo*. Для сравнения, во многих предыдущих способах отбора капсидов AAV в условиях *in vivo* и *in vitro* применяли 3-10 раундов отбора для выявления вариантов капсидов с улучшенными свойствами.

[000192] Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы настоящего изобретения полагают, что CREATE можно применять для обнаружения вариантов капсидов AAV, которые нацелены к определенным Cre-экспрессирующим типам клеток в любом органе. Следовательно, CREATE можно применять не только у трансгенных животных, как показано в настоящем документе, но также для разработки вариантов AAV, которые нацелены к (i) конкретным типам Cre⁺ клеток в культурах сфероидов или органоидных культурах, (ii) клеткам нетрансгенных животных, которые сделали Cre⁺ путем, например, вирусных инъекций, которые обеспечивают экспрессию Cre на основе популяции, проекции³³ или активности, или (iii) Cre⁺ клеткам человека у химерных животных, содержащих клетки человека/

мышь. Учитывая отмеченные различия тропизма AAV между моделями на животных и человеком, схемы отбора, в которых применяют Cre⁺ клетки человека в условиях *in vivo*, экспрессию Cre, специфичную для клеток, в трехмерных клеточных моделях, происходящих из иПСК человека, или будущие Cre-трансгенные игрушки могут быть желательными для разработки улучшенных векторов для вариантов клинического применения. Помимо этого успех способов генной терапии на основе AAV, особенно тех, которые требуют системной доставки, может быть затруднен из-за присутствия нейтрализующих антител к капсиду AAV у человека. Использование CREATE совместно с воздействием объединенных сывороток человека на библиотеки AAV может обеспечить одновременный отбор капсидов с сохраненными или улучшенными характеристиками трансдукции, которые также менее восприимчивы к нейтрализации, опосредуемой антителами.

[000193] CREATE также можно применять с секвенированием следующего поколения для более точного прогнозирования характеристик выделенных последовательностей перед индивидуальным исследованием вариантов. Секвенирование как всего пула вариантов, выделенных из Cre-экспрессирующих клеток-мишеней, так и из неотобранной библиотеки вирусов, должно обеспечивать количественную оценку относительной степени обогащения каждой выделенной последовательности. Более того, секвенирование капсидов, выделенных из множества экспрессирующих cre или неэкспрессирующих Cre популяций, может обеспечить средство для проведения как положительного, так и отрицательного отбора в нескольких типах клеток в одном эксперименте. Такие подходы отбора в условиях *in vivo*-*in silico* должны увеличить мощность CREATE для улучшения переноса генов в ЦНС и другие популяции клеток, сложные для нацеленного воздействия.

[000194] Настоящее изобретение относится к новым нацеливающим к ЦНС последовательностям, которые разрабатывали с применением способа CREATE. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения создавали библиотеки ДНК, которые содержали 7-членные последовательности, вставленные между аминокислотами 588-599 капсидного белка AAV9. После создания библиотек вирусов из библиотек ДНК способ CREATE применяли для отбора и выделения новых капсидных последовательностей AAV, которые трансдуцировали Cre-экспрессирующие клетки через неделю после введения. Варианты, выделенные в ходе отбора, представлены в таблице 4.

Таблица 4

Название	Аминокислотная последовательность	% выделенных клонов	Фенотип
PHP.A	YTLSQGW (SEQ ID NO: 38)	40,0%	Улучшенная трансдукция астроцитов, слабая выработка вирусов, сниженная периферическая трансдукция
PHP.S	QAVRTSL (SEQ ID NO: 37)	33,3%	Улучшенная трансдукция периферических нейронов и миоцитов сердца, сходная с AAV9 трансдукция в пределах ЦНС
G2A3	LAKERLS (SEQ ID NO: 39)	20,0%	Сходно с AAV9 Улучшенная трансдукция ЦНС, повсеместная трансдукция
PHP.B	TLAVPFK (SEQ ID NO: 40)	25,0%	За пределами ЦНС (Сходно с AAV9)
PHP.B2	SVSKPFL (SEQ ID NO: 41)	10,0%	Улучшенная трансдукция ЦНС
PHP.B3	FTLTTPK (SEQ ID NO: 42)	7,5%	Улучшенная трансдукция ЦНС
G2B4	MNSTKNV (SEQ ID NO: 43)	5,0%	Сходно с AAV9
G2B5	VSGGHHS	2,5%	Сходно с AAV9

	(SEQ ID NO: 44)		
--	-----------------	--	--

[000195] CREATE применяли для определения трансдукции трех популяций в ЦНС: GFAP-Cre (астроциты), Vgat-IRES-Cre (ГАМКергические нейроны) и Vglut2-IRES-Cre (подгруппа глутаматергических нейронов). После выделения ДНК из головного мозга и спинного мозга выделенные варианты оценивали с помощью клонирования и/или секвенирования следующего поколения после 2 раундов отбора. Данный подход привел к выявлению векторов, для которых характерна эффективная трансдукция ЦНС (см. таблицу 5). Было обнаружено, что ряд выявленных векторов более эффективен при трансдукции ЦНС, чем PHP.B, например, PHPB-DGT (PHPN), PHPB-EST и PHP.B-ATT-T.

Таблица 5

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO.	Наблюдение
PHP.B-DGT (PHP.N)	DGTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 4	Широкий тропизм в отношении ЦНС, сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-EST	ESTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 5	Сильная трансдукция ЦНС, особенно сильная трансдукция в астроцитах и клетках Пуркинью
PHP.B-GGT	GGTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 6	Сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-ATP	AQTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 7	Сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-ATT-T	ATTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 8	Сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-DGT-T	DGTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 9	Сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-GGT-T	GGTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 10	Сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-SGS	SGSLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 11	Сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-AQP	AQTLAQPFKAQ	SEQ ID NO: 12	Сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-QQP	AQTLQQPFKAQ	SEQ ID NO: 13	Сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-SNP(3)	AQTLSNPFKAQ	SEQ ID NO: 14	Сильная трансдукция ЦНС
PHP.B-SNP	AQTLAVPFSNP	SEQ ID NO:	Сильный тропизм в отношении
		15	ЦНС с высокой специфичностью в отношении нейронов

Пример 3

Способ получения вариантов AAV-PHP.B для эффективной трансдукции Нейроны и глия ЦНС

[000196] 7-Членый пептид AAV-PHP.B и фланкирующие последовательности дополнительно изменяли с помощью сайт-насыщающего мутагенеза трех последовательных аминокислот (см. ФИГ. 13). Пять библиотек насыщения (XXX1-XXX5) получали с помощью ПЦР, смешивали в равных количествах и использовали для получения ДНК. ДНК использовали для получения библиотек капсидов AAV. Отбор выполняли параллельно с помощью CREATE для трансдукции трех популяций ЦНС: GFAP-Cre (астроциты), Vgat-IRES-Cre (ГАМКергические нейроны) и Vglut2-IRES-Cre (подгруппа глутаматергических нейронов). ДНК выделяли из головного мозга и спинного мозга. Выделенные варианты оценивали путем клонирования и/или секвенирования следующего поколения после 2 раундов отбора. Данный подход привел

к выявлению дополнительных векторов, которые проявляли эффективную трансдукцию ЦНС (см. таблицы 3 и 4). Последовательности отбирали для индивидуальной проверки на основании одного или более из следующих критериев: (i) частота, с которой каждый вариант присутствует после двух раундов отбора (последовательности, присутствующие с высокой частотой, вероятно, были обогащены во время отбора в условиях *in vivo*) (ii) присутствие нескольких вариантов последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующих одну и ту же аминокислотную последовательность, и (iii) наблюдаемое обогащение по сравнению с библиотекой вирусов.

Пример 4

Получение вариантов AAV-PHP.B

[000197] 7-Членный пептид AAV-PHP.B (SEQ ID NO: 40) частично рандомизировали, чтобы получить соответствующие варианты с помощью замены с перекрыванием 3 аминокислот последовательности 7-членного пептида и 2 аминокислот, фланкирующих 7-членный пептид, случайными аминокислотами. Обзор стратегии получения вариантов AAV-PHP.B представлен на ФИГ. 21.

[000198] После двух раундов отбора последовательность DGT LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4) отбирали для определения характеристик. Последовательность DGT LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4) независимо отбирали из 2 различных аминокислотных последовательностей:

GAT GGG ACT TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (SEQ ID NO: 54) и (ii)
GAT GGG ACG TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (SEQ ID NO: 55) .

[000199] Согласно некоторым вариантам реализации 7-аминокислотную последовательность (7-членный пептид) вставляли между аминокислотами 588-589 капсидного белка AAV9. Вставка 7-членного пептида AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 37) имеет следующую 7-членную последовательность: QAVRTSL (SEQ ID NO 37). Указанную последовательность отбирали из нуклеотидной последовательности:

CAG GCG GTT AGG ACG TCT TTG (SEQ ID NO 56) .

Пример 5

Характеристика AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) и AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 47)

[000200] В данном примере представлена дополнительная характеристика двух вариантов AAV, AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) и AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 47). AAV-PHP.N отличается от AAV-PHP.B двумя заменами аминокислот (A587D и Q588G). Капсид AAV-PHP.N проявлял повышенную эффективность доставки генов в несколько популяций нейронов в ЦНС по сравнению с капсидом AAV-PHP.N, который может обеспечить перенос генов в большую фракцию клеток или более высокую частоту трансдукции при использовании более низких доз вируса.

[000201] Для того чтобы количественно оценить эффективность трансдукции AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) и AAV-PHP.B, молодым взрослым мышам внутривенно вводили 1×10^{11} в.г. одноцепочечного (оц) AAV-CAG-NLS-GFP, упакованного в AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) или AAV-PHP.B (ФИГ. 23A-E). Через три недели после введения оценивали долю DAPI⁺ клеток, которые экспрессировали локализованный в ядре GFP, в коре головного мозга и полосатом теле. AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) трансдуцировал значительно большую долю DAPI⁺ клеток в коре головного мозга, чем AAV-PHP.B (ФИГ. 24A, 24D). Аналогичную тенденцию наблюдали в полосатом теле ($p=0,054$). Затем определяли долю нейронов, трансдуцированных каждым вектором в коре

головного мозга и полосатом теле (NeuN⁺), а также нейронах Пуркинье в мозжечке (кальбиндин⁺) (ФИГ. 24В, 24Е). AAV-PHPN обеспечил значительно более эффективную трансдукцию нейронов в каждой области. Повышенная эффективность трансдукции с помощью AAV-PHPN по сравнению с AAV-PHP.B дополнительно подтверждалась обнаруженным значительным увеличением интенсивности флуоресценции GFP в клетке (среднее значение медианы интенсивности флуоресценции GFP на ядро) в головном мозге мышей, которые получили AAV-PHPN (SEQ ID NO: 46) (ФИГ. 24G).

Пример 6

Количественная оценка трансдукции с применением AAV-PHP.S

[000202] Капсид AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 47) обеспечивал эффективную трансдукцию периферических сенсорных нейронов в ганглиях задних корешков спинного мозга (DRG) и во внутренних органах, включая кишечную нервную систему. Исследовали эффективность трансдукции периферических нейронов с применением AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 47) по сравнению с AAV9 (SEQ ID NO: 45). AAV-PHP.S и AAV9 использовали для упаковки одного и того же генома AAS-CAG-NLS-GFP, использованного ранее, и вирусы вводили путем внутривенной инъекции молодым взрослым мышам в дозе 1×10^{12} в.г. Через три недели определяли долю нейронов PGP9.5+ DRG, трансдуцированных обоими векторами. У мышей, получивших AAV-PHP.S, наблюдали значительное увеличение доли PGP9.5+ клеток, которые экспрессировали ядерный GFP, и значительное увеличение экспрессии GFP (согласно результатам измерения интенсивности флуоресценции) на клетку. Помимо этого средняя интенсивность флуоресценции GFP в клетках в сердечных ганглиях также была повышена по сравнению с AAV9 (ФИГ. 24А-Г).

[000203] Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы настоящего изобретения полагают, что AAV-PHP.S можно применять для исследования и лечения различных заболеваний и травм, включая, но не ограничиваясь ими, атаксию Фридрейха, сердечную недостаточность, ишемическую болезнь сердца, гипертрофию сердца, хроническую боль и повреждение периферических нервов.

Пример 7

Способ лечения с применением нацеливающих пептидов

[000204] Выявляют субъекта, имеющего расстройство, которое можно лечить путем применения нуклеиновой кислоты для экспрессии у субъекта. Затем субъекту вводят первое количество AAV-вектора, который содержал полинуклеотид, который должен быть экспрессирован. Полинуклеотид кодирует терапевтический белок. AAV-вектор содержит капсидный белок, который содержал часть нацеливающего пептида, содержащую или состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание белка, который должен быть экспрессирован, к соответствующей системе у субъекта. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до момента достижения экспрессии терапевтически эффективного количества белка в соответствующей системе у субъекта.

Пример 8

Способ лечения болезни Хантингтона

[000205] Выявляют субъекта, имеющего болезнь Хантингтона. Затем субъекту вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, который должен быть экспрессирован. Полинуклеотид кодирует терапевтический белок. AAV-вектор содержал капсидный белок, который содержит часть нацеливающего пептида,

состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить у субъекта правильное нацеливание белка, который должен быть экспрессирован, в нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до момента достижения экспрессии терапевтически эффективного количества белка в нервной системе субъекта.

Пример 9

Способ лечения болезни Хантингтона

[000206] Выявляют субъекта, имеющего болезнь Хантингтона. Затем субъекту вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий короткую некодирующую РНК (короткую шпилечную РНК (кшРНК) или микроРНК (миРНК)), сконструированную для уменьшения экспрессии белка хантингтина посредством ее последовательности). AAV-вектор содержит капсидный белок, который содержит часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание указанного полинуклеотида к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества короткой некодирующей РНК в нервной системе субъекта.

Пример 10

Способ лечения болезни Хантингтона

[000207] Выявляют субъекта, имеющего болезнь Хантингтона. Затем субъекту систематически вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий белок с цинковым пальцем (ZFP), сконструированный для подавления транскрипции гена хантингтина (HTT). AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание ZFP к нервной системе, помимо других органов. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества ZFP в нервной системе субъекта.

Пример 11

Способ лечения болезни Хантингтона

[000208] Выявляют субъекта, имеющего болезнь Хантингтона. Затем субъекту систематически вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий короткую некодирующую РНК (короткую шпилечную РНК (кшРНК) или микроРНК (миРНК)), разработанную специалистом в данной области техники для снижения экспрессии белка хантингтина. AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание полинуклеотида к нервной системе, помимо других органов. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества короткой некодирующей РНК в нервной системе субъекта.

Пример 12

Способ лечения болезни Альцгеймера

[000209] Выявляют субъекта, имеющего болезнь Альцгеймера. Затем субъекту вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий антитела к A β или фрагменты антител. AAV вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из

последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание антитела или фрагмента антитела, который должен быть экспрессирован, к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента антитела в нервной системе субъекта.

Пример 13

Способ лечения болезни Альцгеймера

[000210] Выявляют субъекта, имеющего болезнь Альцгеймера. Затем субъекту вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий белок аполипопротеина E (ApoE), предпочтительно полипептид apoE2 из apoE человека или модифицированный вариант apoE2. AAV-вектор, содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание антитела или фрагмента антитела, который должен быть экспрессирован, к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения терапевтически эффективного количества белка ApoE в нервной системе субъекта.

Пример 14

Способ лечения СМА

[000211] Выявляют субъекта, имеющего спинальную мышечную атрофию (СМА). Затем субъекту вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид выживаемости моторных нейронов 1 (SMN1). AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание белка SMN, который должен быть экспрессирован, к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения терапевтически эффективного количества белка SMN в нервной системе субъекта.

Пример 15

Способ лечения атаксии Фридрейха

[000212] Выявляют субъекта, имеющего атаксию Фридрейха. Затем субъекту систематически вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий белок фратаксин. AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание белка фратаксина, который должен быть экспрессирован, к нервной системе и сердцу, помимо других органов. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества белка фратаксина в нервной системе и сердце субъекта.

Пример 16

Способ лечения болезни Помпе

[000213] Выявляют субъекта, имеющего болезнь Помпе. Затем субъекту систематически вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий белок кислой альфа-глюкозидазы (GAA). AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание белка GAA, который должен быть

экспрессирован, к нервной системе и сердцу, помимо других органов. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества белка GAA в нервной системе и сердце субъекта.

5 Пример 17

Способ лечения поздней инфантильной формы нейронального цероидного липофусциноза

[000214] Выявляют субъекта, имеющего позднюю инфантильную форму нейронального цероидного липофусциноза (LINCL). Затем субъекту систематически вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид CLN2, кодирующий белок трипептидилпептидазы 1. Вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание белка трипептидилпептидазы 1, который должен быть экспрессирован, к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества белка трипептидилпептидазы 1 в нервной системе субъекта.

Пример 18

Способ лечения болезни Баттена

[000215] Выявляют субъекта, имеющего ювенильную форму нейронального цероидного липофусциноза (NCL) (болезнь Баттена). Затем субъекту систематически вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид CLN3, кодирующий белок баттенин. AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание белка баттенина, который должен быть экспрессирован, к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества белка баттенина в нервной системе субъекта.

30 Пример 19

Способ лечения болезни Канавана

[000216] Выявляют субъекта, имеющего заболевание Канавана. Затем субъекту систематически вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид ASPA, кодирующий белок аспартоацилазы. AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание белка аспартоацилазы, который должен быть экспрессирован, к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества белка аспартоацилазы в нервной системе субъекта.

Пример 20

Способ лечения болезни Паркинсона

[000217] Выявляют субъекта, имеющего болезнь Паркинсона. Затем субъекту систематически вводят первое количество одного или более AAV-векторов, каждый из которых содержит один или более полинуклеотидов, кодирующих фермент(ы), необходимый для увеличения выработки дофамина из недофаминаергических клеток. AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-

53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание указанного фермента (ов), который будет экспрессирован, к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества фермента (ов) в нервной системе субъекта.

5 Пример 21

Способ лечения болезни Паркинсона

[000218] Выявляют субъекта, имеющего болезнь Паркинсона. Затем субъекту систематически вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий модифицированную, устойчивую к агрегации форму белка альфа-синуклеина, которая уменьшает агрегацию эндогенного альфа-синуклеина. AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание устойчивого к агрегации белка альфа-синуклеина, который должен быть экспрессирован, к нервной системе.

15 При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества белка в нервной системе субъекта.

Пример 22

Способ лечения бокового амиотрофического склероза или деменции лобного типа

[000219] Выявляют субъекта, имеющего боковой амиотрофический склероз или деменцию лобного типа, вызванную мутацией в C9ORF72. Затем субъекту вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий неcodирующую молекулу (молекулы) РНК, которая уменьшает очаги ядерной РНК, вызванные удлинением гексануклеотида (GGGGCC) в клетках субъектов. AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из

25 любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание молекулы (молекул) РНК, которые должны быть экспрессированы, к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества молекулы (молекул) РНК в нервной системе субъекта.

30 Пример 23

Способ лечения рассеянного склероза

[000220] Выявляют субъекта, имеющего рассеянный склероз. Затем субъекту систематически вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий трофический или иммуномодулирующий фактор, например,

35 ингибирующий лейкемию фактор (LIF) или цилиарный нейротрофический фактор (CNTF). AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание указанного фактора, который должен быть экспрессирован, к нервной системе. При необходимости

40 субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества фактора в нервной системе субъекта.

Пример 24

Способ лечения бокового амиотрофического склероза

[000221] Выявляют субъекта, имеющего боковой амиотрофический склероз, вызванный мутацией SOD1. Затем субъекту вводят первое количество AAV-вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий короткую неcodирующую РНК (короткую шпилечную РНК (кшРНК) или микроРНК (миРНК)), разработанную специалистом в данной области техники для снижения экспрессии мутированного белка

SOD1. AAV-вектор содержит капсидный белок, содержащий часть нацеливающего пептида, состоящую из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68, 74-93, так, чтобы обеспечить правильное нацеливание короткой некодирующей РНК, которая должна быть экспрессирована, к нервной системе. При необходимости субъекту вводят вторую или третью дозу вектора до достижения экспрессии терапевтически эффективного количества короткой некодирующей РНК в нервной системе субъекта.

[000222] Все ссылки, приведенные в настоящем документе, включая патенты, заявки на патенты, статьи, печатные издания, и тому подобное, и ссылки, приведенные в них, в той мере, в которой это еще не сделано, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В тех случаях, когда любое из определений или терминов, представленных в ссылках, включенных в настоящий документ посредством ссылки, отличается от терминов и обсуждений, представленных в настоящем документе, настоящие термины и определения имеют приоритет.

[000223] Приведенный выше текст описания считается достаточным для реализации настоящего изобретения специалистом в данной области техники. В приведенном выше описании и примерах подробно описаны некоторые предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения и описаны наилучшие способы, предусмотренные авторами настоящего изобретения. Однако следует понимать, что независимо от того, насколько подробно описано настоящее изобретение, настоящее изобретение может быть реализовано многими способами, и настоящее изобретение должно быть истолковано в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

[000224] По меньшей мере некоторые из описанных выше вариантов реализации, один или более элементов, используемых в варианте реализации, могут быть взаимозаменяемо использованы в другом варианте реализации, за исключением случаев, когда такая замена не является технически осуществимой. Специалисты в данной области техники поймут, что различные другие исключения, добавления и модификации могут быть сделаны в способах и структурах, описанных выше, в пределах объема заявленного предмета изобретения. Подразумевается, что все такие модификации и изменения находятся в пределах объема заявленного предмета настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

[000225] В отношении использования по существу любых множественных и/или сингулярных терминов в настоящем документе специалисты в данной области техники могут осуществлять перевод из множественного числа в единственное число, и/или из единственного числа в множественное число в соответствии с контекстом и/или применением. Различные перестановки единственного/множественного числа могут быть явным образом упомянуты в настоящем документе для ясности.

[000226] Специалисты в данной области техники поймут, что, в целом, используемые в настоящем документе термины и особенно в прилагаемой формуле изобретения (например, части прилагаемой формулы изобретения) обычно обозначены как «открытые» термины (например, термин «включая» следует толковать как «включая, но не ограничиваясь», термин «имеющий» следует толковать как «имеющий по меньшей мере», термин «включает» следует толковать как «включает, но не ограничивается» и т.д.). Специалисты в данной области техники поймут, что если предполагается конкретное количество перечислений заявленных пунктов формулы изобретения, такое намерение будет явным образом указано в формуле настоящего изобретения, и при отсутствии такого перечисления такое намерение отсутствует. Например, чтобы

облегчить понимание настоящего изобретения в нижеследующей прилагаемой формуле изобретения могут быть использованы вводные выражения «по меньшей мере один» и «один или более», чтобы заявить перечисления пунктов формулы настоящего изобретения. Однако использование таких выражений не должно быть истолковано

5 как подразумевающее, что введение перечисления пунктов формулы настоящего изобретения с помощью неопределенного артикля «а» или «an» ограничивает любой конкретный пункт формулы настоящего изобретения, содержащий такое перечисление пунктов формулы, сводя его к вариантам реализации, содержащим только одно такое перечисление, даже в тех случаях, когда этот же пункт формулы настоящего изобретения

10 содержит вводные выражения «один или более» или «по меньшей мере один» и неопределенные артикли, такие как «а» или «an» (например, «а» и/или «an» следует толковать как «по меньшей мере один» или «один или более»); то же самое справедливо и для использования определенного артикля, используемого для введения перечислений пунктов формулы изобретения. Помимо этого, даже если конкретное количество

15 перечислений заявленных пунктов формулы изобретения раскрыто в явном виде, специалисты в данной области техники поймут, что такое перечисление следует толковать как означающее по меньшей мере перечисленное количество (например, безусловное перечисление «двух перечислений», без других модификаторов, означает по меньшей мере два перечисления, или два или более перечислений). Более того, в тех

20 случаях, когда используется общепринятое определение, аналогичное «по меньшей мере один из А, В и С и т.д.», в целом такая конструкция подразумевает, что специалист в данной области техники понимает значение общепринятых определений (например, «система, имеющая по меньшей мере одно из А, В и С», будет включать, но не ограничивается системами, которые имеют только А, только В, только С, А и В вместе,

25 А и С вместе, В и С вместе, и/или А, В и С вместе и т.д.). В тех случаях, когда используется общепринятое определение, аналогичное «по меньшей мере одно из А, В или С и т.д.», в целом такая конструкция подразумевает, что специалист в данной области техники понимает общепринятое определение (например, «система, имеющая по меньшей мере одно из А, В или С», будет включать, но не ограничивается системами,

30 которые имеют только А, только В, только С, А и В вместе, А и С вместе, В и С вместе, и/или А, В и С вместе и т.д.). Специалисты в данной области техники поймут, что практически любое разделительное слово и/или выражение, представляющие два или более альтернативных терминов, будь то в описании, формуле изобретения или чертежах, следует понимать, как подразумевающее возможности включения одного из терминов,

35 любого из терминов или обоих терминов. Например, выражение «А или В» следует понимать как включающее возможности «А» или «В» или «А и В».

[000227] Помимо этого, если признаки или аспекты настоящего изобретения описаны в терминах групп Маркуша, специалисты в данной области техники поймут, что настоящее изобретение также тем самым описано в терминах любого отдельного члена

40 или подгруппы членов группы Маркуша.

[000228] Специалист в данной области техники поймет, что, для любых и всех целей, таких как предоставление письменного описания, все диапазоны, раскрытые в настоящем документе, также включают любые и все возможные поддиапазоны и комбинации поддиапазонов. Любой перечисленный диапазон может быть легко

45 рассмотрен, как описывающий в достаточной степени и позволяющий разделить этот же диапазон на по меньшей мере равные половины, третьи, четвертые, пятые, десятые части и т.д. В качестве неограничивающего примера каждый диапазон, описанный в настоящем документе, может быть легко разбит на нижнюю треть, среднюю треть и

верхнюю треть и т.д. Специалист в данной области техники поймет, что все выражения, такие как «вплоть до», «по меньшей мере», «более чем», «менее чем» и т.п., включают перечисленное число и относятся к диапазонам, которые впоследствии могут быть разбиты на поддиапазоны, как обсуждалось выше. В заключение, как будет понятно специалисту в данной области техники, диапазон включает каждый отдельный член. Так, например, группа, имеющая 1-3 изделия, относится к группам, имеющим 1, 2 или 3 изделия. Аналогичным образом, группа, имеющая 1-5 изделий, относится к группам, имеющим 1, 2, 3, 4 или 5 изделий и т.д.

[000229] Несмотря на то, что различные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения были описаны в настоящем документе, другие аспекты и варианты реализации будут очевидны специалистам в данной области техники. Различные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения, раскрытые в настоящем документе, предназначены для иллюстрации и не предназначены для ограничения, при этом истинная сущность и объем настоящего изобретения раскрыты в нижеследующей формуле изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Пептид, способный нацеливать AAV, содержащий последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$, где

X_1 представляет собой D, A, E, Q, N, G или S;

X_2 представляет собой G, N, S, T, Q, R или V;

X_3 представляет собой T, S или N;

X_4 представляет собой L или V;

X_5 представляет собой A, S, Q, P или T;

X_6 представляет собой V, T, Q, N, L или M;

X_7 представляет собой P;

X_8 представляет собой F, Y, V, L, C или S;

X_9 представляет собой K, R или S;

X_{10} представляет собой A или N; и

X_{11} представляет собой Q или P, при этом указанный пептид, способный нацеливать AAV, не содержит аминокислотную последовательность AQTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1).

2. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, где аминокислоты $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой PFKAQ или PFSNP.

3. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1 или 2, где аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAV, LAT, LAQ, LQQ или LSN.

4. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, отличающийся тем, что X_1 представляет собой D, X_2 представляет собой G, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L, X_6 представляет собой V либо T или X_8 представляет собой F.

5. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, отличающийся тем, что X_4 представляет собой L, X_5 представляет собой A, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой P, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q.

6. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 5, отличающийся тем, что аминокислоты

$X_1X_2X_3$ представляют собой DGT, GGT, EGT, EGS, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT или ART.

7. Пептид, способный нацеливать AAV, по п.1, где аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой DGT, GGT, EGT, EGS, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, AQT или ART.

8. Пептид, способный нацеливать AAV, по п.1, где указанные 11 смежных аминокислот представляют собой AQT LAVPFSNP (SEQ ID NO: 15).

9. Пептид, способный нацеливать AAV, по п.1, где аминокислоты $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой PFKAQ, аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAV и аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой DGT, DST, EGT, EST, EGS, GGT, SGS, QGT, NQT, SGN или AVT.

10. Пептид, способный нацеливать AAV, по п.1, где аминокислоты $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой PFKAQ, аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAT и аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой AQT, ATT, DGT или GGT.

11. Пептид, способный нацеливать AAV, по п.1, где аминокислоты $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой PFKAQ, аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой AQT и аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAQ, LQQ, LSN, LST, LPQ, LSQ или LQL.

12. Пептид, способный нацеливать AAV, по п.11, где аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAQ, LQQ или LSN.

13. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, отличающийся тем, что аминокислоты X_1X_2 представляют собой AQ, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой P, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q.

14. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 13, отличающийся тем, что X_3 представляет собой T и X_4 представляет собой L.

15. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 13, отличающийся тем, что X_5 представляет собой A.

16. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, отличающийся тем, что X_1 представляет собой A, X_2 представляет собой Q, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q.

17. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 16, отличающийся тем, что аминокислоты $X_5X_6X_7$ представляют собой ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP.

18. Пептид, способный нацеливать AAV, по п.1, где аминокислоты $X_5X_6X_7$ представляют собой AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP.

19. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, отличающийся тем, что аминокислоты $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ представляют собой AQT LAV и $X_{10}X_{11}$ представляют собой AQ.

20. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, отличающийся тем, что аминокислоты $X_7X_8X_9$ представляют собой PFK.

21. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, отличающийся тем, что

аминокислоты $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ представляют собой AQTLAVPF.

22. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, отличающийся тем, что аминокислоты $X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой KAQ, KAP или SNP.

23. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, отличающийся тем, что указанная последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой одну из последовательностей SEQ ID NO: 2-36.

24. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, где последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой одну из последовательностей SEQ ID NO: 4-26.

25. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, где последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой одну из последовательностей SEQ ID NO: 4-15.

26. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, где последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой последовательность SEQ ID NO: 4.

27. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, где последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой последовательность SEQ ID NO: 5.

28. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, где последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой последовательность SEQ ID NO: 6.

29. Пептид, способный нацеливать AAV, по п. 1, где последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой последовательность SEQ ID NO: 9.

30. Фармацевтическая композиция для доставки нуклеиновой кислоты, содержащая пептид, способный нацеливать AAV, по любому из пп. 1-29.

31. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид, способный нацеливать AAV, по любому из пп. 1-29.

32. Белок капсида AAV, содержащий пептид, способный нацеливать AAV, по любому из пп. 1-29.

33. Способ доставки нуклеиновой кислоты в целевое окружение в организме субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

обеспечение композиции, содержащей AAV, причем указанный AAV содержит капсидный белок, который содержит последовательность из 11 смежных аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$, и при этом указанный AAV содержит нуклеиновую кислоту для доставки в указанное целевое окружение в организме указанного субъекта, где

X_1 представляет собой D, A, E, Q, N, G или S;

X_2 представляет собой G, N, S, T, Q, R или V;

X_3 представляет собой T, S или N;

X_4 представляет собой L или V;

X_5 представляет собой A, S, Q, P или T;

X_6 представляет собой V, T, Q, N, L или M;

X_7 представляет собой P;

X_8 представляет собой F, Y, V, L, C или S;

X_9 представляет собой K, R или S;

X_{10} представляет собой A или N; и

X_{11} представляет собой Q или P, причем указанный капсидный белок не содержит

аминокислотную последовательность AQTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1); и

введение указанной композиции указанному субъекту, при этом указанное целевое окружение представляет собой сердце, нервную систему или их комбинацию.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что нервная система представляет собой

центральную нервную систему, периферическую нервную систему или их комбинацию.

35. Способ по п. 33, отличающийся тем, что указанное целевое окружение включает нейроны, астроциты, кардиомиоциты или их комбинацию.

36. Способ по п. 33, отличающийся тем, что указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

37. Способ по любому из пп. 33-36, отличающийся тем, что указанная нуклеиновая кислота для доставки в указанное целевое окружение содержит одно или более из следующего:

- а) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трофический фактор, фактор роста или растворимый белок;
- б) кДНК, которая восстанавливает функцию белка у человека или животных, несущих генетическую мутацию (мутации) в указанном гене;
- с) кДНК, которая кодирует белок, который можно применять для контроля или изменения активности или состояния клетки;
- д) кДНК, которая кодирует белок или нуклеиновую кислоту, применяемую для оценки состояния клетки;
- е) кДНК и/или связанную с ней направляющую РНК для осуществления модификации генома;
- ф) последовательность для редактирования генома посредством гомологичной рекомбинации;
- г) последовательность ДНК, кодирующую терапевтическую РНК;
- h) систему доставки кшРНК или искусственной миРНК; и
- i) последовательность ДНК, которая влияет на сплайсинг эндогенного гена.

38. Способ по любому из пп. 33-37, отличающийся тем, что указанный субъект, нуждающийся в этом, является субъектом, страдающим от или подверженным риску развития одного или более из: хронической боли, сердечной недостаточности, сердечных аритмий, атаксии Фридрейха, болезни Хантингтона (БХ), болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП), бокового амиотрофического склероза (БАС), спинальной мышечной атрофии типов I и II (СМА I и II), атаксии Фридрейха (ФА), спинocerebellarной атаксии, лизосомальных болезней накопления, которые поражают клетки в ЦНС.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что указанная лизосомальная болезнь накопления представляет собой болезнь Краббе, болезнь Сандхоффа, болезнь Тея-Сакса, болезнь Гоше (типа I, II или III), болезнь Ниманна-Пика (дефицит NPC1 или NPC2), синдром Гурлера, болезнь Помпе или болезнь Баттена.

40. Способ по любому из пп. 33-39, отличающийся тем, что указанный AAV вводят субъекту путем внутривенного введения или системного введения.

41. Способ по п. 33, отличающийся тем, что указанная нервная система представляет собой центральную нервную систему.

42. Способ по любому из пп. 33-40, отличающийся тем, что указанную нуклеиновую кислоту доставляют субъекту в ганглии задних корешков спинного мозга, внутренние органы или их комбинацию.

43. Способ по любому из пп. 33-40, отличающийся тем, что указанную нуклеиновую кислоту доставляют субъекту в астроциты, нейроны или их комбинацию.

44. Способ по любому из пп. 33-43, отличающийся тем, что указанный субъект является взрослым животным.

45. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой PFKAQ или PFSNP.

46. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAV, LAT, LAQ, LQQ или LSN.

47. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что X_1 представляет собой D, X_2 представляет собой G, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L, X_6 представляет собой V или T или X_8 представляет собой F.

48. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что X_4 представляет собой L, X_5 представляет собой A, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой P, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой DGT, GGT, EGT, EGS, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT или ART.

50. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой DGT, GGT, EGT, EGS, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, AQT или ART.

51. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что 11 смежных аминокислот представляют собой AQT LAVPFSNP (SEQ ID NO: 15).

52. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой PFKAQ, аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAV и аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой DGT, DST, EGT, EST, EGS, GGT, SGS, QGT, NQT, SGN или AVT.

53. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой PFKAQ, аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAT и аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой AQT, ATT, DGT или GGT.

54. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой PFKAQ, аминокислоты $X_1X_2X_3$ представляют собой AQT и аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAQ, LQQ, LSN, LST, LPQ, LSQ или LQL.

55. Способ по п.54, отличающийся тем, что аминокислоты $X_4X_5X_6$ представляют собой LAQ, LQQ или LSN.

56. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты X_1X_2 представляют собой AQ, X_6 представляет собой V, X_7 представляет собой P, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q.

57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что X_3 представляет собой T и X_4 представляет собой L.

58. Способ по п. 56, отличающийся тем, что X_5 представляет собой A.

59. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что X_1 представляет собой A, X_2 представляет собой Q, X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой L, X_8 представляет собой F, X_9 представляет собой K, X_{10} представляет собой A и X_{11} представляет собой Q.

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что аминокислоты $X_5X_6X_7$ представляют собой ATP, AQP, QQP, PQR, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP.

61. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_5X_6X_7$ представляют собой AVP, ATR, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP или TTP.

62. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ представляют собой AQTLAV и $X_{10}X_{11}$ представляют собой AQ.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что аминокислоты $X_7X_8X_9$ представляют собой PFK.

64. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ представляют собой AQTLAVPF.

65. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что аминокислоты $X_9X_{10}X_{11}$ представляют собой KAP, KAP или SNP.

66. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой одну из последовательностей SEQ ID NO: 2-36.

67. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой одну из последовательностей SEQ ID NO: 4-26.

68. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой одну из последовательностей SEQ ID NO: 4-15.

69. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой последовательность SEQ ID NO: 4.

70. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой последовательность SEQ ID NO: 5.

71. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой последовательность SEQ ID NO: 6.

72. Способ по любому из пп. 33-44, отличающийся тем, что последовательность из 11 смежных аминокислот представляет собой последовательность SEQ ID NO: 9.

Перечень последовательностей

<110> Калифорнийский технологический институт

Deverman, Benjamin E.
Gradinaru, Viviana
Chan, Ken Y.

<120> НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ПЕПТИДЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ
ДОСТАВКИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ (AAV)

<130> CALTE.118WO

<150> 62/266184

<151> 2015-12-11

<150> 62/421891

<151> 2016-11-14

<160> 93

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PNP.B

<400> 1

Ala Gl n Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gl n

Страница

1

5

10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PNP.B2

<400> 2

Ala	Gln	Ser	Val	Ser	Lys	Pro	Phe	Leu	Ala	Gln
1				5					10	

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PNP.B3

<400> 3

Ala	Gln	Phe	Thr	Leu	Thr	Thr	Pro	Lys	Ala	Gln
1				5					10	

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PNP.N/PHP.B-DGT

Страница

<400> 4
 Asp Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-EST

<400> 5
 Glu Ser Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-GGT

<400> 6
 Gly Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

Страница

<220>

<223> PHP.B-ATP

<400> 7

Ala	Gln	Thr	Leu	Ala	Thr	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln
1				5					10	

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PHP.B-ATT-T

<400> 8

Ala	Thr	Thr	Leu	Ala	Thr	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln
1				5					10	

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PHP.B-DGT-T

<400> 9

Asp	Gly	Thr	Leu	Ala	Thr	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln
1				5					10	

<210> 10

Страница

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-GGT-T

<400> 10
 Gly Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-SGS

<400> 11
 Ser Gly Ser Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-AQP

<400> 12
 Ala Gln Thr Leu Ala Gln Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

Страница

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-QQP

<400> 13
 Ala Gln Thr Leu Gln Gln Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-SNP(3)

<400> 14
 Ala Gln Thr Leu Ser Asn Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-SNP

Страница

<400> 15
 Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Ser Asn Pro
 1 5 10

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-QGT

<400> 16
 Gln Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-NQT

<400> 17
 Asn Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

Страница

<220>

<223> PHP.B-EGS

<400> 18

Glu Gly Ser Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PHP.B-SGN

<400> 19

Ser Gly Asn Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PHP.B-EGT

<400> 20

Glu Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 21

<211> 7

Страница

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-DST

<400> 21
 Pro His Pro Asx Asp Ser Thr
 1 5

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-DST

<400> 22
 Ala Val Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-STP

<400> 23
 Ala Gln Thr Leu Ser Thr Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

Страница

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-PQP

<400> 24
 Ala Gln Thr Leu Pro Gln Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-SQP

<400> 25
 Ala Gln Thr Leu Ser Gln Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PHP.B-QLP

<400> 26

Страница

Ala Gln Thr Leu Gln Leu Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> РНР.В-ТМР

<400> 27

Ala Gln Thr Leu Thr Met Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> РНР.В-ТТР

<400> 28

Ala Gln Thr Leu Thr Thr Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

Страница

<223> РНР.А

<400> 29

Ala Gln Tyr Thr Leu Ser Gln Gly Trp Ala Gln
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 30

Ala Gln Met Asn Ala Thr Lys Asn Val Ala Gln
1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 31

Ala Gln Val Ser Gly Gly His His Ser Ala Gln
1 5 10

<210> 32

Страница

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 32
 Ala Gln Thr Leu Pro Gln Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> РНР.В-АТР

<400> 33
 Ala Gln Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 34

Страница

Ala Gln Thr Leu Thr Met Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 35

Ala Gln Thr Leu Thr Met Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 36

Ala Gln Thr Leu Ser Lys Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

Страница

<220>

<223> AAV-PHP.S

<400> 37

Gln Ala Val Arg Thr Ser Leu
1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PHP.A

<400> 38

Tyr Thr Leu Ser Gln Gly Trp
1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> G2A3

<400> 39

Leu Ala Lys Glu Arg Leu Ser
1 5

<210> 40

Страница

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> РНР.В

<400> 40
 Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys
 1 5

<210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> РНР.В2

<400> 41
 Ser Val Ser Lys Pro Phe Leu
 1 5

<210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> РНР.В3

<400> 42
 Phe Thr Leu Thr Thr Pro Lys
 1 5

Страница

<210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> G2B4

<400> 43
 Met Asn Ser Thr Lys Asn Val
 1 5

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> G2B5

<400> 44
 Val Ser Gly Gly His His Ser
 1 5

<210> 45
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность капсида AAV9

Страница

<400> 45
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu
 Glu Asp Asn Leu Ser 10
 1 5
 15
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro
 Gly Ala Pro Gln Pro 25
 20
 30
 Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg
 Gly Leu Val Leu Pro 40
 35
 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu
 Asp Lys Gly Glu Pro 55
 50
 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His
 Asp Lys Ala Tyr Asp 70 75
 65
 80
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu
 Lys Tyr Asn His Ala 90
 85
 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp
 Thr Ser Phe Gly Gly 105
 100
 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys
 Arg Leu Leu Glu Pro 120
 115
 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala
 Pro Gly Lys Lys Arg 135
 130

Страница

140
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser
 Ser Ala Gly Ile Gly
 145 150 155
 160
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu
 Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170
 175
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro
 Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185
 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met
 Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200
 205
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp
 Gly Val Gly Ser Ser
 210 215
 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu
 Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235
 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr
 Tyr Asn Asn His Leu
 245 250
 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly
 Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265
 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
 Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280

Страница

285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
 Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295
 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe
 Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315
 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val
 Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330
 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345
 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys
 Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360
 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr
 Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375
 380
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr
 Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395
 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe
 Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410
 415
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
 His Ser Gln Ser Leu
 420 425

Страница

430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
 Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440
 445
 Arg Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln
 Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455
 460
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly
 Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475
 480
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr
 Thr Val Thr Gln Asn
 485 490
 495
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser
 Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505
 510
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala
 Met Ala Ser His Lys
 515 520
 525
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly
 Ser Leu Ile Phe Gly
 530 535
 540
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala
 Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555
 560
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro
 Val Ala Thr Glu Ser
 565 570

Страница

575
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala
 Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585
 590
 Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro
 Gly Met Val Trp Gln
 595 600
 605
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
 Ala Lys Ile Pro His
 610 615
 620
 Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met
 Gly Gly Phe Gly Met
 625 630 635
 640
 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
 Thr Pro Val Pro Ala
 645 650
 655
 Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu
 Asn Ser Phe Ile Thr
 660 665
 670
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile
 Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680
 685
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile
 Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695
 700
 Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val
 Asn Thr Glu Gly Val
 705 710 715

Страница

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr
 Leu Thr Arg Asn Leu
 720 725 730
 735

<210> 46
 <211> 743
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность капсида VP1
 AAV-PHP.N

<400> 46
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu
 Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10
 15
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro
 Gly Ala Pro Gln Pro
 20 25
 30
 Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg
 Gly Leu Val Leu Pro
 35 40
 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu
 Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55
 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His
 Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75

Страница

80
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu
 Lys Tyr Asn His Ala
 85 90
 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp
 Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105
 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys
 Arg Leu Leu Glu Pro
 115 120
 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala
 Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135
 140
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser
 Ser Ala Gly Ile Gly
 145 150 155
 160
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu
 Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170
 175
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro
 Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185
 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met
 Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200
 205
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp
 Gly Val Gly Ser Ser
 210 215

Страница

220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu
 Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235
 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr
 Tyr Asn Asn His Leu
 245 250
 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly
 Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265
 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
 Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280
 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
 Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295
 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe
 Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315
 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val
 Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330
 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345
 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys
 Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360

Страница

365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr
 Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375
 380
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr
 Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395
 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe
 Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410
 415
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
 His Ser Gln Ser Leu
 420 425
 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
 Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440
 445
 Arg Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln
 Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455
 460
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly
 Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475
 480
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr
 Thr Val Thr Gln Asn
 485 490
 495
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser
 Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505

Страница

510
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala
 Met Ala Ser His Lys
 515 520
 525
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly
 Ser Leu Ile Phe Gly
 530 535
 540
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala
 Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555
 560
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro
 Val Ala Thr Glu Ser
 565 570
 575
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Asp
 Gly Thr Leu Ala Val
 580 585
 590
 Pro Phe Lys Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
 Gln Asn Gln Gly Ile
 595 600
 605
 Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
 Tyr Leu Gln Gly Pro
 610 615
 620
 Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
 Phe His Pro Ser Pro
 625 630 635
 640
 Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
 Pro Gln Ile Leu Ile
 645 650

Страница

655
 Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
 Ala Phe Asn Lys Asp
 660 665
 670
 Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
 Gly Gln Val Ser Val
 675 680
 685
 Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
 Lys Arg Trp Asn Pro
 690 695
 700
 Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
 Asn Asn Val Glu Phe
 705 710 715
 720
 Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
 Arg Pro Ile Gly Thr
 725 730
 735
 Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 740

<210> 47
 <211> 743
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность капсида VP1
 AAV-PHP.S

<400> 47
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu

Страница

Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10
 15
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro
 Gly Ala Pro Gln Pro 20 25
 30
 Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg
 Gly Leu Val Leu Pro 35 40
 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu
 Asp Lys Gly Glu Pro 50 55
 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His
 Asp Lys Ala Tyr Asp 65 70 75
 80
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu
 Lys Tyr Asn His Ala 85 90
 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp
 Thr Ser Phe Gly Gly 100 105
 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys
 Arg Leu Leu Glu Pro 115 120
 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala
 Pro Gly Lys Lys Arg 130 135
 140
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser

Страница

Ser Ala Gly Ile Gly
 145 150 155
 160
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu
 Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170
 175
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro
 Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185
 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met
 Ala Ser Gly Gly
 195 200
 205
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp
 Gly Val Gly Ser Ser
 210 215
 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu
 Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235
 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr
 Tyr Asn Asn His Leu
 245 250
 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly
 Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265
 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
 Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280
 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln

Страница

Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295
 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe
 Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315
 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val
 Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330
 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345
 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys
 Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360
 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr
 Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375
 380
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr
 Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395
 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe
 Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410
 415
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
 His Ser Gln Ser Leu
 420 425
 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr

Страница

Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440
 445
 Arg Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln
 Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455
 460
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly
 Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475
 480
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr
 Thr Val Thr Gln Asn
 485 490
 495
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser
 Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505
 510
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala
 Met Ala Ser His Lys
 515 520
 525
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly
 Ser Leu Ile Phe Gly
 530 535
 540
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala
 Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555
 560
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro
 Val Ala Thr Glu Ser
 565 570
 575
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala

Страница

Gln Gln Ala Val Arg
 580 585
 590
 Thr Ser Leu Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
 Gln Asn Gln Gly Ile
 595 600
 605
 Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
 Tyr Leu Gln Gly Pro
 610 615
 620
 Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
 Phe His Pro Ser Pro
 625 630 635
 640
 Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
 Pro Gln Ile Leu Ile
 645 650
 655
 Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
 Ala Phe Asn Lys Asp
 660 665
 670
 Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
 Gly Gln Val Ser Val
 675 680
 685
 Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
 Lys Arg Trp Asn Pro
 690 695
 700
 Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
 Asn Asn Val Glu Phe
 705 710 715
 720
 Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro

Страница

Arg Pro Ile Gly Thr 730
735
Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu 740

```
<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
```

<220>
<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 48
Ser Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala
Gln Ala Gln
1 5 10

```
<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
```

<220>
<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

```
<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2-4  
<223> Хаа = любая аминокислота
```

Страница

<400> 49

Ser Xaa Xaa Xaa Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala
Gln Ala Gln
1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная
последовательность

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 4-6

<223> Xaa = любая аминокислота

<400> 50

Ser Ala Gln Xaa Xaa Xaa Val Pro Phe Lys Ala
Gln Ala Gln
1 5 10

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная

Страница

последовательность

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 6-8

<223> Хаа = любая аминокислота

<400> 51

Ser Ala Gln Thr Leu Хаа Хаа Хаа Phe Lys Ala
Gln Ala Gln

1

5

10

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная
последовательность

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 8-10

<223> Хаа = любая аминокислота

<400> 52

Ser Ala Gln Thr Leu Ala Val Хаа Хаа Хаа Ala
Gln Ala Gln

1

5

10

<210> 53

Страница

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 10-12
 <223> Хаа = любая аминокислота

<400> 53
 Ser Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Хаа Хаа
 Хаа Ala Gln
 1 5 10

<210> 54
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

<400> 54
 gatgggactt tggcggtgcc ttttaaggca cag
 33

<210> 55
 <211> 33
 <212> ДНК

Страница

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая нуклеотидная последовательность

<400> 55

gatgggacgt tggcgggtgcc ttttaaggca cag
33

<210> 56

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая нуклеотидная последовательность

<400> 56

caggcgggtta ggacgtcttt g
21

<210> 57

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая нуклеотидная последовательность

<400> 57

caggtcttca cggactcaga ctagcag
27

Страница

<210> 58
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

<400> 58
 сааgтаааас ctctacaаat gtggтаааat сg
 32

<210> 59
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

<400> 59
 актсатсgас саатаcttgt актатctctc тагаас
 36

<210> 60
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

<400> 60

Страница

ggaagtattc cttggttttg aaccsa
26

<210> 61
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая нуклеотидная последовательность

<400> 61
ggtcgscggtt cttgtttgtg gat
23

<210> 62
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая нуклеотидная последовательность

<400> 62
scacsttgaа gcgcатgaас tcст
24

<210> 63
<211> 83
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая нуклеотидная

Страница

последовательность

<220>

<221> misc_feature

<222> 42, 43, 45, 46, 48, 49, 51, 52, 54,
55, 57, 58, 60, 61

<223> n = a, c, t или g

<400> 63

gtattccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcctgtgc
mnnmnnmnnm nnnmnnmnnm 60
nttgggcact ctggtgggtt gtc
83

<210> 64

<400> 64
000

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная
последовательность

<400> 65

Thr Asn His Gln Ser Ala Gln
1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

Страница

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 66

Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 67

Asp Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys
1 5

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<220>

<221> ВАРИАНТ

Страница

<222> 10-11

<223> Хаа = любая аминокислота

<400> 68

Asp Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Хаа Хаа
1 5 10

<210> 69

<211> 64

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая нуклеотидная
последовательность

<220>

<221> misc_feature

<222> 36, 37, 39, 40, 42, 43

<223> n = a, c, t или g

<400> 69

gtatttccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcmnnmnn
mnnaaaaggc accgcsaaag 60
tttg

64

<210> 70

<211> 70

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая нуклеотидная
последовательность

Страница

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 42, 43, 45, 46, 48, 49
 <223> n = a, c, t или g

<400> 70
 gtattccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcctgtgc
 mnnmnnmnnn accgccaaag 60
 tttgggcact
 70

<210> 71
 <211> 77
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 48, 49, 51, 52, 54, 55
 <223> n = a, c, t или g

<400> 71
 gtattccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcctgtgc
 cttaaamnnm nnnnncaaag 60
 tttgggcact ctggtgg
 77

<210> 72
 <211> 83
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

Страница

<220>

<223> Синтетическая нуклеотидная последовательность

<220>

<221> misc_feature

<222> 54, 55, 57, 58, 60, 61

<223> n = a, c, t или g

<400> 72

gtattccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcctgtgc
cttaaaaggc acmnnmnnmn 60
nttgggcact ctggtgggtt gtg
83

<210> 73

<211> 90

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность обратного праймера, использованного для получения библиотек AAV-RNP.B-XXX

<220>

<221> misc_feature

<222> 57, 58, 60, 61, 63, 64

<223> n = a, c, t или g

<400> 73

ttccttggtt ttgaaccsaa ccggtctgcg cctgtgcctt
aaaaggcacc gccaamnnmn 60
nmnnactctg gtggtttgtg gccacttgtc
90

Страница

<210> 74
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

<400> 74
 acttttggcgg tgccttttaa g
 21

<210> 75
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

<400> 75
 agtgtgagta agcctttttt g
 21

<210> 76
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

Страница

<400> 76
 tttaсgттga сgасссстаа g
 21

<210> 77
 <211> 21
 <212> днк
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

<400> 77
 tataсттттgt сgсaggгттg g
 21

<210> 78
 <211> 21
 <212> днк
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая нуклеотидная
 последовательность

<400> 78
 саggсggтта ggасgtсттt g
 21

<210> 79
 <211> 21
 <212> днк
 <213> Искусственная последовательность

<220>

Страница

<223> Синтетическая нуклеотидная
последовательность

<400> 79
cttgcsaagg agcggctttc g
21

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая аминокислотная
последовательность

<400> 80
Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
1 5

<210> 81
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая аминокислотная
последовательность

<400> 81
Val Pro Phe Lys Ala Gln
1 5

<210> 82

Страница

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 82
 Phe Lys Ala Gln
 1

<210> 83
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 83
 Ala Gln Thr Leu Ala Val
 1 5

<210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

Страница

<400> 84
 Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe
 1 5

<210> 85
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 85
 Gln Ala Val Arg
 1

<210> 86
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 86
 Ala Val Arg Thr
 1

<210> 87
 <211> 4
 <212> PRT

Страница

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 87

Val Arg Thr Ser
1

<210> 88

<211> 4

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 88

Arg Thr Ser Leu
1

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 89

Gln Ala Val Arg Thr

Страница

1

5

<210> 90
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 90
 Ala Val Arg Thr Ser
 1 5

<210> 91
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая аминокислотная
 последовательность

<400> 91
 Val Arg Thr Ser Leu
 1 5

<210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

Страница

<220>

<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 92

Gln Ala Val Arg Thr Ser
1 5

<210> 93

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

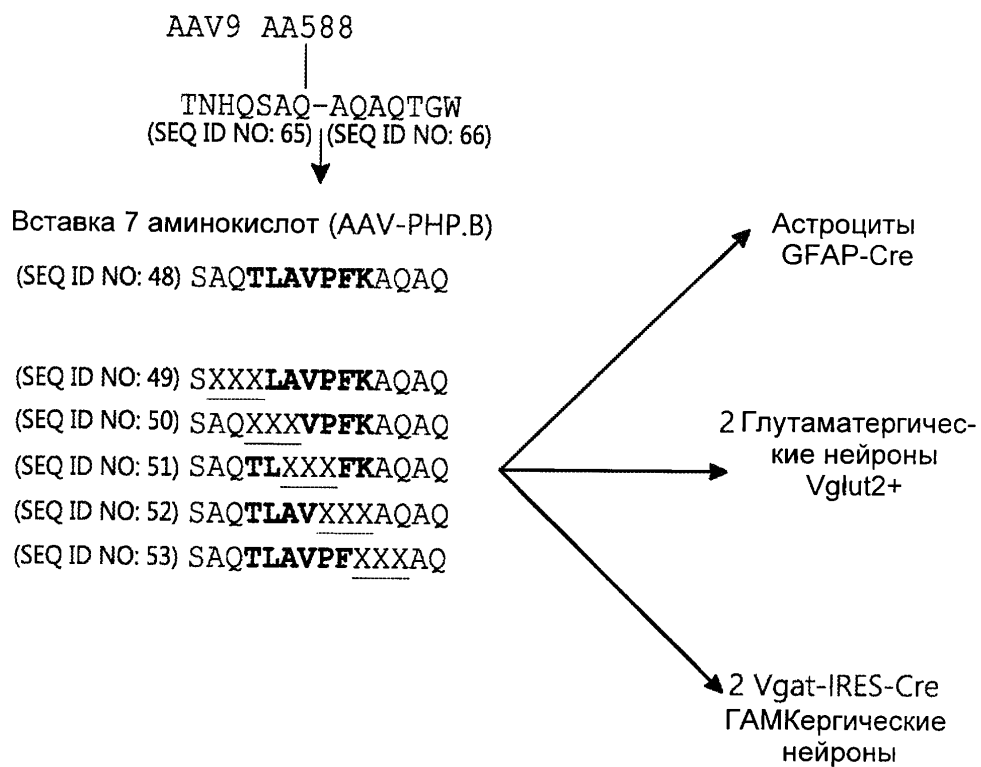
<223> Синтетическая аминокислотная последовательность

<400> 93

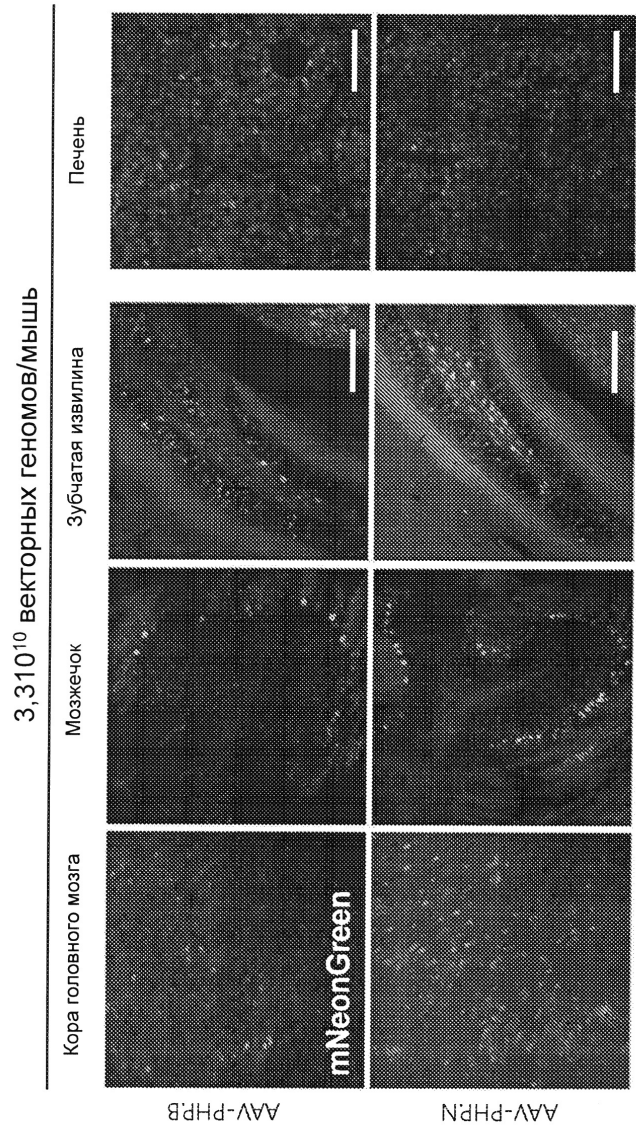
Ala Val Arg Thr Ser Leu
1 5

Страница

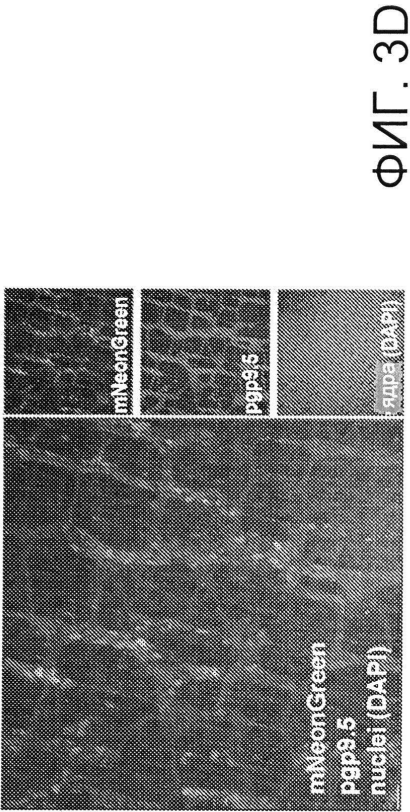
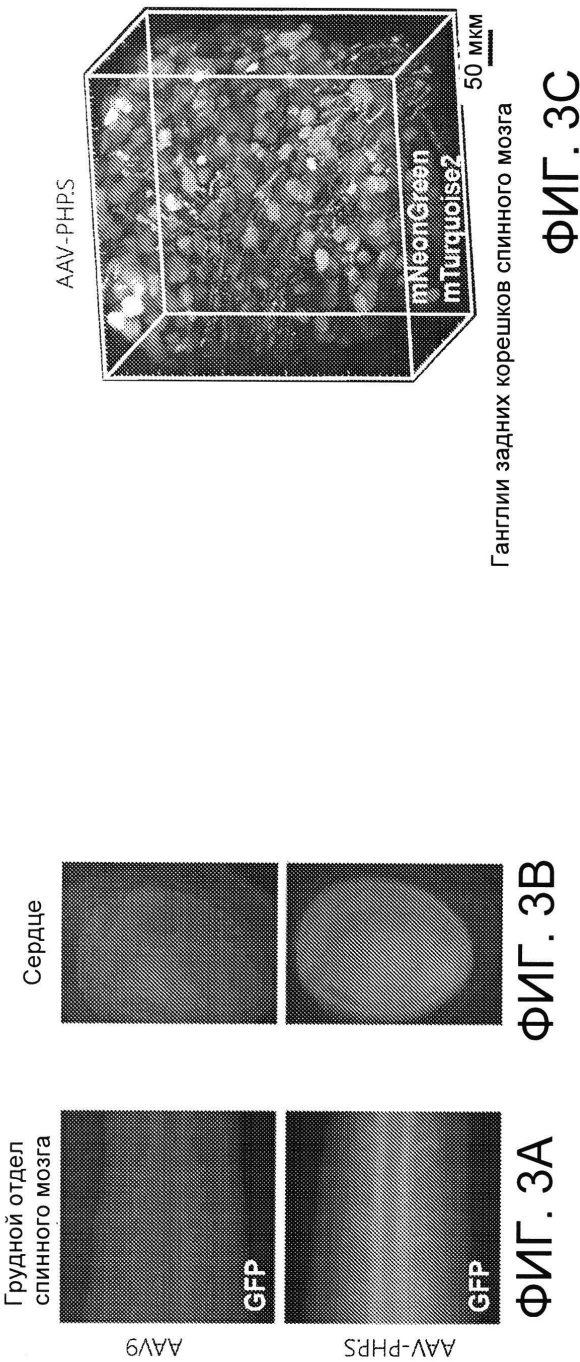
1/38

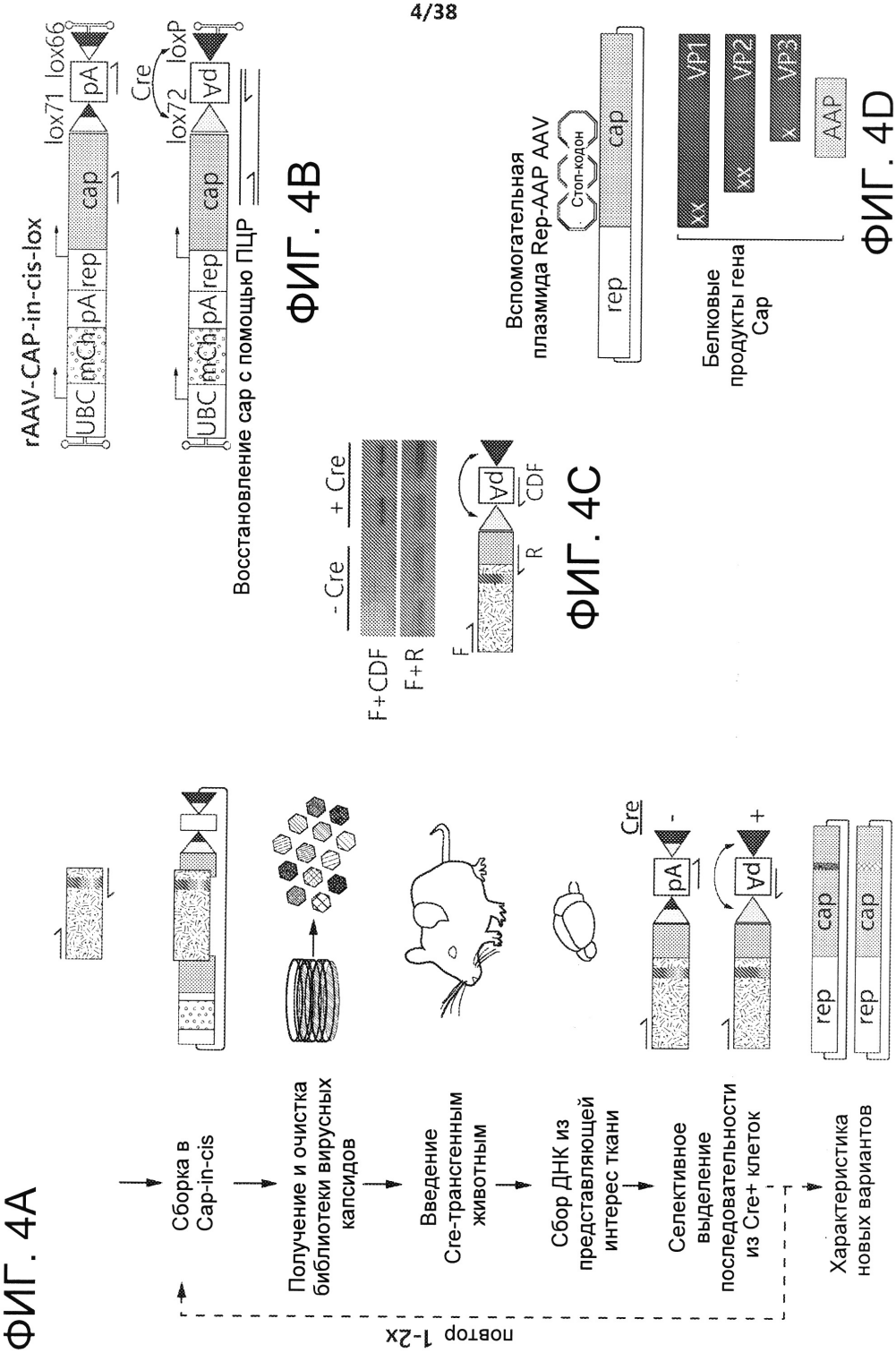


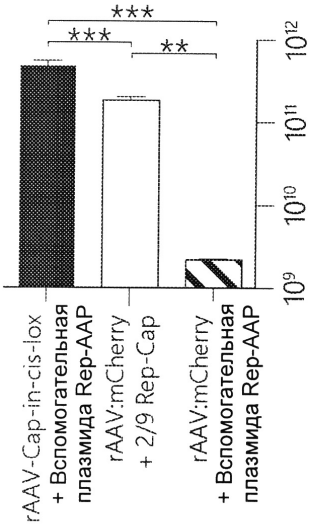
ФИГ. 1



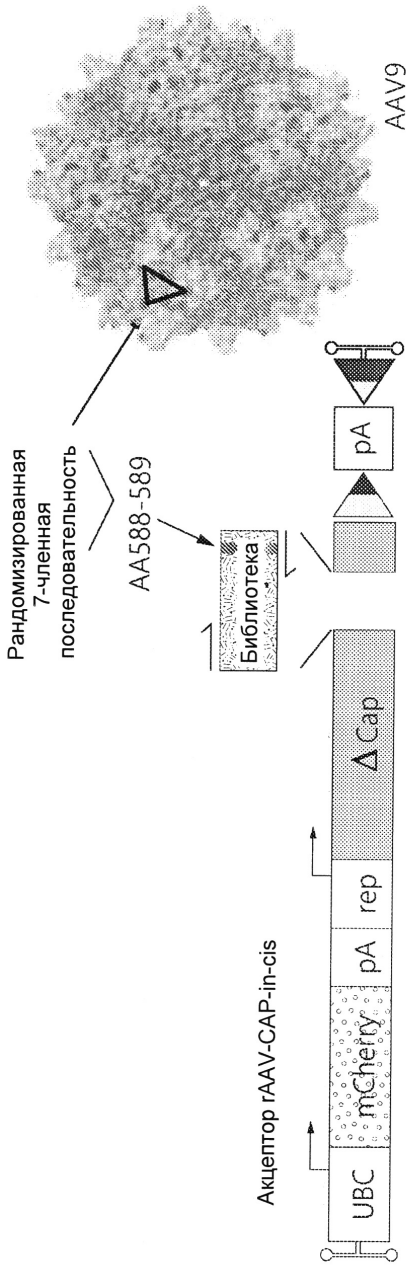
ФИГ. 2





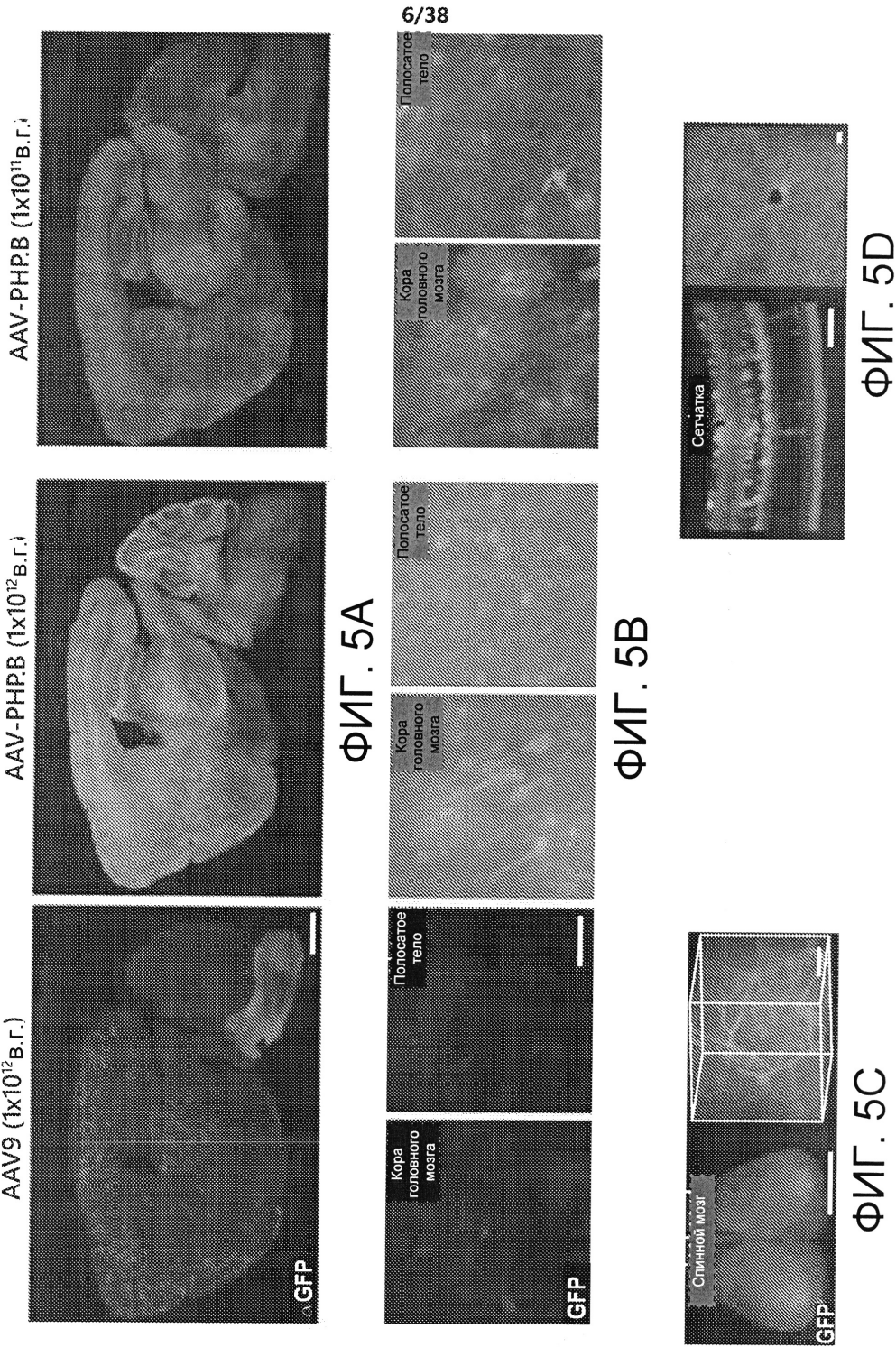


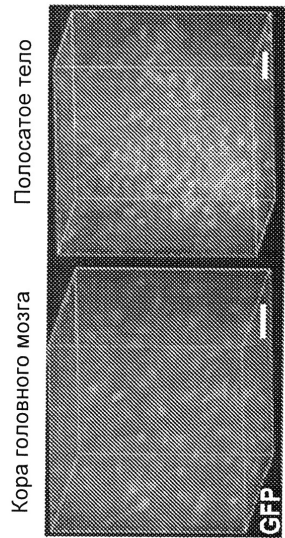
ФИГ. 4Е



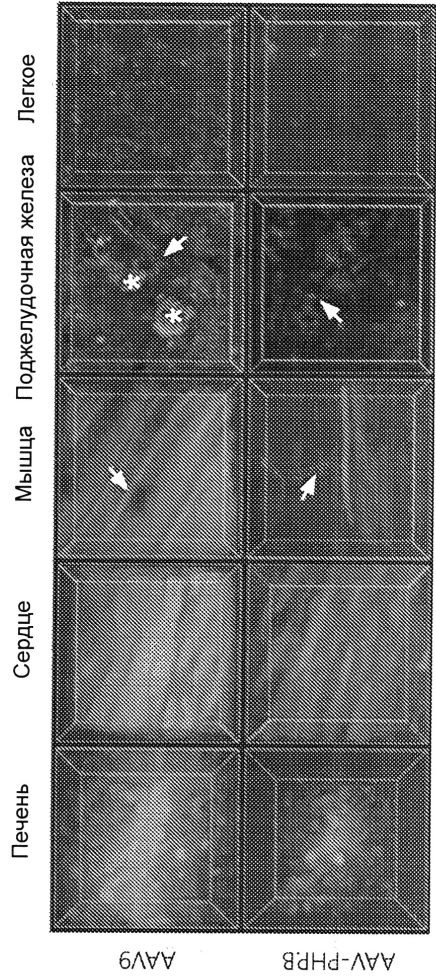
ФИГ. 4G

ФИГ. 4F

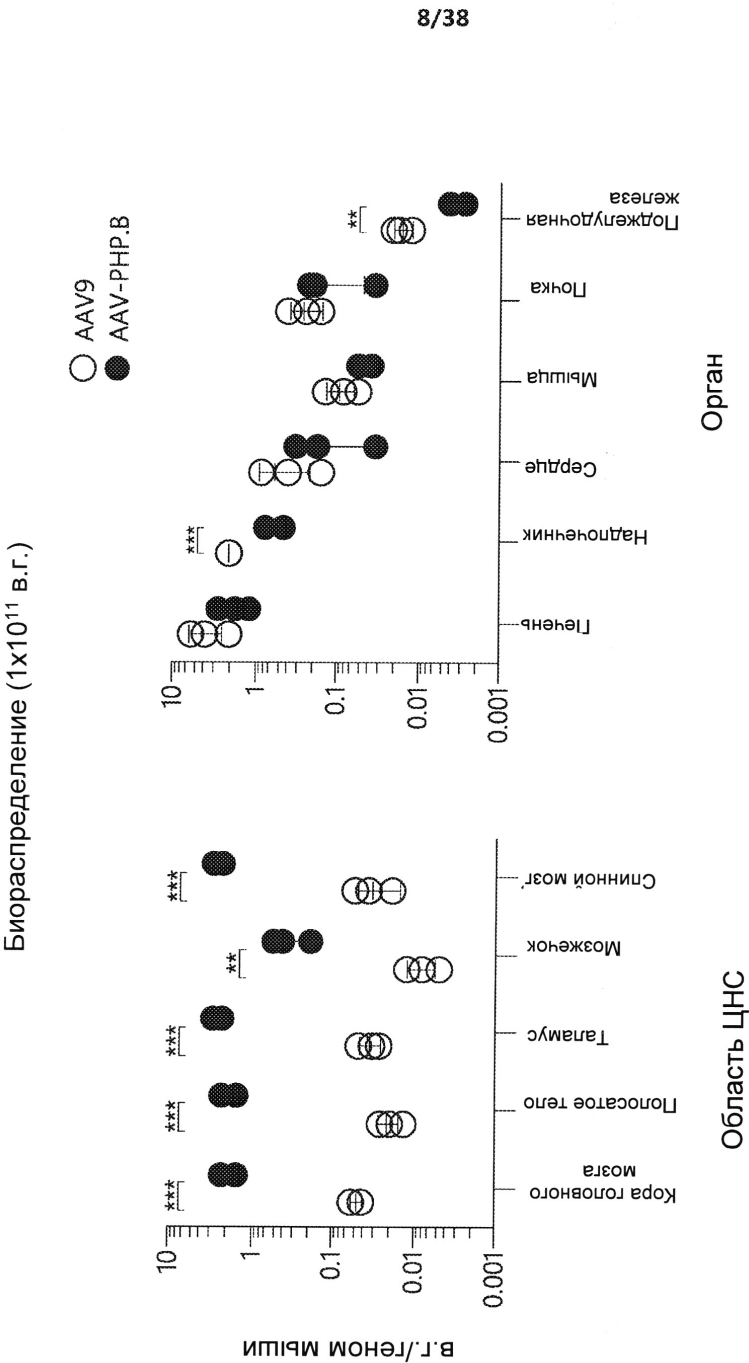




ФИГ. 5E

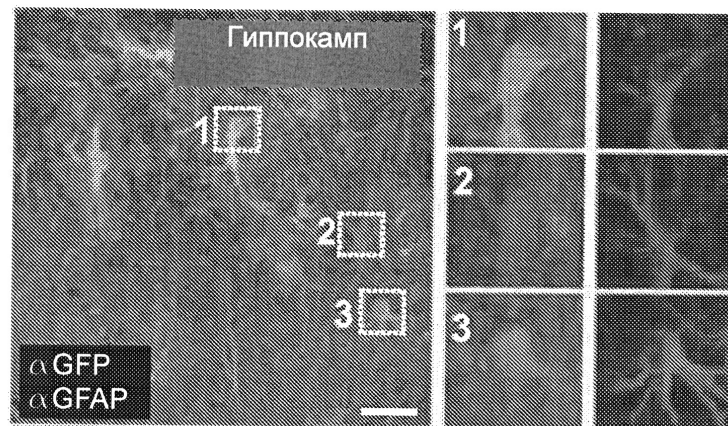


ФИГ. 5F

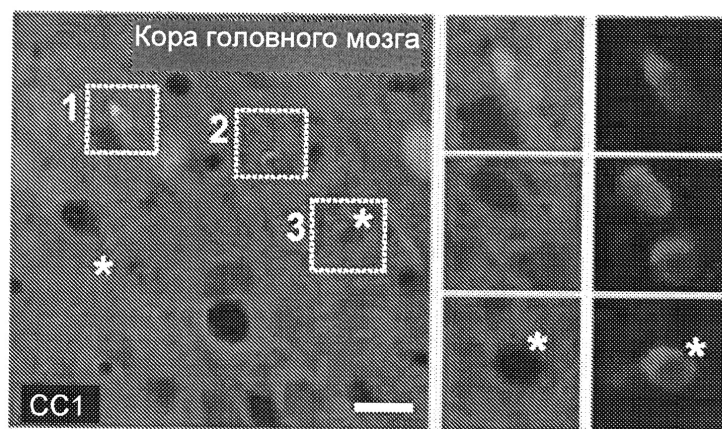


ФИГ. 5G

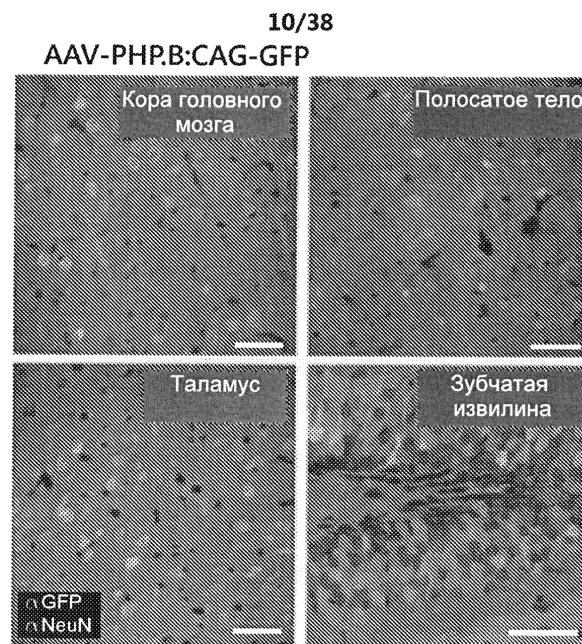
9/38



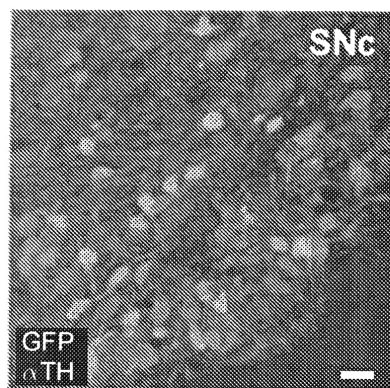
ФИГ. 6А



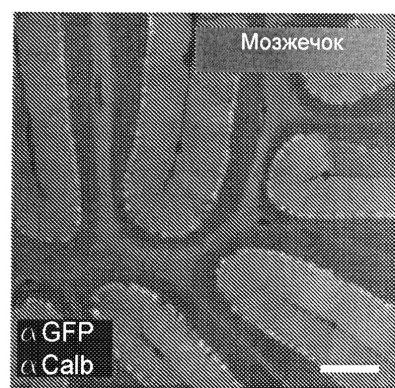
ФИГ. 6В



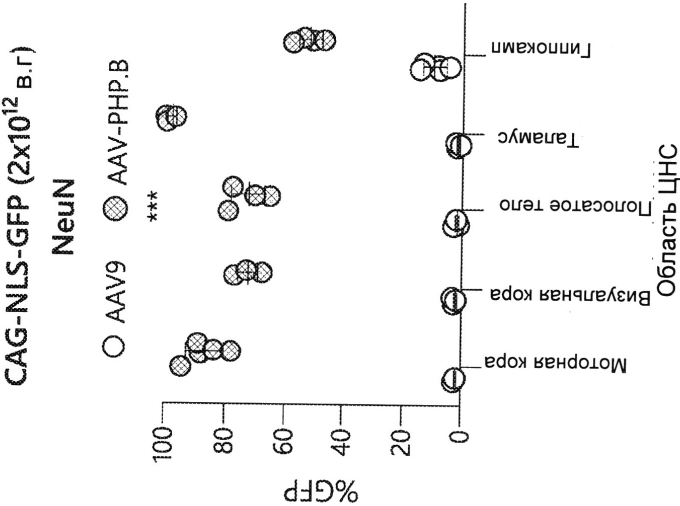
ФИГ. 6С



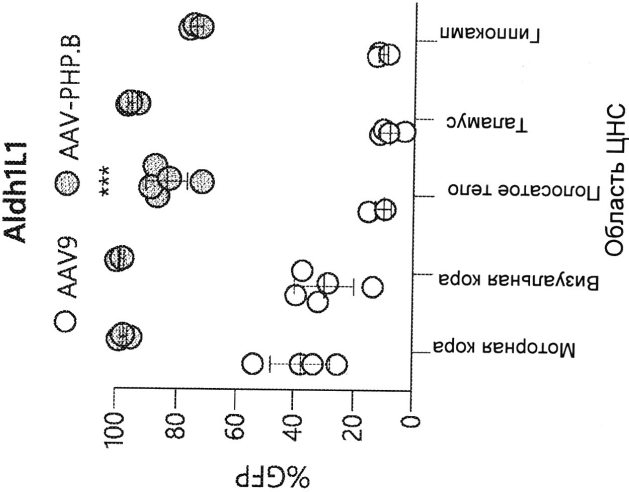
ФИГ. 6D



ФИГ. 6Е

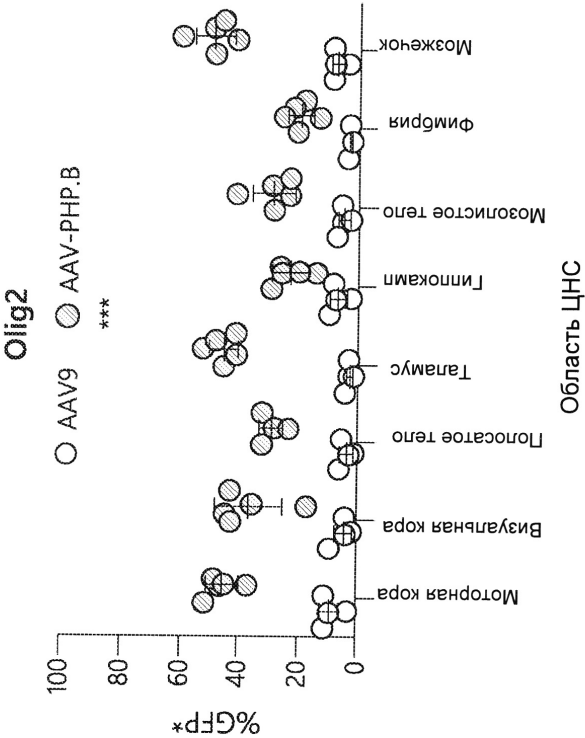


ФИГ. 6G

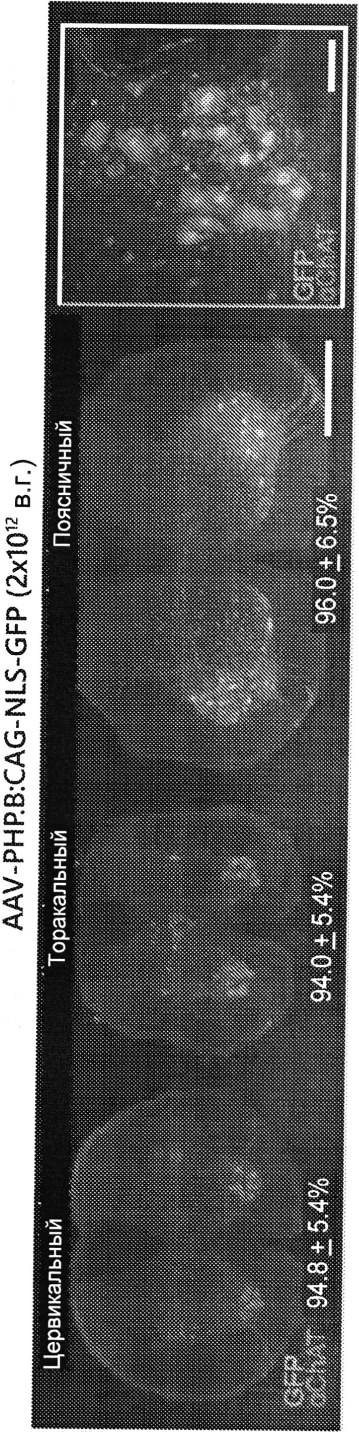


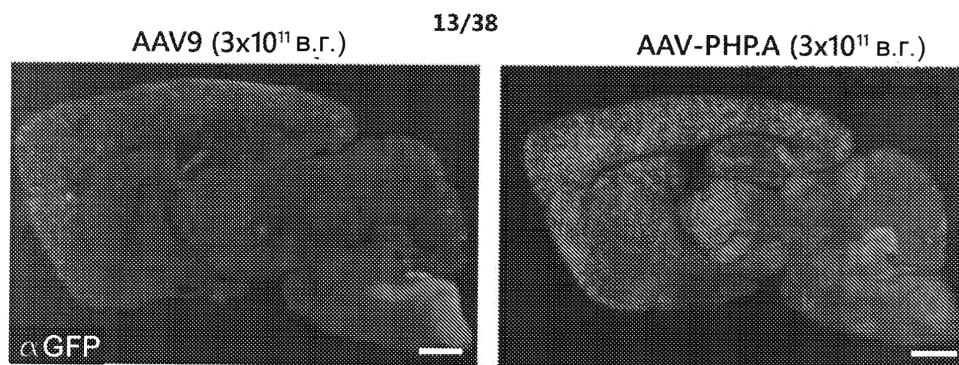
ФИГ. 6F

ФИГ. 6H

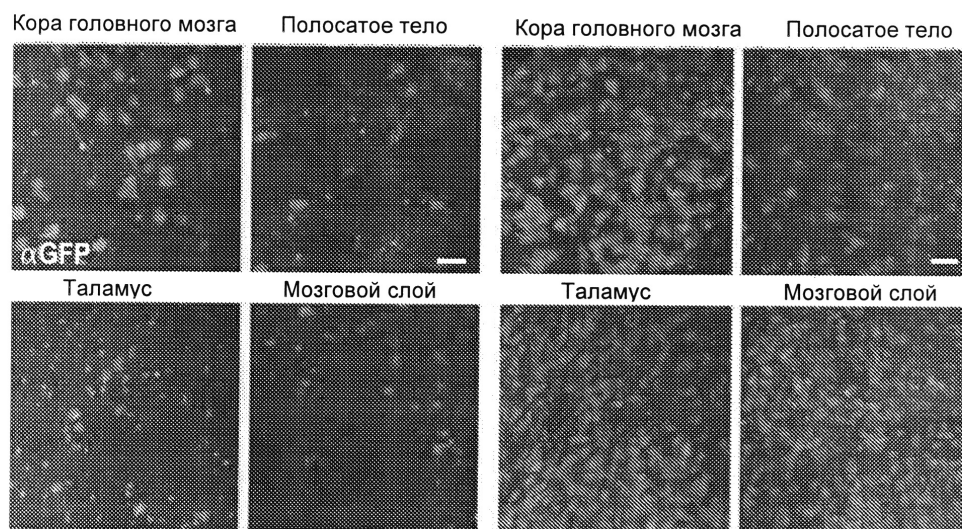


ФИГ. 6I

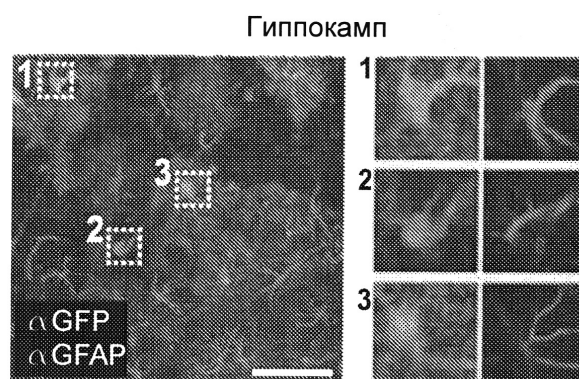




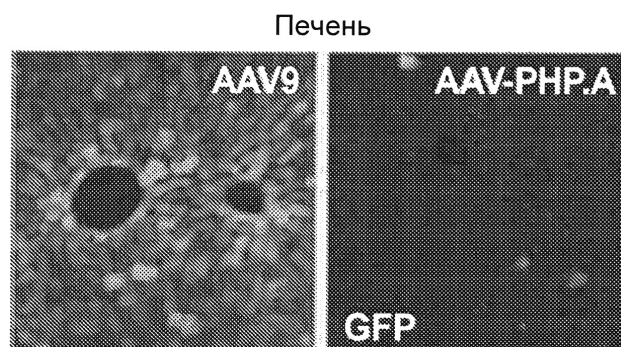
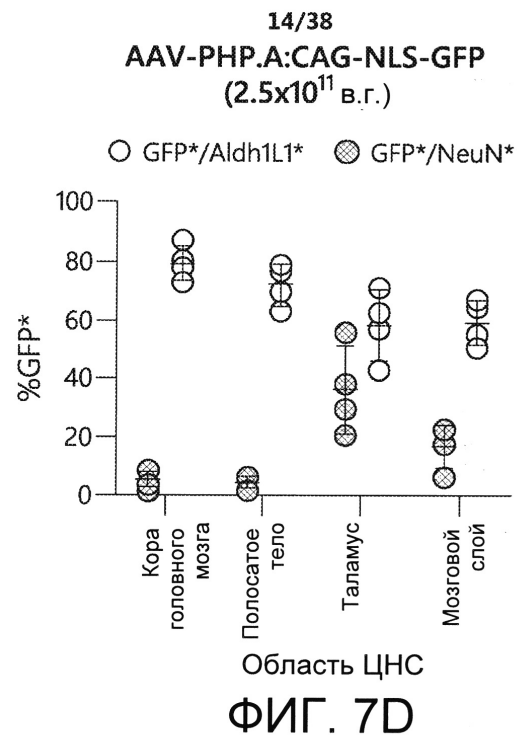
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

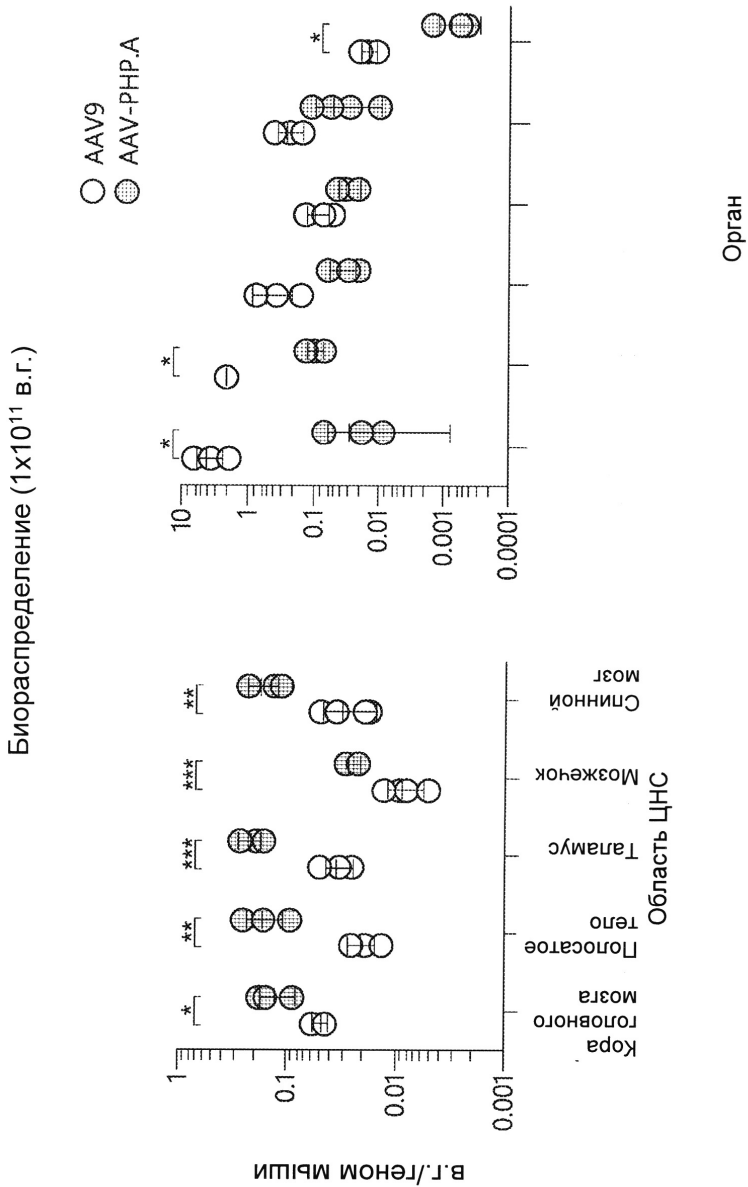


ФИГ. 7С

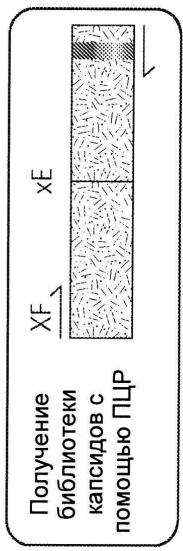


ФИГ. 7E

15/38

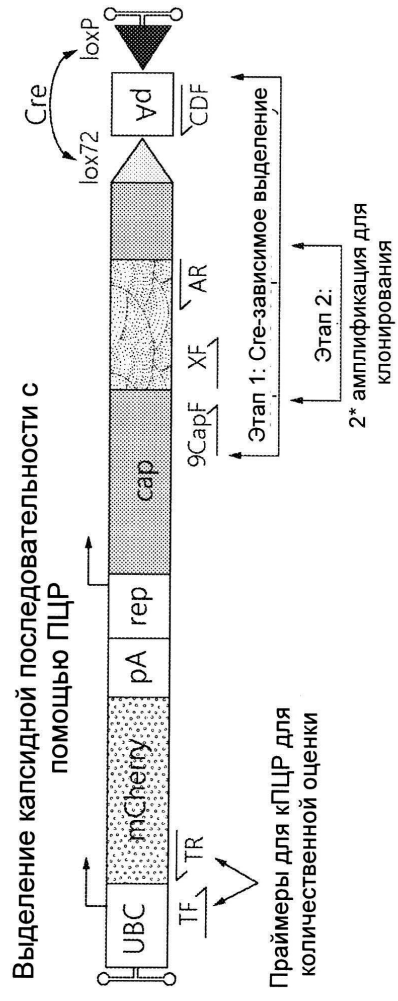


ФИГ. 7F

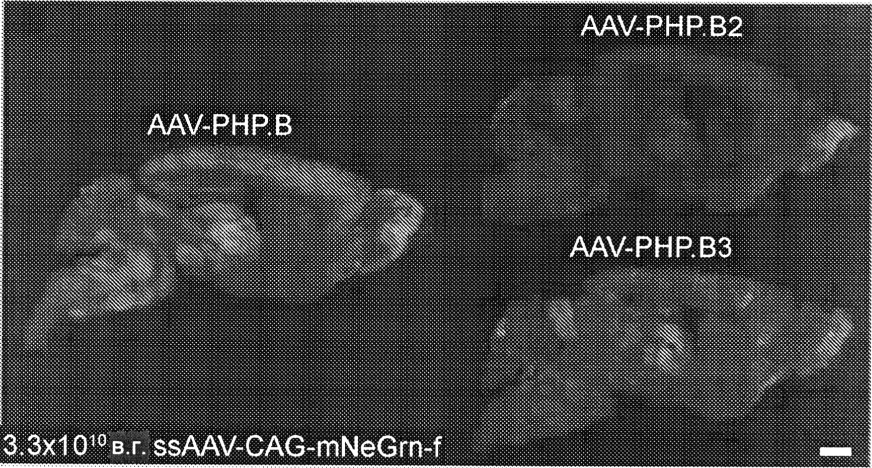


ФИГ. 8А

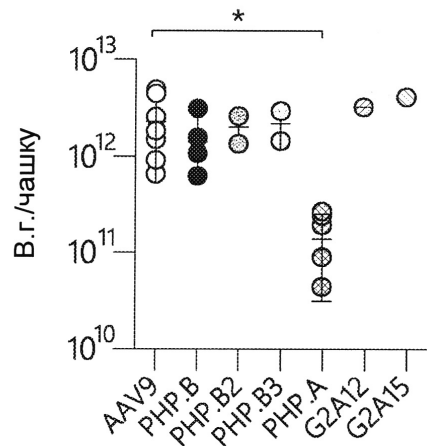
16/38



ФИГ. 8В

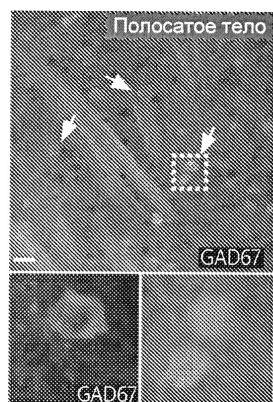


ФИГ. 9А

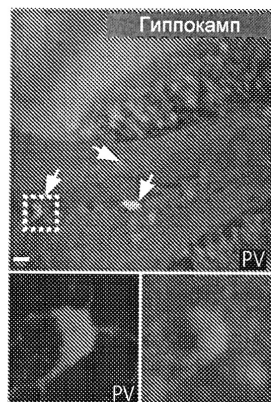


ФИГ. 9В

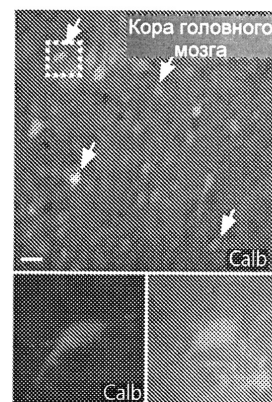
18/38



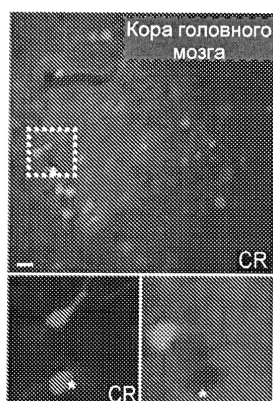
ФИГ. 10А



ФИГ. 10В

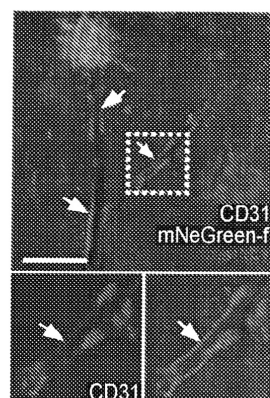


ФИГ. 10С



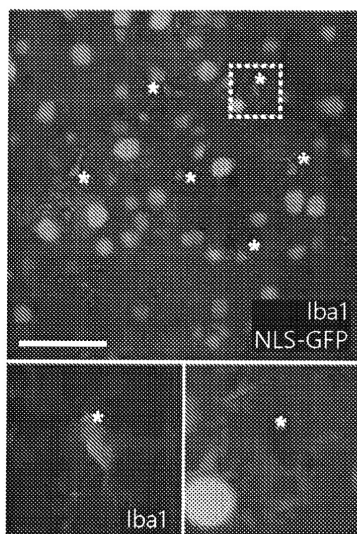
ФИГ. 10D

3.3×10^{10} в.г. ssAAV-CAG-mNeGrn-f

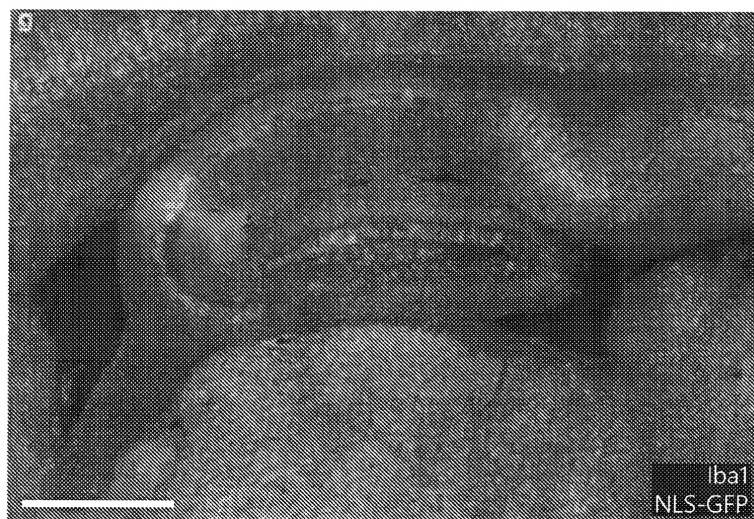


ФИГ. 10Е

19/38

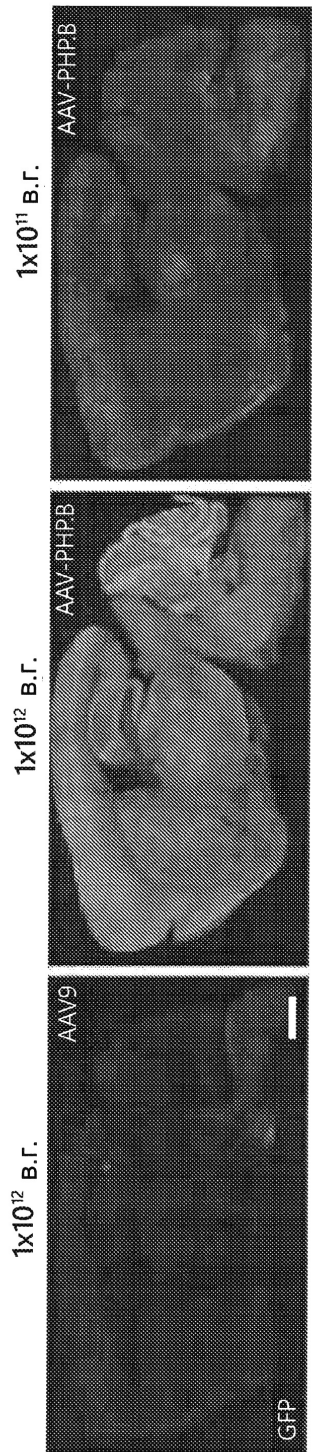


ФИГ. 10F



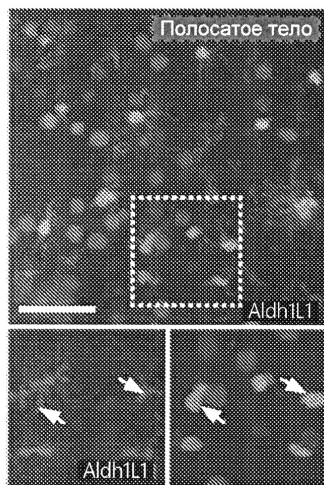
ФИГ. 10G

20/38

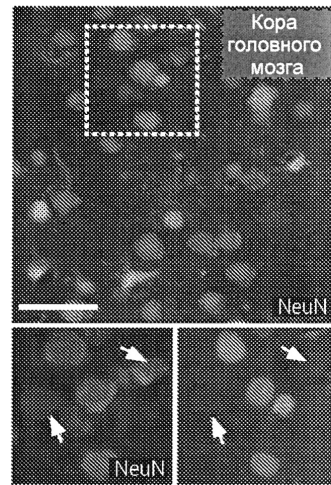


ФИГ. 11

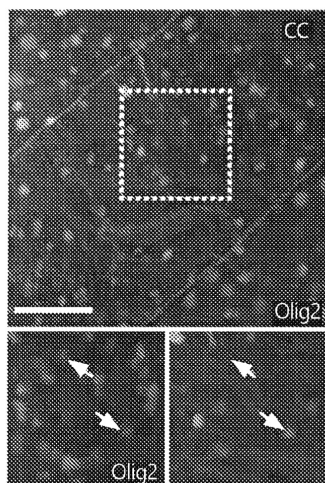
21/38



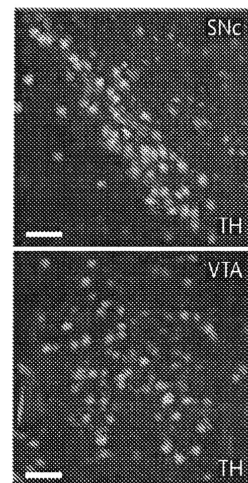
ФИГ. 12А



ФИГ. 12В



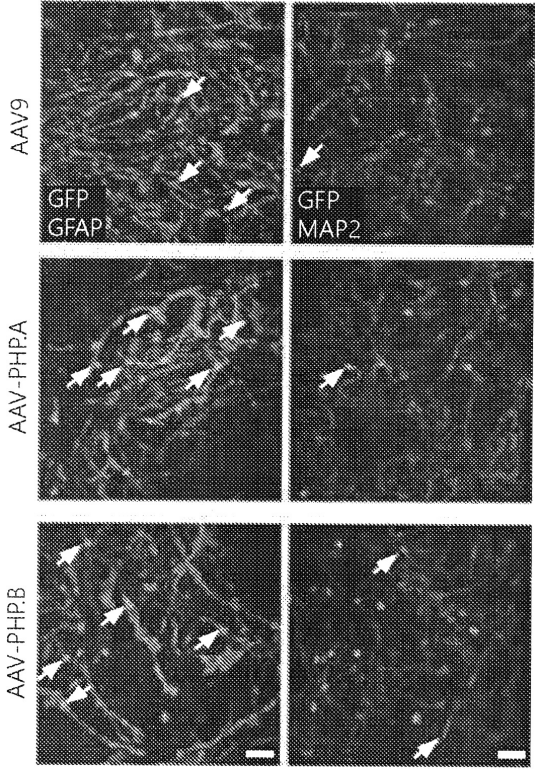
ФИГ. 12С



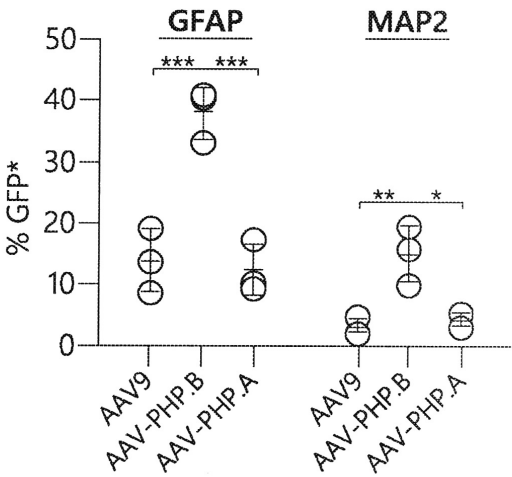
ФИГ. 12D

22/38

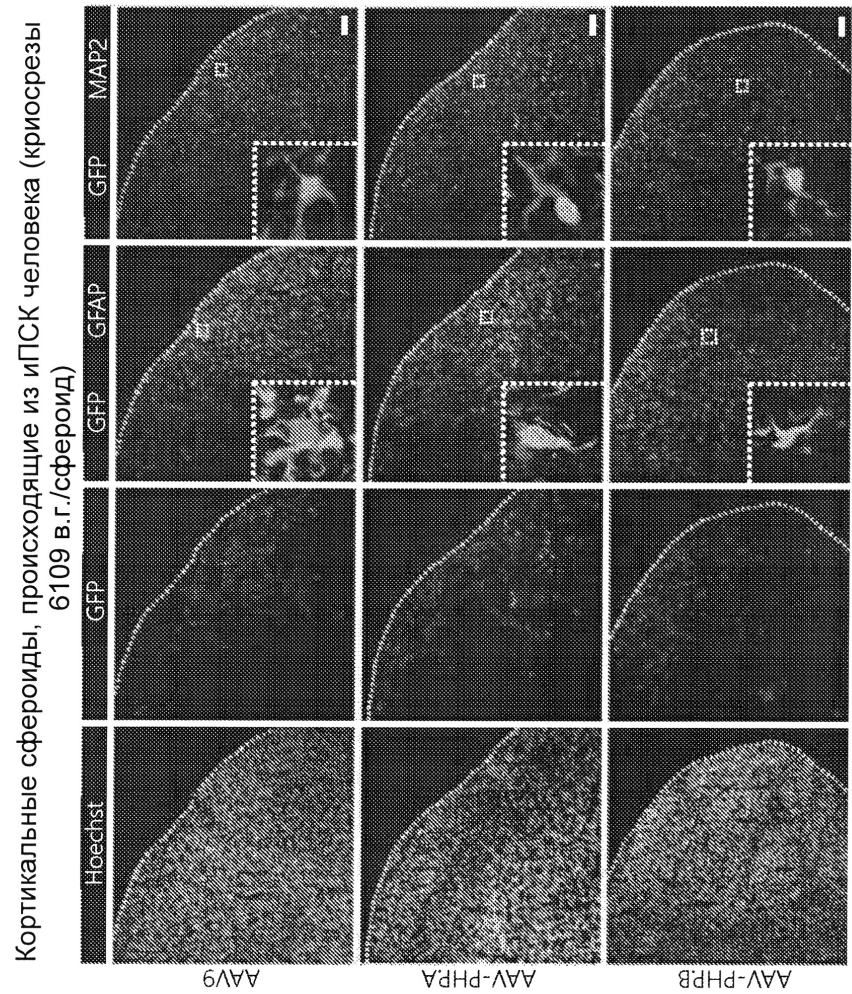
Кортикальные сфероиды, происходящие из ИПСК человека
(диссоциированные культуры: 1х10⁴ в.г./лунку)



ФИГ. 13А

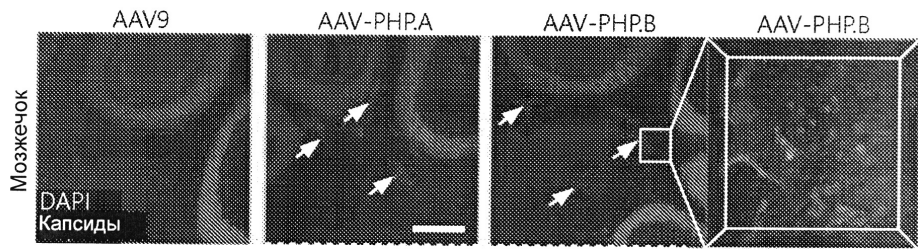


ФИГ. 13В

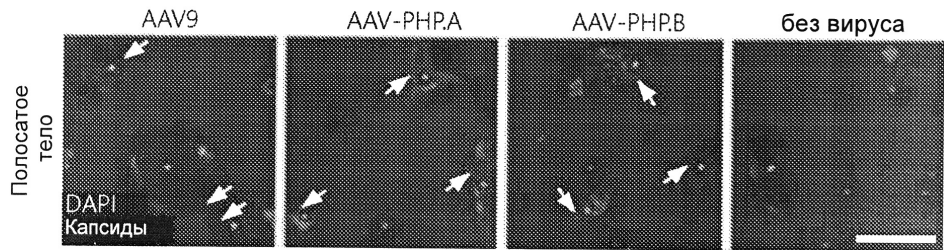


ФИГ. 13С

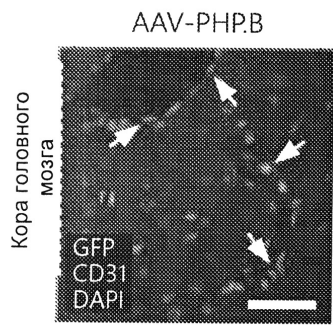
24/38
Распределение капсидов через 1 ч (1x10¹¹ в.г.)



ФИГ. 14А



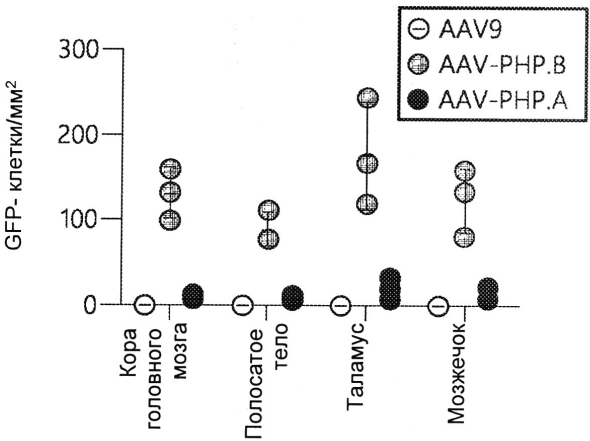
ФИГ. 14В



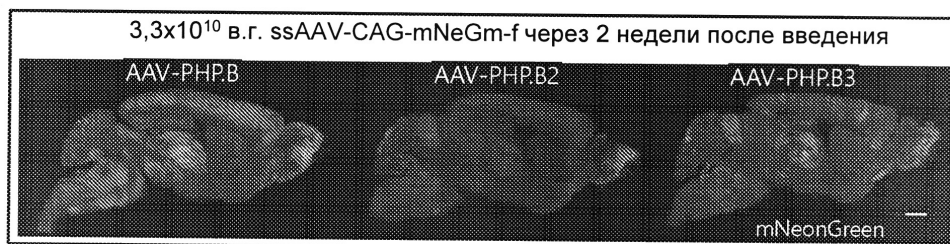
ФИГ. 14С

ФИГ. 14D

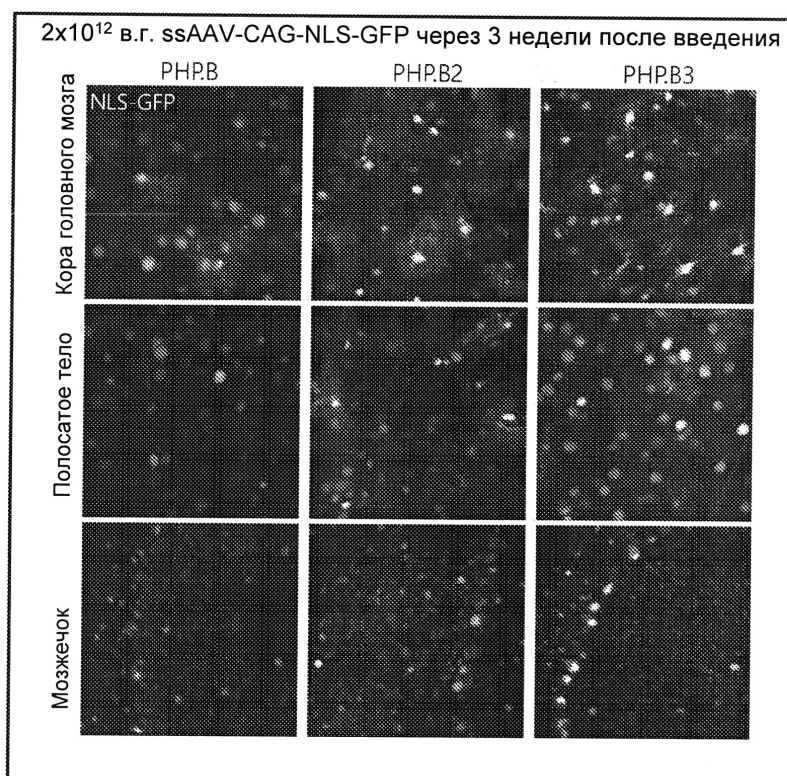
24 часа (1x10¹¹ в.г.)



25/38

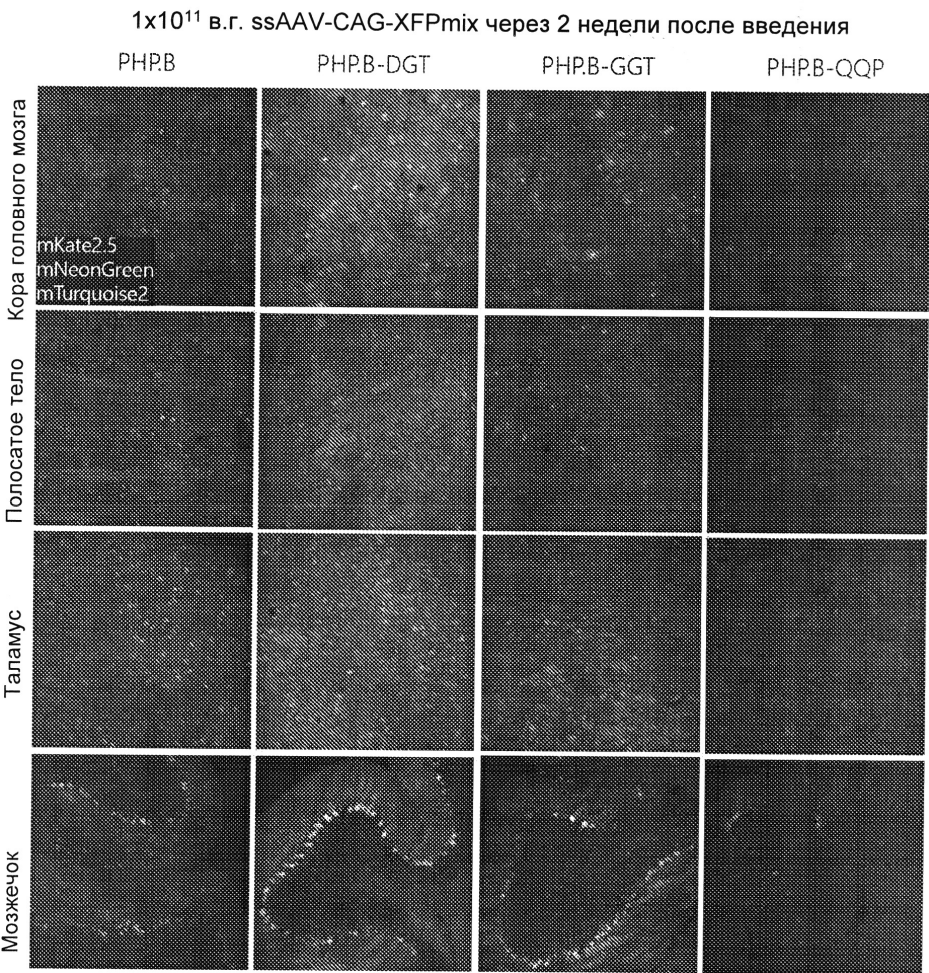


ФИГ. 15А

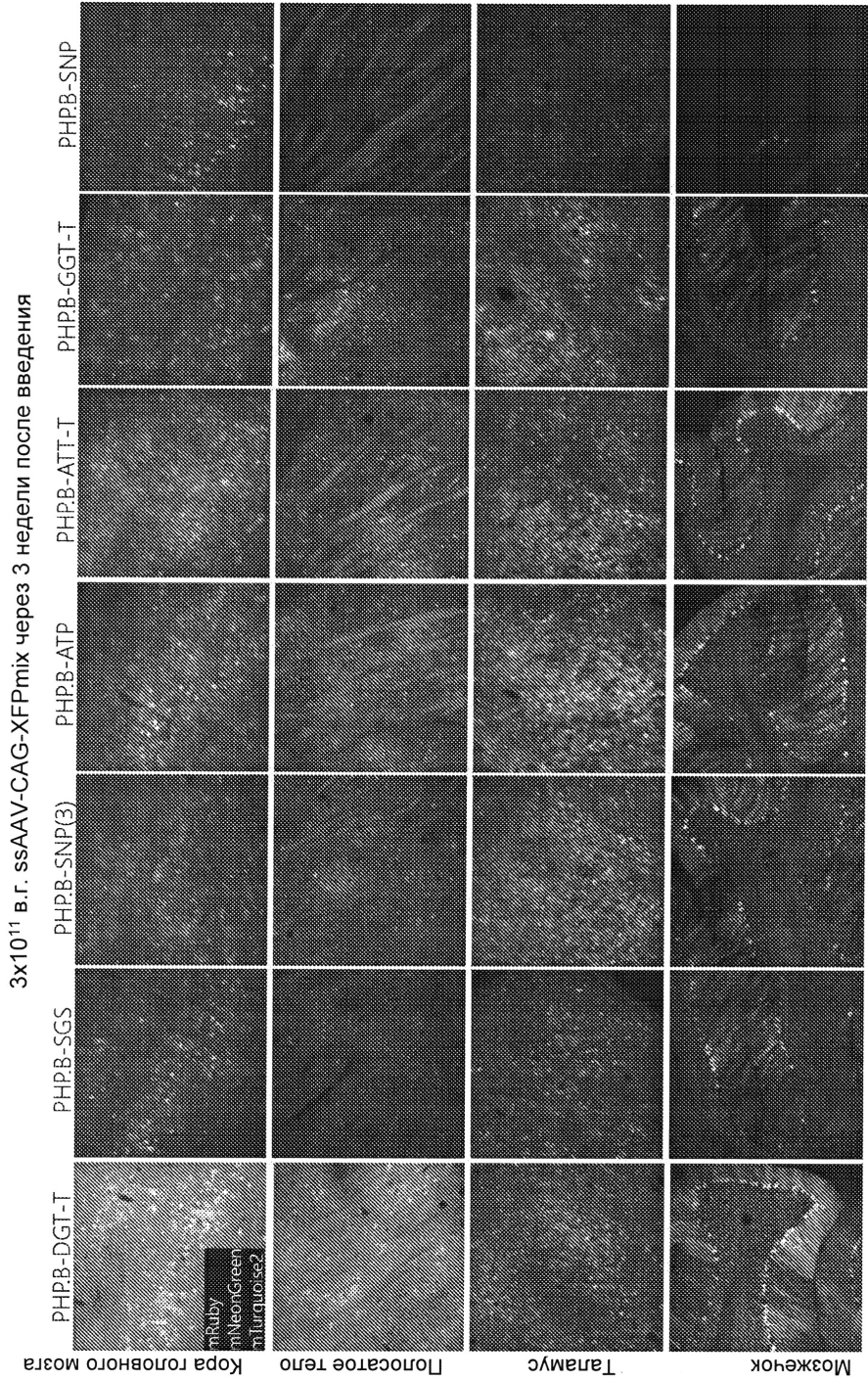


ФИГ. 15В

26/38

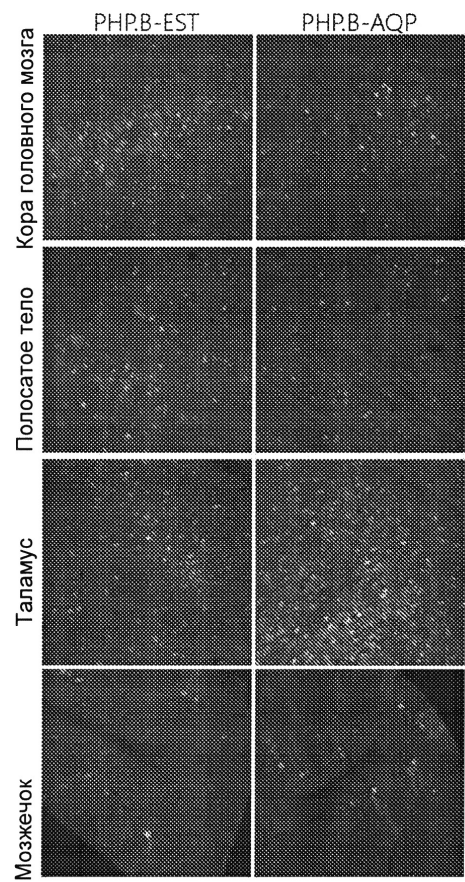


ФИГ. 16

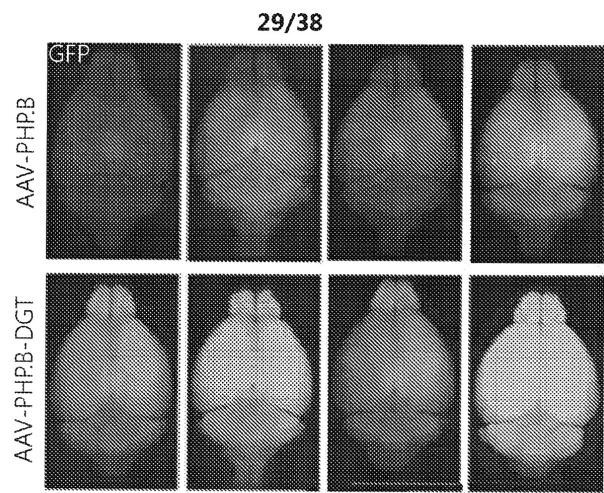


ФИГ. 17

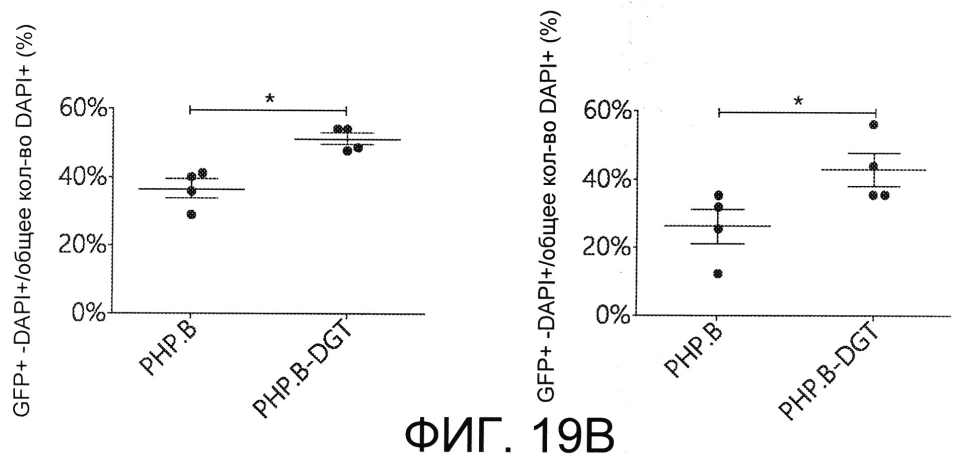
28/38



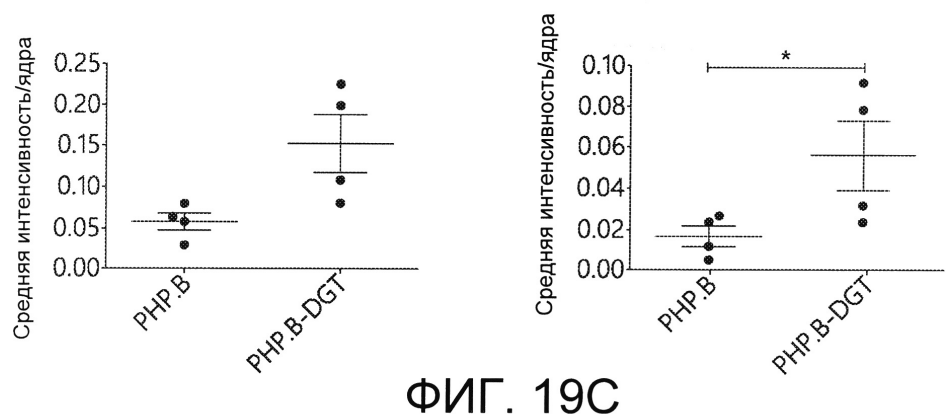
ФИГ. 18



ФИГ. 19А



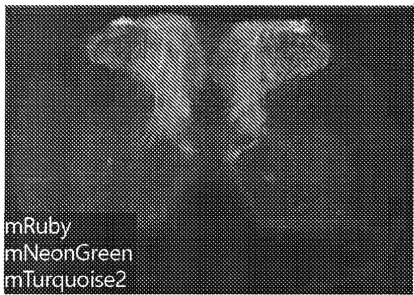
ФИГ. 19В



ФИГ. 19С



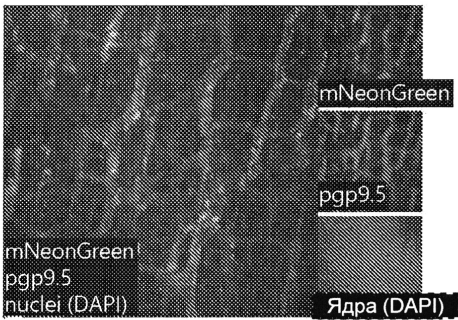
ФИГ. 20А



ФИГ. 20В



ФИГ. 20С



Кишечник
ФИГ. 20D

7-членная последовательность – вставлена между аминокислотами 588-589	XXXX1	SXXXXLAVPFFKQAQAQ (SEQ ID NO: 49)
	XXXX2	SAQXXXVPFFKQAQAQ (SEQ ID NO: 50)
	XXXX3	SAQTLXXXXFFKQAQAQ (SEQ ID NO: 51)
PHPB SAQTLAVPFFKQAQAQ (SEQ ID NO: 48)	XXXX4	SAQTLAVVXXXXAQAQAQ (SEQ ID NO: 52)
	XXXX5	SAQTLAVPFFXXXXAQAQAQ (SEQ ID NO: 53)

ФИГ. 21

ФИГ. 22А

Последовательность капсида VP1 ААР-РНР.N
SEQ ID NO: 46

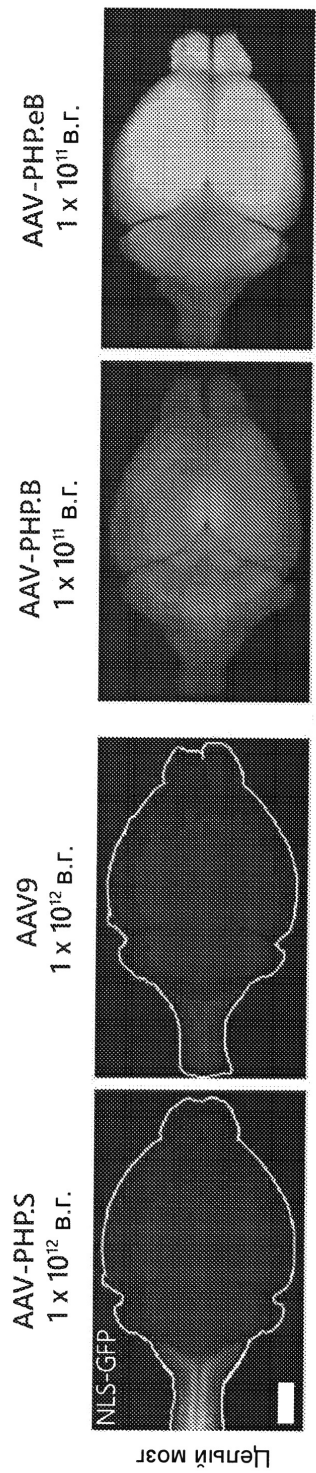
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQHQDNARGVLPGYKYLPGNGLDKGE
VNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGNIGRAVFAQKRLLLEP
LGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVDPDQPIGEPP
AAPSGVGSLLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVTTSTRTWALPTYNNHL
YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRQWQRLNNNWGFRPKRLNFKLFNI
QVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTND
GSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQSYEFENVPFHSSYAHQSGLDRLMNPIDQYLYYLS
RTINGSGQNQQTLLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWPGASSWALN
GRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNDVADKVMITNEEEIKTTNPVATES
YGQVATNHQSDGTLAVPFKAQAQTGWVQNGILPGMWQDRDVLQGPFIWAKIPHTDGNFHPSP
LMGGFGMKHPPPPQILIKNTVPADPPTAFNCKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWN
EIQYTSNYYKSNVFAVNTGEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

ФИГ. 22В

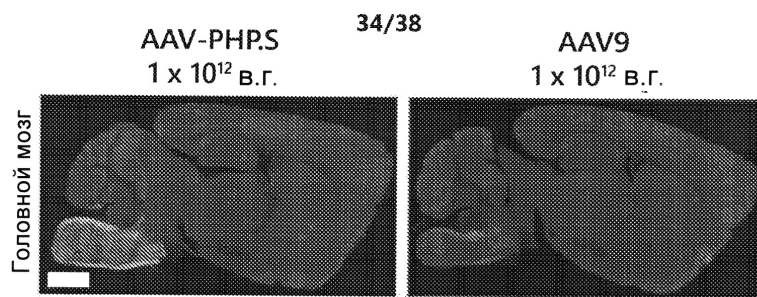
Последовательность капсида VP1 ААР-РНР.S
SEQ ID NO: 47

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQHQDNARGVLPGYKYLPGNGLDKGE
VNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGNIGRAVFAQKRLLLEP
LGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVDPDQPIGEPP
AAPSGVGSLLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVTTSTRTWALPTYNNHL
YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRQWQRLNNNWGFRPKRLNFKLFNI
QVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTND
GSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQSYEFENVPFHSSYAHQSGLDRLMNPIDQYLYYLS
RTINGSGQNQQTLLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWPGASSWALN
GRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNDVADKVMITNEEEIKTTNPVATES
YGQVATNHQSAQAQVTSIAQAQTGWVQNGILPGMWQDRDVLQGPFIWAKIPHTDGNFHPSP
LMGGFGMKHPPPPQILIKNTVPADPPTAFNCKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWN
EIQYTSNYYKSNVFAVNTGEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

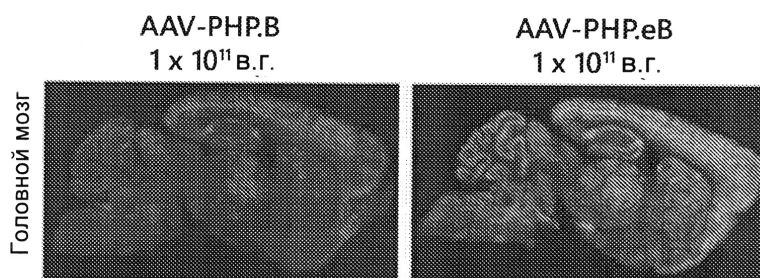
33/38



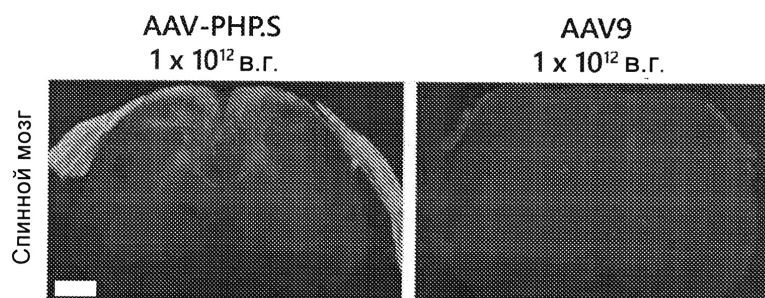
ФИГ. 23А



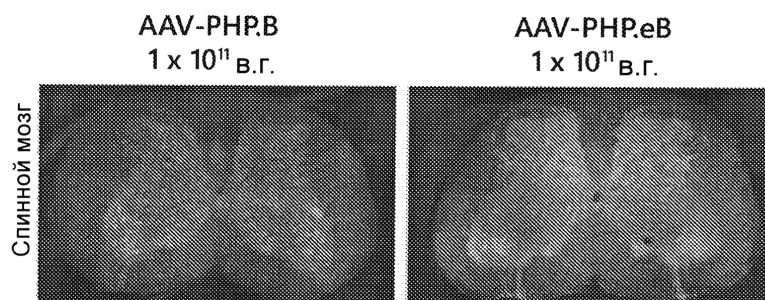
ФИГ. 23В



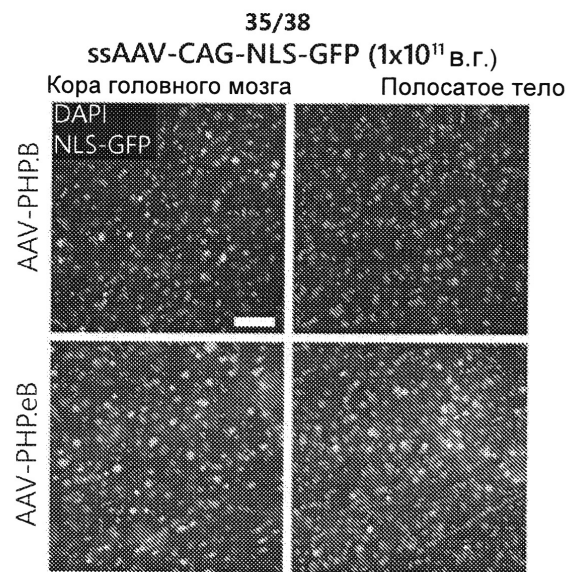
ФИГ. 23С



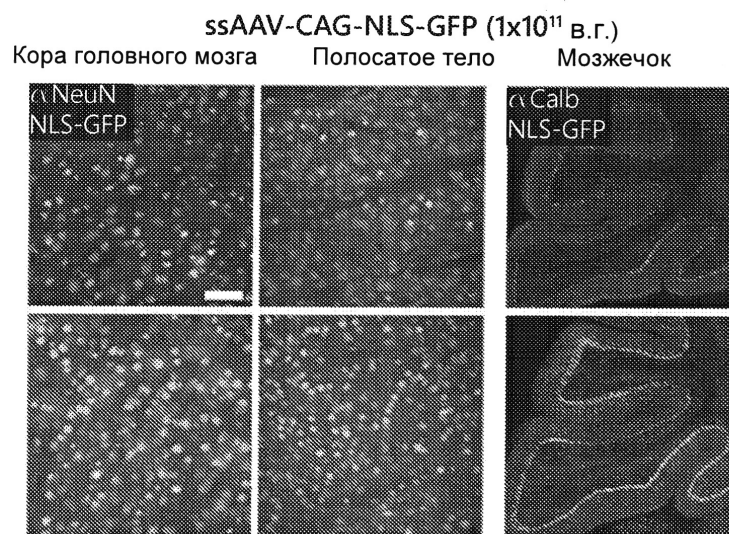
ФИГ. 23D



ФИГ. 23Е



ФИГ. 24А

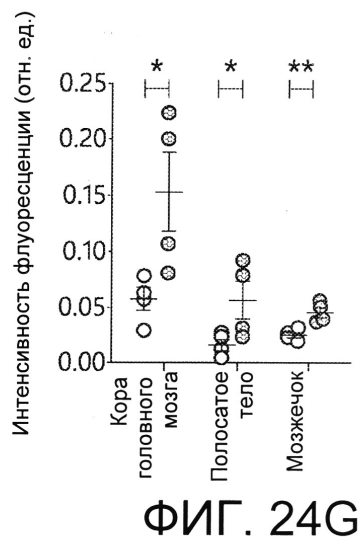
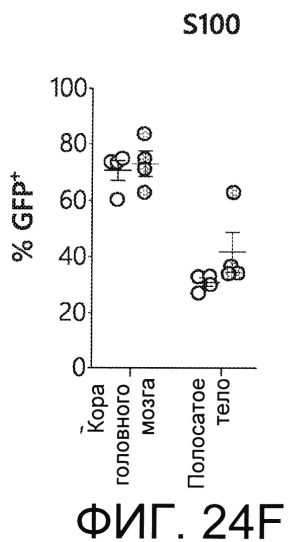
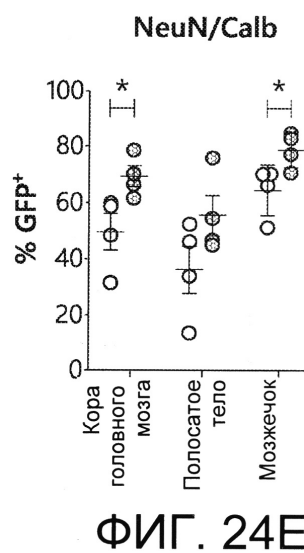
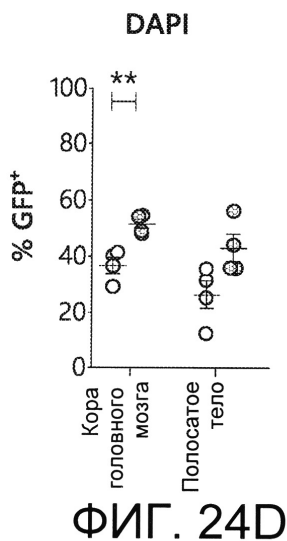


ФИГ. 24В

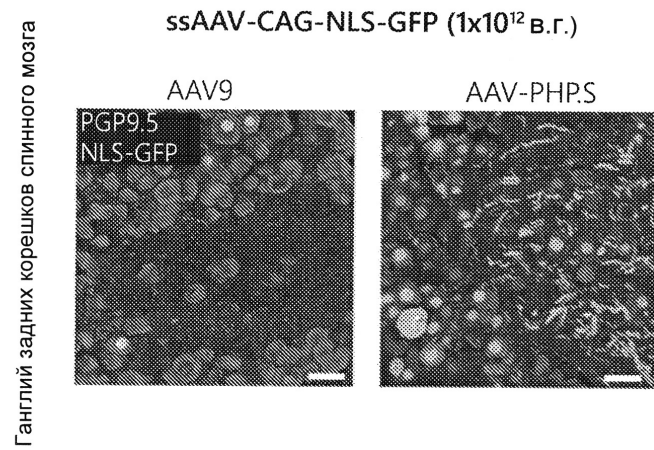
ФИГ. 24С

36/38

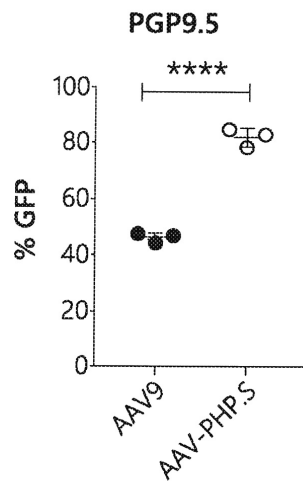
○ PHP.B ● PHP.eB



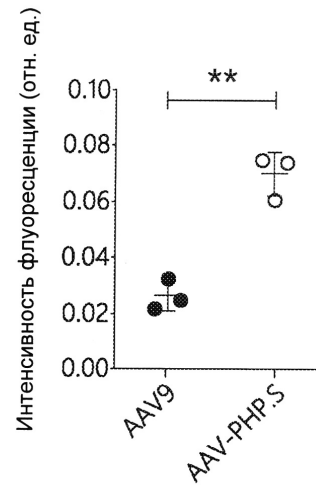
37/38



ФИГ. 25А

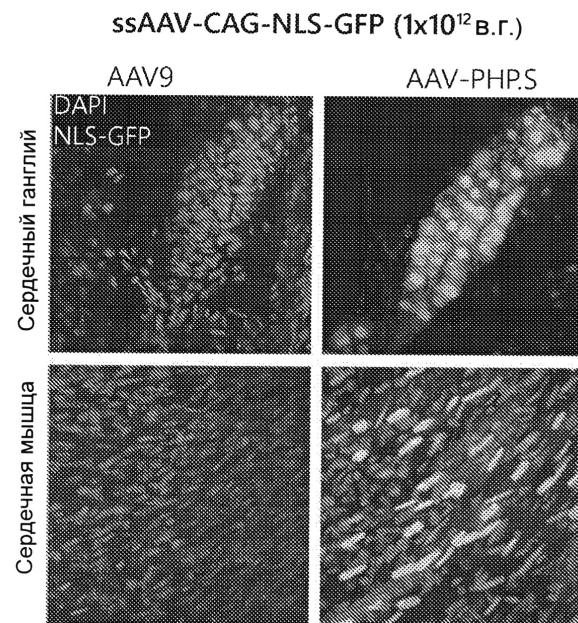


ФИГ. 25В



ФИГ. 25С

38/38



ФИГ. 25D