



MD/EP 3589730 T2 2024.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3589730 (13) T2

(51) Int. Cl: C12N 7/00 (2006.01.01)
A61K 35/76 (2015.01.01)
A61K 48/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0060 (22) Data de depozit: 2018.02.27 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18711202.4, 2018.02.27 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3589730, 2020.01.08 (31) Numărul cererii prioritare: 201762464748 P; 201762591002 P; 201862614002 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.02.28; 2017.11.27; 2018.01.05 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 04/2024, 2024.04.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 52/2023, 2023.12.27 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 02/2020, 2020.02.29
(71) Solicitant: THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, US (72) Inventatori: WILSON James M., US; WANG Qiang, US; GILES April, US; TURNER Kevin, US (73) Titular: THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, US (74) Mandatar autorizat: SOCOLOVA Sofia	

(54) Vector de virus adeno-asociat (AAV) de cladă F și utilizările acestuia

(57) Rezumat:

1

Vector de virus recombinant adeno-asociat (rAAV) care cuprinde o capsidă AAVhu68 produsă într-un sistem de producție care cuprinde o secvență de nucleotide din ID NO SECV: 1, sau o secvență cel puțin 75% identică cu aceasta care codifică ID NO SECV: 2. Capsida AAVhu68 cuprinde subpopulații de reziduuri de asparagină puternic deamidate în perechile asparagină – glicină în secvența de aminoacizi din ID NO SECV: 2. Se furnizează

2

de asemeni compoziții care conțin rAAV-ul și utilizările acestora. Suplimentar, se furnizează rAAV care are o capsulă AVV modificată genetic care cuprinde cel puțin o subpopulație de proteine vp1 sau vp2 având o Val în poziția de aminoacid 157 față de numărătoarea AAVhu68 vp1.

Revendicări: 10
Figuri: 12

MD/EP 3589730 T2 2024.04.30

(54) Adeno-associated virus (AAV) clade F vector and uses therefor**(57) Abstract:**

1

A recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector comprising an AAVhu68 capsid produced in a production system comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, or a sequence at least 75% identical thereto which encodes SEQ ID NO:2. The AAVhu68 capsid comprises subpopulations of highly deamidated asparagine residues in asparagine - glycine pairs in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Also provided are

2

compositions containing the rAAV and uses thereof. Additionally, rAAV having an engineered AAV capsid comprising at least one subpopulation of vp1 or vp2 proteins having a Val at amino acid position 157 with reference to the AAVhu68 vp1 numbering are provided.

Claims: 10

Fig.: 12

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**DECLARAȚIE PRIVIND CERCETAREA SAU DEZVOLTAREA SPONSORIZATĂ LA NIVEL
FEDERAL

Această cerere conține lucrări susținute de Agenția pentru Proiecte de Cercetare Avansată a Departamentului Apărării (DARPA) sub W911NF-13-2-0036. Guvernul SUA poate avea anumite drepturi asupra acestei invenții.

BAZA INVENȚIEI

Virusul adeno-asociat (AAV), un membru al familiei Parvovirus, este un mic virus non-anvelopat, icosaedric, cu genomul de ADN liniar monocatenar (ssADN) de aproximativ 4,7 kilobaze (kb) în lungime. Genomul de tip sălbatic cuprinde repetări terminale inversate (ITR-uri) la ambele capete ale catenei de ADN și două cadre de citire deschise (ORF-uri): rep și cap. Rep este compus din patru gene suprapuse care codifică proteinele rep necesare pentru ciclul de viață al AAV și cap conține secvențe de nucleotide suprapuse ale proteinelor de capsidă: VP1, VP2 și VP3, care se auto-asamblează pentru a forma o capsidă de o simetrie icosaedrică.

AAV este atribuit genului, *Dependovirus*, deoarece virusul a fost descoperit ca un contaminant în stocurile purificate de adenovirus. Ciclul de viață al AAV include o fază latentă, în care genomurile de AAV, după infectare, sunt integrate în mod specific în cromozomii gazdei și o fază infecțioasă, în care, în urma infectării fie cu adenovirus, fie cu virus herpes simplex, genomurile integrate sunt ulterior salvate, replicate și împachetate în virusuri infecțioase. Proprietățile de non-patogenitate, intervalul larg de infecțiozitate al gazdei, incluzând celulele care nu se divid și potențiala integrare cromozomială specifică zonei fac AAV un mijloc atractiv pentru transferul de gene.

Vectori recombinanți cu virus adeno-asociat (rAAV) derivați din parvovirusul uman deficient de replicare au fost descriși ca agenți purtători corespunzători pentru livrarea genei. În mod obișnuit, genele rep funcționale și gena cap sunt îndepărtate din vector, având ca rezultat un vector incompetent de replicare. Aceste funcții sunt asigurate în timpul sistemului de producție a vectorului, dar sunt absente în vectorul final.

Până în prezent, au existat mai multe AAV-uri diferite, bine caracterizate, izolate din primat umane sau non-umane (NHP). S-a descoperit faptul că AAV-urile de diferite serotipuri prezintă eficiențe diferite de transfecție și prezintă tropism pentru diferite celule sau țesuturi. Multe clade de AAV diferite au fost descrise în WO 2005/033321, incluzând clada F care este identificată acolo ca având doar trei membri, AAV9, AAVhu31 și AAVhu32. O analiză structurală a AAV9 este asigurată în M. A. DiMattia și colab., J. Virol. (iunie 2012) vol. 86 nr. 12 6947-6958. Această lucrare raportează faptul că AAV9 are 60 de copii (în total) ale celor trei proteine variabile (vp-uri) care sunt codificate de gena cap și au secvențe suprapuse. Acestea includ VP1 (87 kDa), VP2 (73 kDa) și, respectiv, VP3 (62 kDa), care sunt prezente într-un raport anticipat de 1:1:10. Întreaga secvență a VP3 este cuprinsă în VP2 și toată a VP2 este cuprinsă în VP1. VP1 are un domeniu N-terminal unic. Coordonatele rafinate și factorii de structură sunt disponibile sub nr. de acces 3UX1 din baza de date RCSB PDB.

Mai multe variante diferite de AAV9 au fost structurate pe calea ingineriei pentru a dezșinti sau a ținti diferite țesuturi. Vezi, de exemplu, N. Pulicheria, "Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer", Molecular Therapy, Vol. 19, nr. 6, p. 1070-1078 (iunie 2011). Dezvoltarea variantelor de AAV9 pentru a livra gene peste bariera hemato-encefalică a fost, de asemenea, raportată. Vezi, de exemplu, B.E. Deverman și colab., Nature Biotech, Vol. 34, Nr. 2, p 204 - 211 (publicat online la 1 februarie 2016) și comunicatul de presă al Caltech, A. Wetherston, www.neurology-central.com/2016/02/10/successful-delivery-of-genes-through-the-blood-brain-barrier/, accesat la 10/05/2016. Vezi, de asemenea, WO 2015/164757, WO 2016/0492301 și US 8 734 809.

Ceea ce este de dorit sunt construcțiile pe bază de AAV pentru livrarea de molecule heterologe.

REZUMATUL INVENȚIEI

Secvențe noi de capsidă AAVhu68 și rep sunt descrise, care sunt utile în fabricare și în vectori pentru livrarea moleculelor de acid nucleic la celulele gazdă.

Asigurat aici este un virus recombinant adeno-asociat (rAAV) care cuprinde o capsidă AAVhu68 și un genom de vector în capsida de AAVhu68, în care (A) genomul de vector cuprinde o moleculă de acid nucleic care cuprinde secvențe de repetare terminale inversate (ITR-uri) de AAV și între ITR-uri, o secvență de acid nucleic de non-AAV care codifică un produs legat în mod funcțional la secvențe care direcționează expresia produsului într-o celulă țintă de mamifer; și (8) capsida de AAVhu68 cuprinde proteine AAVhu68 vp1, proteine AAVhu68 vp2 și proteine AAVhu68 vp3 produse dintr-o secvență de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2, în care proteinele

AAVhu68vp1 cuprind un acid glutamic la poziția 67 și o valină la poziția 157 și proteinele AAVhu68vp2 cuprind o valină la poziția 157, pe baza numerotării din NR ID SECV: 2.

Capsida de AAVhu68 poate cuprinde subpopulații de proteine AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3, în care subpopulațiile de proteine AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3 cuprind cel puțin 50% până la 100% asparagine deamidate (N) în perechile de asparagină – glicină, la fiecare dintre pozițiile 57, 329, 452, 512, în raport cu aminoacizii din NR ID SECV: 2, în care asparaginele deamidate sunt deamidate la acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă.

De asemenea asigurat aici, este un virus recombinant adeno-asociat (rAAV) care cuprinde o capsidă AAVhu68 și un genom de vector în capsida de AAVhu68, în care (A) genomul de vector cuprinde o moleculă de acid nucleic care cuprinde secvențe de repetare terminale inversate (ITR-uri) de AAV și între ITR-uri, o secvență de acid nucleic de non-AAV care codifică un produs legat în mod funcțional la secvențe care direcționează expresia produsului într-o celulă țintă de mamifer; și (8) capsida de AAVhu68 cuprinde populații eterogene de proteine AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3, în care proteinele de AAVhu68 vp1 sunt aminoacizii 1 până la 736 din NR ID SECV: 2 (vp1) care cuprind un acid glutamic la poziția 67 și o valină la poziția 157 și cuprind, în plus, subpopulații de proteine vp1 care cuprind aminoacizi modificați pe baza pozițiilor de aminoacizi din NR ID SECV: 2, în care proteinele de AAVhu68 vp2 sunt aminoacizii 138 până la 736 din NR ID SECV: 2 (vp2) care cuprind o valină la poziția 157 și cuprind, în plus, subpopulații de proteine vp2 care cuprind aminoacizi modificați pe baza pozițiilor de aminoacizi din NR ID SECV: 2, și

în care proteinele de AAVhu68 vp3 sunt aminoacizii 203 până la 736 din NR ID SECV: 2 (vp3), care cuprind subpopulații de proteine vp3 care cuprind aminoacizi modificați pe baza pozițiilor de aminoacizi din NR ID SECV: 2, în care subpopulațiile de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3 cuprind cel puțin 50% până la 100% asparagine deamidate (N) în perechile asparagină - glicină la fiecare dintre pozițiile 57, 329, 452, 512, în raport cu aminoacizii în NR ID SECV: 2, în care asparaginele deamidate sunt deamidate la acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă.

Patru reziduuri (N57, N329, N452, N512) prezintă în mod obișnuit niveluri ridicate de deamidare. Reziduurile suplimentare (N94, N253, N270, N304, N409, N477 și Q599) prezintă, de asemenea, niveluri de deamidare de până la ~20% în diferite loturi.

Asparaginele deamidate sunt deamidate la acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora. Glutamina (glutaminele) deamidată (deamidate) poate (pot) fi deamidată (deamidate) la acid (α)-glutamic, acid γ -glutamic, o pereche de interconversie acid (α)-glutamic/acid γ -glutamic sau combinații ale acestora.

În anumite realizări, capsida de AAVhu68 cuprinde subpopulații care prezintă una sau mai multe dintre: (a) cel puțin 65% din asparagine (N) în perechile asparagină - glicină localizate la pozițiile 57 ale proteinelor vp1 este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă, pe baza numerotării NR ID SECV: 2; (b) cel puțin 75% din N în perechile asparagină - glicină din poziția 329 a proteinelor vp1, v2 și vp3 este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă, pe baza numerotării reziduurilor din secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2; (c) cel puțin 50% din N în perechile asparagină - glicină din poziția 452 a proteinelor vp1, v2 și vp3 este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă, pe baza numerotării reziduurilor din secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2; și/sau (d) cel puțin 75% din N în perechile asparagină - glicină din poziția 512 a proteinelor vp1, v2 și vp3 este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă, pe baza numerotării reziduurilor din secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2. În anumite realizări, capsida hu68 cuprinde o subpopulație de vp1 în care 75% până la 100% din N din poziția 57 a proteinelor vp1 este deamidat, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă. În anumite realizări, capsida hu68 cuprinde o subpopulație de proteine vp1, proteine vp2 și/sau proteine vp3 în care 75% până la 100% din N din poziția 329, pe baza numerotării SEQ ID NR: 2, este deamidat așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă. În anumite realizări, capsida hu68 cuprinde o subpopulație de proteine vp1, proteine vp2 și/sau proteine vp3 în care 75% până la 100% din N din poziția 452, pe baza numerotării SEQ ID NR:2, este deamidat așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă. În anumite realizări, capsida hu68 cuprinde o subpopulație de proteine vp1, proteine vp2 și/sau proteine vp3 în care 75% până la 100% din N din poziția 512, pe baza numerotării SEQ ID NR:2, este deamidat așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă. În anumite realizări, secvența de acid nucleic care codifică proteinele este NR ID SECV: 1 sau o secvență cel puțin 80% până la cel puțin 99% identică cu NR ID SECV: 1 care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2. În anumite realizări, secvența este cel puțin 80% până la 97% identică cu NR ID SECV: 1. Capsida de rAAVhu68 poate cuprinde în plus cel

puțin o subpopulație de proteine vp1, vp2 și/sau vp3 care prezintă modificări de aminoacizi din NR ID SECV: 2, care cuprinde cel puțin aproximativ 50 până la 100% deamidare la cel puțin patru poziții selectate dintre una sau mai multe dintre N57, 329, 452, 512 sau combinații ale acestora. În anumite realizări, capsida hu68 cuprinde subpopulații de proteine vp1, vp2 și/sau vp3 care cuprind în plus 1% până la aproximativ 40% deamidarea asparaginelor în cel puțin una sau mai multe dintre pozițiile N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709 sau combinații ale acestora. În anumite realizări, capsida de hu68 cuprinde subpopulații de proteine vp1, vp2 și/sau vp3 care cuprind în plus una sau mai multe modificări selectate dintre una sau mai multe modificări în una sau mai multe dintre următoarele: lizină acetilată, serină și/sau treonină fosforilată, acid aspartic izomerizat, triptofan oxidat și/sau metionină oxidată sau un aminoacid amidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă. rAAVhu68 poate cuprinde aproximativ 60 de proteine totale de capsidă într-un raport de aproximativ 1 vp1 la aproximativ 1 până la 1,5 vp2 la 3 până la 10 proteine vp3. Capsida de AAVhu68 poate cuprinde aproximativ 60 de proteine totale de capsidă într-un raport de aproximativ 1 vp1 la aproximativ 1 vp2 la 3 până la 9 proteine vp3. În anumite realizări, genomul de vector cuprinde secvențe ITR de AAV dintr-o sursă de AAV, alta decât AAVhu68.

În anumite realizări, o compoziție este asigurată, care cuprinde o populație mixtă de virus recombinant adeno-asociat hu68 (rAAVhu68), în care fiecare dintre rAAVhu68 este selectat în mod independent dintr-un rAAVhu68, așa cum a fost descris aici. Capsida medie de AAVhu68 poate cuprinde aproximativ 60 de proteine totale de capsidă într-un raport de aproximativ 1 vp1 la aproximativ 1 până la 1,5 vp2 la 3 până la 10 proteine vp3. Capsida medie de AAVhu68 poate cuprinde aproximativ 60 de proteine totale de capsidă într-un raport de aproximativ 1 vp1 la aproximativ 1 vp2 la 3 până la 6 proteine vp3. În anumite realizări, compoziția este formulată pentru livrare intratecală și genomul de vector cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică un produs pentru livrare la sistemul nervos central. În anumite realizări, compoziția este formulată pentru administrare intravenoasă. Genomul de vector poate cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică un anticorp anti-HER2. În anumite realizări, compoziția este formulată pentru livrare intranasală sau intramusculară. O compoziție poate cuprinde cel puțin un stoc de vector rAAVhu68 și un agent transportor, excipient și/sau agent de conservare opțional. Utilizarea unui rAAVhu68 sau a unei compoziții așa cum a fost definită în revendicările pentru livrarea unui produs genetic dorit unui subiect care are nevoie de acesta, este asigurată. Un rAAVhu68 așa cum a fost definit în revendicări poate fi produs utilizând un sistem de producție rAAV așa cum a fost descris în cele ce urmează. Sistemul de producție cuprinde: (a) o secvență de acid nucleic de capsidă de AAVhu68 care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2; (b) o moleculă de acid nucleic cospunzătoare pentru împachetare în capsida de AAVhu68, molecula menționată de acid nucleic cuprinzând secvențe de repetare terminale inversate (ITR-uri) de AAV și o secvență de acid nucleic de non-AAV care codifică un produs genetic legat în mod funcțional la secvențe care direcționează expresia produsului într-o celulă gazdă; și (c) suficiente funcții rep AAV și funcții auxiliare pentru a permite împachetarea moleculei de acid nucleic în capsida de AAVhu68 recombinantă. Secvența de acid nucleic de la (a) poate cuprinde cel puțin NR ID SECV: 1 sau o secvență cel puțin 70% până la cel puțin 99% identică cu NR ID SECV: 1 care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2. Sistemul poate cuprinde în plus o secvență de acid nucleic de la aproximativ nt 607 până la aproximativ nt 2211 din NR ID SECV: 1, care codifică AAVhu68 vp3 de la aproximativ aa 203 până la aproximativ aminoacidul 736 din NR ID SECV: 2. Sistemul poate cuprinde celule de rinichi embrionar uman 293 sau un sistem de baculovirus.

O metodă pentru reducerea deamidării unei capside AAVhu68 este descrisă, dar nu este revendicată aici. Metoda cuprinde producerea unei capside de AAVhu68 dintr-o secvență de acid nucleic care conține codoni AAVhu68 vp modificați, secvența de acid nucleic cuprinzând codoni de glicină modificați în mod independent la una până la trei dintre perechile arginină - glicină localizate la poziția 58, 330, 453 și/sau 513 din NR ID SECV: 2, astfel încât codonul modificat codifică un aminoacid, altul decât glicina. Metoda poate cuprinde producerea unei capside de AAVhu68 dintr-o secvență de acid nucleic care conține codoni AAVhu68 vp modificați, secvența de acid nucleic cuprinzând codoni de arginină modificați în mod independent la una până la trei dintre perechile arginină - glicină localizate la poziția 57, 329, 452 și/sau 512 în NR ID SECV: 2, astfel încât codonul modificat codifică un aminoacid, altul decât arginină.

Fiecare codon modificat poate codifica un aminoacid diferit.

Doi sau mai mulți codoni modificați pot codifica același aminoacid. O capsidă de AAVhu68 mutantă, așa cum a fost descrisă aici, poate conține o mutație într-o pereche arginină - glicină, astfel încât glicina este schimbată într-o alanină sau într-o serină. O capsidă de AAVhu68 mutantă poate conține unul, doi sau trei mutanți, în care referința AAVhu68 conține în mod nativ patru perechi NG. În anumite realizări, o capsidă de AAVhu68 mutantă conține doar o singură mutație într-o pereche NG. O capsidă de

AAV mutantă poate conține mutații în două perechi NG diferite. O capsidă de AAVhu68 mutantă poate conține mutație în două perechi NG diferite care sunt localizate într-o locație separată, din punct de vedere structural, în capsida de AAVhu68.

Mutația poate să nu fie în regiunea unică VP1.

5 Una dintre mutații poate fi în regiunea unică VP1. O capsidă de AAVhu6 mutantă poate să nu conțină modificări în perechile NG, dar poate conține mutații pentru a minimiza sau elimina deamidarea în una sau mai multe asparagine sau într-o glutamină, localizată în afara unei perechi NG.

O particulă de AAVhu68, așa cum a fost definită în revendicări, poate exprima un anticorp anti-HER2 util pentru tratamentul și/sau profilaxia cancerelor HER2+.

10 O moleculă de acid nucleic care cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică o proteină rep AAVhu68 sau un fragment funcțional al acesteia sub controlul secvențelor de control reglatoare exogene, care direcționează expresia acesteia într-o celulă gazdă este descrisă, dar nu este revendicată aici. Proteina rep poate avea secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 4 sau dintr-un fragment funcțional al acesteia.

15 Acestea și alte puncte de vedere conform invenției vor fi evidente din următoarea descriere detaliată a invenției.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

FIG 1 asigură o aliniere care prezintă secvența de aminoacizi a proteinei de capsidă vp1 de AAVhu68 [NR ID SECV: 16] (marcată hu.68.vp1 în aliniere), cu AAV9 [NR ID SECV: 6], AAVhu31 (marcată hu.31 în aliniere) [NR ID SECV: 10] și AAVhu32 (marcată hu.32 în aliniere) [NR ID SECV: 11]. În comparație cu AAV9, AAVhu31 și AAVhu32, două mutații (A67E și A157V) au fost descoperite ca fiind cruciale în AAVhu68 și încercuite în FIG.

FIGURILE 2A-2C asigură o aliniere a secvenței de acid nucleic care codifică proteina de capsidă vp1 de AAVhu68, cu AAV9, AAVhu31 [NR ID SECV: 12] și AAVhu32 [NR ID SECV: 13].

25 FIGURILE 3A-3B asigură grafice care prezintă randamentele de AAVhu.68 în comparație cu cele ale AAV9. Experimentul a fost efectuat așa cum a fost descris în Exemplul 2. n=6. Valoarea P a fost calculată și prezentată în figuri.

FIG 3A prezintă randamentele de AAVhu.68 și AAV9 din lizatul total. Valoarea p a fost calculată ca 0,4173 și a fost determinată ca fiind ne semnificativă.

30 FIG 3B prezintă randamentele de AAVhu.68 și AAV9 din supernatantul de cultură. Randamentul AAVhu.68 în supernatant este în mod semnificativ mai mare decât cel al AAV9 cu o valoare p la 0,0003.

FIGURILE 4A-4C asigură colorarea imunohistochimică a diferite organe (inimă, ficat, plămân și mușchi) de la șoareci cărora li s-a administrat 5×10^{11} GC AAVhu68.CB7.nLacZ. Probele au fost preparate și procesate așa cum a fost descris în Exemplul 3. Probele au fost contra-colorate cu Eozină prezentată în roșu. O colorare pozitivă pentru LacZ prezentată în albastru indică o transducție de succes a AAVhu68.

35 FIG 4A asigură colorarea imunohistochimică a diferite organe (inimă, ficat, plămân și mușchi) de la șoareci cărora li s-a administrat 5×10^{11} GC AAVhu68.CB7.nLacZ pe cale intravenoasă (IV). Toate organele testate au demonstrat transducția AAVhu68, în timp ce un tropism care favorizează inima și ficatul față de plămân și mușchi a fost observat.

40 FIG 4B asigură colorarea imunohistochimică a diferite organe (inimă, ficat, plămân și mușchi) de la șoareci cărora li s-a administrat 5×10^{11} GC AAVhu68.CB7.nLacZ pe cale intramusculară (IM). Inima, ficatul și mușchiul au demonstrat o rată de transducție ridicată a AAVhu68, în timp ce nicio transducție detectabilă în plămân nu a fost observată.

45 FIG 4C asigură colorarea imunohistochimică a diferite organe (inimă, ficat, plămân și mușchi) de la șoareci cărora li s-a administrat 5×10^{11} GC AAVhu68.CB7.nLacZ pe cale intranasală (IN). Transducția dispersată a fost observată în inimă, ficat, mușchi și plămân.

Figurile 5A-5C asigură imagini microscopice fluorescente de diferite regiuni ale creierului (hipocamp, FIG 5A; cortex motor, FIG 5B; și cerebel, FIG 5C) de la șoareci cărora li s-a administrat AAVhu68.GFP sau AAV9.GFP în doze de 1×10^{10} GC sau 1×10^{11} GC. Probele au fost preparate și procesate așa cum a fost descris în Exemplul 4. Un semnal pozitiv de la GFP prezentat în verde indică o transducție de succes a vectorilor AAV.

50 FIG 5A asigură imagini microscopice fluorescente ale lamelelor de hipocamp de la șoareci cărora li s-a administrat AAVhu68.GFP sau AAV9.GFP la doze de 1×10^{10} GC sau 1×10^{11} GC. Probe corespunzătoare de la șoareci netratați colorate cu colorant de acid nucleic prezentat în albastru au fost asigurate ca un control negativ. Transducția vectorilor AAV a fost observată în toate probele testate, cu excepția uneia de la șoarecii injectați cu 1×10^{10} GC de AAV9.GFP.

55 FIG 5B asigură imagini microscopice fluorescente ale cortexurilor motorii de la șoareci cărora li s-a administrat AAVhu68.GFP sau AAV9.GFP la doze de 1×10^{10} GC sau 1×10^{11} GC. O transducție mai bună a AAVhu68.GFP în comparație cu cea a AAV9 a fost observată.

FIG 5C asigură imagini microscopice fluorescente ale lamelilor de cerebel de la șoareci cărora li s-a administrat AAVhu68.GFP sau AAV9.GFP la doze de 1×10^{10} GC sau 1×10^{11} GC. O transducție de succes a AAVhu68.GFP a fost observată atunci când șoarecii au fost injectați cu 1×10^{11} GC de vector.

Figurile 6A-6D asigură imagini microscopice de diferite organe (ficat, rinichi, inimă și pancreas) de la șoareci cărora li s-a administrat AAVhu68.GFP pe cale intravenoasă. Probele au fost preparate și procesate așa cum a fost descris în Exemplul 4. Un semnal pozitiv de la GFP prezentat în verde indică o transducție de succes a vectorilor AAV menționați. Imaginile de câmp luminos prezentate în alb și negru au fost asigurate pentru morfologia organului, în timp ce canalul fluorescent roșu corespunzător a fost asigurat ca un control negativ, acolo unde este cazul.

FIG 6A asigură imagini microscopice ale unei secțiuni reprezentative de ficat de la șoareci cărora li s-a administrat AAVhu68.GFP pe cale intravenoasă. Un semnal pozitiv prezentat în verde a fost observat.

FIG 6B asigură imagini microscopice ale unei secțiuni reprezentative de rinichi de la șoareci cărora li s-a administrat AAVhu68.GFP pe cale intravenoasă. Un semnal pozitiv prezentat în verde a fost observat.

FIG 6C asigură imagini microscopice ale unei secțiuni reprezentative de inimă de la șoareci cărora li s-a administrat AAVhu68.GFP pe cale intravenoasă. Un semnal pozitiv prezentat în verde a fost observat.

FIG 6D asigură imagini microscopice ale unei secțiuni reprezentative de pancreas de la șoareci cărora li s-a administrat AAVhu68.GFP pe cale intravenoasă. Un semnal pozitiv prezentat în verde a fost observat.

FIG 7 este o imagine a unui aparat pentru livrare intracisternală, incluzând un ac introductor opțional pentru metoda de inserție coaxială, care include o seringă cu vector de 10 cc, o seringă de spălare preumplută de 10 cc, un set de extensie cu conector T, un ac spinal de $22G \times \times 5"$, un ac introductor opțional de $18G \times 3,5"$.

FIGURILE 8A-8B ilustrează randamentul de producție pentru doi vectori AAVhu68 diferiți preparați la scară mică (FIG 8A) și la scară foarte mare (mega, FIG 8B) în comparație cu vectori care prezintă capside diferite. Datele pentru preparatele de vector la scară mică au fost generate utilizând vectori care prezintă o capsidă AAVhu68, AAV9, AAV8 sau AAV8triplu și care prezintă un genom de vector care cuprinde un promotor de citomegalovirus (CMV), o secvență de codificare a luciferazei de licurici și o poli A SV40 (CMV.flLuciferază.SV40). Preparatele la scară mega au fost evaluate utilizând vectori AAVhu68, AAV9, AAV8 sau AAV8triplu care prezintă un genom de vector care prezintă un promotor CMV, un intron, o secvență de codificare a imunoadezinei (201Ig IA) și o poli A SV40.

FIG. 9 asigură puritatea producției pentru vectori AAVhu68 preparați la scară mega în comparație cu vectorii care prezintă capside diferite, incluzând AAV8triplu, AAV9 și AAV8. Preparatele au fost evaluate utilizând vectori AAVhu68, AAV9, AAV8 sau AAV8triplu care prezintă un genom de vector care cuprinde un promotor CMV, un intron, o secvență care codifică imunoadezină (201Ig IA) și o poli A SV40.

Figurile 10A -10B asigură nivelul de expresie transgenică a vectorilor AAVhu68 la șoarecii masculi RAG KO ($n = 5/\text{grup}$) injectați pe cale intramusculară cu 3×10^{11} GC/șoarece (FIG 10A) sau 3×10^{10} GC/șoarece (FIG 10B) de vector în comparație cu cea a vectorilor care prezintă capside diferite, incluzând AAV8triplu, AAV9 și AAV8. Transgena exprimată de vectorii rAAV este o secvență care codifică imunoadezină (201Ig IA). Experimentul a fost efectuat așa cum a fost descris în detaliu în Exemplul 8.

Figurile 11A-11B asigură nivelul de expresie transgenică a vectorilor AAVhu68 fie în ficat (FIG 11A), fie în mușchi (FIG 11B) la șoareci masculi C57BL/6J ($n = 5/\text{grup}$) injectați pe cale intramusculară cu 3×10^{11} GC/șoarece de vector în comparație cu cel al vectorilor care prezintă capside diferite, incluzând AAV8triplu, AAV9 și AAV8. Transgena exprimată de vectorii rAAV este luciferaza de licurici. Experimentul a fost realizat așa cum a fost descris în detaliu în Exemplul 9.

FIG 12 asigură nivelul de expresie transgenică a vectorilor AAVhu68 la macaci cynomolgus masculi și femele, injectați pe cale intramusculară cu 1×10^{13} GC/kg greutate corporală de vector în comparație cu cel al vectorilor care prezintă capside diferite, incluzând AAV8triplu, AAV9 și AAV8. Transgena exprimată de vectorii rAAV este o secvență care codifică imunoadezină (201Ig IA). Experimentul a fost realizat așa cum a fost descris în detaliu în Exemplul 10.

DESCRIERE DETALIATĂ A INVENȚIEI

Expunerea tehnică prezentată mai jos poate, în anumite privințe, să ajungă dincolo de sfera de aplicare a revendicărilor. Elementele conform expunerii care nu intră în sfera de aplicare a revendicărilor sunt asigurate pentru informare.

Asigurate aici sunt secvențe de acid nucleic și aminoacizi ai unui virus nou izolat adeno-asociat (AAV), așa cum a fost definit în revendicări, care este denumit aici AAVhu68, care se află în clada F. AAVhu68 (denumit anterior aici AAV3G2) variază de un alt virus AAV9 de Cladă F (NR ID SECV: 5) prin doi aminoacizi codificați la pozițiile 67 și 157 ale vp1, NR ID SECV: 2. În schimb, celelalte AAV de Cladă F (AAV9, hu31, hu31) are un Ala la poziția 67 și un Ala în poziția 157. Sunt asigurate noi capsde de AAVhu68, așa cum au fost definite în revendicări, având valină (Val sau V) la poziția 157 pe baza

numerotării din NR ID SECV: 2 și un acid glutamic (Glu sau E) la poziția 67. Raportul proteinelor vp3 în capsida de AAVhu68 relativ la proteinele vp1 și vp2 poate fi mai mic decât cel descris anterior pentru capsidul de AAV9 și de alte AAV-uri de clasă F.

Capsida de AAVhu68 poate fi compusă din proteine de AAVhu68 vp1, proteine de AAVhu68 vp2 și proteine de AAVhu68 vp3 într-un raport de aproximativ 1 vp1: 1 până la aproximativ 1,5 vp2: la 3 până la aproximativ 10 vp3. Un stoc de virus rAAVhu68 sau o populație de rAAVhu68 poate fi o compoziție care prezintă o medie de aproximativ 60 proteine totale vp 1, vp2 și vp3 în capsida de AAVhu68, care sunt prezente în raport mediu vp1:vp2:vp3 de aproximativ 1: la aproximativ 1: la aproximativ 3 până la 6. Aceste capside de AAV descrise aici sunt utile pentru generarea de vectori AAV recombinanți (rAAV) care asigură randament și/sau eficiență de împachetare bună și pentru asigurarea de vectori rAAV utili în transducerea unui număr de tipuri diferite de celule și țesuturi. Astfel de tipuri de celule și țesuturi pot include, fără limitare, plămân, inimă, mușchi, ficat, pancreas, rinichi, creier, hipocamp, cortex motor, cerebel, celule epiteliale nazale, celule musculare cardiace sau cardiomiocite, hepatocite, celule endoteliale pulmonare, miocite, celule epiteliale pulmonare, celule insulare, celule acinare, celule renale și neuroni motori.

Un „AAV recombinant” sau „rAAV” este o particulă virală rezistentă la ADN-ază care conține două elemente, o capsidă de AAV și un genom de vector care conține cel puțin secvențe de codificare de non-AAV împachetate în capsida de AAV. Cu excepția faptului în care a fost specificat altfel, acest termen poate fi utilizat în mod interschimbabil cu expresia „vector de rAAV”. rAAV este un „virus deficient de replicare” sau „vector viral”, din moment ce îi lipsește orice genă funcțională rep de AAV sau genă funcțională cap de AAV și nu poate genera urmași. Singurele secvențe de AAV pot fi secvențele de repetare terminale inversate (ITR-uri) de AAV, localizate în mod tipic la capetele terminale extreme 5' și 3' ale genomului de vector pentru a permite genei și secvențelor de reglare localizate între ITR-uri să fie împachetate în cadrul capsidei de AAV.

Așa cum a fost utilizat aici, un „genom de vector” se referă la secvența de acid nucleic împachetată în interiorul capsidei de rAAV care formează o particulă virală. O astfel de secvență de acid nucleic conține secvențe de repetare terminale inversate de AAV (ITR-uri). În exemplele de aici, un genom de vector conține, la un minim, de la 5' la 3', o ITR 5' de AAV, secvență (secvențe) de codificare și o ITR 3' de AAV. ITR-uri de AAV2, o sursă diferită de AAV decât capsida sau altele decât ITR-urile de lungime completă pot fi selectate. ITR-urile pot fi din aceeași sursă de AAV, precum AAV care asigură funcția de rep în timpul producției sau un AAV transcomplementar. În plus, alte ITR-uri pot fi utilizate. Mai mult, genomul de vector conține secvențe reglatoare care direcționează expresia produșilor genetici. Componentele corespunzătoare ale unui genom de vector sunt discutate mai în detaliu, aici.

Un rAAVhu68 este compus dintr-o capsidă de AAVhu68 și un genom de vector. O capsidă de AAVhu68 este un ansamblu dintr-o populație eterogenă de vp1, o populație eterogenă de vp2 și o populație eterogenă de proteine vp3. Așa cum a fost utilizat aici, atunci când este utilizat pentru a se referi la proteine de capsidă vp, termenul „eterogen” sau orice variație gramaticală a acestuia se referă la o populație care constă din elemente care nu sunt aceleași, de exemplu, care prezintă monomeri (proteine) vp1, vp2 sau vp3 cu diferite secvențe de aminoacizi modificate. NR ID SECV: 2 asigură secvența de aminoacizi codificată a proteinei de AAVhu68 vp 1.

Capsida de AAVhu68 conține subpopulații în cadrul proteinelor vp1, în cadrul proteinelor vp2 și în cadrul proteinelor vp3 care au modificări de la reziduurile de aminoacizi anticipate în NR ID SECV: 2. Aceste subpopulații includ, la un minim, anumite reziduuri de asparagină deamidate (N sau Asn). De exemplu, anumite subpopulații cuprind cel puțin una, două, trei sau patru poziții de asparagine (N) foarte deamidate în perechile asparagină - glicină din NR ID SECV: 2 și, în mod opțional, care cuprind în plus alți aminoacizi deamidați, în care deamidarea are ca rezultat o modificare de aminoacid și alte modificări opționale. În anumite realizări, subpopulațiile de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3 cuprind cel puțin 50% până la 100% asparagine (N) deamidate în perechile asparagină - glicină la fiecare dintre pozițiile 57, 329, 452, 512, în raport cu aminoacizii din NR ID SECV: 2, în care asparaginele deamidate sunt deamidate la acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă. NR ID SECV: 14 asigură o secvență de aminoacizi a unei capside de AAVhu68 modificată, ilustrând poziții care pot avea un anumit procent de aminoacizi deamidați sau modificați altfel. Diferitele combinații ale acestor și ale altor modificări sunt descrise aici.

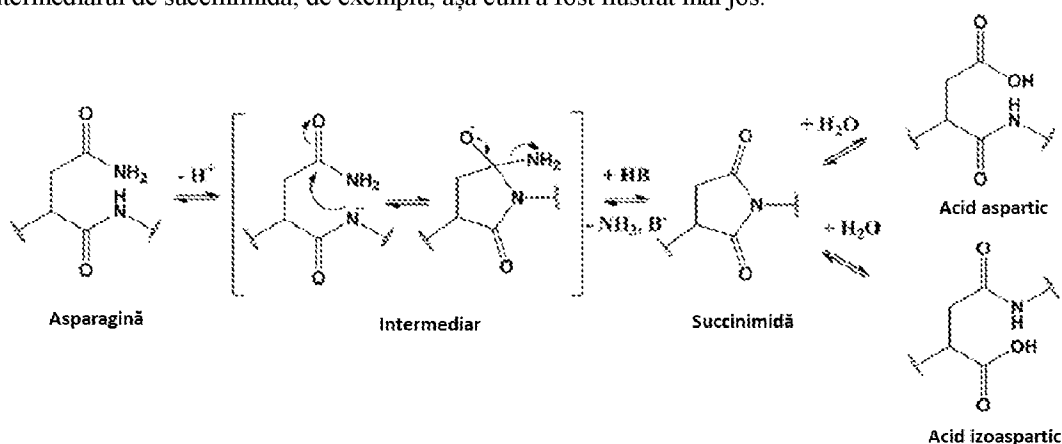
Așa cum a fost utilizată aici, o „subpopulație” de proteine vp se referă la un grup de proteine vp care are cel puțin o caracteristică definită în comun și care constă din cel puțin un membru al grupului până la mai puțin de toți membrii grupului de referință, cu excepția faptului în care a fost specificat altfel. De exemplu, o „subpopulație” de proteine vp1 este cel puțin o (1) proteină vp1 și mai puțin decât toate proteinele vp1 dintr-o capsidă de AAV asamblată, cu excepția faptului în care a fost specificat altfel. O

„subpopulație” de proteine vp3 poate fi o (1) proteină vp3 până la mai puțin decât toate proteinele vp3 dintr-o capsidă de AAV asamblată, cu excepția faptului în care a fost specificat altfel. De exemplu, proteinele vp1 pot fi o subpopulație de proteine vp; proteinele vp2 pot fi o subpopulație separată de proteine vp, și vp3 sunt încă o subpopulație suplimentară de proteine vp într-o capsidă de AAV asamblată. Într-un alt exemplu, proteinele vp1, vp2 și vp3 pot conține subpopulații care prezintă modificări diferite, de exemplu, cel puțin una, două, trei sau patru asparagine înalt deamidate, de exemplu, la perechile asparagină - glicină.

Cu excepția faptului în care a fost specificat altfel, înalt deamidat se referă la cel puțin 50% deamidat, cel puțin 60% deamidat, cel puțin 65% deamidat, cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, 97%, 99%, până la aproximativ 100% deamidat la o poziție de aminoacizi de referință, în comparație cu secvența de aminoacizi anticipată la poziția de aminoacizi de referință (de exemplu, cel puțin 80% din asparagine la aminoacidul 57 din NR ID SECV: 2 poate fi deamidat pe baza proteinelor totale vp1 sau 20% din asparaginele de la aminoacidul 409 din NR ID SECV: 2 poate fi deamidat pe baza proteinelor totale vp 1, vp2 și vp3). Astfel de procente pot fi determinate utilizând tehnici de spectrometrie de masă.

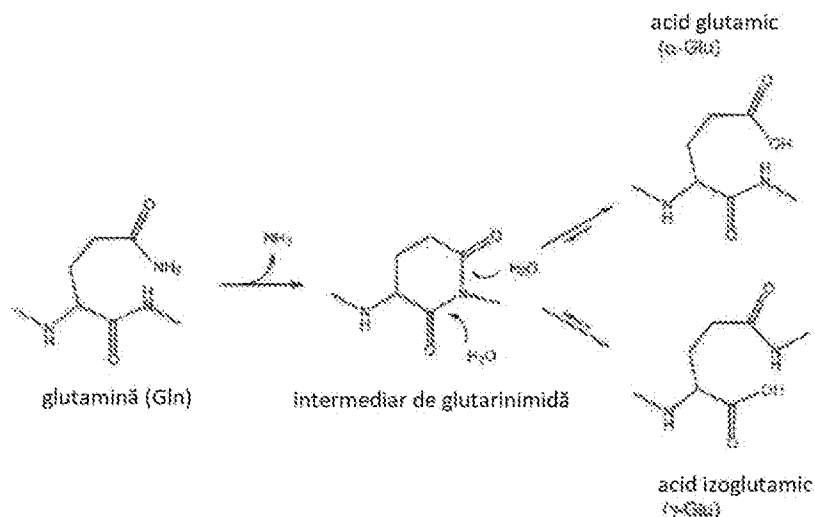
Fără a dori să fie legată de teorie, deamidarea a cel puțin reziduurilor înalt deamidate din proteinele vp din capsida de AAVhu68 este considerată a fi în principal de natură non-enzimatică, fiind cauzată de grupările funcționale din interiorul proteinei de capsidă, care deamidează asparaginele selectate și într-un grad mai mic, reziduuri de glutamină. Asamblarea eficientă a capsidei a majorității proteinelor vp1 de deamidare indică faptul că fie aceste evenimente au loc după asamblarea capsidei sau faptul că deamidarea în monomeri individuali (vp 1, vp2 sau vp3) este bine tolerată din punct de vedere structural și nu afectează în mare măsură dinamica asamblării. Deamidarea extinsă în regiunea unică VP1 (VP1-u) (~aa 1-137), considerată în general a fi localizată intern înainte de intrarea celulară, sugerează faptul că deamidarea VP poate avea loc înainte de asamblarea capsidei.

Fără a dori să fie legată de teorie, deamidarea N poate avea loc prin atomul de azot al rezidului structurii principale de la capătul C-terminal, care conduce un atac nucleofil la atomul de carbon al grupării amidă a catenei laterale a Asn. Un reziduu de succinimidă cu inel închis intermediar este considerat că se formează. Reziduu de succinimidă conduce apoi hidroliza rapidă pentru a duce la produsul final acid aspartic (Asp) sau acid izoaspartic (IzoAsp). Prin urmare, în anumite realizări, deamidarea asparaginei (N sau Asn) duce la un Asp sau un IzoAsp, care se poate face interconversia prin intermediarul de succinimidă, de exemplu, așa cum a fost ilustrat mai jos.



Așa cum a fost asigurat aici, fiecare N deamidat din NR ID SECV: 2 poate fi în mod independent acid aspartic (Asp), acid izoaspartic (IzoAsp), aspartat și/sau un amestec de interconversie de Asp și IzoAsp sau combinații ale acestora. Orice raport corespunzător de acid α - și izoaspartic poate fi prezent. De exemplu, raportul poate fi de la 10:1 până la 1:10 aspartic față de izoaspartic, aproximativ 50:50 aspartic: izoaspartic sau aproximativ 1:3 aspartic: izoaspartic sau un alt raport selectat.

În anumite realizări, una sau mai multe glutamine (Q) din NR ID SECV: 2 deamidează la acid glutamic (Glu), adică acid α -glutamic, acid γ -glutamic (Glu) sau un amestec de acid α - și γ -glutamic, care se poate face interconversia printr-un intermediar comun de glutarimidă. Orice raport corespunzător de acid α - și γ -glutamic poate fi prezent. De exemplu, raportul poate fi de la 10:1 până la 1:10 α față de γ , sau aproximativ 50:50 α : γ sau aproximativ 1:3 α : γ sau un alt raport selectat.



Astfel, o capsidă de rAAVhu68 așa cum a fost revendicată aici, cuprinde o capsidă de AAVhu68 și un genom de vector în capsida de AAVhu68, în care (A) genomul de vector cuprinde o moleculă de acid nucleic care cuprinde secvențe de repetare terminale inversate (ITR-uri) de AAV și între ITR-uri o secvență de acid nucleic de non-AAV care codifică un produs legat în mod funcțional la secvențe care direcționează expresia produsului într-o celulă țintă de mamifer; și (8) capsida de AAVhu68 cuprinde proteine de AAVhu68 vp1, proteine de AAVhu68 vp2 și proteine de AAVhu68 vp3 produse dintr-o secvență de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2, în care proteinele de AAVhu68vp1 cuprind un acid glutamic la poziția 67 și o valină la poziția 157 și proteinele de AAVhu68vp2 cuprind o valină la poziția 157 pe baza numerotării NR ID SECV: 2.

Capsida de AAVhu68 poate cuprinde subpopulații de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3, în care subpopulațiile de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAV hu68 vp3 cuprind cel puțin 50% până la 100% asparagine (N) deamidate în perechi de asparagină – glicină la fiecare dintre pozițiile 57, 329, 452, 512, în raport cu aminoacizii din NR ID SECV: 2, în care asparaginele deamidate sunt deamidate la acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă.

În mod alternativ, capsida de AAVhu68 cuprinde populații eterogene de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3,

în care proteinele de AAVhu68 vp1 sunt aminoacizii 1 până la 736 din NR ID SECV: 2 (vp1) care cuprind un acid glutamic la poziția 67 și o valină la poziția 157 și cuprind, în plus, subpopulații de proteine vp1 care cuprind aminoacizi modificați pe baza pozițiilor de aminoacizi în NR ID SECV: 2,

în care proteinele de AAVhu68 vp2 sunt aminoacizii 138 până la 736 din NR ID SECV: 2 (vp2) care cuprind o valină la poziția 157 și cuprind, în plus, subpopulații de proteine vp2 care cuprind aminoacizi modificați pe baza pozițiilor de aminoacizi în NR ID SECV: 2, și

în care proteinele de AAVhu68 vp3 sunt aminoacizii 203 până la 736 din NR ID SECV: 2 (vp3), care cuprind subpopulații de proteine vp3 care cuprind aminoacizi modificați pe baza pozițiilor de aminoacizi din NR ID SECV: 2, în care subpopulațiile proteinelor AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3 cuprind cel puțin 50% până la 100% asparagine (N) deamidate în perechile asparagină - glicină la fiecare dintre pozițiile 57, 329, 452, 512, în raport cu aminoacizii în NR ID SECV: 2, în care asparaginele deamidate sunt deamidate la acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă.

Capsida de rAAVhu68 poate include subpopulații din capsida de rAAVhu68 a proteinelor vp1, vp2 și/sau vp3 cu aminoacizi deamidați, incluzând la un minim, cel puțin o subpopulație care cuprinde cel puțin o asparagină înalt deamidată. În plus, alte modificări pot include izomerizarea, în special la pozițiile selectate de reziduuri ale acidului aspartic (D sau Asp). Alte modificări pot include, de asemenea, o amidare la o poziție Asp.

O capsidă de AAVhu68 poate conține subpopulații de vp1, vp2 și vp3 care prezintă cel puțin 4 până la cel puțin aproximativ 25 de poziții de reziduuri de aminoacizi deamidate, dintre care cel puțin 1 până la 10% sunt deamidate în comparație cu secvența de aminoacizi codificată din NR ID SECV: 2. Majoritatea acestora pot fi reziduuri de N. Cu toate acestea, reziduurile de Q pot fi, de asemenea, deamidate.

Proteinele de AAVhu68 vp1, vp2 și vp3 sunt exprimate în mod tipic ca variante alternative de matisare codificate de aceeași secvență de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi vp1 de lungime completă din NR ID SECV: 2 (aminoacid 1 până la 736). În mod opțional, secvența care codifică vp1 este utilizată singură pentru a exprima proteinele vp1, vp2 și vp3. În mod alternativ, această secvență poate fi co-exprimată cu una sau mai multe dintr-o secvență de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi de AAVhu68 vp3 din NR ID SECV: 2 (aproximativ aa 203 până la 736) fără regiunea unică a vp1 (aa 1 până la aproximativ aa 137) și/sau regiuni unice vp2 (aproximativ aa 1 până la aproximativ aa 202) sau o catenă complementară acesteia, ARNm-ul sau ARNt-ul corespunzător (aproximativ nt 607 până la aproximativ nt 2211 din NR ID SECV: 1) sau o secvență de cel puțin 70% până la cel puțin 99% (de exemplu, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99%) identică cu NR ID SECV: 1 care codifică aa 203 până la 736 din NR ID SECV: 2. În plus sau alternativ, secvența care codifică vp1 și/sau care codifică vp2 poate fi co-exprimată cu secvența de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi AAVhu68 vp2 din NR ID SECV: 2 (aproximativ aa 138 până la 736) fără regiunea unică vp1 (aa 1 până la aproximativ 137) sau o catenă complementară acesteia, ARNm-ul sau ARNt-ul corespunzător (nt 412 până la 2211 din NR ID SECV: 1) sau o secvență de cel puțin 70% până la cel puțin 99% (de exemplu, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99%) identică cu NR ID SECV: 1 care codifică aproximativ aa 138 până la 736 din NR ID SECV: 2.

Așa cum a fost descris aici, un rAAVhu68 are o capsidă de rAAVhu68 produsă într-un sistem de producție care exprimă capsidă dintr-un acid nucleic de AAVhu68 care codifică secvența de aminoacizi vp1 din NR ID SECV: 2 și, în mod opțional, secvențe de acid nucleic suplimentare, de exemplu, care codifică o proteină vp 3 fără regiunile unice vp 1 și/sau vp2. rAAVhu68 rezultat din producerea care utilizează o singură secvență de acid nucleic vp1 produce populații eterogene de proteine vp1, proteine vp2 și proteine vp3. Mai particular, capsida de AAVhu68 conține subpopulații în cadrul proteinelor vp1, în cadrul proteinelor vp2 și în cadrul proteinelor vp3 care au modificări din reziduurile de aminoacizi anticipate în NR ID SECV: 2. Aceste subpopulații includ, la un minim, reziduuri de asparagină (N sau Asn) deamidată. De exemplu, asparaginele din perechile asparagină - glicină sunt înalt deamidate.

În anumite realizări, subpopulațiile de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAV hu68 vp3 cuprind cel puțin 50% până la 100% asparagine (N) deamidate în perechile asparagină - glicină la fiecare dintre pozițiile 57, 329, 452, 512, în raport cu aminoacizii din NR ID SECV: 2, în care asparaginele deamidate sunt deamidate la acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă.

Secvența de acid nucleic AAVhu68 vp1 poate avea secvența din NR ID SECV: 1 sau o catenă complementară acesteia, de exemplu, ARNm-ul sau ARNt-ul corespunzător.

Proteinele vp2 și/sau vp3 pot fi exprimate suplimentar sau alternativ din secvențe de acid nucleic diferite decât vp1, de exemplu, pentru a modifica raportul dintre proteinele vp într-un sistem de expresie selectat. O secvență de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi AAVhu68 vp3 din NR ID SECV: 2 (aproximativ aa 203 până la 736) fără regiunea unică vp1 (aproximativ aa 1 până la aproximativ aa 137) și/sau regiuni unice vp2 (aproximativ aa 1 până la aproximativ aa 202) sau o catenă complementară acesteia, ARNm-ul sau ARNt-ul corespunzător (aproximativ nt 607 până la aproximativ nt 2211 din NR ID SECV: 1) pot fi selectate pentru utilizare la producerea capsidelor de AAVhu68.

O secvență de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi AAVhu68 vp2 din NR ID SECV: 2 (aproximativ aa 138 până la 736) fără regiunea unică vp1 (aproximativ aa 1 până la aproximativ 137) sau o catenă complementară acesteia, ARNm-ul sau ARNt-ul corespunzător (nt 412 până la 2211 din NR ID SECV: 1) pot fi selectate pentru utilizare în producerea capsidelor de AAVhu68.

Cu toate acestea, alte secvențe de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2 pot fi selectate pentru utilizare în producerea capsidelor de rAAVhu68. Secvența de acid nucleic poate avea secvența de acid nucleic din NR ID SECV: 1 sau o secvență cel puțin 70% până la 99%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 99%, identică cu NR ID SECV: 1 care codifică NR ID SECV: 2. Secvența de acid nucleic poate avea secvența de acid nucleic din NR ID SECV: 1 sau o secvență cel puțin 70 % până la 99%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 99%, identică cu aproximativ nt 412 până la aproximativ nt 2211 din NR ID SECV: 1 care codifică proteina de capsidă vp2 (aproximativ aa 138 până la 736) din NR ID SECV: 2. Secvența de acid nucleic poate avea secvența de acid nucleic de la aproximativ nt 607 până la aproximativ nt 2211 din NR ID SECV: 1 sau o secvență cel puțin 70% până la 99%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 99%, identică cu nt NR ID SECV: 1 care codifică proteina de capsidă vp3 (aproximativ aa 203 până la 736) din NR ID SECV: 2.

Este în cadrul aptitudinilor în domeniu să se proiecteze secvențe de acid nucleic care codifică această capsidă de AAVhu68, incluzând ADN (genomic sau ADNc) sau ARN (de exemplu, ARNm).

Secvența de acid nucleic care codifică proteina de capsidă AAVhu68 vp1 este asigurată în NR ID SECV: 1. *Vezi, de asemenea, FIGURILE 1B-1D.*

5 Astfel de secvențe de acid nucleic pot fi optimizate cu codoni pentru expresie într-un sistem selectat (adică, tip de celulă), pot fi proiectate prin diferite metode. Această optimizare poate fi efectuată utilizând metode care sunt disponibile on-line (de exemplu, GeneArt), metode publicate sau printr-o companie care asigură servicii de optimizare a codonului, de exemplu, DNA2.0 (Menlo Park, CA). O metodă de optimizare a codonului este descrisă, de exemplu, în Publicația Internațională de Brevet SUA

10 nr. WO 2015/012924.

Vezi de asemenea, de exemplu, Publicația Brevetului SUA Nr. 2014/0032186 și Publicația Brevetului SUA Nr. 2006/0136184. În mod corespunzător, întreaga lungime a cadrului de citire deschis (ORF) pentru produs este modificată. Cu toate acestea, în anumite realizări, numai un fragment de ORF poate fi modificat. Prin utilizarea uneia dintre aceste metode, se pot aplica frecvențele la orice secvență

15 dată de polipeptidă și se poate produce un fragment de acid nucleic al unei regiuni de codificare optimizată cu codon care codifică polipeptida. Un număr de opțiuni sunt disponibile pentru efectuarea modificărilor reale la codoni sau pentru sintetizarea regiunilor de codificare optimizate cu codoni, proiectate așa cum a fost descris aici. Astfel modificări sau sinteze pot fi efectuate utilizând manipulări biologice moleculare standard și de rutină bine cunoscute profesioniștilor în domeniu. Într-o abordare, o serie de perechi de oligonucleotide complementare de 80-90 de nucleotide fiecare în lungime și care se

20 întind pe lungimea secvenței dorite sunt sintetizate prin metode standard. Aceste perechi de oligonucleotide sunt sintetizate astfel încât, după calcinare, acestea formează fragmente dublu spiralate de 80-90 perechi de baze, care conțin capete terminale coezive, de exemplu, fiecare oligonucleotidă din pereche este sintetizată pentru a se extinde cu 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau mai multe baze dincolo de regiunea

25 care este complementară cu cealaltă oligonucleotidă din pereche. Capetele monocatenare ale fiecărei perechi de oligonucleotide sunt proiectate pentru a calcina cu capătul terminal monocatenar al altei perechi de oligonucleotide. Perechile de oligonucleotide sunt lăsate să calcineze și aproximativ cinci până la șase dintre aceste fragmente dublu spiralate sunt apoi lăsate să calcineze împreună prin intermediul capetelor terminale monocatenare coezive, și apoi, acestea s-au ligaturat împreună și clonat într-un vector

30 de clonare bacterian standard, de exemplu, un vector TOPO® disponibil de la Invitrogen Corporation, Carlsbad, California. Construcția este apoi secvențiată prin metode standard. Câteva dintre aceste construcții care constau din 5 până la 6 fragmente de 80 până la 90 de fragmente de perechi de baze ligate împreună, *adică*, fragmente de aproximativ 500 de perechi de baze sunt preparate, astfel încât întreaga secvență dorită este reprezentată într-o serie de construcții plasmidice. Inserțiile acestor plasmide sunt

35 apoi tăiate cu enzime de restricție corespunzătoare și ligate împreună pentru a forma construcția finală. Construcția finală este apoi clonată într-un vector de clonare bacterian standard și secvențiată. Metode suplimentare vor fi imediat evidente profesionistului în domeniu. În plus, sinteza genelor este disponibilă cu ușurință pe cale comercială.

40 Asparagina (N) în perechile N-G din proteinele de AAVhu68 vp1, vp2 și vp3 poate fi înalt deamidată. O capsidă de AAVhu68 poate conține subpopulații de proteine de capsidă AAV vp 1, vp2 și/sau vp3 care prezintă cel puțin patru poziții de asparagină (N) în proteinele de capsidă AAVhu68 care sunt înalt deamidate.

Aproximativ 20 până la 50% dintre perechile N-N (exclusiv tripleți N-N-N) pot prezenta deamidare. Primul N poate fi deamidat. Al doilea N poate fi deamidat. Deamidarea poate fi între

45 aproximativ 15% până la aproximativ 25% deamidare. Deamidarea la Q la poziția 259 din NR ID SECV: 2 este de aproximativ 8% până la aproximativ 42% din proteinele de capsidă de AAVhu68 vp1, vp2 și vp3 ale unei proteine de AAVhu68.

Capsida de rAAVhu68 poate fi caracterizată suplimentar printr-o amidare în D297 a proteinelor vp1, vp2 și vp3. Aproximativ 70% până la aproximativ 75% din D la poziția 297 a proteinelor vp1, vp2

50 și/sau vp3 într-o capsidă de AAVhu68 poate fi amidat, pe baza numerotării NR ID SECV: 2.

În anumite realizări, cel puțin o Asp în vp1, vp2 și/sau vp3 a capsidei este izomerizată la D-Asp. Astfel de izomeri sunt în general prezenți într-o cantitate mai mică de aproximativ 1% din Asp la una sau mai multe dintre pozițiile de reziduu 97, 107, 384, pe baza numerotării NR ID SECV: 2.

Un rAAVhu68 poate avea o capsidă de AAVhu68 care prezintă proteine vp 1, vp2 și vp3 care prezintă subpopulații care cuprind combinații de unul, două, trei, patru sau mai multe reziduuri deamidate în pozițiile prezentate în tabelul de mai jos. Deamidarea în rAAV poate fi determinată utilizând

55 spectrometrie de masă.

Cromatografia online poate fi efectuată cu o coloană Acclaim PepMap și un sistem Thermo UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific) cuplat la un Q Exactive HF cu o sursă NanoFlex

(Thermo Fisher Scientific). Datele MS sunt dobândite utilizând o metodă top-20 dependentă de date pentru Q Exactive HF, în mod dinamic alegând cei mai abundenți ioni precursori care nu au fost încă secvențiați din scanările studiului (200-2000 m/z). Secvențierea este realizată prin intermediul fragmentării de disociere colizională de energie mai mare cu o valoare țintă de $1e5$ ioni determinată cu control predictiv al câștigului automat și o izolare a precursorilor a fost efectuată cu o fereastră de 4 m/z. Scanările studiului au fost dobândite la o rezoluție de 120.000 la m/z 200. Rezoluția pentru spectrele HCD poate fi setată la 30000 la m/z200 cu un timp maxim de injectare a ionilor de 50 ms și o energie de coliziune normalizată de 30. Nivelul RF al lentilei S poate fi setat la 50, pentru a asigura o transmisie optimă a regiunii m/z ocupată de peptidele din digerare. Ionii precursori pot fi excluși cu stări de sarcină singulare, nealocate sau de șase și mai mari din selecția de fragmentare. Software-ul BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific) poate fi utilizat pentru analiza datelor dobândite. Pentru cartografierea peptidelor, căutările sunt efectuate utilizând o bază de date FASTA de proteine cu intrare unică, cu carbamidometilarea setată ca o modificare fixată; și oxidarea, deamidarea și fosforilarea setate ca modificări variabile, o precizie a masei de 10 ppm, o specificitate ridicată de protează și un nivel de încredere de 0,8 pentru spectrele MS/MS. Exemple de proteaze corespunzătoare pot include, de exemplu, tripsina sau chimotripsina. Identificarea spectrometrică de masă a peptidelor deamidate este relativ simplă, din moment ce deamidarea se adaugă la masa moleculei intacte +0,984 Da (diferența de masă între grupările -OH și -NH₂). Procentul de deamidare a unei peptide particulare este aria de masă determinată a peptidei deamidate împărțită la suma ariei peptidelor deamidate și native. Având în vedere numărul de locuri posibile de deamidare, speciile izobare care sunt deamidate la diferite zone pot co-migra într-un singur vârf. În consecință, ionii de fragmentare care provin din peptide cu zone multiple potențiale de deamidare pot fi utilizați pentru a localiza sau diferenția zone multiple de deamidare. În aceste cazuri, intensitățile relative din cadrul modelelor de izotop observate pot fi utilizate pentru a determina în mod specific abundența relativă a diferiților izomeri peptidici deamidați. Această metodă presupune faptul că eficiența fragmentării pentru toate speciile izomerice este aceeași și independentă pe zona deamidării. Va fi înțeles de către un specialist în domeniu faptul că un număr de variații ale acestor metode ilustrative poate fi utilizat. De exemplu, spectrometrele de masă corespunzătoare pot include, *de exemplu*, un spectrometru de masă cu timp de zbor quadrupol (QTOF), cum ar fi un Waters Xevo sau Agilent 6530 sau un instrument orbitrap, cum ar fi Orbitrap Fusion sau Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Sisteme corespunzătoare de cromatografie lichidă includ, *de exemplu*, sistemul UPLC Acquity din sistemele Waters sau Agilent (seria 1100 sau 1200). Software corespunzător de analiză a datelor poate include, *de exemplu*, MassLynx (Waters), Pinpoint și Pepfinder (Thermo Fischer Scientific), Mascot (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Alte tehnici suplimentare pot fi descrise, de exemplu, în X. Jin și colab., Hu Gene Therapy Methods, Vol. 28, nr. 5, pp. 255-267, publicat online la 16 iunie, 2017.

Deamidare pe bază de AAVHu68 [NR ID SECV: 2] anticipat	% mediu pe baza proteinelor VP1/VP2/VP3 în capsida de AAVhu68	
Reziduu deamidat + 1 (AA învecinat)	Interval larg al procentelor (%)	Intervale înguste (%)
N57 (N-G)	78 până la 100%	80 până la 100, 85 până la 97
N66 (N-E)	0 până la 5	0, 1 până la 5
N94 (N-H)	0 până la 15,	0, 1 până la 15, 5 până la 12, 8
N113 (N-L)	0 până la 2	0, 1 până la 2
-N253 (N-N)	10 până la 25	15 până la 22
Q259 (Q-I)	8 până la 42	10 până la 40, 20 până la 35
-N270 (N-D)	12 până la 30	15 până la 28
-N304 (N-N) (position 303 also N)	0 până la 5	1 până la 4
N319 (N-I)	0 până la 5	0, 1 până la 5, 1 până la 3
N329 * (N-G)*(position 328 also N)	65 până la 100	70 până la 95, 85 până la 95, 80 până la 100, 85 până la 100,

Deamidare pe bază de AAVHu68 [NR ID SECV: 2] anticipat	% mediu pe baza proteinelor VP1/VP2/VP3 în capsida de AAVHu68	
Reziduu deamidat + 1 (AA învecinat)	Interval larg al procentelor (%)	Intervale înguste (%)
N336 (N-N)	0 până la 100	0, 1 până la 10, 25 până la 100, 30 până la 100, 30 până la 95
-N409 (N-N)	15 până la 30	20 până la 25
N452 (N-G)	75 până la 100	80 până la 100, 90 până la 100, 95 până la 100,
N477 (N-Y)	0 până la 8	0, 1 până la 5
N512 (N-G)	65 până la 100	70 până la 95, 85 până la 95, 80 până la 100, 85 până la 100,
-N515 (N-S)	0 până la 25	0, 1 până la 10, 5 până la 25, 15 până la 25
~Q599 (Asn-Q-Gly)	1 până la 20	2 până la 20, 5 până la 15
N628 (N-F)	0 până la 10	0, 1 până la 10, 2 până la 8
N651 (N-T)	0 până la 3	0, 1 până la 3
N663 (N-K)	0 până la 5	0, 1 până la 5, 2 până la 4
N709 (N-N)	0 până la 25	0,1 până la 22, 15 până la 25
N735	0 până la 40	0. 1 până la 35, 5 până la 50, 20 până la 35

Capsida de AAVHu68 poate fi caracterizată prin faptul că are proteine de capsidă în care cel puțin 45% din reziduurile de N sunt deamidate la cel puțin una dintre pozițiile N57, N329, N452 și/sau N512 pe baza numerotării secvenței de aminoacizi din NR ID SECV: 2. Cel puțin aproximativ 60%, cel puțin aproximativ 70%, cel puțin aproximativ 80% sau cel puțin 90% din reziduurile de N la una sau mai multe dintre aceste poziții N-G (adică, N57, N329, N452 și/sau N512, pe baza numerotării secvenței de aminoacizi din NR ID SECV: 2) poate fi deamidat. O capsidă de AAVHu68 poate fi caracterizată suplimentar prin faptul că are o populație de proteine în care aproximativ 1% până la aproximativ 20% din reziduurile de N prezintă deamidări la una sau mai multe dintre pozițiile: N94, N253, N270, N304, N409, N477 și/sau Q599, pe baza numerotării secvenței de aminoacizi din NR ID SECV: 2.

AAVHu68 poate cuprinde cel puțin o subpopulație de proteine vp1, vp2 și/sau vp3 care sunt deamidate la una sau mai multe dintre pozițiile N35, N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, N735, pe baza numerotării secvenței de aminoacizi din NR ID SECV: 2 sau combinații ale acestora. În anumite realizări, proteinele de capsidă pot avea, de asemenea, unul sau mai mulți aminoacizi amidați.

Alte modificări suplimentare sunt observate, dintre care majoritatea nu au ca rezultat conversia unui aminoacid într-un reziduu de aminoacid diferit. În mod opțional, cel puțin un Lys în vp1, vp2 și vp3 ale capsidei este acetilat. În mod opțional, cel puțin un Asp în vp1, vp2 și/sau vp3 ale capsidei este izomerizat la D-Asp. În mod opțional, cel puțin un S (Ser, serină) în vp1, vp2 și/sau vp3 ale capsidei este fosforilat. În mod opțional, cel puțin un T (Thr, Treonină) în vp1, vp2 și/sau vp3 ale capsidei este fosforilat. În mod opțional, cel puțin un W (trp, triptofan) în vp1, vp2 și/sau vp3 ale capsidei este oxidat. În mod opțional, cel puțin un M (Met, Metionină) în vp1, vp2 și/sau vp3 ale capsidei este oxidat.

Proteinele de capsidă pot avea una sau mai multe fosforilări. De exemplu, anumite proteine de capsidă vp1 pot fi fosforilate în poziția 149.

O capsidă AAVHu68 poate cuprinde o populație heterogenă de proteine vp1 care sunt produsul unei secvențe de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2, în care proteinele

vp1 cuprind un acid Glutamic (Glu) în poziția 67 și o valină (Val) la poziția 157; o populație heterogenă de proteine vp2 care cuprinde o valină (Val) la poziția 157; și o populație eterogenă de proteine vp3. Capsida de rAAVhu68 poate conține cel puțin o subpopulație în care cel puțin 65% dintre asparagine (N) în perechile asparagină - glicină localizate la poziția 57 a proteinelor vp1 și cel puțin 70% dintre asparaginele (N) în perechile asparagină - glicină la pozițiile 329, 452 și/sau 512 ale proteinelor vp1, v2 și vp3 sunt deamidate, pe baza numerotării reziduurilor din secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2, în care deamidarea are ca rezultat o schimbare a aminoacizilor.

Așa cum a fost discutat mai în detaliu aici, asparaginele deamidate sunt deamidate la acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora. În anumite realizări, rAAVhu68 sunt caracterizate suplimentar prin una sau mai multe dintre: (a) fiecare dintre proteinele vp2 este în mod independent produsul unei secvențe de acid nucleic care codifică cel puțin proteina vp2 din NR ID SECV: 2; (b) fiecare dintre proteinele vp3 este în mod independent produsul unei secvențe de acid nucleic care codifică cel puțin proteina vp3 din

NR ID SECV: 2; (c) secvența de acid nucleic care codifică proteinele vp1 este NR ID SECV: 1, sau o secvență de cel puțin 70% până la cel puțin 99% (de exemplu, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99%) identică cu NR ID SECV: 1 care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2. În mod opțional, acea secvență este utilizată singură pentru a exprima proteinele vp1, vp2 și vp3. În mod alternativ, această secvență poate fi co-exprimată cu una sau mai multe dintr-o secvență de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi de AAVhu68 vp3 din NR ID SECV: 2 (aproximativ aa 203 până la 736) fără regiunea unică a vp1 (aproximativ aa 1 până la aproximativ aa 137) și/sau regiuni unice vp2 (aproximativ aa 1 până la aproximativ aa 202) sau o catenă complementară acesteia, ARNm-ul sau ARNt-ul corespunzător (aproximativ nt 607 până la aproximativ nt 2211 din NR ID SECV: 1) sau o secvență cel puțin 70% până la cel puțin 99% (de exemplu, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99%) identică cu NR ID SECV: 1 care codifică aa 203 până la 736 din NR ID SECV: 2. În plus sau în mod alternativ, secvența care codifică vp1 și/sau care codifică vp2 poate fi co-exprimată cu secvența de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi AAVhu68 vp2 din SECV. ID NR: 2 (aproximativ aa 138 până la 736) fără regiunea unică vp1 (aa 1 până la aproximativ 137) sau o catenă complementară acesteia, ARNm-ul sau ARNt-ul corespunzător (nt 412 până la 2211 din NR ID SECV: 1) sau o secvență cel puțin 70% până la cel puțin 99% (de exemplu, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99%) identică cu NR ID SECV: 1 care codifică aproximativ aa 138 până la 736 din NR ID SECV: 2.

În plus sau în mod alternativ, capsida de rAAVhu68 poate cuprinde cel puțin o subpopulație de proteine vp1, vp2 și/sau vp3 care sunt deamidate la una sau mai multe dintre pozițiile N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N512, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, pe baza numerotării din NR ID SECV: 2, sau combinație a acestora, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă; (e) capsida de rAAVhu68 poate cuprinde o subpopulație de proteine vp1, vp2 și/sau vp3 care cuprinde 1% până la 20% deamidare la una sau mai multe dintre pozițiile N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, pe baza numerotării din NR ID SECV: 2 sau combinații ale acestora, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă; (f) capsida de rAAVhu68 poate cuprinde o subpopulație de vp1 în care 65% până la 100% din N la poziția 57 a proteinelor vp1, pe baza numerotării din NR ID SECV: 2, este deamidat așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă; (g) capsida de rAAVhu68 poate cuprinde subpopulație de proteine vp1 în care 75% până la 100% din N la poziția 57 a proteinelor vp1 pe baza numerotării din NR ID SECV: 2 este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă (h), capsida de rAAVhu68 cuprinde subpopulație de proteine vp1, proteine vp2 și/sau proteine vp3 în care 80% până la 100% din N la poziția 329, pe baza numerotării NR ID SECV: 2, este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă; (i) capsida de rAAVhu68 poate cuprinde o subpopulație de proteine vp1, proteine vp2 și/sau proteine vp3 în care 80% până la 100% din N la poziția 452, pe baza numerotării din NR ID SECV: 2, este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă; (j) capsida de rAAVhu68 poate cuprinde o subpopulație de proteine vp1, proteine vp2 și/sau proteine vp3 în care 80% până la 100% din N din poziția 512, pe baza numerotării din NR ID SECV: 2, este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă; (k) rAAV poate cuprinde aproximativ 60 de proteine totale de capsidă într-un raport de aproximativ 1 vp1 la aproximativ 1 până la 1,5 vp2 la 3 până la 10 proteine vp3; (l) rAAV cuprinde aproximativ 60 de proteine totale de capsidă într-un raport de aproximativ 1 vp1 la aproximativ 1 vp2 la 3 până la 9 proteine vp3.

Așa cum a fost utilizat aici, "secvența de aminoacizi codificată" se referă la aminoacidul care este anticipat pe baza translației unui codon ADN cunoscut al unei secvențe de acid nucleic la care s-a

făcut referire, fiind translatată într-un aminoacid. Următorul tabel ilustrează codoni de ADN și douăzeci de aminoacizi comuni, care prezintă atât codul cu o singură literă (SLC), cât și codul cu trei litere (3LC).

Amino Acid	SLC	3LC	Codoni de ADN
Izoleucină	I	Ile	ATT, ATC, ATA
Leucină	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valină	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
Fenilalanină	F	Phe	TTT, TTC
Metionină	M	Met	ATG
Cisteină	C	Cys	TGT, TGC
Alanină	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
Glicină	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
Prolină	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
Treonină	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
Serină	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tirozină	Y	Tyr	TAT, TAC
Triptofan	W	Trp	TGG
Glutamină	Q	Gln	CAA, CAG
Asparagină	N	Asn	AAT, AAC
Histidină	H	His	CAT, CAC
Acid glutamic	E	Glu	GAA, GAG
Acid aspartic	D	Asp	GAT, GAC
Lizină	K	Lys	AAA, AAG
Arginină	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Codoni de oprire	Stop		TAA, TAG, TGA

- 5 Capsidele de AAVhu68 pot fi utile. De exemplu, astfel de capsidă pot fi utilizate în generarea de anticorpi monoclonali și/sau în generarea de reactivi utili în analizele pentru monitorizarea nivelurilor de concentrație de AAVhu68 la pacienții cu terapie genetică. Tehnicile pentru generarea de anticorpi anti-AAVhu68 utili, marcarea unor astfel de anticorpi sau capsidă goale, precum și formate corespunzătoare de analize sunt cunoscute profesioniștilor în domeniu.
- 10 Expusă, dar nerevendicată aici, este o secvență de acid nucleic din NR ID SECV: 1 sau o secvență cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, la cel puțin 97%, cel puțin 99%, care codifică secvența de aminoacizi de vp1 din NR ID SECV: 2 cu o modificare (de exemplu, aminoacid deamidat), așa cum a fost descris aici. O secvență de aminoacizi de vp1 nerevendicată aici este reprodusă în NR ID SECV: 14.
- 15 Așa cum a fost utilizat aici, termenul „cladă” din moment ce acesta are legătură cu grupurile de AAV se referă la un grup de AAV care este legat filogenetic unul de celălalt, așa cum a fost determinat utilizând un algoritm de unire a vecinului printr-o valoare bootstrap de cel puțin 75% (din cel puțin 1000 de replici) și o măsurare a distanței de corecție Poisson de nu mai mult de 0,05, pe baza alinierii secvenței de aminoacizi AAV vp1. Algoritmul de unire a vecinului a fost descris în literatură. *Vezi, de exemplu, M. Nei și S. Kumar, Molecular Evolution and Phylogenetics (Oxford University Press, New York (2000)).*
- 20 Programe de calculator sunt disponibile, care pot fi utilizate pentru a implementa acest algoritm. De exemplu, programul MEGA v2.1 implementează metoda Nei-Gojobori modificată. Utilizând aceste tehnici și programe de calculator și secvența unei proteine de capsidă AAV vp1, un profesionist în domeniu poate determina cu ușurință dacă un AAV selectat este conținut într-una dintre cladele

identificate aici, într-o altă cladă sau este în afara acestor clade. *Vezi, de exemplu*, G Gao, și colab., J Virol, 2004 Jun; 78(10: 6381-6388, care identifică Cladele A, B, C, D, E și F și asigură secvențe de acid nucleic ale AAV nou, numerele de acces GenBank AY530553 până la AY530629. *Vezi, de asemenea*, WO 2005/033321.

5 rAAV revendicat poate fi produs utilizând o moleculă structurată pe calea ingineriei care cuprinde o secvență agent de spațiere între secvența de codificare AAVhu68 vp1 și secvențele de codificare AAVhu68 rep. Această secvență de codificare este: atgacttaaacagggt, NR ID SECV: 9. Secvența de codificare pentru rep52 a AAVhu68 este reprodusă în NR ID SECV: 3. Secvența de proteină rep52 este reprodusă în NR ID SECV: 4.

10 Într-o comparație între AAVhu68 și AAVrh10, AAVhu68 a fost descoperit că asigură o eficiență de transducție mai bună decât AAVrh10 la doză scăzută (de exemplu, aproximativ 1×10^9 GC) în urma administrării intracerebroventriculare. Într-o comparație suplimentară între AAVhu68 și AAV9, AAVhu68 a fost descoperit că asigură o eficiență de transducție mai bună decât AAV9 în cerebel, cortexul motor și hipocampusul creierului (de exemplu, la aproximativ 1×10^{11} GC) în urma administrării intracerebroventriculare.

15 Un vector de AAVhu68 poate cuprinde un genom de vector care exprimă un anticorp direcționat împotriva unui receptor HER2. Un astfel de vector este util în tratamentul și/sau prevenirea cancerelor.

Așa cum a fost utilizată aici, o "capsidă de AAV9" este o capsidă de AAV auto-asamblată compusă din mai multe proteine AAV9 vp. Proteinele de AAV9 vp sunt exprimate în mod tipic ca
20 variante alternative de matisare codificate de o secvență de acid nucleic din NR ID SECV: 5 sau o secvență cel puțin 70%, cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 97%, cel puțin 99% față de aceasta, care codifică secvența de aminoacizi vp1 din NR ID SECV: 6 (acces GenBank: AAS99264). Aceste variante de matisare au ca rezultat proteine de lungimi diferite din NR ID SECV: 6. "Capsida de AAV9" include un AAV care prezintă o secvență de aminoacizi care este
25 99% identică cu AAS99264 sau 99% identică cu NR ID SECV: 6. *Vezi, de asemenea*, US 7906111 și WO 2005/033321. Așa cum au fost utilizate aici, „variantele de AAV9” le includ pe cele descrise în, de exemplu, WO 2016/049230, US 8 927 514, US 2015/0344911 și US 8 734 809.

Metode de generare a capsidei, a secvențelor de codificare prin urmare și metode pentru producerea vectorilor virali de rAAV au fost descrise. *Vezi, de exemplu*, Gao, și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003)) și US 2013/0045186A1.

30 Termenul „omologie substanțială” sau „asemănare substanțială”, atunci când se referă la un acid nucleic sau la un fragment al acestuia, indică faptul că, atunci când este aliniat optim cu inserții sau ștergeri de nucleotide corespunzătoare cu un alt acid nucleic (sau catena sa complementară), există o identitate de secvență de nucleotide în cel puțin aproximativ 95 până la 99% dintre secvențele aliniate. De
35 preferat, omologia este pe o secvență de lungime completă sau pe un cadru de citire deschis al acesteia sau pe un alt fragment corespunzător care are cel puțin 15 nucleotide în lungime. Exemple de fragmente corespunzătoare sunt descrise aici.

Termenii "identitate de secvență" "identitate de secvență procentuală" sau "procent identic" în contextul secvențelor de acid nucleic se referă la reziduurile din cele două secvențe care sunt aceleași
40 atunci când sunt aliniate pentru o corespondență maximă. Lungimea comparației identității de secvență poate fi pe întreaga lungime a genomului, întreaga lungime a unei secvențe de codificare a unei gene sau a unui fragment de cel puțin aproximativ 500 până la 5000 de nucleotide, este de dorit. Cu toate acestea, identitatea printre fragmentele mai mici, *de exemplu*, cel puțin aproximativ nouă nucleotide, de obicei cel puțin aproximativ 20 până la 24 de nucleotide, cel puțin aproximativ 28 până la 32 de nucleotide, cel puțin
45 aproximativ 36 sau mai multe nucleotide, poate fi, de asemenea, dorită. În mod asemănător, „identitatea de secvență procentuală” poate fi determinată cu ușurință pentru secvențele de aminoacizi, pe întreaga lungime a unei proteine sau a unui fragment al acesteia. În mod corespunzător, un fragment este de cel puțin aproximativ 8 aminoacizi în lungime și poate avea până la aproximativ 700 de aminoacizi. Exemple de fragmente corespunzătoare sunt descrise aici.

50 Termenul „omologie substanțială” sau „asemănare substanțială”, atunci când se referă la aminoacizi sau la fragmente ale acestora, indică faptul că, atunci când sunt aliniați optim cu inserții sau ștergeri corespunzătoare de aminoacizi cu un alt aminoacid (sau catena sa complementară), există o identitate de secvență de aminoacizi în cel puțin aproximativ 95 până la 99% dintre secvențele aliniate. De preferat, omologia este pe o secvență de lungime completă sau pe o proteină a acesteia, *de exemplu*, o
55 proteină cap, o proteină rep sau un fragment al acestora care este de cel puțin 8 aminoacizi sau mai de dorit, cel puțin 15 aminoacizi în lungime. Exemple de fragmente corespunzătoare sunt descrise aici.

Prin termenul "înalt conservat" se înțelege cel puțin 80% identitate, de preferat cel puțin 90% identitate, și mai de preferat, peste 97% identitate. Identitatea este determinată cu ușurință de către un

specialist în domeniu prin recurgere la algoritmi și programe de calculator cunoscute de profesioniștii în domeniu.

În general, atunci când se face referire la "identitate", "omologie" sau "asemănare" între două virusuri adeno-asociate diferite, "identitatea", "omologia" sau "asemănarea" este determinată cu referire la secvențele "aliniat". Secvențele "aliniat" sau "alinieri" se referă la secvențe multiple de acid nucleic sau la secvențe de proteine (aminoacizi), care conțin adesea corecții pentru baze sau aminoacizi lipsă sau suplimentare, în comparație cu o secvență de referință. În exemple, alinierea AAV sunt efectuate utilizând secvențele AAV9 publicate ca un punct de referință. Alinierea sunt efectuate utilizând oricare dintr-o varietate de Programe de Aliniere cu Secvențe Multiple disponibile public sau pe cale comercială. Exemple de astfel de programe includ „Clustal Omega”, „Clustal W”, „CAP Sequence Assembly”, „MAP” și „MEME”, care sunt accesibile prin serverele web de pe internet. Alte surse pentru astfel de programe sunt cunoscute profesioniștilor în domeniu. În mod alternativ, utilități de Vector NTI sunt utilizate, de asemenea. Există, de asemenea, un număr de algoritmi cunoscuți în domeniu care pot fi utilizați pentru a măsura identitatea secvenței de nucleotide, incluzând pe cei conținuți în programele descrise mai sus. Ca un alt exemplu, secvențele de polinucleotide pot fi comparate utilizând Fasta™, un program în GCG Versiunea 6.1. Fasta™ asigură alinieri și identitate de secvență procentuală a regiunilor cu cea mai bună suprapunere între secvențele de interogare și cele de căutare. De exemplu, identitatea de secvență procentuală dintre secvențele de acid nucleic poate fi determinată utilizând Fasta™ cu parametrii săi impliciti (o dimensiune a cuvântului de 6 și factorul NOPAM pentru matricea de scorare), așa cum a fost asigurat în GCG Versiunea 6.1. Mai multe programe de aliniere a secvenței sunt, de asemenea, disponibile pentru secvențele de aminoacizi, de exemplu, programele "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" și "Match-Box". În general, oricare dintre aceste programe este utilizat la setările implicite, deși un profesionist în domeniu poate modifica aceste setări după cum este necesar. În mod alternativ, un profesionist în domeniu poate utiliza un alt algoritm sau program de calculator care asigură cel puțin nivelul de identitate sau de aliniere precum cel asigurat de algoritmi și programele la care s-a făcut referire. *Vezi, de exemplu*, J. D. Thomson și colab., Nucl. Acizi. Res., „A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13):2682-2690 (1999)).

I. Vectori rAAV

Așa cum a fost indicat mai sus, noile secvențe și proteine de AAVhu68 sunt utile în producerea de rAAV și sunt, de asemenea, utile în vectori recombinanți AAV care pot fi vectori de livrare antisens, vectori de terapie genetică sau vectori de vaccin.

Secvențele genomice care sunt împachetate într-o capsidă de AAV și livrate unei celule gazdă sunt compuse în mod tipic din, la un minim, o transgenă și secvențele sale reglatoare și repetări terminale inversate (ITR-uri) AAV. Atât AAV monocatenar, cât și AAV auto-complementar (sc) sunt cuprinse cu rAAV-ul. Transgena este o secvență de codificare a acidului nucleic, heterologă față de secvențele vector, care codifică o polipeptidă, o proteină, o moleculă funcțională de ARN (de exemplu, ARNm, inhibitor de ARNm) sau alt produs genetic, de interes. Secvența de codificare a acidului nucleic este legată în mod funcțional la componentele reglatoare într-un mod care permite transcripția, translația și/sau expresia transgenei într-o celulă a unui țesut țintă.

Secvențele de AAV ale vectorului cuprind în mod tipic secvențele repetate terminale inversate 5' și 3' care acționează cis (vezi, de exemplu, B. J. Carter, în „Handbook of Parvoviruses”, ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). Secvențele ITR sunt de aproximativ 145 bp în lungime. De preferat, secvențele întregi în mod substanțial care codifică ITR-urile sunt utilizate în moleculă, deși un anumit grad de modificare minoră a acestor secvențe poate fi permis. Abilitatea de a modifica aceste secvențe ITR este la îndemâna competenței din domeniu. (Vezi, de exemplu, texte cum ar fi Sambrook și colab., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", a doua ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); și K. Fisher și colab., J. Virol., 70:520 532 (1996)). Un exemplu al unei astfel de molecule folosită în prezenta invenție este o plasmidă „care acționează cis” care conține transgena, în care secvența de transgenă selectată și elementele reglatoare asociate sunt flancate de secvențele ITR de AAV 5' și 3'. ITR-urile pot fi de la un AAV diferit de cel care asigură o capsidă. Secvențele ITR pot fi de la AAV2. O versiune scurtată a ITR-ului 5', denumită ΔITR a fost descrisă, în care secvența D și zona de rezoluție terminală (trs) sunt șterse. ITR-uri AAV 5' și 3' de lungime completă pot fi utilizate. Cu toate acestea, ITR-uri din alte surse de AAV pot fi selectate. Acolo unde sursa ITR-urilor este din AAV2 și capsida de AAV este dintr-o altă sursă de AAV, vectorul rezultat poate fi denumit pseudotipat. Cu toate acestea, alte configurații ale acestor elemente pot fi corespunzătoare.

În plus față de elementele majore identificate mai sus pentru vectorul de AAV recombinant, vectorul include, de asemenea, elementele de control convenționale necesare, care sunt legate în mod funcțional la transgenă într-un mod care permite transcripția, translația și/sau expresia acesteia într-o celulă transfectată cu vectorul de plasmidă sau infectat cu virusul produs de către invenție. Așa cum a fost

utilizat aici, secvențele "legate în mod funcțional" includ atât secvențe de control al expresiei care sunt învecinate cu gena de interes, cât și secvențe de control al expresiei care acționează în trans sau la o distanță, pentru a controla gena de interes.

Elementele de control reglatoare conțin în mod tipic o secvență promotor ca parte a secvențelor de control al expresiei, de exemplu, localizată între secvența ITR 5' selectată și secvența de codificare. Promotori constitutivi, promotori care pot fi reglați [vezi, *de exemplu*, WO 2011/126808 și WO 2013/04943], promotori specifici țesuturilor sau un promotor sensibil la indicii fiziologici pot fi utilizați în vectorii descriși aici. Promotorul (promoterii) poate (pot) fi selectat (selecțat) din diferite surse, de exemplu, agentul de intensificare/promotorul imediat-timpuriu al citomegalovirusului uman (CMV), agentul de intensificare/promotorul timpuriu SV40, promotorul polimovirusului JC, proteina bazică a mielinei (MBP) sau promotori ai proteinei acide fibrilare gliale (GFAP), promotorul asociat latenței (LAP) virusului herpes simplex (HSV-1), promotorul de repetare terminală lungă (LTR) al virusului sarcomului rouse (RSV), promotorul specific neuronului (NSE), promotorul factorului de creștere derivat din trombocite (PDGF), hSYN, promotorul hormonului de concentrare a melaninei (MCH), CBA, promotorul metaloproteinei matriceale (MPP) și promotorul beta-actinei de pui. În plus față de un promotor, un vector poate conține una sau mai multe alte secvențe agent de intensificare corespunzătoare de inițiere a transcripției, de terminare, semnale eficiente de procesare a ARN, cum ar fi semnale de matisare și poliadenilare (poliA); secvențe care stabilizează ARNm citoplasmatic, de exemplu WPRE; secvențe care îmbunătățesc eficiența translației (adică, secvență consens Kozak); secvențe care îmbunătățesc stabilitatea proteinei; și, atunci când se dorește, secvențe care îmbunătățesc secreția produsului codificat. Un exemplu de agent de intensificare corespunzător este agentul de intensificare CMV. Alți agenți de intensificare corespunzători îi includ pe cei care sunt corespunzători pentru infecțiunile țesutului țintă dorit.

Caseta de expresie poate cuprinde unul sau mai mulți agenți de intensificare ai expresiei. Caseta de expresie poate conține doi sau mai mulți agenți de intensificare ai expresiei. Acești agenți de intensificare pot fi aceiași sau pot diferi unul de celălalt. De exemplu, un agent de intensificare poate include un agent de intensificare imediat timpuriu al CMV. Acest agent de intensificare poate fi prezent în două copii care sunt localizate adiacent unul față de celălalt. În mod alternativ, copiile duale ale agentului de intensificare pot fi separate prin una sau mai multe secvențe. Caseta de expresie poate conține în plus un intron, de exemplu, intronul beta-actină de pui. Alți introni corespunzători îi includ pe cei cunoscuți în domeniu, de exemplu, așa cum sunt descriși în WO 2011/126808. Exemple de secvențe poliA corespunzătoare includ, de exemplu, SV40, SV50, hormonul de creștere bovin (bGH), hormonul de creștere uman și poliA-uri sintetice. În mod opțional, una sau mai multe secvențe pot fi selectate pentru a stabili ARNm-ul. Un exemplu al unei astfel de secvențe este o secvență WPRE modificată, care poate fi structurată pe calea ingineriei în amonte de secvența poliA și în aval de secvența de codificare [vezi, de exemplu, MA Zanta-Boussif, și colab, Gene Therapy (2009) 16: 605-619].

Aceste rAAV-uri sunt în special bine corespunzătoare pentru livrarea genei în scopuri terapeutice și pentru imunizare, incluzând, pentru inducerea imunității protectoare. Mai mult, compozițiile conform invenției pot fi utilizate, de asemenea, pentru producerea unui produs genetic dorit *in vitro*. Pentru producția *in vitro*, un produs dorit (*de exemplu*, o proteină) poate fi obținută dintr-o cultură dorită după transfecția celulelor gazdă cu un rAAV care conține molecula care codifică produsul dorit și cultivarea culturii celulare în condiții care permit expresia. Produsul exprimat poate fi apoi purificat și izolat, după cum se dorește. Tehnicile corespunzătoare pentru transfecție, cultivare celulară, purificare și izolare sunt cunoscute specialiștilor în domeniu.

Un rAAV sau o compoziție așa cum a fost asigurată aici nu poate conține un anticorp anti-gripă sau o construcție de imunoglobulină. Un rAAV sau o compoziție, așa cum a fost asigurată aici, poate să nu conțină o secvență de codificare SMN.

Gene terapeutice și produse genetice

Produsele utile codificate de transgenă includ o varietate de produse genetice care înlocuiesc o genă defectuoasă sau deficitară, inactivează sau „elimină”, sau „înlătură” sau reduc expresia unei gene care se exprimă la un nivel nedorit de ridicat, sau livrarea unui produs genetic care are un efect terapeutic dorit. În majoritatea cazurilor, terapia va fi „terapie genetică somatică”, adică transferul de gene la o celulă a corpului care nu produce spermatozoizi sau ovule. Transgenele pot exprima proteine care prezintă secvența secvențelor umane native. Cu toate acestea, proteinele sintetice pot fi, de asemenea, exprimate. Astfel de proteine pot fi avute în vedere pentru tratament oamenilor sau proiectate pentru tratamentul animalelor, incluzând animale de companie, cum ar fi populațiile canine sau feline sau pentru tratamentul animalelor de fermă sau al altor animale care vin în contact cu populațiile umane.

Exemple de produse genetice corespunzătoare pot include pe cele asociate cu hipercolesterolemia familială, distrofia musculară, fibroza chistică și boli rare sau orfane. Exemple de

astfel de boli rare pot includ atrofia musculară spinală (SMA), boala Huntingdon, sindromul Rett (de exemplu, proteina 2 de legare a metil-CpG (MeCP2); UniProtKB - P51608), Scleroza Laterală Amiotrofică (ALS), distrofia Musculară de Tip Duchenne, Ataxia Friedrichs (de exemplu, frataxină), progranulină (PRGN) (asociată cu degenerări cerebrale non-Alzheimer, inclusiv demență frontotemporală (FTD), afazia progresivă non-fluentă (PNFA) și demența semantică), printre altele. Vezi, de exemplu, www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php; rarediseases.info.nih.gov/diseases.

Exemple de gene corespunzătoare pot include, de exemplu, hormoni și factori de creștere și de diferențiere incluzând, fără limitare, insulina, glucagonul, peptida 1 de tip glucagon (GLP1), hormonul de creștere (GH), hormonul paratiroidian (PTH), factorul de eliberare a hormonului de creștere. (GRF), hormonul de stimulare a foliculului (FSH), hormonul luteinizant (LH), gonadotropina corionică umană (hCG), factorul de creștere a endoteliului vascular (VEGF), angiopoietine, angiostatina, factorul de stimulare a coloniilor de granulocite (GCSF), eritropoietina (EPO) (incluzând, de exemplu, epo umană, canină sau felină), factorul de creștere a țesutului conjunctiv (CTGF), factorii neutrofici incluzând, de exemplu, factorul de creștere a fibroblastelor de bază (bFGF), factorul de creștere a fibroblastelor acide (aFGF), factorul de creștere epidermal (EGF), factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF), factorii I și II de creștere a insulinei (IGF-I și IGF-II), oricare dintre superfamilia factorului de creștere și transformare α , incluzând TGF α , activine, inhibine sau oricare dintre BMP-urile 1-15 de proteine morfogene osoase (BMP), oricare dintre familia factorilor de creștere a factorului de diferențiere (NDF) heregluină/neuregulină/ARIA/neu, factorul de creștere a nervilor (NGF), factorul neurotrofic derivat din creier (BDNF), neurotrofinele NT-3 și NT-4/5, factorul neurotrofic ciliar (CNTF), factorul neurotrofic derivat din linia celulară glială (GDNF), neurturina, agrina, oricare din familia de semaforine/colapsine, netrina-1 și netrina-2, factorul de creștere a hepatocitelor (HGF), efrine, noggin, sonic hedgehog și tirozin hidroxilază.

Alte produse transgenetice utile includ proteine care reglează sistemul imunitar, incluzând, fără limitare, citokine și limfokine, cum ar fi trombopoietina (TPO), interleukinele (IL) IL-1 până la IL-36 (incluzând, *de exemplu*, interleukine umane IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31, IL-35), proteina chemoattractantă monocitară, factorul inhibitor de leucemie, factorul de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage, ligandul Fas, factorii de necroză tumorală α și β , interferonii α , β și γ , factorul de celule stem, ligandul flk-2/flt3. Produsele genetice produse de sistemul imunitar sunt, de asemenea, utile în invenție. Acestea includ, fără limitări, imunoglobulinele IgG, IgM, IgA, IgD și IgE, imunoglobulinele himerice, anticorpii umanizați, anticorpii cu lanț unic, receptorii pentru celule T, receptorii pentru celulele T himerice, receptorii pentru celulele T cu lanț unic, moleculele MHC de clasă I și clasă II, precum și imunoglobulinele structurate pe calea ingineriei și moleculele MHC. De exemplu, anticorpii rAAV pot fi proiectați pentru a livra anticorpi canini sau de felină, de exemplu, cum ar fi anti-IgE, anti-IL31, anti-CD20, anti-NGF, anti-GnRH. Produsele genetice utile includ, de asemenea, proteine reglatoare a complementului, cum ar fi proteinele reglatoare a complementului, proteina cofactor membranară (MCP), factorul de accelerare a dezintegrării (DAF), CR1, CF2, CD59 și inhibitorul de esterază C1 (C1-INH).

Alte produse genetice suplimentare utile includ oricare dintre receptorii pentru hormoni, factorii de creștere, citokine, limfokine, proteinele reglatoare și proteinele sistemului imunitar. Invenția cuprinde receptori pentru reglarea colesterolului și/sau modularea lipidelor, incluzând receptorul pentru lipoproteine cu densitate scăzută (LDL), receptor pentru lipoproteine cu densitate înaltă (HDL), receptorul pentru lipoproteine cu densitate foarte scăzută (VLDL) și receptori scavenger. Invenția cuprinde, de asemenea, produse genetice, cum ar fi membrii superfamiliei receptorului pentru hormonii steroizi, incluzând receptorii pentru glucocorticoizi și receptorii pentru estrogen, receptorii pentru vitamina D și alți receptori nucleari. În plus, produsele genetice utile includ factori de transcripție cum ar fi *ca jun*, *fos*, *max*, *mad*, factorul de răspuns seric (SRF), AP-1, AP2, *myb*, MyoD și miogenină, proteine care conțin caseta ETS, TFE3, E2F, ATF 1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteine de legare a casetei CCAAT, factorul de reglare a interferonului (IRF) -1), proteină tumorală Wilms, proteina de legare a ETS, STAT, proteine de legare a casetei GATA, *de exemplu*, GATA-3 și familia de proteine helix înaripate.

Alte produse genetice utile includ carbamoil sintetaza I, ornitin transcarbamilaza (OTC), arginosuccinat sintetaza, arginosuccinat liaza (ASL) pentru tratamentul deficienței de arginosuccinat liază, arginaza, fumarilacetat hidrolaza, fenilalanină hidroxilaza, alfa-1 antitripsina, rhesus alfa fetoproteina (AFP), gonadotropina corionică rhesus (CG), glucozo-6-fosfataza, porfobilinogen deaminaza, cistation beta-sintaza, decarboxilaza cetoacid cu lanț ramificat, albumina, izovaleril-coA dehidrogenaza, propionil CoA carboxilaza, metil malonil coAcid mutaza, glutaril CoA dehidrogenaza, insulina, beta-glucozidază, piruvat carboxilatul, fosforilază hepatică, fosforilază kinaza, glicină decarboxilază, proteina H, proteina T, o secvență de reglare transmembranară a fibrozei chistice (CFTR)

și un produs al genei distrofinei, *de exemplu*, o mini- sau micro-distrofină]. Alte produse genetice suplimentare utile includ enzime, cum ar fi, care pot fi utile în terapia de înlocuire a enzimelor, care este utilă într-o varietate de afecțiuni care rezultă din activitatea deficitară a enzimei. De exemplu, enzimele care conțin manoză-6-fosfat pot fi utilizate în terapii pentru bolile de depozitare lizozomală (*de exemplu*,

o genă corespunzătoare o include pe aceea care codifică β -glucuronidaza (GUSB)).
rAAV poate fi utilizat în sisteme de editare a genelor, sistem care poate implica un rAAV sau co-administrarea de stocuri multiple de rAAV. De exemplu, rAAV poate fi structurat pe calea ingineriei pentru a livra SpCas9, SaCas9, ARCUS, Cpf1 și alte construcții corespunzătoare de editare a genelor.

Alte produse genetice suplimentare utile le includ pe cele utilizați pentru tratamentul hemofiliei, incluzând hemofilia B (incluzând Factorul IX) și hemofilia A (incluzând Factorul VIII și variantele sale, cum ar fi lanțul ușor și lanțul greu al heterodimerului și domeniul șters B; Brevetul SUA Nr. 6 200 560 și Brevetul SUA Nr. 6 221 349). Minigena poate cuprinde primele 57 de perechi de baze ale lanțului greu al Factorului VIII care codifică secvența semnal de 10 aminoacizi, precum și secvența de poliadenilare a hormonului de creștere uman (hGH). Minigena poate cuprinde suplimentar domeniile A1 și A2, precum și 5 aminoacizi de la capătul N-terminal al domeniului B și/sau 85 de aminoacizi de la capătul C-terminal al domeniului B, precum și A3, C1 și domeniile C2.

Acizii nucleici care codifică lanțul greu și lanțul ușor al Factorului VIII pot fi asigurați într-o singură minigenă separată de 42 de acizi nucleici, care codifică 14 aminoacizi din domeniul B. [Brevetul SUA Nr. 6 200 560].

Alte produse genetice utile includ polipeptide care apar în mod non-natural, cum ar fi polipeptide himerice sau hibride care prezintă o secvență de aminoacizi care apare în mod non-natural, care conține inserții, ștergeri sau substituții de aminoacizi. De exemplu, imunoglobulinele structurate pe calea ingineriei cu un lanț unic ar putea fi utile la anumiți pacienți imunocompromiși. Alte tipuri de secvențe de gene care apar în mod non-natural includ molecule antisens și acizi nucleici catalitici, cum ar fi ribozimele, care ar putea fi utilizate pentru a reduce supraexpresia unei ținte.

Reducerea și/sau modularea expresiei unei gene este în special de dorit pentru tratamentul afecțiunilor hiperproliferative caracterizate prin celule de hiperproliferare, cum sunt cancerul și psoriazisul. Polipeptidele țintă includ acele polipeptide care sunt produse în mod exclusiv sau la niveluri mai mari în celule hiperproliferative, în comparație cu celulele normale. Antigenele țintă includ polipeptide codificate de oncogene cum ar fi myb, myc, fyn și gena de translocare bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk și EGRF. În plus față de produsele oncogenetice ca antigene țintă, polipeptidele țintă pentru tratamentele anticancer și regimurile protectoare includ regiuni variabile de anticorpi produși de limfoamele cu celule B și regiuni variabile ale receptorilor celulelor T ai limfoamelor cu celule T care pot fi, de asemenea, utilizate ca antigene țintă pentru boala autoimună. Alte polipeptide asociate cu tumora pot fi utilizate ca polipeptide țintă, cum ar fi polipeptide care se găsesc la niveluri mai ridicate în celulele tumorale, incluzând polipeptida recunoscută de anticorpus monoclonal 17-1A și polipeptidele de legare la folat.

Alte polipeptide și proteine terapeutice corespunzătoare le includ pe cele care pot fi utile pentru tratarea indivizilor care suferă de boli și tulburări autoimune prin conferirea unui răspuns imunitar protector de bază largă împotriva țăntelor care sunt asociate cu autoimunitate, incluzând receptori celulari și celulele care produc anticorpi „autodirecționați”. Bolile autoimune mediate de celulele T includ artrita reumatoidă (RA), scleroza multiplă (SM), sindromul Sjögren, sarcoidoza, diabetul zaharat insulino-dependent (IDDM), tiroidita autoimună, artrita reactivă, spondilita anchilozantă, sclerodermia, polimiozita, dermatomiozita, psoriazis, vasculita, granulomatoza Wegener, boala Crohn și colita ulcerosă. Fiecare dintre aceste boli este caracterizată de receptori ai celulelor T (TCR-uri) care se leagă la antigenele endogene și inițiază cascada inflamatorie asociată cu bolile autoimune.

Alte gene ilustrative care pot fi livrate prin intermediul rAAV includ, fără limitare, glucozo-6-fosfataza, asociată cu boala de depozitare a glicogenului sau cu deficiența de tip 1A (GSD1), fosfoenolpiruvat-carboxikinaza (PEPCK), asociată cu deficiența de PEPCK; kinaza de tip 5 dependentă de ciclină 5 (CDKL5), de asemenea cunoscută ca serin/treonin kinaza 9 (STK9) asociată cu convulsii și deteriorare severă a dezvoltării neurologice; galactoză-1 fosfat uridil transferaza, asociată cu galactozemie; fenilalanin hidroxilaza, asociată cu fenilketonurie (PKU); alfa-cetoacid dehidrogenaza cu lanț ramificat, asociată cu boala urinei cu miros de sirop de arțar; fumarilacetoacetat hidrolaza, asociată cu tirozinemia de tip 1; metilmalonil-CoA mutaza, asociată cu acidemia metilmalonica; acil CoA dehidrogenaza cu lanț mediu, asociată cu deficiența de acetyl CoA cu lanț mediu; ornitin transcarbamilaza (OTC), asociată cu deficit de ornitin transcarbamilază; sintetaza acidului argininosuccinic (ASS1), asociată cu citrulinemia; deficitul de lecitina-colesterol aciltransferază (LCAT); o acidemie metilmalonica (MMA); boala Niemann-Pick, tip C1; acidemia propionica (PA); proteina receptorului de lipoproteine cu densitate scăzută (LDLR), asociată cu hipercolesterolemia familială (FH); UDP-

glucouronosiltransferaza, asociată cu boala Crigler-Najjar; adenzin deaminaza, asociată cu boala imunodeficienței combinate severe; hipoxantin guanin fosforibozil transferaza, asociată cu guta și sindromul Lesch-Nyan; biotimidaza, asociată cu deficiența de biotimidază; alfa-galactozidaza A (a-Gal A) asociată cu boala Fabry; ATP7B asociat cu boala Wilson; beta-glucocerebrozidaza, asociată cu boala Gaucher tip 2 și 3; proteina membranară peroxizomală de 70 kDa, asociată cu sindromul Zellweger; arilsulfataza A (ARSA) asociată cu leucodistrofia metacromatică; enzimă galactocerebrozidază (GALC), asociată cu boala Krabbe; alfa-glucozidaza (GAA), asociată cu boala Pompe; gena sfingomielinază (SMPD1) asociată cu boala Nieman Pick tip A; argininosuccinat sintaza, asociată cu citrulinemie de tip II cu debut la adult (CTLN2); carbamoil-fosfat sintaza 1 (CPS1), asociată cu tulburările ciclului ureei; proteina neuronului motor de supraviețuire (SMN), asociată cu atrofia musculară spinală; ceramidaza, asociată cu lipogranulomatoza Farber; b-hexosaminidaza, asociată cu ganglioziidoza GM2 și bolile Tay-Sachs și Sandhoff; aspartilglucozaminidaza, asociată cu aspartil-glucozaminurie; a-fucozidaza, asociată cu fucozidoză; α -manozidaza, asociată cu alfa-manozidoză; porfobilinogen deaminaza, asociată cu porfirie acută intermitentă (AIP); alfa-1 antitripsina pentru tratamentul deficienței de alfa-1 antitripsină (emfizem); eritropoietina pentru tratamentul anemiei datorate talasemiei sau insuficienței renale; factorul de creștere endotelial vascular, angiopoietina-1 și factorul de creștere a fibroblastelor pentru tratamentul bolilor ischemice; trombomodulina și inhibitorul căii factorului tisular pentru tratamentul vaselor de sânge ocluzate, după cum se observă, de exemplu, în ateroscleroză, tromboză sau embolie; aminoacid aromatic decarboxilaza (AADC) și tirozin hidroxilaza (TH) pentru tratamentul bolii Parkinson; receptorul beta adrenergic, anti-sens față de, sau o formă mutantă a, fosfolamban, adenzin trifosfataza-2 reticulului sarco(endo)plasmatic. (SERCA2) și adenilil ciclaza cardiacă pentru tratamentul insuficienței cardiace congestive; o genă supresoare a tumorii, cum ar fi p53, pentru tratamentul diferitelor cancere; o citokină, cum ar fi una dintre diferitele interleukine, pentru tratamentul tulburărilor inflamatorii și imune și al cancerelor; distrofina sau minidistrofina și utrofina sau miniutrofina pentru tratamentul distrofiilor musculare; și, insulina sau GLP-1 pentru tratamentul diabetului.

Genele și bolile de interes suplimentare includ, de exemplu, boli asociate cu gena distonină, cum ar fi Neuropatia Ereditară Senzorială și Autonomă de Tip VI (gena DST codifică distonina; vectori duali AAV pot fi necesari din cauza dimensiunii proteinei (-7570 aa); boli asociate cu SCN9A, în care mutații cu pierderea funcției cauzează incapacitatea de a simți durere și mutații cu câștig în funcție cauzează afecțiuni dureroase, cum ar fi eritromelalgia. O altă afecțiune este Charcot-Marie-Tooth de tip 1F și 2E din cauza mutațiilor în gena NEFL (lanțul ușor al neurofilamentului) caracterizată printr-o neuropatie periferică progresivă motorie și senzorială cu expresie clinică și electrofiziologică variabilă.

rAAV descris aici poate fi utilizat în tratamentul tulburărilor de mucopolizacaridoze (MPS). Un astfel de rAAV poate purta o secvență de acid nucleic care codifică α -L-iduronidază (IDUA) pentru tratarea MPS I (sindroame Hurler, Hurler-Scheie și Scheie); o secvență de acid nucleic care codifică iduronat-2-sulfataza (IDS) pentru tratarea MPS II (sindromul Hunter); o secvență de acid nucleic care codifică sulfamidaza (SGSH) pentru tratarea MPSIII A, B, C și D (sindromul Sanfilippo); o secvență de acid nucleic care codifică N-acetilgalactozamin-6-sulfat sulfataza (GALNS) pentru tratarea MPS IV A și B (sindromul Morquio); o secvență de acid nucleic care codifică arilsulfataza B (ARSB) pentru tratarea MPS VI (sindromul Maroteaux-Lamy); o secvență de acid nucleic care codifică hialuronidaza pentru tratarea MPSI IX (deficiență de hialuronidază) și o secvență de acid nucleic care codifică beta-glucuronidaza pentru tratarea MPS VII (sindromul Sly).

Transgene imunogene

Un vector de rAAV care cuprinde un acid nucleic care codifică un produs genetic asociat cu cancerul (de exemplu, supresori de tumoră) poate fi utilizat pentru a trata cancerul, prin administrarea unui rAAV care prezintă vectorul de rAAV la un subiect care are cancerul.

Un vector de rAAV care cuprinde un acid nucleic care codifică un acid nucleic interferent mic (de exemplu, shARN-uri, siARN-uri) care inhibă expresia unui produs genetic asociat cu cancer (de exemplu, oncogene) poate fi utilizat pentru a trata cancerul, prin administrarea unui rAAV care prezintă vectorul de rAAV la un subiect care prezintă cancer. Un vector de rAAV care cuprinde un acid nucleic care codifică un produs genetic asociat cu cancerul (sau un ARN funcțional care inhibă expresia unei gene asociate cu cancerul) poate fi utilizat în scopuri de cercetare, de exemplu, pentru a studia cancerul sau pentru a identifica produsele terapeutice care tratează cancerul. Următoarea este o listă non-limitativă de gene exemplificative cunoscute a fi asociate cu dezvoltarea cancerului (de exemplu, oncogene și supresori de tumoră): AARS, ABCB1, ABCC4, ABI2, ABL1, ABL2, ACK1, ACP2, ACY1, ADSL, AK1, AKR1C2, AKT1, ALB, ANPEP, ANXA5, ANXA7, AP2M1, APC, ARHGAP5, ARHGEF5, ARID4A, ASNS, ATF4, ATM, ATP5B, ATP5O, AXL, BARD1, BAX, BCL2, BHLHB2, BLMH, BRAF, BRCA1, BRCA2, BTK, CANX, CAP1, CAPN1, CAPNS1, CAV1, CBFB, CBLB, CCL2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CCT5, CCYR61, CD24, CD44, CD59, CDC20, CDC25, CDC25A,

CDC25B, CDC2L5, CDK10, CDK4, CDK5, CDK9, CDKL1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2D, CEBPG, CENPC1, CGRRF1, CHAF1A, CIB1, CKMT1, CLK1, CLK2, CLK3, CLNS1A, CLTC, COL1A1, COL6A3, COX6C, COX7A2, CRAT, CRHR1, CSF1R, CSK, CSNK1G2, CTNNA1, CTNNB1, CTPS, CTSC, CTSD, CUL1, CYR61, DCC, DCN, DDX10, DEK, 5 DHCR7, DHRS2, DHX8, DLG3, DVL1, DVL3, E2F1, E2F3, E2F5, EGFR, EGR1, EIF5, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC3, ETV1, ETV3, ETV6, F2R, FASTK, FBN1, FBN2, FES, FGFR1, FGR, FKBP8, FN1, FOS, FOSL1, FOSL2, FOXG1A, FOXO1A, FRAP1, FRZB, FTL, FZD2, FZD5, FZD9, G22P1, GAS6, GCN5L2, GDF15, GNA13, GNAS, GNB2, GNB2L1, GPR39, GRB2, GSK3A, GSPT1, GTF2I, HDAC1, HDGF, HMMR, HPRT1, HRB, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPB1, HSPH1, 10 HYAL1, HYOU1, ICAM1, ID1, ID2, IDUA, IER3, IFTM1, IGF1R, IGF2R, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IL1B, ILK, ING1, IRF3, ITGA3, ITGA6, ITGB4, JAK1, JARID1A, JUN, JUNB, JUND, K-ALPHA-1, KIT, KITLG, KLK10, KPNA2, KRAS2, KRT18, KRT2A, KRT9, LAMB1, LAMP2, LCK, LCN2, LEP, LITAF, LRPAP1, LTF, LYN, LZTR1, MADH1, MAP2K2, MAP3K8, MAPK12, MAPK13, MAPKAPK3, MAPRE1, MARS, MAS1, MCC, MCM2, MCM4, MDM2, MDM4, MET, MGST1, 15 MICB, MLLT3, MME, MMP1, MMP14, MMP17, MMP2, MNDA, MSH2, MSH6, MT3, MYB, MYBL1, MYBL2, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYL9, MYLK, NEO1, NF1, NF2, NFKB1, NFKB2, NFSF7, NID, NINE, NMBR, NME1, NME2, NME3, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, NPM1, NQO1, NR1D1, NR2F1, NR2F6, NRAS, NRG1, NSE1, OSM, PA2G4, PABPC1, PCNA, PCTK1, PCTK2, PCTK3, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDPK1, PEA15, PFDN4, PFDN5, PGAM1, PHB, 20 PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG, PIM1, PKM2, PKMYT1, PLK2, PPARD, PPARG, PPIH, PPP1CA, PPP2R5A, PRDX2, PRDX4, PRKAR1A, PRKCBP1, PRNP, PRSS15, PSMA1, PTCH, PTEN, PTGS1, PTMA, PTN, PTPRN, RAB5A, RAC1, RAD50, RAF1, RALBP1, RAP1A, RARA, RARB, RASGRF1, RB1, RBBP4, RBL2, REA, REL, RELA, RELB, RET, RFC2, RGS19, RHOA, RHOB, RHOC, RHOD, RIPK1, RPN2, RPS6 KB1, RRM1, SARS, SELENBP1, SEMA3C, SEMA4D, SEPP1, SERPINH1, SFN, 25 SFPQ, SFRS7, SHB, SHH, SIAH2, SIVA, SIVA TP53, SKI, SKIL, SLC16A1, SLC1A4, SLC20A1, SMO, sfingomielină fosfodiesterasa 1 (SMPD1), SNAI2, SND1, SNRPB2, SOCS1, SOCS3, SOD1, SORT1, SPINT2, SPRY2, SRC, SRPX, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, STC1, TAF1, TBL3, TBRG4, TCF1, TCF7L2, TFAP2C, TFDP1, TFDP2, TGFA, TGFB1, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS1, TIE, TIMP1, TIMP3, TJP1, TK1, TLE1, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A, 30 TNFRSF1B, TNFRSF6, TNFSF7, TNK1, TOB1, TP53, TP53BP2, TP53I3, TP73, TPBG, TPT1, TRADD, TRAM1, TRRAP, TSG101, TUFM, TXNRD1, TYRO3, UBC, UBE2L6, UCHL1, USP7, VDAC1, VEGF, VHL, VIL2, WEE1, WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WT1, XRCC1, YES1, YWHAB, YWHAZ, ZAP70 și ZNF9..

Un vector de rAAV poate cuprinde ca transgenă un acid nucleic care codifică o proteină sau un 35 ARN funcțional care modulează apoptoza. Următoarea este o listă non-limitativă a genelor asociate cu apoptoză și acizii nucleici care codifică produsele acestor gene și omologii lor și care codifică acizi nucleici interferenți mici (de exemplu, shARN-uri, miARN-uri) care inhibă expresia acestor gene, și omologii lor sunt utili ca transgene: RPS27A, ABL1, AKT1, APAF1, BAD, BAG1, BAG3, BAG4, BAK1, BAX, BCL10, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L11, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L2, 40 BCLAF1, BFAR, BID, BIK, NAIP, BIRC2, BIRC3, XIAP, BIRC5, BIRC6, BIRC7, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BOK, BRAF, CARD10, CARD11, NLRC4, CARD14, NOD2, NOD1, CARD6, CARDS, CARDS, CASP1, CASP10, CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR, CIDEA, CIDEB, CRADD, DAPK1, DAPK2, DFFA, DFFB, FADD, GADD45A, GDNF, HRK, IGF1R, LTA, LTBR, MCL1, NOL3, PYCARD, RIPK1, RIPK2, TNF, 45 TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF14, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF25, CD40, FAS, TNFRSF6B, CD27, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF14, TNFSF18, CD40LG, FASLG, CD70, TNFSF8, TNFSF9, TP53, TP53BP2, TP73, TP63, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4 și TRAF5.

Produsele genetice utile includ și miARN-uri. miARN-urile și alți acizi nucleici interferenți mici 50 reglează expresia genelor prin intermediul scindării/degradării transcriptului de ARN țintă sau prin reprimare translațională a ARN-ului mesager țintă (mARN). miARN-urile sunt exprimate nativ, în mod tipic, ca 19-25 produse de ARN non-translatate finale. miARN-urile își prezintă activitatea prin interacțiuni specifice secvenței cu regiunile 3' netranslate (UTR) ale mARN-urilor țintă. Aceste miARN-uri exprimate în mod endogen formează precursori în ac de păr care sunt ulterior procesați într-un duplex de miARN și suplimentar într-o moleculă de miARN monocatenară „matură”. Acest miARN 55 matur ghidează un complex multiproteic, miRISC, care identifică zona țintă, de exemplu, în regiunile 3' UTR, ale mARN-urilor țintă pe baza complementarității lor cu miARN-ul matur.

Următoarea listă non-limitativă de gene miARN și omologii lor este utilă ca gene sau ca ținte pentru acizi nucleici interferenți mici codificați de gene (de exemplu, bureți miARN, oligonucleotide

antisens, ARN-uri TuD): hsa-let-7a, hsa-let-7a*, hsa-let-7b, hsa-let-7b*, hsa-let-7c, hsa-let-7c*, hsa-let-7d, hsa-let-7d*, hsa-let-7e, hsa-let-7e*, hsa-let-7f, hsa-let-7f-1*, hsa-let-7f-2*, hsa-let-7g, hsa-let-7g*, hsa-let-71, hsa-let-71*, hsa-miR-1, hsa-miR-100, hsa-miR-100*, hsa-miR-101, hsa-miR-101*, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-105*, hsa-miR-106a, hsa-miR-106a*, hsa-miR-106b, hsa-miR-106b*, hsa-miR-107, hsa-miR-10a, hsa-miR-10a*, hsa-miR-10b, hsa-miR-10b*, hsa-miR-1178, hsa-miR-1179, hsa-miR-1180, hsa-miR-1181, hsa-miR-1182, hsa-miR-1183, hsa-miR-1184, hsa-miR-1185, hsa-miR-1197, hsa-miR-1200, hsa-miR-1201, hsa-miR-1202, hsa-miR-1203, hsa-miR-1204, hsa-miR-1205, hsa-miR-1206, hsa-miR-1207-3p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1208, hsa-miR-122, hsa-miR-122*, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-1225-3p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1226, hsa-miR-1226*, hsa-miR-1227, hsa-miR-1228, hsa-miR-1228*, hsa-miR-1229, hsa-miR-1231, hsa-miR-1233, hsa-miR-1234, hsa-miR-1236, hsa-miR-1237, hsa-miR-1238, hsa-miR-124, hsa-miR-124*, hsa-miR-1243, hsa-miR-1244, hsa-miR-1245, hsa-miR-1246, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1249, hsa-miR-1250, hsa-miR-1251, hsa-miR-1252, hsa-miR-1253, hsa-miR-1254, hsa-miR-1255a, hsa-miR-1255b, hsa-miR-1256, hsa-miR-1257, hsa-miR-1258, hsa-miR-1259, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-125b-1*, hsa-miR-125b-2*, hsa-miR-126, hsa-miR-126*, hsa-miR-1260, hsa-miR-1261, hsa-miR-1262, hsa-miR-1263, hsa-miR-1264, hsa-miR-1265, hsa-miR-1266, hsa-miR-1267, hsa-miR-1268, hsa-miR-1269, hsa-miR-1270, hsa-miR-1271, hsa-miR-1272, hsa-miR-1273, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1274a, hsa-miR-1274b, hsa-miR-1275, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-1276, hsa-miR-1277, hsa-miR-1278, hsa-miR-1279, hsa-miR-128, hsa-miR-1280, hsa-miR-1281, hsa-miR-1282, hsa-miR-1283, hsa-miR-1284, hsa-miR-1285, hsa-miR-1286, hsa-miR-1287, hsa-miR-1288, hsa-miR-1289, hsa-miR-129*, hsa-miR-1290, hsa-miR-1291, hsa-miR-1292, hsa-miR-1293, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-1294, hsa-miR-1295, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-1297, hsa-miR-1298, hsa-miR-1299, hsa-miR-1300, hsa-miR-1301, hsa-miR-1302, hsa-miR-1303, hsa-miR-1304, hsa-miR-1305, hsa-miR-1306, hsa-miR-1307, hsa-miR-1308, hsa-miR-130a, hsa-miR-130a*, hsa-miR-130b, hsa-miR-130b*, hsa-miR-132, hsa-miR-132*, hsa-miR-1321, hsa-miR-1322, hsa-miR-1323, hsa-miR-1324, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a, hsa-miR-135a*, hsa-miR-135b, hsa-miR-135b*, hsa-miR-136, hsa-miR-136*, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-138-1*, hsa-miR-138-2*, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-141*, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-143*, hsa-miR-144, hsa-miR-144*, hsa-miR-145, hsa-miR-145*, hsa-miR-146a, hsa-miR-146a*, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147, hsa-miR-147b, hsa-miR-148a, hsa-miR-148a*, hsa-miR-148b, hsa-miR-148b*, hsa-miR-149, hsa-miR-149*, hsa-miR-150, hsa-miR-150*, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-154, hsa-miR-154*, hsa-miR-155, hsa-miR-155*, hsa-miR-15a, hsa-miR-15a*, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b*, hsa-miR-16, hsa-miR-16-1*, hsa-miR-16-2*, hsa-miR-17, hsa-miR-17*, hsa-miR-181a, hsa-miR-181a*, hsa-miR-181a-2*, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181c*, hsa-miR-181d, hsa-miR-182, hsa-miR-182*, hsa-miR-1825, hsa-miR-1826, hsa-miR-1827, hsa-miR-183, hsa-miR-183*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-185*, hsa-miR-186, hsa-miR-186*, hsa-miR-187, hsa-miR-187*, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a, hsa-miR-18a*, hsa-miR-18b, hsa-miR-18b*, hsa-miR-190, hsa-miR-190b, hsa-miR-191, hsa-miR-191*, hsa-miR-192, hsa-miR-192*, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-193b*, hsa-miR-194, hsa-miR-194*, hsa-miR-195, hsa-miR-195*, hsa-miR-196a, hsa-miR-196a*, hsa-miR-196b, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-19a*, hsa-miR-19b, hsa-miR-19b-1*, hsa-miR-19b-2*, hsa-miR-200a, hsa-miR-200a*, hsa-miR-200b, hsa-miR-200b*, hsa-miR-200c, hsa-miR-200c*, hsa-miR-202, hsa-miR-202*, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-206, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20a*, hsa-miR-20b, hsa-miR-20b*, hsa-miR-21, hsa-miR-21*, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-214, hsa-miR-214*, hsa-miR-215, hsa-miR-216a, hsa-miR-216b, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-218-1*, hsa-miR-218-2*, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-22*, hsa-miR-220a, hsa-miR-220b, hsa-miR-220c, hsa-miR-221, hsa-miR-221*, hsa-miR-222, hsa-miR-222*, hsa-miR-223, hsa-miR-223*, hsa-miR-224, hsa-miR-23a, hsa-miR-23a*, hsa-miR-23b, hsa-miR-23b*, hsa-miR-24, hsa-miR-24-1*, hsa-miR-24-2*, hsa-miR-25, hsa-miR-25*, hsa-miR-26a, hsa-miR-26a-1*, hsa-miR-26a-2*, hsa-miR-26b, hsa-miR-26b*, hsa-miR-27a, hsa-miR-27a*, hsa-miR-27b, hsa-miR-27b*, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-297, hsa-miR-298, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29a*, hsa-miR-29b, hsa-miR-296-1*, hsa-miR-296-2*, hsa-miR-29c, hsa-miR-29c*, hsa-miR-300, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-302a, hsa-miR-302a*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302b*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302c*, hsa-miR-302d, hsa-miR-302d*, hsa-miR-302e, hsa-miR-302f, hsa-miR-30a, hsa-miR-30a*, hsa-miR-30b, hsa-miR-30b*, hsa-miR-30c, hsa-miR-30c-1*, hsa-miR-30c-2*, hsa-miR-30d, hsa-miR-30d*, hsa-miR-30e, hsa-miR-30e*, hsa-miR-31, hsa-miR-31*, hsa-miR-32, hsa-miR-32*, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d, hsa-miR-323-3p, hsa-miR-323-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-

328, hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-335*, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a, hsa-miR-33a*, hsa-miR-33b, hsa-miR-33b*, hsa-miR-340, hsa-miR-340*, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34a*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363*, hsa-miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-367*, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374a*, hsa-miR-374b, hsa-miR-374b*, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a*, hsa-miR-376b, hsa-miR-376c, hsa-miR-377, hsa-miR-377*, hsa-miR-378, hsa-miR-378*, hsa-miR-379, hsa-miR-379*, hsa-miR-380, hsa-miR-380*, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-411*, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-424*, hsa-miR-425, hsa-miR-425*, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-431*, hsa-miR-432, hsa-miR-432*, hsa-miR-433, hsa-miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452*, hsa-miR-453, hsa-miR-454, hsa-miR-454*, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487a, hsa-miR-487b, hsa-miR-488, hsa-miR-488*, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-493*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-497, hsa-miR-497*, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-500*, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-505*, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-513c, hsa-miR-514, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516b, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-miR-518e*, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f*, hsa-miR-519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e, hsa-miR-519e*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522, hsa-miR-523, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b*, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539, hsa-miR-541, hsa-miR-541*, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-545*, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-548b-3p, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-548e, hsa-miR-548f, hsa-miR-548g, hsa-miR-548h, hsa-miR-548i, hsa-miR-548j, hsa-miR-548k, hsa-miR-548l, hsa-miR-548m, hsa-miR-548n, hsa-miR-548o, hsa-miR-548p, hsa-miR-549, hsa-miR-550, hsa-miR-550*, hsa-miR-551a, hsa-miR-551b, hsa-miR-551b*, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-555, hsa-miR-556-3p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-589*, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-593*, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616, hsa-miR-616*, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-624*, hsa-miR-625, hsa-miR-625*, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-629*, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-653, hsa-miR-654-3p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-663b, hsa-miR-664, hsa-miR-664*, hsa-miR-665, hsa-miR-668, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-675, hsa-miR-7, hsa-miR-708, hsa-miR-708*, hsa-miR-7-1*, hsa-miR-7-2*, hsa-miR-720, hsa-miR-744, hsa-miR-744*, hsa-miR-758, hsa-miR-760, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-873, hsa-miR-874, hsa-miR-875-3p, hsa-miR-875-5p, hsa-miR-876-

3p, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-877, hsa-miR-877*, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-887, hsa-miR-888, hsa-miR-888*, hsa-miR-889, hsa-miR-890, hsa-miR-891a, hsa-miR-891b, hsa-miR-892a, hsa-miR-892b, hsa-miR-9, hsa-miR-9*, hsa-miR-920, hsa-miR-921, hsa-miR-922, hsa-miR-923, hsa-miR-924, hsa-miR-92a, hsa-miR-92a-1*, hsa-miR-92a-2*, hsa-miR-92b, hsa-miR-92b*, hsa-miR-93, hsa-miR-93*, hsa-miR-933, hsa-miR-934, hsa-miR-935, hsa-miR-936, hsa-miR-937, hsa-miR-938, hsa-miR-939, hsa-miR-940, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-943, hsa-miR-944, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-96*, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-99a*, hsa-miR-99b și hsa-miR-99b*. De exemplu, miARN care țintește cadrul de citire deschis 72 al cromozomului 8 (C9orf72) care exprimă superoxid dismutaza (SOD1), asociat cu scleroza laterală amiotrofică (ALS) poate fi de interes.

Un miARN inhibă funcția ARNm-urilor pe care le țintesc și, ca rezultat, inhibă expresia polipeptidelor codificate de ARNm-uri. Astfel, blocarea (parțială sau totală) a activității miARN-ului (de exemplu, silențierea miARN-ului) poate induce sau restabili în mod eficient expresia unei polipeptide a cărei expresie este inhibată (dereprimă polipeptida).

Dereprimarea polipeptidelor codificate de ținte de ARNm ale unui miARN poate fi realizată prin inhibarea activității miARN-ului în celule prin oricare dintr-o varietate de metode. De exemplu, blocarea activității unui miARN poate fi realizată prin hibridizare cu un acid nucleic interferent mic (de exemplu, oligonucleotidă antisens, burete miARN, ARN TuD) care este complementar sau complementar în mod substanțial cu miARN, astfel blocând interacțiunea miARN-ului cu ARNm-ul său țintă. Așa cum a fost utilizat aici, un acid nucleic interferent mic care este complementar în mod substanțial cu miARN este unul care este capabil de hibridizare cu un miARN și de blocarea activității miARN-ului.

Un acid nucleic interferent mic care este complementar în mod substanțial unui miARN poate fi un acid nucleic interferent mic care este complementar cu miARN, la toate, dar cu excepția a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 sau 18 baze. Un "inhibitor de miARN" este un agent care blochează funcția, expresia și/sau procesarea miARN. De exemplu, aceste molecule includ, dar nu sunt limitate la antisens specific microARN, bureți microARN, ARN-uri momelă rezistentă (ARN-uri TuD) și oligonucleotide microARN (oligonucleotide dublu catenare, ac de păr, scurte) care inhibă interacțiunea miARN cu un complex Drosha.

Încă alte gene utile pot include pe cele care codifică imunoglobuline care conferă imunitate pasivă unui agent patogen. O "moleculă de imunoglobulină" este o proteină care conține porțiunile active din punct de vedere imunologic ale unui lanț greu de imunoglobulină și ale unui lanț ușor de imunoglobulină cuplate în mod covalent împreună și capabile de combinare în mod specific cu antigenul. Moleculele de imunoglobulină sunt de orice tip (de exemplu, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA și IgY), clasă (de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 și IgA2) sau subclasă. Termenii "anticorp" și "imunoglobulină" pot fi utilizați aici în mod interschimbabil.

Un „lanț greu de imunoglobulină” este o polipeptidă care conține cel puțin o porțiune din domeniul de legare la antigen al unei imunoglobuline și cel puțin o porțiune dintr-o regiune variabilă a unui lanț greu de imunoglobulină sau cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă a unui lanț greu de imunoglobulină. Astfel, lanțul greu derivat din imunoglobulină are regiuni semnificative de omologie a secvenței de aminoacizi cu un membru al superfamiliei genelor de imunoglobulină. De exemplu, lanțul greu dintr-un fragment Fab este un lanț greu derivat din imunoglobulină.

Un "lanț ușor de imunoglobulină" este o polipeptidă care conține cel puțin o porțiune din domeniul de legare la antigen al unei imunoglobuline și cel puțin o porțiune a regiunii variabile sau cel puțin o porțiune a unei regiuni constante a unui lanț ușor de imunoglobulină. Astfel, lanțul ușor derivat din imunoglobulină are regiuni semnificative de omologie de aminoacizi cu un membru al superfamiliei genelor de imunoglobulină.

O „imunoadezină” este o moleculă himerică, de tip anticorp, care combină domeniul funcțional al unei proteine de legare, de obicei un receptor, un ligand sau o moleculă de adeziune celulară, cu domenii constante de imunoglobulină, incluzând în mod obișnuit regiunile balama și Fc.

Un "fragment de legare la antigen" (Fab) este o regiune a unui anticorp care se leagă la antigene. Acesta este compus dintr-un domeniu constant și unul variabil al fiecăruia dintre lanțul greu și lanțul ușor.

Construcția anti-patogenă este selectată pe baza agentului cauzal (patogenul) pentru boala împotriva căreia se caută protecție. Acești agenți patogeni pot fi de origine virală, bacteriană sau fungică și pot fi utilizați pentru a preveni infecția la oameni împotriva bolilor umane sau la mamifere non-umane sau alte animale pentru a preveni bolile veterinare.

rAAV poate include gene care codifică anticorpi și, în special, anticorpi de neutralizare împotriva unui agent patogen viral. Astfel de anticorpi anti-virali pot include anticorpi anti-gripă direcționați împotriva unuia sau mai multora dintre gripa A, Gripa B și Gripa C. Virusurile de tip A sunt cei mai virulenți agenți patogeni umani. Serotipurile de gripă A care au fost asociate cu pandemii includ,

H1N1, care a provocat gripa spaniolă în 1918 și gripa porcină în 2009; H2N2, care a provocat Gripa Asiatică în 1957; H3N2, care a provocat Gripa din Hong Kong în 1968; HSN1, care a provocat Gripa Aviară în 2004; H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3; și H10N7. Alte virusuri patogene țintă includ arenavirusuri (incluzând funină, machupo și Lassa), filovirusuri (incluzând Marburg și Ebola), hantavirusuri, picomoviridae (incluzând rinovirusuri, ecovirus), coronavirusuri, paramixovirus, morbillivirus, virus sincițial respirator, togavirus, coxsackievirus, virus JC, parvovirus B19, parainfluenza, adenovirusuri, reovirusuri, variola (Variola major (Variola)) și Vaccinia (Variola vacii) din familia poxvirus-urilor și varicela-zoster (pseudorabii). Febrele hemoragice virale sunt cauzate de membrii familiei arenavirusurilor (febra Lassa) (familie care este asociată, de asemenea, cu Coriomeningita Limfocitară (LCM)), filovirus (virusul ebola) și hantavirus (puremala). Membrii picornavirusurilor (o subfamilie de rinovirusuri) sunt asociați cu răceala obișnuită la oameni. Familia coronavirusurilor, care include o serie de virusuri non-umane, cum ar fi virusul bronșitei infecțioase (păsări de curte), virusul gastroenteric transmisibil la porcine (porc), virusul encefalomielitei hemaglutinatinei porcine (porc), virusul peritonitei infecțioase feline (pisica), coronavirusul enteric la feline (pisică), coronavirusul canin (câine). Coronavirusurile respiratorii umane au fost asociate în mod fals cu răceala obișnuită, hepatita non-A, B sau C și sindromul respirator acut brusc (SARS). Familia paramixovirusurilor includ virusul parainfluenza Tip 1, virusul parainfluenza Tip 3, virusul parainfluenza bovin Tip 3, rubulavirusul (virusul oreionului, virusul parainfluenza Tip 2, virusul parainfluenza Tip 4, virusul bolii Newcastle (găini), pesta bovină, morbilivirusul, care include rujeola și răpciuga canină și pneumovirusul, care include virusul sincițial respirator (RSV). Familia de parvovirusuri include parvovirusul felin (enterita la feline), panleucopeniavirusul felin, parvovirusul canin și parvovirusul porcine. Familia adenovirusurilor include virusuri (EX, AD7, ARD, O.B.) care cauzează boli respiratorii. Astfel, în anumite realizări, un vector de rAAV, așa cum a fost descris aici, poate fi structurat pe calea ingineriei pentru a exprima un anticorp anti-ebola, de exemplu, 2G4, 4G7, 13C6, un anticorp anti-gripal, de exemplu, FI6, CR8033 și anti -anticorp RSV, de exemplu, palivizumab, motavizumab.

Un construcție de anticorp de neutralizare împotriva unui agent patogen bacterian poate fi, de asemenea, selectat pentru utilizare în prezenta invenție. Construcția de anticorp de neutralizare poate fi direcționată împotriva bacteriei însăși. Construcția de anticorp de neutralizare poate fi direcționată împotriva unei toxine produse de bacterii. Exemple de agenți patogeni bacterieni transportați în aer includ, de exemplu, *Neisseria meningitidis* (meningită), *Klebsiella pneumonia* (pneumonie), *Pseudomonas aeruginosa* (pneumonie), *Pseudomonas pseudomallei* (pneumonie), *Pseudomonas mallei* (pneumonie), *Acinetobacter* (pneumonie), *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella lacunata*, *Alkaligenes*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus influenzae* (gripă), *Haemophilus parainfluenzae*, *Bordetella pertussis* (tuse convulsivă), *Francisella tularensis* (pneumonie/febră), *Legionella pneumonia* (boala legionarilor), *Chlamydia psittaci* (pneumonie), *Chlamydia pneumoniae* (pneumonie), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculoză (TB)), *Mycobacterium kansasii* (TB), *Mycobacterium avium* (pneumonie), *Nocardia asteroides* (pneumonie), *Bacillus anthracis* (antrax), *Staphylococcus aureus* (pneumonie), *Streptococcus pyogenes* (scarlatină), *Streptococcus pneumoniae* (pneumonie), *Corynebacteria diphtheria* (difterie), *Mycoplasma pneumoniae* (pneumonie).

rAAV poate include gene care codifică anticorpi și, în special, anticorpi de neutralizare împotriva unui agent patogen bacterian, cum ar fi agentul cauzal al antraxului, o toxină produsă de *Bacillus anthracis*. Anticorpi de neutralizare împotriva agentului de protecție (PA), una dintre cele trei peptide care formează toxoidul, au fost descriși. Celelalte două polipeptide constau din factor letal (LF) și factor de edem (EF). Anticorpii de neutralizare anti-PA au fost descriși ca fiind eficienți în imunizarea pasivă împotriva antraxului. Vezi, de exemplu, Brevetul SUA NR. 7 442 373; R. Sawada-Hirai și colab, J Immune Based Ther Vaccines. 2004; 2: 5. (on-line 12 mai 2004). Alți anticorpi suplimentari de neutralizare a toxinei anti-antrax au fost descriși și/sau pot fi generați. În mod asemănător, anticorpii de neutralizare împotriva altor bacterii și/sau toxine bacteriene pot fi utilizați pentru a genera o construcție anti-patogen livrată de AAV, așa cum a fost descris aici.

Anticorpii împotriva bolilor infecțioase pot fi cauzati de paraziți sau de ciuperci, inclusiv, de exemplu, specia *Aspergillus*, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor plumbeus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, specia *Penicillium*, *Micropolyspora faeni*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Alternaria alternate*, specia *Cladosporium*, *Helminthosporium* și specia *Stachybotrys*.

rAAV poate include gene care codifică anticorpi și, în special, anticorpi de neutralizare, împotriva factorilor patogeni ai bolilor, cum ar fi boala Alzheimer (AD), boala Parkinson (PD), GBA-Parkinson, artrita reumatoidă (RA), sindromul colonului iritabil (IBS), boala pulmonară obstructivă cronică (BPOC), cancere, tumori, scleroză sistemică, astm și alte boli. Astfel de anticorpi pot fi, fără limitare, de exemplu, alfa-sinucleină, anti-factorul de creștere vascular endotelial (VEGF) (anti-VEGF),

anti-VEGFA, anti-PD-1, anti-PDL1, anti-CTLA-4, anti-TNF-alfa, anti-IL-17, anti-IL-23, anti-IL-21, anti-IL-6, receptor anti-IL-6, anti-IL-5, anti-IL-7, anti-Factor XII, anti-IL-2, anti-HIV, anti-IgE, anti-receptorul 1 al factorului de necroză tumorală (TNFR1), anti-notch 2/3, anti-notch 1, anti-OX40, anti-tirozin kinaza 3 a receptorului erb-b2 (ErbB3), anti-ErbB2, anti-antigenul de maturare a celulelor beta, anti-stimulatorul de limfocite B, anti-CD20, anti-HER2, anti-factorul de stimulare a coloniilor de granulocite macrofage, anti-oncostatina M (OSM), anti-proteina 3 a genei de activare a limfocitelor (LAG3), anti-CCL20, anti-componenta P a amiloidului seric (SAP), anti-inhibitorul prolil hidroxilazei, anti-CD38, anti-glicoproteina IIb/IIIa, anti-CD52, anti-CD30, anti-IL-1beta, anti-receptorul factorului de creștere epidermic, anti-CD25, anti-ligandul RANK, anti-proteina C5 a sistemului de complement, anti-CD11a, anti-receptorul CD3, anti-alfa-4 integrină ($\alpha 4$), anti-proteina F RSV și anti-integrina $\alpha 4\beta 7$. Alți agenți patogeni suplimentari și alte boli vor fi evidente unui profesionist în domeniu. Alți anticorpi corespunzători pot fi include pe cei utili pentru tratarea bolii Alzheimer, cum ar fi, de exemplu, anti-beta-amiloid (de exemplu, crenezumab, solanezumab, aducanumab), anti-fibrila amiloidului beta, anti-plăcile amiloidului beta, anti-tau, un bapineuzumab, printre altele. Alți anticorpi corespunzători pentru tratarea unei varietăți de afecțiuni îi includ pe cei descriși, de exemplu, în PCT/US2016/058968, depus la 27 Octombrie 2016, publicat ca WO 2017/075119A1.

II. Producția de vectori de rAAV

Pentru utilizare în producerea unui vector viral de AAV (de exemplu, un AAV recombinant (r)), casetele de expresie pot fi purtate pe orice vector corespunzător, de exemplu, o plasmidă, care este livrată unei celule gazdă de împachetare. Plasmidele utile în această invenție pot fi structurate pe calea ingineriei astfel încât să fie corespunzătoare pentru replicare și împachetare *in vitro* în celule procariote, celule de insecte, celule de mamifere, printre altele. Tehnicile de transfecție corespunzătoare și celulele gazdă de împachetare sunt cunoscute și/sau pot fi proiectate cu ușurință de către un profesionist în domeniu.

Metodele pentru generarea și izolarea de AAV-uri corespunzătoare pentru utilizare ca vectori sunt cunoscute în domeniu. Vezi, în general, de exemplu, Grieger & Samulski, 2005, „Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications,” Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119-145; Buning și colab., 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," J. Gene Med. 10:717-733; și referințele citate mai jos. Pentru împachetarea unei gene în virioni, ITR-urile sunt singurele componente de AAV necesare în *cis* în aceeași construcție, precum molecula de acid nucleic care conține caseta (casetele) de expresie. Genele cap și rep pot fi asigurate în *trans*.

Casetele de expresie descrise aici pot fi proiectate pe calea ingineriei într-un element genetic (de exemplu, o plasmidă navetă) care transferă secvențele construcției de imunoglobulină purtate pe acestea într-o celulă gazdă de împachetare pentru producerea unui vector viral.

Elementul genetic selectat poate fi livrat la o celulă de împachetare a AAV prin orice metodă corespunzătoare, incluzând transfecția, electroporarea, livrarea lipozomilor, tehnicile de fuziune la membrană, trombocite acoperite cu ADN de mare viteză, infecția virală și fuziunea protoplastelor. Celule stabile de împachetare a AAV pot fi, de asemenea, realizate. În mod alternativ, casetele de expresie pot fi utilizate pentru a genera un vector viral altul decât AAV sau pentru producerea de amestecuri de anticorpi *in vitro*. Metodele utilizate pentru a realiza astfel de construcții sunt cunoscute celor cu calificare în manipularea acidului nucleic și includ inginerie genetică, inginerie recombinată și tehnici sintetice. Vezi, de exemplu, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

Termenul "intermediar de AAV" sau "intermediar de vector de AAV" se referă la o capsidă de rAAV asamblată căreia îi lipsec secvențele genomice dorite împachetate în aceasta. Acestea pot fi, de asemenea, denumite o capsidă „goală”. O astfel de capsidă poate să nu conțină secvențe genomice detectabile ale unei casete de expresie sau doar secvențe genomice împachetate parțial care sunt insuficiente pentru a realiza expresia produsului genetic. Aceste capside goale sunt non-funcționale pentru a transfera gena de interes la o celulă gazdă.

Virusul adeno-asociat recombinant (AAV) descris aici poate fi generat utilizând tehnici care sunt cunoscute. Vezi, de exemplu, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. O astfel de metodă implică cultivarea unei celule gazdă care conține o secvență de acid nucleic care codifică o proteină de capsidă AAV; o genă rep funcțională; o casetă de expresie compusă din, la un minim, repetări terminale inversate (ITR-uri) AAV și o transgenă; și suficiente funcții auxiliare pentru a permite împachetarea casetei de expresie în proteina de capsidă AAV. Metode de generare a capsidei, secvențe de codificare pentru aceasta și metode pentru producerea vectorilor virali de rAAV au fost descrise. Vezi, de exemplu, Gao, și colab, Proc. Natl. Acad. Sci. SUA 100 (10), 6081-6086 (2003) și US 2013/0045186A1. Un AAVhu68 recombinant poate fi produs utilizând un AAVhu68 recombinant poate fi produs utilizând cultura celulară de producție așa cum a fost descris în cele ce urmează. O astfel de

cultură celulară conține un acid nucleic care codifică NR ID SECV: 2, care exprimă proteina de capsidă AAVhu68 în celula gazdă; o moleculă de acid nucleic corespunzătoare pentru împachetare în capsida de AAVhu68, adică un genom de vector care conține ITR-uri AAV și o secvență de acid nucleic de non-AAV care codifică un produs genetic legat în mod funcțional la secvențe care direcționează expresia produsului într-o celulă gazdă; și suficiente funcții rep AAV și funcții auxiliare de adenovirus pentru a permite împachetarea moleculei de acid nucleic în capsida de AAVhu68 recombinant. Cultura celulară poate fi compusă din celule de mamifere (de exemplu, celule de rinichi embrionar uman 293, printre altele) sau celule de insecte (de exemplu, baculovirus).

În mod opțional, funcțiile rep sunt asigurate de un alt AAV decât hu68. Cel puțin părți din funcțiile rep pot fi de la AAVhu68. Vezi, de exemplu, secvențele rep codifică proteinele rep ale NR ID SECV: 4 și fragmentele funcționale ale acestora. AAV rep poate fi codificată de secvența de acid nucleic din NR ID SECV: 3. Proteina rep poate fi o proteină rep heterologă, alta decât AAVhu68rep, de exemplu, dar nu limitată la, proteina rep AAV1, proteina rep AAV2, proteina rep AAV3, proteină rep AAV4, proteina rep AAV5, proteina rep AAV6, proteina rep AAV7, proteina rep AAV8; sau rep 78, rep 68, rep 52, rep 40, rep68/78 și rep40/52; sau un fragment al acestora; sau altă sursă. În mod opțional, secvențele rep și cap sunt pe același element genetic în cultura celulară. Poate exista un agent de spațiere între secvența rep și gena cap. În mod opțional, agentul de spațiere este atgacttaaacagggt, NR ID SECV: 9. Oricare dintre aceste secvențe de capsidă de AAVhu68 sau de AAV mutant poate fi sub controlul secvențelor de control reglator exogene care direcționează expresia acestora într-o celulă gazdă.

Vectorii de terapie genetică pot fi fabricați într-o cultură celulară corespunzătoare (de exemplu, celule HEK 293). Metodele pentru fabricarea vectorilor de terapie genetică descrise aici includ metode bine cunoscute în domeniu, cum ar fi generarea de ADN plasmidic utilizat pentru producerea vectorilor de terapie genetică, generarea de vectori și purificarea vectorilor. Vectorul de terapie genetică poate fi un vector de AAV și plasmidele generate pot fi o cis-plasmidă AAV care codifică genomul de AAV și gena de interes, o trans-plasmidă AAV care conține gene rep și cap AAV și o plasmidă helper de adenovirus. Procesul de generare a vectorului poate include etape ale metodei, cum ar fi inițierea culturii celulare, trecerea celulelor, însămânțarea celulelor, transfecția celulelor cu ADN plasmidic, schimbul de mediu post-transfecție în mediu fără ser și recoltarea de celule care conțin vector și a mediilor de cultură. La celulele recoltate care conțin vector și la mediile de cultură recoltate s-a făcut referire aici ca recoltare de celule brute. Într-un alt sistem suplimentar, vectorii de terapie genetică sunt introduși în celulele de insecte prin infectare cu vectori pe bază de baculovirus. Pentru recenzii asupra acestor sisteme de producție, vezi, în general, de exemplu, Zhang și colab, 2009, „Adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production,” Human Gene Therapy 20:922-929.

Metodele de realizare și utilizare a acestora și a altor sisteme de producție de AAV sunt, de asemenea, descrise următoarele Brevete SUA: 5 139 941; 5 741 683; 6 057 152; 6 204 059; 6 268 213; 6 491 907; 6 660 514; 6 951 753; 7 094 604; 7 172 893; 7 201 898; 7 229 823; și 7 439 065.

Recoltarea de celule brute poate fi apoi supusă etapelor metodei, cum ar fi concentrarea recoltei de vector, diafiltrarea recoltei de vector, microfluidizarea recoltei de vector, digestia cu nuclează a recoltei de vector, filtrarea intermediarului microfluidizat, purificarea brută prin cromatografie, purificarea brută prin ultracentrifugare, schimb de tampon prin filtrare cu flux tangențial și/sau formulare și filtrare pentru a prepara vectorul în vrac.

O purificare prin cromatografie de afinitate în două etape la concentrație ridicată de sare, urmată de cromatografia pe rășină cu schimb de anioni, este utilizată pentru a purifica produsul medicamentos de vector și pentru a îndepărta capsidale goale. Aceste metode sunt descrise mai detaliat în Cererea Internațională de Brevet nr. PCT/US2016/065970, depusă la 9 decembrie, 2016 și documentele sale prioritare, Cererile de Brevet SUA Nr. 62/322 071, depusă la 13 Aprilie 2016 și 62/226 357, depusă la 11 decembrie 2015 și intitulată „Metodă de Purificare Scalabilă pentru AAV9”.

Metode de purificare pentru AAV8, Cererea Internațională de Brevet nr. PCT/US2016/065976, depusă la 9 decembrie 2016 și documentele sale prioritare Cererile de Brevet SUA Nr. 62/322 098, depusă la 13 aprilie 2016 și 62/266 341, depusă la 11 decembrie 2015 și rh10, Cererea Internațională de Brevet nr. PCT/US16/66013, depusă la 9 decembrie 2016 și documentele sale prioritare, Cererea de Brevet SUA Nr. 62/322 055, depusă la 13 aprilie 2016 și 62/266 347, intitulată "Metodă de Purificare Scalabilă pentru AAVrh10", depusă, de asemenea, la 11 decembrie 2015, și pentru AAV1, Cererea Internațională de Brevet nr. PCT/US2016/065974, depusă la 9 decembrie 2016 și documentele sale prioritare Cererile de Brevet SUA Nr. 62/322 083, depusă la 13 aprilie 2016 și 62/26 351, pentru "Metodă de Purificare Scalabilă pentru AAV1", depusă la 11 decembrie 2015.

Pentru a calcula conținutul de particule goale și pline, volumele de bandă VP3 pentru o probă selectată (de exemplu, în exemplele de aici, un preparat purificat cu gradient de iodixanol în care 4 din GC = 4 din particule) sunt reprezentate grafic în raport cu particulele GC încărcate. Ecuația liniară

rezultată ($y = mx+c$) este utilizată pentru a calcula numărul de particule din volumele de bandă ale vârfurilor articolului de testat. Numărul de particule (pt) per 20 μ L încărcăți este apoi multiplicat cu 50 pentru a asigura particule (pt)/mL. Pt/mL împărțit la GC/mL asigură raportul dintre particule față de copiile de genom (pt/GC). Pt/mL-GC/mL asigură pt/mL gol. pt/mL gol împărțit la pt/mL și $\times 100$ asigură procentul de particule goale.

În general, metodele de testare a capsidelor goale și a particulelor de vector de AAV cu genomuri împachetate au fost cunoscute în domeniu. Vezi, de exemplu, Grimm și colab, Gene Therapy (1999) 6:1322-1330; Sommer și colab, Molec. Ther. (2003) 7:122-128. Pentru a testa capsida denaturată, metodele includ supunerea stocului de AAV tratat la electroforeză pe gel SDS-poliacrilamidă, constând din orice gel capabil de separarea celor trei proteine de capsidă, de exemplu, un gel gradient care conține 3-8% Tris-acetat în tampon, apoi rularea gelului până când materialul de probă este separat și blottarea gelului pe membrane de nailon sau nitroceluloză, de preferat nailon. Anticorpii anti-capsidă de AAV sunt apoi utilizați ca anticorpi primari care se leagă la proteinele de capsidă denaturate, de preferat un anticorp monoclonal anti-capsidă de AAV, cel mai de preferat anticorpul monoclonal B1 anti-AAV-2 (Wobus și colab, J. Virol. (2000) 74:9281-9293). Un anticorp secundar este apoi folosit, unul care se leagă la anticorpul primar și conține un mijloc pentru detectarea legării cu anticorpul primar, mai de preferat un anticorp anti-IgG care conține o moleculă de detectare legată în mod covalent la acesta, cel mai de preferat un anticorp de oaie anti-IgG de șoarece legat în mod covalent la peroxidază de hrean. O metodă pentru detectarea legării este utilizată pentru a determina semi-cantitativ legarea dintre anticorpii primari și secundari, de preferat o metodă de detectare capabilă de detectarea emisiilor de izotopi radioactivi, a radiațiilor electromagnetice sau a modificărilor colorimetrice, cel mai de preferat, un kit de detectare a chemiluminiscenței. De exemplu, pentru SDS-PAGE, probele din fracțiile de coloană pot fi prelevate și încălzite în tampon de încărcare SDS-PAGE care conține agent reducător (de exemplu, DTT), și proteinele de capsidă au fost rezolvate pe gradient de geluri de poliacrilamidă pre-turnate (de exemplu, Novex). Colorarea cu argint poate fi efectuată utilizând SilverXpress (Invitrogen, CA) în conformitate cu instrucțiunile producătorului sau altă metodă de colorare corespunzătoare, adică colorări SYPRO rubin sau coomassie. Concentrația genomurilor de vector AAV (vg) în fracțiile de coloană poate fi măsurată prin PCR cantitativă în timp real (Q-PCR). Probele sunt diluate și digerate cu DNază I (sau altă nuclează corespunzătoare) pentru a îndepărta ADN-ul exogen. După inactivarea nucleazei, probele sunt diluate în plus și amplificate utilizând primeri și o sondă fluorogenă TaqMan™ specifică pentru secvența de ADN dintre primeri. Numărul de cicluri necesare pentru a atinge un nivel definit de fluorescență (ciclu de prag, Ct) este măsurat pentru fiecare probă pe un Sistem de Detectare a Secvenței Applied Biosystems Prism 7700. ADN-ul plasmidic care conține secvențe identice cu cele conținute în vectorul de AAV este folosit pentru a genera o curbă standard în reacția Q-PCR. Valorile pragului ciclului (Ct) obținute din probe sunt utilizate pentru a determina titrul genomului de vector prin normalizarea acestuia la valoarea Ct a curbei standard a plasmidei. Analize de punct final pe bază de PCR digitală pot fi, de asemenea, utilizate.

O metodă q-PCR optimizată poate fi utilizată, care utilizează o serin protează de spectru larg, de exemplu, proteinaza K (așa cum este disponibilă pe cale comercială de la Qiagen). Mai particular, analiza optimizată a titrului genomului qPCR este asemănătoare cu o analiză standard, cu excepția faptului că, după digestia cu DNază I, probele sunt diluate cu tampon de proteinază K și tratate cu proteinază K urmată de inactivare termică. Probele corespunzătoare sunt diluate cu tampon de proteinază K într-o cantitate egală cu dimensiunea probei. Tamponul de proteinază K poate fi concentrat de 2 ori sau mai mult. De obicei, tratamentul cu proteinază K este de aproximativ 0,2 mg/mL, dar poate fi variat de la 0,1 mg/mL până la aproximativ 1 mg/mL. Etapa de tratament este în general efectuată la aproximativ 55°C timp de aproximativ 15 minute, dar poate fi efectuată la o temperatură mai scăzută (de exemplu, aproximativ 37°C până la aproximativ 50°C) pe o perioadă mai lungă de timp (de exemplu, aproximativ 20 de minute până la aproximativ 30 de minute) sau o temperatură mai mare (de exemplu, până la aproximativ 60°C) pentru o perioadă de timp mai scurtă (de exemplu, aproximativ 5 până la 10 minute). În mod asemănător, inactivarea termică este în general la aproximativ 95°C timp de aproximativ 15 minute, dar temperatura poate fi scăzută (de exemplu, aproximativ 70 până la aproximativ 90°C) și timpul poate fi prelungit (de exemplu, aproximativ 20 minute până la aproximativ 30 de minute). Probele sunt apoi diluate (de exemplu, de 1000 de ori) și supuse analizei TaqMan, așa cum a fost descris în analiza standard.

În plus sau în mod alternativ, PCR digitală cu picături (ddPCR) poate fi utilizată. De exemplu, metode pentru determinarea titrurilor de genom de vector de AAV monocatenar și auto-complementar prin ddPCR au fost descrise. Vezi, de exemplu, M. Lock și colab, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 14 februarie.

Pe scurt, metoda pentru separarea particulelor de rAAVhu68 care prezintă secvențe genomice împachetate din intermediarii de AAVhu68 deficienți de genom implică supunerea unei suspensii care

cuprind particule virale de AAVhu68 recombinante și intermediari de capsidă de AAVhu689 la cromatografie lichidă cu performanță rapidă, în care particulele virale de AAVhu68 și intermediarii de AAVhu68 sunt legați la o rășină cu schimb puternic de anioni echilibrată la un pH de 10,2 și supuși unui gradient de sare în timp ce se monitorizează eluatul pentru absorbția ultraviolete la aproximativ 260 și aproximativ 280. Deși mai puțin optim pentru rAAV9hu68, pH-ul poate fi în intervalul de aproximativ 10,0 până la 10,4. În această metodă, capsidurile complete de AAVhu68 sunt colectate dintr-o fracție care este eluată atunci când raportul A260/A280 atinge un punct de inflexiune. Într-un exemplu, pentru etapa de Cromatografie de Afinitate, produsul diafiltrat poate fi aplicat unei rășini de afinitate Poros-AAV2/9 Capture Select™ (Life Technologies) care captează eficient serotipul AAV2/hu68. În aceste condiții ionice, un procent semnificativ de ADN celular rezidual și de proteine reziduale curge prin coloană, în timp ce particulele de AAV sunt capturate în mod eficient.

III. Compoziții și utilizări

Asigurate aici sunt compoziții care cuprind o populație mixtă de virus adeno-asociat recombinant hu68 (rAAVhu68), în care fiecare dintre rAAVhu68 este selectat în mod independent dintre un rAAV, așa cum a fost definit aici și un agent transportor, excipient și/sau agent de conservare opțional. Un stoc de rAAV se referă la o multitudine de vectori rAAV care sunt aceiași, de exemplu, cum ar fi în cantitățile descrise mai jos în discuția despre concentrații și unități de dozare.

Așa cum a fost utilizat aici, "agent transportor" include oricare și toți solvenții, mediile de dispersie, agenții purtători, agenții de acoperire, diluanții, agenții antibacterieni și antifungici, agenții izotonici și de întârziere a absorbției, tamponurile, soluțiile agent transportor, suspensiile, coloizii și altele asemenea. Utilizarea unor astfel de medii și agenți pentru substanțe active farmaceutice este bine cunoscută în domeniu. Ingrediente active suplimentare pot fi, de asemenea, încorporate în compoziții. Expresia "acceptabile din punct de vedere farmaceutic" se referă la entități și compoziții moleculare care nu produc o reacție alergică sau nefavorabilă asemănătoare atunci când sunt administrate unei gazde. Agenți purtători de livrare, cum ar fi lipozomi, nanocapsule, microparticule, microsferă, particule lipidice, vezicule și altele asemenea, pot fi utilizate pentru introducerea compozițiilor conform prezentei invenții în celulele gazdă corespunzătoare. În special, vectorul de rAAV livrat genomurilor de vector poate fi formulat pentru livrare fie încapsulat într-o particulă de lipidă, un lipozom, o veziculă, o nanosferă sau o nanoparticulă sau altele asemenea.

O compoziție poate include o formulare finală corespunzătoare pentru livrare la un subiect, de exemplu, este o suspensie lichidă apoasă tamponată la un pH și o concentrație de sare compatibile din punct de vedere fiziologic. În mod opțional, unul sau mai mulți agenți tensioactivi sunt prezenți în formulare. Compoziția poate fi transportată ca un concentrat care este diluat pentru administrare la un subiect. Compoziția poate fi liofilizată și reconstituită la momentul de timp al administrării.

Un agent tensioactiv corespunzător sau o combinație de agenți tensioactivi, poate fi selectată dintre agenții tensioactivi non-ionici care sunt non-toxici. Un agent tensioactiv de copolimer bloc difuncțional care se termină în grupări hidroxil primare poate fi selectat, de exemplu, cum ar fi Pluronic® F68 [BASF], de asemenea cunoscut ca Poloxamer 188, care are un pH neutru, are o greutate moleculară medie de 8400. Alți agenți tensioactivi și alți Poloxameri pot fi selectați, adică co-polimeri tribloc non-ionici compuși dintr-un lanț hidrofoab central de polioxipropilenă (oxid de polipropilenă)) flancat de două lanțuri hidrofile de polioxietilenă (poli(etilen oxid)), Solutol HS 15 (Macrogol-15 Hidroxistearat), LABRASOL (gliceridă polioxi caprilică), polioxi 10 oleil eter, TWEEN (esteri ai acidului gras de polioxietilen sorbitan), etanol și polietilen glicol. Formularea poate conține un poloxamer. Acești copolimeri sunt denumiți în mod obișnuit cu litera „P” (pentru poloxamer) urmată de trei cifre: primele două cifre × 100 asigură masa moleculară aproximativă a nucleului de polioxipropilenă și ultima cifră × 10 asigură procentul de conținut de polioxietilenă. Într-o realizare Poloxamer 188 este selectat. Agentul tensioactiv poate fi prezent într-o cantitate de până la aproximativ 0,0005 % până la aproximativ 0,001 % din suspensie.

Vectorii sunt administrați în cantități suficiente pentru a transfecta celulele și pentru a asigura niveluri suficiente de transfer de gene și expresie pentru a asigura un beneficiu terapeutic fără efecte adverse nejustificate sau cu efecte fiziologice acceptabile din punct de vedere medical, care pot fi determinate de profesioniștii în domeniile medicale. Căile convenționale și acceptabile din punct de vedere farmaceutic de administrare includ, dar nu sunt limitate la, livrarea directă la un organ dorit (de exemplu, ficatul (în mod opțional prin intermediul arterei hepatice), plămânul, inima, ochiul, rinichiul), orală, inhalatorie, intranasală, intratecală, intratraheală, intraarterială, intraoculară, intravenoasă, intramusculară, subcutanată, intradermică și alte căi de administrare parentală. Căile de administrare pot fi combinate, dacă se dorește.

Dozele vectorului viral vor depinde în primul rând de factori, cum ar fi afecțiunea care este tratată, vârsta, greutatea și sănătatea pacientului și pot astfel varia între pacienți. De exemplu, o doză

umană eficientă din punct de vedere terapeutic din vectorul viral este în general în intervalul de la aproximativ 25 până la aproximativ 1000 microlitri până la aproximativ 100 ml de soluție care conține concentrații de la aproximativ 1×10^9 până la 1×10^{16} de vector de virus al genomurilor. Dozarea va fi ajustată pentru a echilibra beneficiul terapeutic față de orice efecte secundare și astfel de dozări pot varia în funcție de aplicația terapeutică pentru care vectorul recombinant este folosit. Nivelurile de expresie ale produsului de transgenă pot fi monitorizate pentru a determina frecvența dozării care rezultă în vectori virali, de preferat vectori de AAV care conțin minigena. În mod opțional, regimuri de dozare asemănătoare cu cele descrise în scopuri terapeutice pot fi utilizate pentru imunizare utilizând compozițiile conform invenției.

Compozițiile cu virus deficient de replicare pot fi formulate în unități de dozare pentru a conține o cantitate de virus deficient de replicare care este în intervalul de aproximativ $1,0 \times 10^9$ GC până la aproximativ $1,0 \times 10^{16}$ GC (pentru a trata un subiect mediu de 70 kg greutate corporală) incluzând toate numerele întregi sau cantitățile fracționale din cadrul intervalului și, de preferat, $1,0 \times 10^{12}$ GC până la $1,0 \times 10^{14}$ GC pentru un pacient uman. Compozițiile pot fi formulate pentru a conține cel puțin 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 sau 9×10^9 GC per doză incluzând toate cantitățile întregi sau cantitățile fracționale din cadrul intervalului. Compozițiile pot fi formulate pentru a conține cel puțin 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} sau 9×10^{10} GC per doză incluzând toate numerele întregi sau cantitățile fracționale din interval.

Compozițiile pot fi formulate pentru a conține cel puțin 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} sau 9×10^{11} GC per doză incluzând toate numerele întregi sau cantitățile fracționale din cadrul intervalului. Compozițiile pot fi formulate astfel încât să conțină cel puțin 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} sau 9×10^{12} GC per doză incluzând toate numerele întregi sau cantitățile fracționale din cadrul intervalului.

Compozițiile pot fi formulate pentru a conține cel puțin 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} sau 9×10^{13} GC per doză incluzând toate numerele întregi sau cantitățile fracționale din cadrul intervalului. Compozițiile pot fi formulate pentru a conține cel puțin 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} sau 9×10^{14} GC per doză incluzând toate numerele întregi sau cantitățile fracționale din cadrul intervalului. Compozițiile pot fi formulate pentru a conține cel puțin 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} sau 9×10^{15} GC per doză incluzând toate numerele întregi sau cantitățile fracționale din cadrul intervalului. Pentru aplicarea umană, doza poate varia de la 1×10^{10} până la aproximativ 1×10^{12} GC per doză incluzând toate numerele întregi sau cantitățile fracționale din cadrul intervalului.

Aceste doze de mai sus pot fi administrate într-o varietate de volume de agent transportor, excipient sau formulare tampon, variind de la aproximativ 25 până la aproximativ 1000 microlitri, sau volume mai mari, incluzând toate numerele din interval, în funcție de dimensiunea ariei care urmează să fie tratată, titrul viral utilizat, calea de administrare și efectul dorit al metodei.

Volumul agentului transportor, al excipientului sau al tamponului poate fi de cel puțin aproximativ 25 μ L. Volumul poate fi aproximativ 50 μ L. Volumul poate fi aproximativ 75 μ L. Volumul poate fi aproximativ 100 μ L. Volumul poate fi aproximativ 125 μ L. Volumul poate fi aproximativ 150 μ L.

Volumul poate fi aproximativ 175 μ L. Volumul poate fi aproximativ 200 μ L. Volumul poate fi aproximativ 225 μ L. Volumul poate fi aproximativ 250 μ L. Volumul poate fi aproximativ 275 μ L.

Volumul poate fi aproximativ 300 μ L. Volumul poate fi aproximativ 325 μ L. Volumul poate fi aproximativ 350 μ L.

Volumul poate fi aproximativ 375 μ L. Volumul poate fi aproximativ 400 μ L.

Volumul poate fi aproximativ 450 μ L. Volumul poate fi aproximativ 500 μ L. Volumul poate fi aproximativ 550 μ L.

Volumul poate fi aproximativ 600 μ L. Volumul poate fi aproximativ 650 μ L.

Volumul poate fi aproximativ 700 μ L. Volumul poate fi între aproximativ 700 și 1000 μ L.

Doza poate fi în intervalul de aproximativ 1×10^9 GC/g de masă cerebrală până la aproximativ 1×10^{12} GC/g de masă cerebrală. Doza poate fi în intervalul de aproximativ 3×10^{10} GC/g de masă cerebrală la aproximativ 3×10^{11} GC/g de masă cerebrală.

Doza poate fi în intervalul de aproximativ 5×10^{10} GC/g de masă cerebrală la aproximativ $1,85 \times 10^{11}$ GC/g de masă cerebrală.

Construcțiile virale pot fi livrate în doze de cel puțin aproximativ 1×10^9 GC-uri până la aproximativ 1×10^{15} , sau aproximativ 1×10^{11} până la 5×10^{13} GC. Volumele corespunzătoare pentru livrarea acestor doze și concentrații pot fi determinate de un profesionist în domeniu. De exemplu, volume de aproximativ 1 μ L până la 150 mL pot fi selectate, volume mai mari fiind selectate pentru adulți. De obicei, pentru sugarii nou-născuți un volum corespunzător este de aproximativ 0,5 mL până la

aproximativ 10 mL, pentru sugarii mai mari, aproximativ 0,5 mL până la aproximativ 15 mL pot fi selectate. Pentru copii mici, un volum de aproximativ 0,5 mL până la aproximativ 20 mL poate fi selectat. Pentru copii, volume de până la aproximativ 30 mL pot fi selectate. Pentru pre-adolescenți și adolescenți, volume de până la aproximativ 50 mL pot fi selectate. În încă alte realizări, un pacient care poate primi o

5 administrare intratecală într-un volum de aproximativ 5 mL până la aproximativ 15 mL este selectat sau aproximativ 7,5 mL până la aproximativ 10 mL. Alte volume și dozări corespunzătoare pot fi determinate. Doza va fi ajustată pentru a echilibra beneficiul terapeutic față de orice efecte secundare și astfel de dozări pot varia în funcție de aplicația terapeutică pentru care este folosit vectorul recombinant.

Vectorii recombinanți descriși mai sus pot fi livrați celulelor gazdă în conformitate cu metodelor

10 publicate. rAAV, de preferat suspendat într-un agent transportor compatibil din punct de vedere fiziologic, poate fi administrat unui pacient mamifer uman sau non-uman.

Pentru administrare la un pacient uman, rAAV este suspendat în mod corespunzător într-o soluție apoasă care conține soluție salină, un agent tensioactiv și o sare sau un amestec de săruri compatibile din punct de vedere fiziologic. În mod corespunzător, formularea este ajustată la un pH

15 acceptabil din punct de vedere fiziologic, de exemplu, în intervalul de pH 6 până la 9, sau pH 6,5 până la 7,5, pH 7,0 până la 7,7 sau pH 7,2 până la 7,8. Din moment ce pH-ul lichidului cefalorahidian este de aproximativ 7,28 până la aproximativ 7,32, pentru livrarea intratecală, un pH în cadrul acestui interval poate fi dorit; în timp ce pentru livrarea intravenoasă, un pH de aproximativ 6,8 până la aproximativ 7,2 poate fi dorit. Cu toate acestea, alte pH-uri în cadrul celor mai largi intervale și acestor subintervale pot fi

20 selectate pentru altă cale de livrare

Compoziția poate include un agent transportor, diluant, excipient și/sau adjuvant. Agenți transportori corespunzători pot fi selectați cu ușurință de către un profesionist în domeniu, având în vedere afecțiunea pentru care virusul de transfer este direcționat. De exemplu, un agent transportor corespunzător include soluție salină, care poate fi formulată cu o varietate de soluții de tamponare (de

25 exemplu, soluție salină tamponată cu fosfat). Alți agenți transportori exemplificativi includ soluție salină sterilă, lactoză, zaharoză, fosfat de calciu, gelatină, dextran, agar, pectină, ulei de arahide, ulei de susan și apă. Tamponul/agentul transportor trebuie să includă o componentă care previne rAAV să se lipească de tubul de perfuzie, dar care nu interferează cu activitatea de legare a rAAV *in vivo*. Un agent tensioactiv corespunzător sau o combinație de agenți tensioactivi poate fi selectată dintre agenții tensioactivi non-ionici care sunt non-toxici. Un agent tensioactiv de copolimer bloc difuncțional care se termină în grupări hidroxil primare poate fi selectat, de exemplu, cum ar fi Pluronic® F68 [BASF], de asemenea cunoscut ca Poloxamer 188, care are un pH neutru, are o greutate moleculară medie de 8400. Alți agenți tensioactivi și alți Poloxameri pot fi selectați adică, adică copolimeri tribloc non-ionici compuși dintr-un lanț hidrofob central de polioxipropilenă (oxid de polipropilenă) flancat de două lanțuri hidrofile de polioxietilenă (poli(oxid de etilenă)), SUTOL HS 15 (Macrogol-15 Hidroxistearat), LABRASOL (gliceridă polioxi-caprilică), eter de polioxi-oleil, TWEEN (esteri ai acidului gras de polioxietilen sorbitan), etanol și polietilen glicol. Formularea poate conține un poloxamer. Acești copolimeri sunt denumiți în mod

35 obișnuit cu litera „P” (pentru poloxamer) urmată de trei cifre: primele două cifre × 100 asigură masa moleculară aproximativă a nucleului de polioxipropilenă și ultima cifră × 10 asigură procentul de conținut de polioxietilenă. Într-o realizare Poloxamerul 188 este selectat. Agentul tensioactiv poate fi prezent într-o cantitate de până la aproximativ 0,0005% până la aproximativ 0,001 % din suspensie. Într-un exemplu, formularea poate conține, de exemplu, soluție salină tamponată care cuprind unul sau mai multe dintre clorură de sodiu, bicarbonat de sodiu, dextroză, sulfat de magneziu (de exemplu, sulfat de magneziu ·7H₂O), clorură de potasiu, clorură de calciu (de exemplu, clorură de calciu ·2H₂O), fosfat de sodiu dibazic și amestecuri ale acestora, în apă. În mod corespunzător, pentru livrarea intratecală, osmolaritatea este în cadrul unui interval compatibil cu lichidul cefalorahidian (de exemplu, aproximativ 275 până la aproximativ 290); vezi, de exemplu, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview. În mod

45 opțional, pentru administrarea intratecală, un diluant disponibil pe cale comercială poate fi utilizat ca un agent de suspendare sau în combinație cu un alt agent de suspendare și alți excipienți opționali. Vezi, de exemplu, soluția Elliotts B® [Lukare Medical]. Formularea poate conține unul sau mai mulți agenți de intensificare ai permeației. Exemple de agenți de intensificare ai permeației corespunzători pot include, de exemplu, manitol, glicocolat de sodiu, taurocolat de sodiu, deoxicolat de sodiu, salicilat de sodiu, caprilat de sodiu, caprat de sodiu, lauril sulfat de sodiu, polioxietilen-9-laurel eter sau EDTA.

În mod opțional, compozițiile conform invenției pot conține, în plus față de rAAV și agent

50 transportor (agenți transportori), alte ingrediente farmaceutice convenționale, cum ar fi agenți de conservare sau agenți de stabilizare chimici. Agenți de conservare exemplificativi corespunzători includ clorbutanol, sorbat de potasiu, acid sorbic, dioxid de sulf, galat de propil, parabenii, etil vanilină, glicerină, fenol și paraclorofenol. Agenți de stabilizare chimici corespunzători includ gelatină și albumină.

Compozițiile în conformitate cu prezenta invenție pot cuprinde un agent transportor acceptabil din punct de vedere farmaceutic, așa cum a fost definit mai sus. În mod corespunzător, compozițiile descrise aici cuprind o cantitate eficientă dintr-unul sau mai multe AAV-uri suspendate într-un agent transportor corespunzător din punct de vedere farmaceutic și/sau amestecate cu excipienți corespunzători proiectați pentru livrarea subiectului prin intermediul injectării, pompei osmotice, cateterului intratecal sau pentru livrare printr-un alt dispozitiv sau altă cale. Într-un exemplu, compoziția este formulată pentru livrare intratecală.

Așa cum au fost utilizați aici, termenii "livrare intratecală" sau "administrare intratecală" se referă la o cale de administrare a medicamentelor printr-o injectare în canalul spinal, mai specific în spațiul subarahnoidian, astfel încât acesta să ajungă în lichidul cefalorahidian (LCR). Livrarea intratecală poate include puncție lombară, intraventriculară (incluzând intracerebroventriculară (ICV)), suboccipitală/intracisternală și/sau puncție C1-2. De exemplu, materialul poate fi introdus pentru difuzie în spațiul subarahnoidian prin intermediul puncției lombare. Într-un alt exemplu, injectarea poate fi în cisterna magna.

Așa cum au fost utilizați aici, termenii „livrare intracisternală” sau „administrare intracisternală” se referă la o cale de administrare pentru medicamente în mod direct în lichidul cefalorahidian al cisternei magna cerebellomedularis, mai specific prin intermediul unei puncții suboccipitale sau prin injectare directă în cisterna magna sau prin intermediul tubului poziționat permanent.

IV. Aparat și Metodă pentru Livrarea unei Compoziții Farmaceutice în Lichidul Cefalorahidian

Vectorii asigurați aici pot fi administrați pe cale intratecală prin intermediul metodei și/sau dispozitivului asigurat în această secțiune și descris în continuare în FIG. 7. În mod alternativ, alte dispozitive și metode pot fi selectate. Metoda cuprinde etapele de avansare a unui ac spinal în cisterna magna a unui pacient, conectarea unei lungimi de tub flexibil la un pivot proximal al acului spinal și un orificiu de ieșire al unei valve la un capăt proximal al tubului flexibil și, după etapele menționate de avansare și conectare și după permiterea tubulaturii să fie auto-amorsată cu lichidul cefalorahidian al pacientului, conectarea unui prim vas care conține o cantitate de soluție izotonică la un orificiu de intrare de spălare al valvei și apoi conectarea unui al doilea vas care conține o cantitate de compoziție farmaceutică la un orificiu de intrare vector al valvei. După conectarea primului și a celui de-al doilea vas la valvă, o cale pentru curgerea fluidului este deschisă între orificiul de intrare vector și orificiul de ieșire al valvei și compoziția farmaceutică este injectată în pacient prin acul spinal și, după injectarea compoziției farmaceutice, o cale pentru curgerea fluidului este deschisă prin orificiul de intrare de spălare și orificiul de ieșire al valvei și soluția izotonică este injectată în acul spinal pentru a curge compoziția farmaceutică în pacient.

Un dispozitiv pentru administrarea intracisternală a unei compoziții farmaceutice este descris, dar nu este revendicat aici. Dispozitivul include un prim vas care conține o cantitate dintr-o compoziție farmaceutică, un al doilea vas care conține o soluție izotonică și un ac spinal prin care compoziția farmaceutică poate fi ejectată din dispozitiv în mod direct în lichidul cefalorahidian în cisterna magna a unui pacient. Dispozitivul include în plus o valvă care prezintă un prim orificiu de intrare interconectat la primul vas, un al doilea orificiu de intrare interconectat la al doilea vas, un orificiu de ieșire interconectat la acul spinal și un luer-lock pentru controlul fluxului compoziției farmaceutice și al soluției izotonice prin acul spinal.

Așa cum a fost utilizat aici, termenul tomografie computerizată (CT) se referă la radiografie în care o imagine tridimensională a unei structuri corporale este construită de computer dintr-o serie de imagini de secțiuni transversale plane realizate de-a lungul unei axe.

Aparatul sau dispozitivul medical 10 așa cum a fost prezentat în FIG. 7 include unul sau mai multe vase, 12 și 14, interconectate prin intermediul unei valve 16. Vasele, 12 și 14, asigură o sursă proaspătă dintr-o compoziție farmaceutică, medicament, vector sau substanță similară și o sursă proaspătă de soluție izotonică, cum ar fi soluție salină, respectiv. Vasele, 12 și 14, pot fi orice formă de dispozitiv medical care permite injectarea de fluide într-un pacient.

Pe calea exemplului, fiecare vas, 12 și 14, poate fi asigurat sub forma unei seringi, canule sau altele asemenea. De exemplu, în aparatul sau dispozitivul medical ilustrat, vasul 12 este asigurat ca o seringă separată care conține o cantitate dintr-o compoziție farmaceutică și la care s-a făcut referire aici ca "seringă cu vector". Doar în scopuri de exemplu, vasul 12 poate conține aproximativ 10cc dintr-o compoziție farmaceutică sau altele asemenea.

De asemenea, vasul 14 poate fi asigurat sub forma unei seringi, canule sau altele asemenea, separate, care conține o cantitate de soluție salină și la care se poate face referire ca "seringă de spălare". Doar în scopuri de exemplu, vasul 14 poate conține aproximativ 10cc de soluție salină.

Ca o alternativă, vasele 12 și 14 pot fi asigurate în alte forme decât seringile și pot fi integrate într-un singur dispozitiv, cum ar fi un dispozitiv medical integrat de injectare, care prezintă o pereche de

camere separate, una pentru compoziția farmaceutică și una pentru soluția salină. De asemenea, dimensiunea camerelor sau a vaselor poate fi asigurată după cum este necesar, pentru a conține o cantitate dorită de fluid.

În aparatul sau dispozitivul medical ilustrat, valva 16 este asigurată ca un robinet cu 4 căi care prezintă un luer lock cu conector pivotant 18. Valva 16 interconectează vasele 12 și 14 (adică, seringă cu vector și seringă de spălare în aparatul sau dispozitivul medical ilustrat), și luer lock cu conector pivotant permite ca o cale prin valva 16 să fie închisă sau deschisă către fiecare dintre vasele 12 și 14. În acest fel, calea prin valva 16 poate fi închisă atât pentru seringă cu vector, cât și pentru seringă de spălare sau poate fi deschisă către una selectată dintre seringă cu vector și seringă de spălare. Ca o alternativă la un robinet cu 4 căi, valva poate fi un robinet cu 3 căi sau un dispozitiv de control al fluidului.

În aparatul sau dispozitivul medical ilustrat, valva 16 este conectată la un capăt al unei lungimi de tub de extensie 20 sau al unei conducte asemănătoare pentru fluid. Tubul 20 poate fi selectat pe baza lungimii dorite sau a volumului intern. Doar pe calea exemplului, tubul poate fi de aproximativ 6 până la 7 inci în lungime.

În aparatul sau dispozitivul medical ilustrat, un capăt opus 22 al tubulaturii 12 este conectat la un set de extensie de conector T 24 care, la rândul său, este conectat la un ac spinal 26. Pe calea exemplului, acul 26 poate fi un ac spinal de cinci inci, calibrul 22 sau 25. În plus, ca o opțiune, acul spinal 26 poate fi conectat la un ac introductor 28, cum ar fi un ac introductor de trei inci și jumătate, calibrul 18.

În timpul utilizării, acul spinal 26 și/sau acul introductor opțional 28 pot fi avansate într-un pacient către cisterna magna. După avansarea acului, imagini de Tomografie Computerizată (CT) pot fi obținute, care permit vizualizarea acului 26 și/sau 28 și a țesuturilor moi relevante (de exemplu, mușchii paraspinali, osul, trunchiul cerebral și măduva spinării). Plasarea corectă a acului este confirmată prin observarea Lichidului Cefalorahidian (LCR) în pivotul acului și vizualizarea unui vârf de ac în cisterna magna. Apoi, tubul de extensie relativ scurt 20 poate fi atașat la acul spinal introdus 26, și robinetul de oprire cu 4 căi 16 poate fi apoi atașat la capătul opus al tubului 20.

Ansamblului de mai sus i se permite să devină „auto-amorsat” cu LCR al pacientului. Apoi, seringă de spălare cu soluție salină normală pre-umplută 14 este atașată la un orificiu de intrare de spălare al robinetului cu 4 căi 16 și apoi seringă cu vector 12 care conține o compoziție farmaceutică este atașată la un orificiu de intrare cu vector al robinetului cu 4 căi 16. După aceea, orificiul de ieșire al robinetului de oprire 16 este deschis către seringă cu vector 12, și conținutul seringii cu vector poate fi injectat lent prin valva 16 și aparatul asamblat și în pacient pe o perioadă de timp. Doar în scopuri de exemplu, această perioadă de timp poate fi aproximativ 1-2 minute și/sau orice alt timp dorit.

După ce conținutul seringii cu vector 12 este injectat, dispozitivul de blocare pivotant 18 de pe robinetul 16 este rotit într-o a doua poziție, astfel încât robinetul 16 și ansamblul de ac să poată fi spălate cu o cantitate dorită de soluție salină normală utilizând seringă de spălare pre-umplută atașată 14. Doar pe calea exemplului, 1 până la 2 cc de soluție salină normală pot fi utilizați; deși cantități mai mari sau mai mici pot fi utilizate, după cum este necesar. Soluția salină normală asigură că toată sau cea mai mare parte a compoziției farmaceutice este forțată să fie injectată prin dispozitivul asamblat și în pacient și astfel încât puțin sau deloc din compoziția farmaceutică să rămână în dispozitivul asamblat.

După ce dispozitivul asamblat a fost spălat cu soluție salină, dispozitivul asamblat în întregime, inclusiv acul (acele), tubul de extensie, robinetul și seringile sunt îndepărtate lent din subiect și plasate pe o tavă chirurgicală pentru a fi aruncată într-un recipient de deșuri cu risc biologic recipient sau într-un recipient dur (pentru ac (ace)).

Un proces de selectare poate fi realizat de un investigator principal care poate duce în cele din urmă la o procedură intracisternală (IC). Investigatorul principal poate descrie procesul, procedura, procedura de administrare în sine și toate riscurile potențiale de siguranță pentru ca subiectul (sau îngrijitorul desemnat) să fie pe deplin informat. Istoricul medical, medicamentele concomitente, examenul fizic, semnele vitale, electrocardiograma (ECG) și rezultatele testelor de laborator sunt obținute sau efectuate și asigurate unui neuroradiolog, neurochirurg și anestezist pentru utilizare în evaluarea de selectare a eligibilității subiectului pentru procedura IC.

Pentru a permite un timp corespunzător pentru a revizui eligibilitatea, următoarele proceduri pot fi efectuate în orice moment între prima vizită de selectare și până la o săptămână înainte de o vizită de studiu. De exemplu, în „Ziua 0”, Imagistica prin Rezonanță Magnetică Cap/Gât (RMN) cu și fără gadoliniu (adică, eGFR > 30 mL/min/1,73 m²) poate fi obținută. Pe lângă RMN-ul de Cap/Gât, investigatorul poate determina nevoia oricărei evaluări suplimentare a gâtului prin intermediul studiilor de flexie/extensie. Protocolul RMN poate include imagini de protocol T1, T2, DTI, FLAIR și CINE.

În plus, MRA/MRV Cap/Gât poate fi obținut conform protocolului instituțional (adică, subiecții cu o istorie de operații intra/transdurale pot fi excluși sau pot avea nevoie de teste suplimentare (de

exemplu, cisternografia cu radionucleotide)) care permite evaluarea corespunzătoare a fluxului de LCR și identificarea posibilelor blocaje sau a lipsei de comunicare între spațiile LCR.

În cele din urmă, neuroradiologul, neurochirurgul și anestezistul discută și determină eligibilitatea fiecărui subiect pentru procedurile IC pe baza tuturor informațiilor disponibile (scanări, istoric medical, examen fizic, laboratoare etc.). O evaluare pre-operatorie a anesteziei poate fi, de asemenea, obținută de la „Ziua -28” până la „Ziua 1”, care asigură o evaluare detaliată a căilor respiratorii, gâtului (scurtat/îngroșat) și a intervalului de mișcare a capului (gradul de flexie a gâtului), având în vedere nevoile fiziologice speciale ale unui subiect MPS.

Înainte de o procedură IC, CT Suite va confirma că următoarele echipamente și medicamente sunt prezente: Kit de puncție lombară (LP) pentru adulți (asigurat pe instituție); BD (Becton Dickinson) calibru 22 sau 25 × 3 - 7" ac spinal (Quincke bevel); ac introductor coaxial, utilizat la discreția intervenționistului (pentru introducerea acului spinal); robinet cu diametru mic cu 4 căi cu luer lock pivotant (Spin); set de extensie pentru conector T (tub) cu adaptor luer lock priză-priză, lungime aproximativă de 6,7 inci; Omnipaque 180 (iohexol), pentru administrare intratecală; contrast iodat pentru administrare intravenoasă (IV); soluție de lidocaină 1% pentru injectare (dacă nu este asigurată în kitul LP pentru adulți); Seringă de spălare cu soluție salină normală (sterilă) de 10cc pre-umplută; Marker (markeri) Radiopaque; Echipament de pregătire chirurgicală/aparat de ras; Perne/suporturi pentru a permite poziționarea corectă a subiectului intubat; Echipament de intubare endotraheală, aparat de anestezie generală și ventilator mecanic; echipament de monitorizare neurofiziologică intra-operatorie (IONM) (și personalul necesar); și seringă de 10 cc care conține vector, pregătite și transportate la CT/sala de operație (OR) în conformitate cu Manualul separat de Farmacie.

Consimțământul informat pentru procedură este confirmat și documentat în fișa medicală și/sau în dosarul de studiu. Consimțământul separat pentru procedură din partea personalului de radiologie și anestezie este obținut conform cerințelor instituționale. Subiectul are acces intravenos plasat în unitatea de îngrijire spitalicească corespunzătoare, în conformitate cu ghidurile instituționale (de exemplu, două locuri de acces IV). Lichidele intravenoase sunt administrate la discreția medicului anestezist. La discreția medicului anestezist și în conformitate cu ghidurile instituționale, subiectul poate fi indus și poate fi supus intubării endotraheale cu administrarea anesteziei generale într-o unitate de îngrijire a pacientului corespunzătoare, într-o zonă de deținere sau într-un locație de proceduri chirurgicale/CT.

O puncție lombară este realizată, mai întâi pentru a îndepărta 5 cc de lichid cefalorahidian (LCR) și ulterior pentru a injecta contrast (Omnipaque 180) pe cale intratecală pentru a ajuta la vizualizarea cisterna magna. Manevre corespunzătoare de poziționare a subiectului pot fi efectuate pentru a facilita difuzarea contrastului în cisterna magna.

Echipamentul de monitorizare neurofiziologică intra-operatorie (IONM) este atașat subiectului. Subiectul este așezat pe masa cu scanner CT în poziția decubit ventral sau lateral. Personalul corespunzător trebuie să fie prezent pentru a asigura siguranța subiectului în timpul transportului și poziționării. Dacă se consideră corespunzător, subiectul poate fi poziționat într-un mod care să ofere flexie a gâtului la gradul determinat a fi sigur în timpul evaluării pre-operatorii și cu semnalele normale ale monitorului neurofiziologic documentate după poziționare.

Următorul personal poate fi confirmat a fi prezent și identificat la fața locului: intervenționist/neurochirurg care efectuează procedura; Anestezist și tehnician respirator (tehnicieni respiratori); Infirmerie și asistenți medicali; tehnicieni CT (sau OR); Tehnician de neurofiziologie; și Medicul Coordonator. O „pauză” poate fi efectuată în conformitate cu protocolul Comisiei Mixte/al Spitalului pentru a verifica subiectul corect, procedura, locul, poziționarea și prezența tuturor echipamentelor necesare în cameră. Investigatorul principal al locului poate confirma apoi cu personalul că el/ea poate continua cu pregătirea subiectului.

Pielea subiectului de sub baza craniului este rasă, după cum este necesar. Imagini CT scout sunt realizate, urmate de o planificare CT de pre-procedură cu contrast IV, dacă sunt considerate necesare de intervenționist pentru a localiza locația țintă și pentru a supune imagisticii vascularizația. După ce zona țintă (cisterna magna) este identificată și traiectoria acului este planificată, pielea este pregătită și drapată utilizând o tehnică sterilă, în conformitate cu ghidurile instituționale. Un marker radio-opac este plasat pe locația țintă a pielii, așa cum a fost indicat de intervenționist. Pielea de sub marker este anesteziată prin intermediul infiltrării cu lidocaină 1%. Un ac spinal de 22G sau 25G este apoi avansat spre cisterna magna, cu opțiunea de a utiliza un ac introductor coaxial.

După avansarea acului, imaginile CT sunt obținute utilizând cea mai subțire posibilă grosime a lamelei CT utilizând echipament instituțional (în mod ideal ≤ 2,5 mm). Imagini CT în serie care utilizează cea mai mică doză de radiație posibilă care permite vizualizarea corespunzătoare a acului și a țesuturilor moi relevante (de exemplu, mușchii paraspinali, osul, trunchiul cerebral și măduva spinării) sunt obținute.

Amplasarea corectă a acului este confirmată prin observarea LCR în pivotul acului și vizualizarea vârfului acului în cisterna magna.

Intervenționistul confirmă faptul că seringă cu vector este poziționată aproape de, dar în afara câmpului steril. Înainte de manipularea sau administrarea compoziției farmaceutice în seringă cu vector, mănuși, mască și protecție pentru ochi sunt donate de către personalul care asistă procedura în câmpul steril.

Tubul de extensie este atașat la acul spinal introdus, care este apoi atașat la robinetul cu 4 căi. Odată ce acest aparat este "auto-amorsat" cu LCR al subiectului, seringă de spălare cu soluție salină normală pre-umplută de 10 cc este atașată la un orificiu de intrare de spălare al robinetului cu 4 căi. Seringă cu vector este apoi asigurată intervenționistului și atașată la un orificiu de intrare cu vector de pe robinetul cu 4 căi.

După ce orificiul de evacuare al robinetului este deschis la seringă cu vector prin plasarea opritorului pivotant al robinetului într-o primă poziție, conținutul seringii cu vector este injectat lent (în aproximativ 1-2 minute), având grijă să nu se aplice forță excesivă asupra pistonului seringii în timpul injectării. După ce conținutul seringii cu vector este injectat, opritorul pivotant al robinetului este rotit într-o a doua poziție, astfel încât ansamblul robinet și ac să poată fi spălat cu 1-2 cc de soluție salină normală utilizând seringă de spălare pre-umplută atașată.

Atunci când este gata, intervenționistul alertează apoi personalul că el/ea va îndepărta aparatul din subiect. Într-o singură mișcare, acul, tubul de prelungire, robinetul și seringile sunt îndepărtate lent din subiect și plasate pe o tavă chirurgicală pentru a fi aruncate într-un recipient pentru deșeuri cu risc biologic sau într-un recipient dur (pentru ac).

Zona de inserare a acului este examinată pentru semne de sângerare sau scurgere de LCR și tratată așa cum a fost indicat de către investigator. Zona este îmbrăcată folosind tifon, bandă chirurgicală și/sau pansament Tegaderm, așa cum a fost indicat. Subiectul este apoi îndepărtat din scannerul CT și plasat în decubit dorsal pe o targă. Personalul adecvat este prezent pentru a asigura siguranța subiectului în timpul transportului și poziționării.

Anestezia este întreruptă și subiectul este îngrijit urmând ghidurile instituționale pentru îngrijire post-anestezie. Monitoare neurofiziologice sunt îndepărtate de la subiect. Capul țării pe care se află subiectul trebuie să fie ușor ridicat (~30 de grade) în timpul recuperării. Subiectul este transportat la o unitate de îngrijire post-anestezie corespunzătoare, în conformitate cu ghidurile instituționale. După ce subiectul și-a recuperat în mod corespunzător cunoștința și este în stare stabilă, el/ea va fi admis la etajul/unitatea corespunzătoare pentru evaluări obligatorii de protocol. Evaluările neurologice vor fi urmate în conformitate cu protocolul, și Investigatorul primar supraveghează îngrijirea subiectului în colaborare cu personalul de spital și de cercetare. O metodă pentru livrarea unei compoziții descrisă, dar nerevendicată aici, poate cuprinde etapele de: avansarea unui ac spinal în cisterna magna a unui pacient; conectarea unei lungimi de tub flexibil la un pivot proximal al acului spinal și la un orificiu de ieșire al unei valve la un capăt proximal al tubului flexibil; după etapele menționate de avansare și conectare și după permiterea tubului să fie auto-amorsat cu lichidul cefalorahidian al pacientului, conectarea unui prim vas care conține o cantitate de soluție izotonică la un orificiu de intrare de spălare al valvei și apoi conectarea unui al doilea vas care conține o cantitate de o compoziție farmaceutică la un orificiu de intrare cu vector al valvei; după conectarea primului și celui de-al doilea vas menționat la valvă, deschiderea unei căi pentru curgerea fluidului între orificiul de intrare cu vector și orificiul de evacuare al valvei și injectarea compoziției farmaceutice în pacient prin acul spinal; și după injectarea compoziției farmaceutice, deschiderea unei căi pentru curgerea fluidului prin orificiul de intrare de spălare și orificiul de ieșire al valvei și injectarea soluției izotonice în acul spinal pentru a curge compoziția farmaceutică în pacient.

Metoda poate cuprinde suplimentar confirmarea plasării corespunzătoare a unui vârf distal al acului spinal în interiorul cisternei magna înainte de conectarea tubului și valvei la pivotul acului spinal. Etapa de confirmare poate include vizualizarea vârfului distal al acului spinal în interiorul cisternei magna cu imagistică de Tomografie Computerizată (CT). Etapa de confirmare poate include observarea prezenței lichidului cefalorahidian al pacientului în pivotul acului spinal.

În metoda descrisă mai sus, valva poate fi un robinet cu un opritor pivotant adaptat să pivezeze într-o primă poziție care permite fluxul din orificiul de intrare cu vector la orificiul de ieșire, blocând simultan fluxul prin orificiul de intrare de spălare și într-o a doua poziție care permite fluxul din orificiul de intrare de spălare la orificiul de evacuare, în timp ce are loc blocarea simultană a fluxului prin orificiul de intrare cu vector și în care opritorul pivotant este poziționat în prima poziție menționată atunci când compoziția farmaceutică este injectată pacientului și este poziționată în a doua poziție atunci când compoziția farmaceutică menționată este introdusă în pacientul menționat prin soluția izotonică. După injectarea soluției izotonice în acul apinal pentru a introduce compoziția farmaceutică în pacient, acul

spinal poate fi retras din pacient cu tubul, valva și primul și al doilea vas conectate la acestea ca un ansamblu. Valva poate fi un robinet cu 4 căi cu un opritor pivotant. Primul și al doilea vas pot fi seringi separate. Un conector T poate fi amplasat la pivotul acului spinal și interconectează tubul la acul spinal. În mod opțional, acul spinal poate include un ac introductor la capătul distal al acului spinal. Acul spinal

5 poate fi un ac spinal de 5 inci, de calibrul 22 sau 24. Acul de introductor poate fi un ac de introductor de 3,5 inci, calibrul 18.

Metoda poate utiliza un dispozitiv care este compus, la un minim, dintr-un prim vas pentru a conține o cantitate dintr-o compoziție farmaceutică; un al doilea vas pentru a conține o soluție izotonică; un ac spinal prin care compoziția farmaceutică poate fi ejectată din dispozitiv în mod direct în lichidul cefalorahidian în cisterna magna a unui pacient; și o valvă care prezintă un prim orificiu de intrare interconectat la primul vas, un al doilea orificiu de intrare interconectat la al doilea vas, un orificiu de evacuare interconectat la acul spinal și un opritor pentru controlul fluxului compoziției farmaceutice și al soluției izotonice prin acul spinal. Valva poate fi un robinet cu un opritor pivotant adaptat să pivezeze într-o primă poziție care permite fluxul din primul orificiu de intrare la orificiul de ieșire, blocând simultan fluxul prin cel de-al doilea orificiu de intrare și într-o a doua poziție care permite fluxul din al doilea orificiu de intrare la orificiul de ieșire blocând simultan fluxul prin primul orificiu de intrare. În mod opțional, valva este un robinet cu 4 căi cu un opritor pivotant. Primul și al doilea vas pot fi seringi separate. Acul spinal poate fi interconectat la supapă printr-o lungime a tubului flexibil. Un conector T poate interconecta tubul la acul spinal. În anumite realizări, acul spinal este un ac spinal de 5 inci, calibrul 22 sau 24. Dispozitivul poate cuprinde suplimentar un ac introductor conectat la un capăt distal al acului spinal. În mod opțional, acul introductor este un ac introductor de 3,5 inci, calibrul 18.

10
15
20

Această metodă și acest dispozitiv pot fi utilizate în mod opțional fiecare pentru livrarea intratecală a compozițiilor asigurate aici. În mod alternativ, alte metode și dispozitive pot fi utilizate pentru o astfel de livrare intratecală.

O compoziție poate cuprinde anticorpii rAAVhu68.anti-HER2 astfel încât vectorii de AAV să poarte casetele de expresie a acidului nucleic care codifică construcțiile de imunoglobulină și secvențele reglatoare care direcționează expresia imunoglobulinei acestora în celula selectată. După administrarea vectorilor în SNC, vectorii livrează casetele de expresie la SNC și exprimă construcțiile preteice de imunoglobulină *in vivo*. Utilizarea compozițiilor descrise aici într-o metodă anti-neoplazică este descrisă, precum și utilizările acestor compoziții în regimuri anti-neoplazice, care pot implica în mod opțional livrarea unuia sau mai multor alți agenți anti-neoplazici sau alți agenți activi.

25
30

O compoziție poate conține un singur tip de vector de AAVhu68, așa cum a fost descris aici, care conține caseta de expresie pentru livrarea construcției anti-neoplazice de imunoglobulină *in vivo*. În mod alternativ, o compoziție poate conține doi sau mai mulți vectori de AAV diferiți, fiecare dintre care are împachetate casete de expresie diferite. De exemplu, cele două sau mai multe AAV-uri diferite pot avea casete de expresie diferite care exprimă polipeptide de imunoglobulină care se assemblează *in vivo* pentru a forma o singură construcție de imunoglobulină funcțională. Într-un alt exemplu, cele două sau mai multe AAV-uri pot avea casete de expresie diferite care exprimă polipeptide de imunoglobulină pentru ținte diferite, de exemplu, două asigură două construcții de imunoglobulină funcțională (de exemplu, o construcție de imunoglobulină anti-Her2 și o a doua construcție anti-neoplazică de imunoglobulină). Într-o altă alternativă suplimentară, cele două sau mai multe AAV-uri diferite pot exprima construcții de imunoglobulină direcționate către aceeași țintă, în care una dintre construcțiile de imunoglobulină a fost modificată pentru a elimina legarea FcRn și o a doua construcție de imunoglobulină care își păstrează capacitatea sau are capacitatea îmbunătățită de a se lega la FcRn. O astfel de compoziție poate fi utilă pentru a asigura în mod simultan anticorpi cu retenție crescută în zona creierului și anticorpi pentru livrarea sistemică a construcției de imunoglobulină.

35
40
45

În mod opțional, una sau ambele dintre aceste construcții de imunoglobulină descrise aici au activitate ADCC îmbunătățită. Un regim așa cum a fost descris aici poate cuprinde, în plus față de una sau mai multe dintre combinațiile descrise aici, o combinație suplimentară cu unul sau mai multe dintre un medicament biologic anti-neoplazic, un medicament anti-neoplazic cu moleculă mică, un agent chimioterapeutic, agenți de intensificare imunitari, radiații, intervenție chirurgicală și altele asemenea. Un medicament biologic așa cum a fost descris aici, se bazează pe o peptidă, polipeptidă, proteină, enzimă, moleculă de acid nucleic, vector (incluzând vectori virali) sau altele asemenea.

50

În mod corespunzător, compozițiile descrise aici cuprind o cantitate eficientă anti-neoplazică dintr-un sau mai multe AAVhu68 suspendate într-un agent transportor corespunzător din punct de vedere farmaceutic proiectat pentru livrare la subiect prin intermediul injectării, pompei osmotice, cateterului intratecal sau pentru livrare printr-un alt dispozitiv sau o altă cale. Într-un exemplu, compoziția este formulată pentru livrare intratecală. Așa cum a fost utilizat aici, livrarea intratecală cuprinde o injectare în canalul spinal, mai specific în spațiul subarahnoidian. Cu toate acestea, alte căi de livrare pot fi selectate

55

și agenți transportori acceptabili din punct de vedere farmaceutic pentru compozițiile de AAV incluzând, de exemplu, livrarea lichidului cefalorahidian, intranasal, intracisternal, intracerebrospinal, printre alte căi corespunzătoare directe sau sistemice, adică, rezervorul Ommaya.

Compozițiile pot fi formulate în unități de dozare pentru a conține o cantitate de AAV care este în intervalul de aproximativ 1×10^9 copii de genomului (GC) până la aproximativ 5×10^{13} GC (pentru a trata un subiect mediu de 70 kg greutate corporală). Un racord spinal poate fi efectuat, în care de la aproximativ 15 mL (sau mai puțin) până la aproximativ 40 mL CSF sunt îndepărtați și în care vectorul este amestecat cu CSF și/sau suspendat într-un agent transportor compatibil și livrat subiectului. Într-un exemplu, concentrația vectorului este de aproximativ 3×10^{13} GC, dar alte cantități, cum ar fi aproximativ 1×10^9 GC, aproximativ 5×10^9 GC, aproximativ 1×10^{10} GC, aproximativ 5×10^{10} GC, aproximativ 1×10^{11} GC, aproximativ 5×10^{11} GC, aproximativ 1×10^{12} GC, aproximativ 5×10^{12} GC sau aproximativ $1,0 \times 10^{13}$ GC.

Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru întârzierea creșterii unei tumori. Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru scăderea dimensiunii tumorii la un subiect. Compozițiile descrise aici pot fi utile în reducerea numărului de celule canceroase într-un cancer tumoral non-solid. O compoziție așa cum a fost asigurată aici poate fi utilă pentru creșterea supraviețuirii generale și/sau a supraviețuirii fără progresie la un pacient. Construcțiile anti-neoplazice de imunoglobulină pot fi selectate în vederea neoplasmului care urmează să fie tratat. De exemplu, pentru tratamentul unui cancer de sân metastatic în creier, se poate structura pe calea ingineriei o casetă de expresie pentru un anticorp anti-HER într-un AAV recombinant, așa cum a fost descris aici. În mod opțional, compozițiile de AAV așa cum au fost descrise aici pot fi administrate în absența unui agent farmacologic sau chimic extrinsec suplimentar sau a unei alte perturbări fizice a barierei hematoencefalice. Într-o terapie combinată, construcția de imunoglobulină livrată de AAV descrisă aici poate fi administrată înainte, în timpul sau după începerea terapiei cu alt agent, precum și orice combinație a acestora, adică, înainte și în timpul, înainte și după, în timpul și după, sau înainte, în timpul și după începerea terapiei anti-neoplazice. De exemplu, AAV-ul poate fi administrat între 1 și 30 de zile, de preferat, 3 și 20 de zile, mai de preferat între 5 și 12 zile înainte de începerea radioterapiei. Chimioterapia poate fi administrată concomitent cu sau, mai de preferat, ulterior terapiei cu imunoglobulină (anticorp) mediată de AAV. Compozițiile conform invenției pot fi combinate cu alte substanțe biologice, de exemplu, medicamente cu anticorpi monoclonali recombinanți, conjugați anticorp-medicament sau altele asemenea. În plus, combinații de diferite construcții de imunoglobulină livrate de AAV așa cum sunt discutate mai sus pot fi utilizate în astfel de regimuri. Orice metodă sau cale corespunzătoare poate fi utilizată pentru a administra o compoziție care conține AAVhu68.anti-Her2, așa cum a fost descris aici, și în mod opțional, pentru a co-administra agenți anti-neoplazici și/sau antagoniști ai altor receptori. Regimurile de agent anti-neoplazic utilizate includ orice regim considerat a fi corespunzător optim pentru tratamentul afecțiunii neoplazice a pacientului. Diferite afecțiuni maligne pot necesita utilizarea de anticorpi antitumorali specifici și de agenți anti-neoplazici specifici, care vor fi determinate de la pacient la pacient. Căile de administrare includ, de exemplu, administrare sistemică, orală, intravenoasă, intraperitoneală, subcutanată sau intramusculară. Doza de antagonist administrată depinde de numeroși factori, incluzând, de exemplu, tipul de antagoniști, tipul și severitatea tumorii care este tratată și calea de administrare a antagoniștilor.

Este de semnalat faptul că termenul "un" sau "o" se referă la unul sau mai multe. Ca atare, termenii "un" (sau "o"), "unul sau mai mulți" și "cel puțin unul" sunt utilizați aici în mod interschimbabil.

Cuvintele „cuprinde”, „cuprind” și „care cuprinde” trebuie interpretate mai degrabă inclusiv, decât exclusiv. Cuvintele „constă”, „care constă” și variantele lor trebuie interpretate mai degrabă exclusiv, decât inclusiv. În timp ce diverse realizări din specificație sunt prezentate utilizând limbajul „care cuprinde”, în alte circumstanțe, o realizare înrudită este de asemenea intenționată a fi interpretată și descrisă utilizând limbajul „care constă din” sau „care constă în mod esențial din”.

Așa cum a fost utilizat aici, termenul "aproximativ" înseamnă o variabilitate de 10% ($\pm 10\%$) față de referința dată, cu excepția cazului în care nu a fost specificat altfel.

Așa cum au fost utilizate aici, „boală”, „tulburare” și „afecțiune” sunt folosite în mod interschimbabil, pentru a indica o stare anormală la un subiect.

Cu excepția cazului în care au fost definiți altfel în această specificație, termenii tehnici și științifici folosiți aici prezintă aceeași semnificație, așa cum este înțeleasă în mod obișnuit de către un profesionist în domeniu și prin referire la textele publicate, care asigură unui profesionist în domeniu un ghid general pentru mulți dintre termenii utilizați în prezenta cerere.

Termenul "expresie" este utilizat aici în sensul său cel mai larg și cuprinde producerea de ARN sau de ARN și proteine. În ceea ce privește ARN, termenul "expresie" sau "translație" se referă în special la producerea de peptide sau proteine. Expresia poate fi tranzitorie sau poate fi stabilă.

Așa cum a fost utilizat aici, termenul "titru de NAb" este o măsurătoare a cât de mult anticorp de neutralizare (de exemplu, Nab anti-AAV) este produs, care neutralizează efectul fiziologic al epitopului său țintit (de exemplu, un AAV). Titrurile de Nab anti-AAV pot fi măsurate așa cum a fost descris în, de exemplu, Calcedo, R, și colab, Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. 199(3): p. 381-390.

Așa cum a fost utilizată aici, o "casetă de expresie" se referă la o moleculă de acid nucleic care cuprinde o secvență de codificare, un promotor și poate include alte secvențe reglatoare pentru aceasta. Un genom de vector poate conține două sau mai multe casete de expresie. Termenul "transgenă" poate fi utilizat în mod interschimbabil cu "casetă de expresie". De obicei, o astfel de casetă de expresie pentru generarea unui vector viral conține secvența de codificare pentru produsul genetic descris aici, flancată de semnale de împachetare ale genomului viral și alte secvențe de control al expresiei, cum ar fi cele descrise aici.

Abrevierea „sc” se referă la auto-complementare. "AAV auto-complementar" se referă la o construcție în care o regiune de codificare purtată de o secvență de acid nucleic de AAV recombinant a fost proiectată pentru a forma un model de ADN dublu catenar intramolecular. După infectare, mai degrabă decât să aștepte sinteza mediată de celulă a celei de-a doua catene, cele două jumătăți complementare ale scAAV se vor asocia pentru a forma o unitate de ADN dublu catenar (dsADN) care este gata pentru replicare și transcripție imediată. *Vezi, de exemplu*, DM McCarty și colab, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Numărul 16, Paginile 1248-1254. AAV-uri auto-complementare sunt descrise în, *de exemplu*, Brevetele SUA Nr. 6 596 535; 7 125 717; și 7 456 683.

Așa cum a fost utilizat aici, termenul "legat în mod funcțional" se referă atât la secvențe de control al expresiei care sunt învecinate cu gena de interes, cât și la secvențe de control al expresiei care acționează în trans sau la distanță pentru a controla gena de interes.

Termenul "heterolog" atunci când este utilizat cu referire la o proteină sau la un acid nucleic indică faptul că proteina sau acidul nucleic cuprinde două sau mai multe secvențe sau subsecvențe care nu se găsesc în aceeași relație una cu cealaltă în natură. De exemplu, acidul nucleic este produs în mod recombinant în mod tipic, având două sau mai multe secvențe din gene neînrudite aranjate pentru a realiza un nou acid nucleic funcțional. De exemplu, acidul nucleic poate avea un promotor dintr-o genă aranjată pentru a direcționa expresia unei secvențe de codificare dintr-o genă diferită. Astfel, cu referire la secvența de codificare, promotorul este heterolog.

Un „virus deficient de replicare” sau un „vector viral” se referă la o particulă virală sintetică sau artificială în care o casetă de expresie care conține o genă de interes este împachetată într-o capsidă virală sau într-o anvelopă, unde orice secvențe genomice virale sunt, de asemenea, împachetate în capsida sau anvelopă virală, sunt deficiente de replicare; *adică*, acestea nu pot genera virioni descendenți, dar păstrează capacitatea de a infecta celulele țintă. Genomul vectorului viral poate să nu includă gene care codifică enzimele necesare pentru replicare (genomul poate fi structurat pe calea ingineriei pentru a fi „fără intestine” – conținând doar gena de interes flancată de semnalele necesare pentru amplificarea și împachetarea genomului artificial), dar aceste gene pot fi asigurate în timpul producției. Prin urmare, acesta este considerat sigur pentru utilizare în terapia genetică, din moment ce replicarea și infectarea prin virionii descendenți nu pot avea loc decât în prezența enzimelor virale necesare pentru replicare.

În multe cazuri, la particulele de rAAV s-a făcut referire ca rezistente la DNază. Totuși, în plus față de această endonuclează (DNază), alte endo- și exo-nucleaze pot fi, de asemenea, utilizate în etapele de purificare descrise aici, pentru a îndepărta acizii nucleici de contaminare. Astfel de nucleaze pot fi selectate pentru a degrada ADN-ul monocatenar și/sau ADN-ul dublu catenar și ARN-ul. Astfel de etape pot conține o singură nuclează sau amestecuri de nucleaze direcționate către diferite ținte și pot fi endonucleaze sau exonucleaze.

Termenul „rezistent la nuclează” indică faptul că capsida de AAV s-a asamblat complet în jurul casetei de expresie, care este proiectată să livreze o genă la o celulă gazdă și protejează aceste secvențe genomice împachetate de degradare (digestie) în timpul etapelor de incubare a nucleazei proiectate pentru a elimina acizii nucleici de contaminare, care pot fi prezenți din procesul de producție.

Așa cum a fost utilizată aici, o "cantitate eficientă" se referă la cantitatea compoziției de rAAV care livrează și exprimă în celulele țintă o cantitate din produsul genetic din genomul de vector. O cantitate eficientă poate fi determinată pe baza unui model animal, mai degrabă decât a unui pacient uman. Exemple ale unui model murinic corespunzător sunt descrise aici.

Un rAAV sau o compoziție așa cum a fost asigurată aici poate exclude un anticorp anti-gripă sau o construcție de imunoglobulină. Un rAAV sau o compoziție așa cum a fost asigurată aici poate exclude o genă a atrofiei musculare spinale (SMA) sau o secvență de codificare a SMN.

Termenul „translație” în contextul prezentei invenții se referă la un proces la ribozom, în care o catenă de ARNm controlează ansamblul unei secvențe de aminoacizi pentru a genera o proteină sau o peptidă.

Așa cum au fost utilizați în această specificație și în revendicări, termenii "care cuprind", "care conțin", "care includ" și variantele sale includ alte componente, elemente, numere întregi, etape și altele asemenea. În schimb, termenul „care constă” și variantele sale sunt exclusiv din alte componente, elemente, numere întregi, etape și altele asemenea.

Este de semnalat faptul că termenul "un" sau "o", se referă la unul sau mai mulți, de exemplu, "un agent de intensificare", se înțelege că reprezintă unul sau mai mulți agent (agenți) de intensificare. Ca atare, termenii "un" (sau "o"), "unul sau mai mulți" și "cel puțin unul" sunt utilizați aici în mod interschimbabil.

Așa cum a fost descris mai sus, termenul „aproximativ” atunci când este utilizat pentru a modifica o valoare numerică înseamnă o variație de $\pm 10\%$, cu excepția faptului în care nu a fost specificat altfel.

Următoarele exemple sunt doar ilustrative.

EXEMPLE

În anumite realizări, capsida de AAVhu68 a fost observată că are un randament mai bun de AAV9, care este, de asemenea, în Clada F. Una sau ambele modificări ale aminoacizilor ale acidului glutamic (Glu) în poziția 67 și valina (Val) în poziția 157 pot conferi acest randament crescut. În anumite realizări, vectorii care prezintă capsidale de AAVhu68 asigură o creștere de cel puțin 15% în randamentul vectorului împachetat în comparație cu vectorii pe bază de AAV9. Într-o comparație între AAVhu68 și AAVrh10, AAVhu68 a fost descoperit că asigură o eficiență de transducție mai bună decât AAVrh10 la doză scăzută (de exemplu, aproximativ 1×10^9) în urma administrării intracerebroventriculare.

EXEMPLUL 1

A. Identificarea AAVhu68

ADN-ul tisular a fost extras din probe de țesut uman ca model PCR cu coloane QIAamp (Qiagen) urmând recomandările producătorului cu următoarele modificări. ADN polimeraza Q5 (Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, NEB) a fost aleasă pentru fidelitatea extraordinară de înaltă și eficiența sa robustă pentru a recupera gena VP1 de lungime completă a potențialelor AAV-uri în probe, așa cum a fost descris de Gao, și colab [Proc Natl Acad Sci USA, 3 Septembrie 2002 3, 99(18): 11854-11859 (Epub 21 August 2002)] cu setul de primeri modificat după cum urmează: în locul AV1NS, primerul GCTGCGYCAACTGGACCAATGAGAAC, prm504 [NR ID SECV: 7] a fost utilizat și în locul primerului invers AV2CAS, prm505:CGCAGAGACCAAGTTCAACTGAAACGA [NR ID SECV: 8], a fost utilizat. Condițiile PCR au fost modificate după cum urmează:

	μL
Apă	9
prm504	1,25
prm505	1,25
Model	1
2X Q5	12,5

program PCR

	Timp (secunde)	Ciclu (cicluri)
98	30	1
98	10	50
59	10	
72	93	
72	120	1

Benzile de ~ 3 kb din PCR au fost tăiate din gel; ADN-ul a fost extras cu Kitul de Extracție cu Gel QIAquick (Qiagen) și clonat în Kitul de clonare PCR Zero Blunt® TOPO® (Thermo Fisher Scientific). Plasmidele au fost secvențiate pentru a obține întreaga lungime a genei AAV VP1. Pentru majoritatea probelor, cel puțin trei plasmide au fost secvențiate complet și secvențele consens au fost extrase ca secvență finală AAV pentru acea probă.

Secvența de acid nucleic dobândită care codifică proteina de capsidă vp1 a AAVhu68 este asigurată în NR ID SECV: 1. Vezi, de asemenea, FIG. 2A-2C. Secvența de aminoacizi de vp1 de AAVhu68 este asigurată în FIG. 1 și NR ID SECV: 2. În comparație cu AAV9, AAVhu31 și AAVhu32, două mutații (A67E și A157V) au fost identificate critice în AAVhu68 (încercuite în FIG. 1).

5 Această metodă de amplificare a asigurat, de asemenea, o secvență agent de distanțiere între secvența de codificare vp1 și secvențele de codificare rep. Această secvență de codificare este: atgacttaaccaggt, NR ID SECV: 9. Secvența de codificare pentru rep52 de AAVhu68 este reproducă în NR ID SECV: 3. Secvența de proteină rep52 este de asemenea reproducă în NR ID SECV: 4.

10 Plasmida *trans* pAAV2/hu68 a fost apoi realizată prin încărcarea genei VP1 de hu68 într-o structură principală de pAAV2/9 în locul genei VP1 AAV9 pentru a evalua eficiența de împachetare, randamentul și proprietățile de transducție. Plasmida pAAV2/9 conține ITR-uri AAV2 5' și 3' care flanchează gena de capsidă și este disponibilă de la Penn Vector Core [Universitatea din Pennsylvania, Phila, PA US, pennvectorcore.med.upenn.edu].

B. Caracterizarea AAVhu68

15 Deși acest fenomen nu a fost observat sau descris anterior în capsidale de virus adeno-asociat, alte proteine și peptide au fost descoperite a fi susceptibile, atât *in vivo*, precum și *in vitro*, la o varietate de modificări chimice. Una dintre cele mai frecvente modificări este deamidarea asparaginei, o reacție spontană non-enzimatică. În general, timpii de înjumătățire ai deamidării asparaginilului în condiții fiziologice (pH 7,4, 37°C) variază între aproximativ 1 și 1000 de zile. O serie asemănătoare de reacții
20 apare în reziduurile de glutamină la glutamat, dar aceste reacții sunt mult mai lente decât cele ale omologilor lor de asparagină.

În peptide scurte, formarea intermediarilor ciclici este controlată de secvența primară, în timp ce în proteine structurile secundare, terțiare și cuaternare au un efect suplimentar. Astfel, rata de deamidare a
25 fiecărei amide proteice este determinată în mod unic. Identificarea spectrometrică a masei a peptidelor deamidate este relativ simplă, din moment ce deamidarea se adaugă la masa moleculei intacte +0,984 Da (diferența de masă dintre grupările -OH și -NH₂). Din moment ce deamidarea este o modificare stabilă în faza gazoasă, spectrele MS/MS pot releva poziția deamidării chiar și în prezența mai multor zone potențiale de deamidare.

Patru vectori AAVhu68 au fost produși utilizând unul dintre cele patru genomuri de vector care
30 nu sunt relevanți pentru acest studiu, fiecare produs utilizând metode convenționale de transfecție triplă în celule 293. Pentru o descriere generală a acestor tehnici *vezi, de exemplu*, Bell CL și colab, "The AAV9 receptor and its modification to improve *in vivo* lung gene transfer in mice.", J Clin Invest. 2011;121:2427-2435. Pe scurt, o plasmidă care codifică secvența care urmează să fie împachetată (un produs genetic exprimat dintr-un promotor de β-actină de pui, un intron și un hormon de creștere poli A) flancat de repetări terminale inversate de AAV2, a fost împachetat prin transfecție triplă a celulelor
35 HEK293 cu plasmide care codifică gena rep de AAV2 și gena cap de AAVhu68 și o plasmidă auxiliară a adenovirusului (pAdΔF6). Particulele virale de AAV rezultate pot fi purificate utilizând centrifugare cu gradient de CsCl, concentrate și congelate pentru utilizare ulterioară.

40 Denaturare și alchilare: La 100 μg de preparat viral dezghețat (soluție proteică), se adaugă 2 μl de ditioneitol 1M (DTT) și 2 μl de clorhidrat de guanidină 8M (GndHCl) și se incubează la 90°C timp de 10 minute. Se lasă soluția să se răcească la temperatura camerei, apoi se adaugă 5 μl de iodoacetamidă 1 M (IAM) proaspăt preparată și se incubează timp de 30 de minute la temperatura camerei în întuneric. După 30 de minute, se stinge reacția de alchilare prin adăugarea de 1 μl de DTT 1M.

45 Digestia: La soluția de proteină denaturată se adaugă de bicarbonat de amoniu 20 mM, pH 7,5-8 la un volum care diluează concentrația finală de GndHCl la 800 mM. Se adaugă soluție de protează (tripsină sau chimotripsină) pentru un raport protează la proteină de 1:20 și se incubează la 37°C în timpul nopții. După digestie, se adaugă TFA până la un final de 0,5% pentru a stinge reacția de digestie.

50 Spectrometrie de masă: Aproximativ 1 microgram din amestecul combinat de digestie este analizat prin UHPLC-MS/MS. LC este efectuată pe un sistem UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific). Faza mobilă A este apă MilliQ cu acid formic 0,1%. Faza mobilă B este acetonitril cu acid formic 0,1%. Gradientul LC este rulat de la 4% B la 6% B timp de 15 minute, apoi la 10% B timp de 25 de minute (40 de minute în total), apoi la 30% B timp de 46 de minute (86 de minute în total). Probele sunt încărcate în mod direct în coloană. Dimensiunea coloanei este de 75 cm × 15 μm I.D. și este împachetată cu medii C18 de 2 microni (Acclaim PepMap). LC este interfațată cu un spectrometru de
55 masă cuadropol-Orbitrap (Q-Exactive HF, Thermo Scientific) prin intermediul ionizării cu electropulverizare nanoflex utilizând o sursă. Coloana este încălzită la 350°C și se aplică o tensiune de electropulverizare de 2,2 kV. Spectrometrul de masă este programat să dobândească spectre de masă în tandem de la primii 20 de ioni. Rezoluție completă MS la 120.000 și rezoluție MS/MS la 30.000. Energia

de coliziune normalizată este setată la 30, controlul automat al câștigului la 1e5, umplerea maximă MS la 100 ms, umplerea maximă MS/MS la 50 ms.

Procesarea datelor: Fișierele de date RAW ale spectrometrului de masă au fost analizate de BioPharma Finder 1.0 (Thermo Scientific). Pe scurt, toate căutările au necesitat toleranță de masă a precursorului de 10 ppm, toleranță de masă a fragmentului de 5 ppm, scindare triptică, până la 1 scindări greșite, modificare fixă a alchilării cisteinei, modificare variabilă a oxidării metioninei/triptofanului, deamidarea asparaginei/glutaminei, fosforilare, metilare și amidarea.

În următorul tabel, T se referă la tripsină și C se referă la chimiotripsină.

Modificare												
Enzimă	T	T	T	T	C	C	C	C	T	T	T	
% acoperire	93,6	92	93,1	92,5	90,2	89,7	91,1	88,9	98,9	97	94,6	92,4
+ Deamidare (Deamid)												
~N35												
N57+ Deamid	87,6	95,5	89,3	88,2	90,5	96,3	86,4	84,8	100,0	100,0	99,0	92,7
N66+ Deamid	4,7											
N94+ Deamid	11,3	10,9	11,0	5,3	11,6	10,4	10,8	5,6	5,0	11,1	5,4	16,0
N113+ Deamid			1,8									
-N253+ Deamid	17,7	22,0	21,1	15,0	17,0	22,6	20,5	15,6	4,2	5,5		
Q259+ Deamid	35,2	25,6	21,0		35,4	26,3	20,9	9,2				
-N270+ Deamid	16,4	25,1	23,2	16,6	15,9	24,9	23,5	16,1	0,2			
-N304+ Deamid	2,6	2,9	2,8	1,3	2,5	2,8	2,9	1,3	16,6	10,3		
~N314+Deamid									6,5			
N319+ Deamid	0,3	2,8	2,8	0,2		2,9	2,8	0,2				
N329+ Deamid	72,7	85,6	89,1	86,8	71,0	87,2	88,7	84,7	85,5	79,4	78,9	91,8
N336+ Deamid		30,8	9,3	100,0		31,0	9,2	95,7				
-N409+ Deamid	21,3	22,9	23,9	24,0	22,0	23,4	24,7	24,2				
N452+ Deamid	98,8	99,7	99,2	100,0	98,9	97,3	98,1	95,2	98,2	68,7	67,4	49,4
N477+ Deamid	4,4	4,3	4,3	2,6	4,5	4,4	4,3	2,6			0,8	
N512+ Deamid	97,5	97,9	95,3	95,7	92,2	91,8	99,2	96,1	99,7	98,2	87,9	75,7
-N515+ Deamid	8,2	21,0	16,0		8,3	21,0	16,5	0,0	2,5	3,0		15,1
~Q599+ Deamid	4,0	15,4	10,1	13,6	4,0	15,5	10,0	13,8	15,8			
N628+ Deamid	5,3		5,6		5,4	0,0	5,4	0,0				
N651+ Deamid	0,9	1,6	1,6						0,5			
N663+ Deamid	3,4		3,5	3,7	3,4	0,0	3,4	3,6				
N709+ Deamid	0,6	0,8	20,2	0,6	0,6	0,8	19,8	0,6	0,3	1,3	0,1	0,2
N735									25,0	42,7		21,7
+ Acetilare (Ac):												
K332 + Ac				100,0								
~K693+Ac	13,0		13,5									
~K666+Ac				93,8								

În cazul proteinei de capsidă AAVhu68, 4 reziduuri (N57, N329, N452, N512) prezintă în mod obișnuit niveluri ridicate de deamidare și în majoritatea cazurilor > 90% în diferite loturi. Reziduurile suplimentare de asparagină (N94, N253, N270, N304, N409, N477) și Q599) prezintă, de asemenea, niveluri de deamidare de până la ~20% în diferite loturi. Nivelurile de deamidare au fost identificate inițial utilizând o digestie cu tripsină și verificate cu o digestie cu chimotripsină.

EXEMPLUL 2 - Randamentul vectorilor de AAVhu68

Vectori de AAVhu68 și AAV9 care poartă diverși markeri universali, cum ar fi GFP și LacZ au fost generați și evaluați. Fiecare dintre vectori a fost generat utilizând tehnica de transfecție triplă în celule 293, așa cum a fost descris de Gao și colab. [Gao, Guang-Ping, și colab. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99,18 (2002): 11854-11859.]

A. Producerea plasmidei *trans* pAAVhu68

Secvența de acid nucleic care codifică proteina de capsidă vp1 este asigurată în NR ID SECV: 1.

Plasmida *trans* pAAV2/hu68 a fost realizată prin încărcarea genei VP1 de hu68 într-o structură principală de pAAV2/9 în locul genei VP1 de AAV9 pentru a evalua eficiența împachetării, randamentul și proprietățile de transducție. Plasmida pAAV2/9 conține ITR-uri AAV2 5' și 3' care flanchează gena capsidului și este disponibilă de la Penn Vector Core [Universitatea din Pennsylvania, Phila, PA US, pennvectorcore.med.upenn.edu].

B. Randamentul vectorilor de AAVhu68

Celule 293 au fost cultivate și menținute în DMEM, 1X (Mediu Esențial Minim Eagle cu Modificare Dulbecco) cu 4,5 g/L glucoză, L-glutamină și piruvat de sodiu suplimentat cu 10% ser fetal de bovină sub atmosferă cu 5% CO₂ la 37°C. Transfecțiile au fost efectuate așa cum a fost descris de Gao și colab. [Gao, Guang-Ping, și colab. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99,18 (2002): 11854-11859.] cu plasmida vectorului înlocuită cu pAAV2/hu68 sau pAAV2/9. Transgena (casetă de expresie) utilizată a fost CB7.CI.βLuciferază.RBG. Celulele transfectate au fost cultivate în continuare în plăci cu 6 godeuri. Lizatul total al celulelor, precum și supernatantul au fost colectate pentru cuantificarea virusului prin intermediul analizei TaqMan (Applied Biosystems) utilizând sonde și primeri care țintesc regiunea poliA beta-globină de iepure a transgenei (casetă de expresie), așa cum a fost descris în Gao și colab. [Gao, Guangping, și colab. "Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo." *Human gene therapy* 11,15 (2000): 2079-2091.]. Randamentele a șase plasmide pAAV2/9 și șase plasmide pAAV2/hu.68 au fost comparate pe o placă cu 6 godeuri, cap la cap, atât în termeni de titru al supernatantului, cât și ai titrului total de lizat. Fiecare plasmidă a provenit dintr-o colonie de bacterii individuale.

Randamentul AAVhu68 a fost descoperit a fi asemănător cu cel al AAV9 în termeni de lizat total (FIG. 3A, n=6, p = 0,42). Cu toate acestea, în supernatant, randamentul AAVhu68 a fost în mod semnificativ mai mare decât cel al AAV9 (FIG. 3B, n=6, p = 0,0003). Astfel, AAVhu68 a fost demonstrat ca un vector mai bun în comparație cu AAV9 în termeni de producție, din moment ce supernatantul este recoltat în timpul scalării stivei celulare și producției de virus.

EXEMPLUL 3 - Transducția in vivo a AAVhu68.LacZ

AAVhu68.CB7.nLacZ (la care s-a făcut referire, de asemenea ca AAVhu68.LacZ) a fost generat prin intermediul inserării unei secvențe care codifică β-galactozidaza bacteriană localizată nuclear (nLacZ) și apoi produs așa cum a fost descris în Exemplul 2. Pentru a evalua eficiența împachetării, randamentul, proprietățile de transducție, eficiența transducției și tropismul AAVhu68 *in vivo*, șoarecii au fost injectați cu 5×10^{11} copii de genom ale vectorului AAVhu68.LacZ prin intermediul a diferite metode de administrare, cum ar fi administrare intravenoasă, intramusculară și intranazală. Mușchiul, plămânul, ficatul și inima au fost colectate după sacrificarea șoarecilor la două săptămâni după administrarea vectorului. Secțiunile înghețate ale fiecărui organ au fost pregătite, procesate și analizate ca protocol convențional de detectare a expresiei genei LacZ [Bell, Peter, și colab. "An optimized protocol for detection of E. coli β-galactosidase in lung tissue following gene transfer." *Histochemistry and cell biology* 124,1 (2005): 77-85.]. O colorare pozitivă pentru LacZ prezentată în albastru (FIG. 4A-4C) indică o transducție reușită a AAVhu68.

Așa cum a fost prezentat în FIG. 4A, după ce vectorii au fost introduși la șoareci prin intermediul injectării intravenoase (IV), toate organele testate (inima, ficatul, plămânul și mușchiul) au demonstrat transducția AAVhu68 în timp ce un tropism care favorizează inima și ficatul față de plămân și mușchi a fost observat. După ce vectorii introduși la șoareci prin intermediul injectării intramusculare (IM), inima, ficatul și mușchiul au demonstrat o rată de transducție ridicată a AAVhu68, în timp ce nicio transducție detectabilă în plămân nu a fost observată. Dacă administrarea intranazală a fost efectuată, transducție dispersată a fost observată în inimă, ficat, mușchi și plămân.

Aceste rezultate au relevat faptul că AAVhu68 a demonstrat o eficiență ridicată de transducție și un tropism larg de țesut/organ.

EXEMPLUL 4 - Transducția in vivo a AAVhu68.GFP în comparație cu AAV9.GFP

AAVhu68.GFP și AAV9.GFP au fost generate prin intermediul inserării unei gene care codifică proteina fluorescentă verde (GFP) ca genele care sunt apoi produse așa cum a fost descris în Exemplul 2. Pentru a evalua eficiența împachetării, randamentul, proprietățile de transducție, eficiența transducției și

tropismul AAVhu68 și AAV9 *in vivo*, șoarecii au fost administrați cu AAVhu68.GFP sau AAV9.GFP la doze de 1×10^{10} GC sau 1×10^{11} GC. Creierul, mușchiul, plămânul, ficatul și inima au fost colectate după sacrificarea șoarecilor la două săptămâni după administrarea vectorului. Secțiunile congelate ale fiecărui organ au fost pregătite și procesate pentru a vizualiza expresia GFP așa cum a fost descris de Wang și colab. [Wang L, și colab., Hum Gene Ther. 2011 Nov; 22(11):1389-401; Wang L, și colab., Mol Ther. 2010 Jan; 18(1): 126-34]. O colorare pozitivă pentru GFP prezentată în verde (FIG. 5A-5C și FIG. 6A-6D) indică o transducție de succes a vectorilor testați.

Secțiuni din diferite regiuni ale creierului (hipocamp, cortex motor și cerebel) de șoareci cu administrare intracerebroventriculară a vectorilor au fost investigate. Transducția vectorilor AAV a fost observată în toate probele de hipocamp testate, cu excepția unuia dintre șoarecii injectați cu 1×10^{10} GC de AAV9.GFP. O transducție mai bună a AAVhu68.GFP în comparație cu cea a AAV9 a fost observată în cortexul motor. În plus, transducția în cerebel a AAVhu68.GFP a fost observată atunci când șoarecii au fost injectați cu 1×10^{11} GC doar de vector. Prin urmare, AAVhu68 a prezentat o eficiență de transducție mai mare, precum și un tropism mai larg în creier în comparație cu AAV9.

Într-un experiment suplimentar, diferite organe, cum ar fi ficatul, rinichiul, inima și pancreasul, de la șoareci administrați cu AAVhu68.GFP pe cale intravenoasă au fost preparate și procesate așa cum a fost descris de Wang și colab. [Wang L, Calcedo R, Bell P, Lin J, Grant RL, Siegel DL, Wilson JM, Hum Gene Ther. 2011 Nov; 22(11): 1389-401; Wang L, Calcedo R, Wang H, Bell P, Grant R, Vandenberghe LH, Sanmiguel J, Morizono H, Batshaw ML, Wilson JM, Mol Ther. 2010 Jan; 18(1):126-34]. Un semnal pozitiv de la GFP prezentat în verde indică o transducție reușită a vectorilor de AAV menționați. Imaginile de câmp luminos prezentate în alb și negru au fost asigurate pentru morfologia organului, în timp ce canalul fluorescent roșu corespunzător a fost asigurat ca un control negativ.

Semnalul pozitiv puternic prezentat în verde a fost observat în ficat, în timp ce rinichiul, inima și pancreasul au demonstrat și transducția vectorului menționat de asemenea, indicând un tropism larg de țesut/organ al vectorului AAVhu68.

EXEMPLUL 5 - Randament și transducție *in vivo* ale vectorilor AAV cu mutație A67E și A157V

Pentru a crește randamentul și/sau eficiența de împachetare a unui vector recombinant adeno-asociat (rAAV), o genă a capsidei de AAV pentru a exprima o proteină vpl cu o Glu la poziția de aminoacid 67 și/sau o Val la poziția de aminoacid 157 este structurată pe calea ingineriei la vectori de AAV, cum ar fi AAV9, AAVhu31 și AAVhu32, în care numerotarea reziduurilor de aminoacizi se bazează pe AAVhu68 [NR ID SECv: 5].

Vectorii AAV menționați sunt produși și evaluați pentru randamentul fiecărui vector în conformitate cu Exemplul 2. Eficiența transducției *in vivo* și tropismul țesutului/organului/regiunii sunt evaluate în continuare prin metode convenționale, așa cum au fost ilustrate în Exemplul 3.

EXEMPLUL 6 - AAVhu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 intratecal pentru profilaxia metastazelor cerebrale ale cancerului mamar uman cu HER2+

AAV9	Virus adeno-asociat 9
AAV9.trastuzumab	AAV9.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 (AAV9 care poartă o casetă de expresie a trastuzumab)
BCA	Analiza acidului bicineconinic
BCBM	Metastaze cerebrale ale cancerului de sân
CI	Intron himeric
CMV (Promoter)	Agent de intensificare timpuriu imediat al citomegalovirusului /promoter de beta-actină de pui
CSF	Lichid cefalorahidian
ddPCR	Reacția digitală cu picături în lanț a polimerazei
DNA	Acid deoxiribonucleic
GC	Copii de genomuri
GLP	Bune practice de laborator
GTP	Program de terapie genetică
HER2	Receptorul 2 al factorului de creștere epidermic uman

AAVhu68	Serotipul hu68 al virusului adeno-asociat
AAVhu68, trastuzumab	hu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 (AAVhu68 care poartă o casetă de expresie cu trastuzumab)
ICV	Intracerebroventricular
ID	Număr de identificare
IT	Intratecal
mAb	Anticorp monoclonal
MED	Doză esențială minimă
n	Număr de animale
PBS	Soluție salină de fosfat
qPCR	Reacția cantitativă în lanț a polimerazei
RAG1 ^{-/-}	Gena 1 de eliminare de activare a recombinării
RAG1	Gena 1 de activare a recombinării
rBG	Secvența poli A de β-globină de iepure
RPM	Rotație per minut
SD	Deviere standard
SOP	Procedură standard de operare
SV40 (semnal Poli A)	Semnal de poliadenilare a virusului simian 40

A. Rezumat

Scopul acestui studiu a fost să testeze eficacitatea terapeutică a AAVhu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 (AAVhu68.trastuzumab), un virus recombinant adeno-asociat de serotip AAVhu68 care conține o casetă de expresie a trastuzumab, pentru profilaxia metastazelor cerebrale ale cancerului de sân uman cu HER2+ într-un model de șoarece cu xenogrefă. Trastuzumab (Herceptin®, Roche) este un anticorp monoclonal umanizat (mAb) direcționat împotriva HER2 care extinde supraviețuirea pacienților atunci când este utilizat pe cale intravenoasă cu chimioterapie pentru a trata boala sistemică cu HER2+. Cu toate acestea, bariera hemato-encefalică exclude Herceptin® care este administrat pe cale intravenoasă de la intrarea în sistemul nervos central, făcându-l incapabil să trateze în mod eficient metastazele cerebrale ale cancerului de sân cu HER2+. Mai multe rapoarte de caz indică faptul că Herceptin® administrat pe cale intratecală poate crește supraviețuirea pacienților cu boală leptomeningeală cu HER2+ sau poate opri progresia metastazelor focale cu HER2+ [J. C. Bendell, și colab., Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 97, 2972-2977 (2003); D. J. Slamon, și colab., Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2, *N. Engl. J. Med.* 344, 783-792 (2001), M. A. Cobleigh, și colab., Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* 17, 2639-2648 (1999), Zagouri F, și colab., (2013). Intrathecal administration of trastuzumab for the treatment of meningeal carcinomatosis in HER2-positive metastatic breast cancer: a systematic review and pooled analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 139(1):13-22, Bousquet G, și colab. (2016). Intrathecal Trastuzumab Halts Progression of CNS Metastases in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 34(16):e151-155]. Cu toate acestea, LCR se transformă rapid, compromițând probabil efectul terapeutic al IT Herceptin® datorită profilului farmacocinetic LCR cu fluctuații mari. Scopul tratamentului cu AAVhu68.trastuzumab este de a preveni apariția, de a încetini creșterea, de a îmbunătăți supraviețuirea sau de a crește calitatea clinică a măsurilor pentru viață asociate cu HER2+ BCBM prin asigurarea expresiei localizate, pe termen lung, a AAVhu68.trastuzumab în parenchimul cerebral însuși.

AAVhu68.trastuzumab a fost administrat la patru doze diferite ($1,00 \times 10^{10}$, $3,00 \times 10^{10}$, $1,00 \times 10^{11}$ și $3,00 \times 10^{11}$ GC/animal) prin injectare intracranioventriculară (ICV) în șoareci RAG1^{-/-} în vârstă de 6-9 săptămâni. Celulele BT474.M1.fluc, derivate dintr-o linie celulară de carcinom ductal uman cu HER2+, au fost implantate cel puțin 21 de zile mai târziu. Șoarecii au fost observați zilnic și eutanasiați la punctul

final al studiului. Țesutul cerebral a fost colectat la necropsie pentru măsurarea volumului tumorii. S-a concluzionat faptul că administrarea ICV profilactică a AAVhu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 într-un model de xenogrefă RAG1^{-/-} a metastazelor cerebrale de cancer de sân cu HER2+ a avut ca rezultat un volum al tumorii redus în mod semnificativ la toate dozele de testare în acest experiment. În total, aceste rezultate au demonstrat eficacitatea terapeutică potențială a AAVhu68.trastuzumab pentru a îmbunătăți supraviețuirea pacienților cu BCBM HER2+.

B. Obiectivul acestui studiu a fost de a investiga doza minimă esențială (MED) de AAVhu68.trastuzumab pentru profilaxia tumorii într-un model de xenogrefă RAG1^{-/-} de BCBM HER2+ pe calea studierii volumului tumorii. Vectorul este AAVhu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 sau AAVhu68.trastuzumab.

Titlul ddPCR: $7,38 \times 10^{13}$ GC/ml

Endotoxină: < 2,0 EU/ml

Puritate: 100%

Soluție salină cu tampon fosfat (PBS) (Fără control al tratamentului)

Capacitatea AAVhu68.trastuzumab de a asigura profilaxia tumorii a fost evaluată utilizând un model de xenogrefă murinică RAG1^{-/-} de BCBM HER2+. Un model de șoarece cu imunodeficiență permite creșterea tumorilor ortotopice de origine umană într-un șoarece, fără respingere de către sistemul imunitar al șoarecelui. În plus, șoarecele RAG1^{-/-} nu posedă IgG intrinsecă, permițând trastuzumab să fie cuantificat prin ELISA de proteină A.

Tabel: Proiectarea studiului

Grup nr.	Tratament	Doză (GC/șoareci)	Genotip (n)	Volumul dozei (μl)	ROA	Implantarea celulei tumorale
1	AAVhu68.trastuzumab	$1,0 \times 10^{10}$	RAG1 ^{-/-} (10)	5	ICV	21 zile după tratament
2	AAVhu68.trastuzumab	$3,0 \times 10^{10}$	RAG1 ^{-/-} (10)	5	ICV	
3	AAVhu68.trastuzumab	$1,0 \times 10^{11}$	RAG1 ^{-/-} (10)	5	ICV	
4	AAVhu68.trastuzumab	$3,0 \times 10^{11}$	RAG1 ^{-/-} (10)	5	ICV	
5	PBS	Nici un tratament	RAG1 ^{-/-} (10)	5	ICV	

Articolul de testat și controlul negativ au fost diluate cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) sterilă la concentrație corespunzătoare. Vectorul a fost administrat ICV în ventriculul lateral stâng.

Livrarea intratecală de AAV poate fi efectuată utilizând o varietate de rute pentru accesul LCR. Calea ICV a fost aleasă deoarece este minim invazivă și nu necesită nicio procedură chirurgicală la șoarece (în comparație cu calea cisterna magna care necesită incizii prin piele și mușchii gâtului). S-a demonstrat anterior în laboratorul nostru și de către alții, faptul că o singură injecție de vector de AAV9 în lichidul cefalorahidian (ICV sau cisterna magna) atât la șoareci, cât și la animalele mari țintește neuronii din tot creierul [Dirren și colab. (2014). Intracerebroventricular Injection Of Adeno-Associated Virus 6 And 9 Vectors For Cell Type-Specific Transgene Expression In The Spinal Cord. Hum. Gene. Therapy 25, 109-120, Snyder și colab. (2011). Comparison Of Adeno-Associated Viral Vector Serotypes For Spinal Cord And Motor Neuron Gene Delivery. Hum. Gene Ther 22, 1129-1135, Bucher și colab (2014). Intracisternal Delivery Of AAV9 Results In Oligodendrocyte And Motor Neuron Transduction In The Whole Central Nervous System Of Cats. Gene Therapy 21, 522-528, Hinderer și colab. (2014). Intrathecal Gene Therapy Corrects CNS Pathology In A Feline Model Of Mucopolysaccharidosis I. Mol Ther: 22, 2018-2027].

C. Implantarea celulelor tumorale la șoareci RAG1^{-/-}

Pentru crearea unui model de xenogrefă de șoarece pentru BCBM HER2+, o linie celulară de carcinom cu celule ductale HER2+ umană transdusă cu luciferază de licurici, BT474-MI.fluc a fost folosită. Pentru procedura de injecție, șoarecii au fost anesteziați cu ketamina/xilazină. Blana de pe scalp și gât a fost tunsă. O granulă de 17-β estradiol cu eliberare în timp (1,7 mg, eliberare în 90 de zile, Innovative Research of America) a fost implantată pe cale subcutanată în dorsul gâtului și readministrată la fiecare 90 de zile în timpul studiului. Șoarecii au fost fixați într-un aparat stereotaxic. Pielea expusă a

fost curățată cu povidonă-iod și 70% etanol. O incizie antero-posterioară de 1 cm a fost făcută peste partea superioară a craniului. Bregma a fost identificată. Un burghiu pneumatic a fost poziționat la bregma, apoi a fost mutat cu 0,8 mm în spate și la 2,2 mm în stânga bregma, unde o gaură de bavură a fost forată în craniu. O seringă Hamilton de 25 μ L a fost încărcată cu 5 μ L suspensie de celule tumorale (100.000 de celule în total în 50:50 MatriGel®:PBS). Acul a fost adus la bregma și mutat la coordonatele indicate mai sus înainte de a pătrunde 4,0 mm în parenchimul cerebral. Acul a fost apoi ridicat cu 1,0 mm înapoi pe pista acului pentru a crea un buzunar în care să se injecteze celulele tumorale. Acul a fost lăsat pe loc timp de 5 minute. Apoi, 5 μ L de suspensie celulară au fost injectați timp de 10 minute utilizând un aparat de injecție motorizat. Acul a fost lăsat pe loc timp de 5 minute după ce injectarea a fost finalizată, apoi a fost îndepărtat încet. Incizia peste craniu a fost suturată cu 4,0 vicril și șoarecii au primit 15 mg/kg de enrofloxacină (Bayer) în PBS steril împreună cu 0,3 mg/kg de buprenorfină în PBS steril, ambele pe cale subcutanată.

Șoarecii au fost monitorizați zilnic. Atunci când sunt muribunzi, șoarecii au fost eutanasiați prin supraexpunere la CO₂ urmată de dislocare cervicală. La necropsie, creierele au fost izolate și tăiate coronal prin pista acului de injectare a tumorii.

Volumul tumorii: Măsurarea diametrului tumorii în ziua 35 a fost efectuată cu șublere digitale Vernier (Thermo-Fisher). Creierele au fost recoltate la necropsie. Disecția brută la nivelul pistei acului de injectare a tumorii a fost utilizată pentru a izola tumorile din țesutul cerebral înconjurător. Diametrul tumorii a fost apoi măsurat în 3 dimensiuni (x, y și z) și volumul tumorii a fost calculat ca volumul unui elipsoid, $\frac{4}{3} \times \pi \times \frac{x}{2} \times \frac{y}{2} \times \frac{z}{2}$. Emisfera cerebrală dreaptă, emisfera contralaterală la zona injectării vectorului și a implantării tumorii au fost păstrate în formol. Tumorile disecate au fost colectate raportat la cohorta de doză și conservate în formol. Comparațiile de volum tumoral au fost efectuate utilizând testul Mann-Whitney în GraphPad Prism 7.

D. Rezultate

Volumul tumorii: Pentru a determina dacă profilaxia tumorii IT AAVhu68.trastuzumab încetinește creșterea tumorii, am măsurat diametrul tumorii la 35 de zile după implantare. Volumul mediu al tumorilor din grupul care a primit cea mai mare doză de AAVhu68.trastuzumab profilaxia tumorii (0,4 mm³, n=10) a fost în mod semnificativ mai mic decât șoarecii care nu au primit niciun tratament (26,1 mm³, n=9). Șoarecii care au primit doze mai mici de AAVhu68.trastuzumab au avut tumori în mod semnificativ mai mici în comparație cu niciun tratament. Volumul tumoral mediu al șoarecilor care au primit $1,00 \times 10^{10}$ GC/șoarece a fost calculat ca fiind același din punct de vedere statistic cu volumul tumoral median al șoarecilor care au primit $3,00 \times 10^{10}$ GC/șoarece (p=0,6029). De notat, doi șoareci din grupul 1, un șoarece din grupul 2, trei șoareci din grupul 3 și trei șoareci din grupul 4 nu au avut o tumoră foarte apreciabilă la disecție.

Grup	DOZA (GC/șoarece)	Număr de șoareci	Volum mediu al tumorii (mm ³)	Valoarea p în comparație cu niciun tratament
1	$1,00 \times 10^{10}$	9*	6,4	0,0375
2	$3,00 \times 10^{10}$	10	8,1	0,0053
3	$1,00 \times 10^{11}$	9*	1,3	0,0026
4	$3,00 \times 10^{11}$	10	0,4	<0,0001

* Un animal din fiecare dintre aceste grupuri a fost eutanasiat înainte de data programată pentru necropsie și, prin urmare, nu a fost inclus în analiză.

La toate dozele, administrarea IT de AAVhu68.trastuzumab a condus la un volum mediu al tumorii în mod semnificativ mai mic la D35 post-implantare tumorală atunci când a fost administrat pe cale profilactică într-un model de xenogrefă murină RAG1^{-/-} de BCBM HER2+ care utilizează linia celulară de carcinom ductal uman BT474.M1 HER2+. AAVhu68.trastuzumab MED măsurat în acest studiu a fost $1,00 \times 10^{10}$ GC/șoarece.

EXEMPLUL 7 - Randament producției și puritatea pentru vectorii AAVhu68

Pentru a compara randamentul producției și/sau puritatea unui vector recombinant adeno-asociat (rAAV) care prezintă capsidă diferite, două seturi diferite de vectori care prezintă capsidă diferite, incluzând AAVhu68, AAV8triplu, AAV8 și AAV9 au fost generate și preparate.

Pe scurt, un set de vectori care prezintă o capsidă indicată și un genom de vector care cuprinde un promotor de citomegalovirus (CMV), o secvență de codificare a luciferazei de licurici și o poli A SV40 (CMV.fLuciferază.SV40) au fost produse și evaluate pentru randamentul fiecărui vector la scară mică. Rezultatele arată faptul că vectorii AAV9 au asigurat cel mai mare randament în timp ce vectorul AAVhu68 a urmat ca al doilea (FIG 8A). Vectorii AAV8 și AAV8triplu au asigurat, de asemenea, un

randament de peste 4×10^{13} GC (FIGURA 8A). Celălalt set de vectori care prezintă o capsidă indicată și un genom de vector care cuprinde un promotor CMV, un intron, o secvență de codificare a imunoadezinei (201lg IA) și o poli A SV40 (CMV.PI.201lg IA.SV40) au fost produse și evaluate pentru randamentul și puritatea fiecărui vector la

scară mega, în conformitate cu metode convenționale. Rezultatele sunt prezentate în Figurile 8B și 9. Asemănător cu randamentele preparatelor la scară mică, vectorii de AAV9 au asigurat cel mai mare randament la aproximativ $5,7 \times 10^{14}$ GC în timp ce vectorul de AAVhu68 a urmat ca al doilea, la aproximativ $3,8 \times 10^{14}$ GC (FIG 8B). Vectorii de AAV8 au asigurat un randament de aproximativ $3,6 \times 10^{14}$ GC și AAV8triplu la aproximativ $1,8 \times 10^{14}$ GC (FIG 8B). Puritățile preparatelor testate sunt comparabile, variind de la aproximativ 97,4% până la aproximativ 98,6%.

EXEMPLUL 8 - Vectori de rAAV la șoareci masculi RAG KO. Expresia genei a fost testată *in vivo* utilizând vectori de rAAV care prezintă diferite capside, incluzând AAVhu68, AAV8triplu, AAV8 și AAV9 și care exprimă un produs transgenetic secretat, 201lg IA.

Șoarecii masculi RAG KO în vârstă de 6-8 săptămâni ($n = 5/\text{grup}$) au fost administrați pe cale intramusculară în mușchiul gastrocnemian fie cu 3×10^{11} GC/șoarece sau 3×10^{10} GC/șoarece din vectorul testat utilizând o seringă Hamilton. Serul a fost colectat săptămânal de la șoareci cărora li s-au administrat vectori care exprimă proteine secretate prin prelevări de sânge submandibulare în tuburi de colectare a serului. Nivelurile de expresie a transgenelor au fost măsurate în ser prin ELISA așa cum a fost descris în Greig și colab, Intramuscular Injection of AAV8 in Mice and Macaques Is Associated with Substantial Hepatic Targeting and Transgene Expression, PLoS One. 13 Noiembrie 2014 13;9(11):e112268, doi: 10.1371/journal.pone.0112268, eCollection 2014.

Așa cum a fost prezentat în FIG. 10A și 10B, vectorii de AAVhu68, AAV8 și AAV9 au exprimat transgena la un nivel asemănător, în timp ce vectorul AAV8triplu se exprimă mai bine după injectare IM la șoareci. La doza mai mică testată (adică, 3×10^{10} GC/șoarece), diferența în expresie față de AAV8triplu este substanțială.

EXEMPLUL 9 - Expresia transgenetică a vectorilor de rAAV la șoareci masculi C57BL/6J.

Expresia în ficat și mușchi a fost testată *in vivo* utilizând vectori de rAAV care prezintă diferite capside, incluzând AAVhu68, AAV8triplu, AAV8 și AAV9 și care exprimă o luciferază de licurici (fLuc) ca transgenă.

Șoareci masculi C57BL/6J în vârstă de 6-8 săptămâni ($n = 5/\text{grup}$) au fost administrați pe cale intramusculară în mușchiul gastrocnemian cu 3×10^{11} GC/șoarece din vectorul testat utilizând o seringă Hamilton. Expresia fLuc a fost vizualizată săptămânal prin imagistică de bioluminescență a întregului corp, așa cum a fost descris anterior (Greig și colab., PLoS One 2014, citat mai sus).

Așa cum a fost prezentat în FIG. 11A și 11B, vectorii de AAVhu68, AAV8 și AAV9 au fost exprimați la un nivel asemănător atât în mușchi, cât și în ficat, în timp ce vectorul AAV8triplu a redus expresia în ficat și a îmbunătățit expresia în mușchi.

EXEMPLUL 10 - Vectori de rAAV în Macaci Cynomolgus masculi și femele.

Expresia transgenei a fost testată în Macaci Cynomolgus utilizând vectori de rAAV care prezintă diferite apsde, incluzând AAVhu68, AAV8triplu, AAV8 și AAV9 și care exprimă o transgenă secretată, 201lg IA.

Macacii cynomolgus masculi și femele care prezintă titruri de Nab la vectorul injectat de $<1,5$ la începutul studiilor, au fost administrați cu o doză de 10^{13} GC/kg de greutate corporală de vector care exprimă 201lg IA de la una dintre cele patru capsde de vector (AAV8triplu, AAVhu68, AAV9 sau AAV8) pe cale intramusculară în mușchiul vast lateral al picioarelor, drept și stâng, ca injectări de 1 ml per kg greutate corporală (concentrația vectorului din 10^{13} GC/ml) pentru studiul de biodistribuție a vectorului. Probele de sânge au fost prelevate anterior studiului și săptămânal în timpul studiului prin intermediul puncției venoase a venei femurale. Nivelurile de expresie a transgenelor au fost măsurate în ser prin ELISA, așa cum a fost descris anterior (Greig și colab., PLoS One 2014, citat mai sus).

Așa cum a fost prezentat în FIG12, AAVhu68 și AAV8triplu se exprimă mai bine în comparație cu vectorii AAV9 și AAV8 după injectare IM.

(Text Liber de Enumerare a Secvențelor)

Următoarele informații sunt asigurate pentru secvențele care conțin text liber sub identificatorul numeric <223>.

NR ID SECV: (conține text liber)	Text liber sub <223>
2	<223> Construcție sintetică
3	<223> Gena rep de AAVhu68 de origine homo
4	<223> Construcție sintetică
5	<223> Capsida VP 1 de AAV9 de origine homo sapiens
	<220>
	<221> CDS
	<222> (1)..(2208)
	<223> Capsida VP1 de AAV9
6	<223> Construcție sintetică
7	<223> primer prm504
8	<223> primer prm505
9	<223> Secvență agent de spațiere de AAVhu68
10	<223> Proteina de capsidă vp1 de AAVhu31
11	<223> Proteina de capsidă vp1 de AAVhu32
12	<223> Secvență de codificare a vp1 de AAVhu31
13	<223> Secvență de codificare a vp1 de AAVhu32
14	<223> hu68vp1 modificat
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (23)..(23)
	<223> Xaa poate fi W (Trp, triptofan) sau W oxidat.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (35)..(35)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (57)..(57)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (66)..(66)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ

NR ID SECV: (conține text liber)	Text liber sub <223>
	<222> (94)..(94)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (97)..(97)
	<223> Xaa poate fi D (asp, acid aspartic) sau D izomerizat.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (107)..(107)
	<223> Xaa poate fi D (asp, acid aspartic) sau D izomerizat.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (113)..(113)
	<223> Xaa poate fi orice aminoacid care apare pe cale naturală
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (149)..(149)
	<223> Xaa poate fi S (Ser, serină) sau S Fosforilată
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (149)..(149)
	<223> Xaa poate fi S (Ser, serină) sau S Fosforilată
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (247)..(247)
	<223> Xaa poate fi W (Trp, triptofan) sau W oxidat (de exemplu, kinurenină).
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (253)..(253)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (259)..(259)
	<223> Xaa reprezintă Q, sau Q deamidat în acid glutamic (acid alfa-glutamic), acid gamma-glutamic (Glu) sau un amestec de acid alfa- și gamma-glutamic

NR ID SECV: (conține text liber)	Text liber sub <223>
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (270)..(270)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (297)..(297)
	<223> Xaa reprezintă D (Asp, acid aspartic) sau D amindat în N (Asn, asparagină)
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (304)..(304)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (306)..(306)
	<223> Xaa poate fi W (Trp, triptofan) sau W oxidat (de exemplu, kinurenină).
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (314)..(314)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (319)..(319)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (329)..(329)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (332)..(332)
	<223> Xaa poate fi K (lys, lizină) sau K acetilată
	<220>

NR ID SECV: (conține text liber)	Text liber sub <223>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (336)..(336)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (384)..(384)
	<223> Xaa poate fi D (asp, aspartic acid) sau D izomerizat.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (404)..(404)
	<223> Xaa poate fi M (Met, Metionină) sau M oxidată.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (409)..(409)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (436)..(436)
	<223> Xaa poate fi M (Met, Metionină) sau M oxidată.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (452)..(452)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (477)..(477)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (499)..(499)
	<223> Xaa poate fi S (Ser, serină) sau S Fosforilată
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (512)..(512)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau

NR ID SECV: (conține text liber)	Text liber sub <223>
	Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (515)..(515)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (518)..(518)
	<223> Xaa poate fi M (Met, Metionină) sau M oxidată.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (524)..(524)
	<223> Xaa poate fi M (Met, Metionină) sau M oxidată.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (559)..(559)
	<223> Xaa poate fi M (Met, Metionină) sau M oxidată.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (569)..(569)
	<223> Xaa poate fi T (Thr, treonină) sau T Fosforilată
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (586)..(586)
	<223> Xaa poate fi S (Ser, serină) sau S Fosforilată
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (599)..(599)
	<223> Xaa reprezintă Q, sau Q deamidat în acid glutamic (acid alfa-glutamic), acid gamma-glutamic (Glu) sau un amestec de acid alfa- și gamma-glutamic
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (605)..(605)
	<223> Xaa poate fi M (Met, Metionină) sau M oxidată.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (619)..(619)

NR ID SECV: (conține text liber)	Text liber sub <223>
	<223> Xaa poate fi W (Trp, triptofan) sau W oxidat (de exemplu, kinurenină).
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (628)..(628)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (640)..(640)
	<223> Xaa poate fi M (Met, Metionină) sau M oxidată.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (651)..(651)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (663)..(663)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (666)..(666)
	<223> Xaa poate fi K (lys, lizină) sau K acetilată
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (689)..(689)
	<223> Xaa poate fi K (lys, lizină) sau K acetilată
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (693)..(693)
	<223> Xaa poate fi K (lys, lizină) sau K acetilată
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (695)..(695)
	<223> Xaa poate fi W (Trp, triptofan) sau W oxidat.
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ

NR ID SECV: (conține text liber)	Text liber sub <223>
	<222> (709)..(709)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp
	<220>
	<221> TRĂSĂTURĂ_NOUĂ
	<222> (735)..(735)
	<223> Xaa poate fi Asn, sau deamidat în Asp, izoAsp, sau Asp/izoAsp

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- KATHRIN MEYER ET AL: "Improving Single Injection CSF Delivery of AAV9-mediated Gene Therapy for SMA: A Dose-response Study in Mice and Nonhuman Primates", MOLECULAR THERAPY, vol. 23, no. 3, 1 March 2015 (2015-03-01), pages 477-487, XP055337771, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2014.210
- WO-A1-2015/164757
- HINDERER C ET AL: "Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN", HUMAN GENE THERAPY, vol. 29, no. 3, 12 February 2018 (2018-02-12), pages 285-298, XP002779693,
- WO-A1-2015/164757
- HINDERER C ET AL: "Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN", HUMAN GENE THERAPY, vol. 29, no. 3, 12 February 2018 (2018-02-12), pages 285-298, XP002779693,
- WO-A1-2015/164757
- KATHRIN MEYER ET AL: "Improving Single Injection CSF Delivery of AAV9-mediated Gene Therapy for SMA: A Dose-response Study in Mice and Nonhuman Primates", MOLECULAR THERAPY, vol. 23, no. 3, 1 March 2015 (2015-03-01), pages 477-487, XP055337771, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2014.210
- WO-A1-2016/049230
- HINDERER C ET AL: "Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN", HUMAN GENE THERAPY, vol. 29, no. 3, 12 February 2018 (2018-02-12), pages 285-298, XP002779693,
- WO-A1-2016/049230
- WO-A1-2016/049230
- ClinicalTrials.gov, NCT04771416
- WO-A1-2018/035059
- ClinicalTrials.gov, NCT04713475
- WO-A2-2005/033321
- Clinical Trial Register EU; 2020-01109-22/GB
- WO-A2-2005/033321
- WO-A2-2005/033321
- WO-A2-2007/127264
- WO-A2-2007/127264
- WO-A2-2007/127264

(57) Revendicări:

1. Virus recombinant adeno-asociat (rAAV) care cuprinde o capsidă de AAVhu68 și un genom de vector în capsida de AAVhu68, în care:

(A) genomul de vector cuprinde o moleculă de acid nucleic care cuprinde secvențe de repetare terminale inversate (ITR-uri) de AAV și între ITR-uri o secvență de acid nucleic de non-AAV care codifică un produs legat în mod funcțional la secvențe care direcționează expresia produsului într-o celulă țintă de mamifer; și

(B) capsida de AAVhu68 cuprinde proteine de AAVhu68 vp1, proteine de AAVhu68 vp2 și proteine de AAVhu68 vp3 produse dintr-o secvență de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2, în care proteinele de AAVhu68vp1 cuprind un acid glutamic la poziția 67 și o valină în poziția 157 și proteinele de AAVhu68vp2 cuprind o valină în poziția 157 pe baza numerotării din NR ID SECV: 2.

2. rAAV în conformitate cu revendicarea 1, în care capsida de AAVhu68 cuprinde subpopulații de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3, în care subpopulațiile de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAV hu68 vp3 cuprind cel puțin 50% până la 100% asparagine deamidate (N) în perechile asparagină - glicină la fiecare dintre pozițiile 57, 329, 452, 512 în raport cu aminoacizii din NR ID SECV: 2, în care asparaginele deamidate sunt deamidate în acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă.

3. Virus recombinant adeno-asociat (rAAV) care cuprinde o capsidă de AAVhu68 și un genom de vector în capsida de AAVhu68, în care:

(A) genomul de vector cuprinde o moleculă de acid nucleic care cuprinde secvențe de repetare terminale inversate (ITR-uri) de AAV și între ITR-uri o secvență de acid nucleic de non-AAV care codifică un produs legat în mod funcțional la secvențe care direcționează expresia produsului într-o celulă țintă de mamifer; și

(B) capsida de AAVhu68 cuprinde populații eterogene de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAVhu68 vp3,

în care proteinele de AAVhu68 vp1 sunt aminoacizii 1 până la 736 din NR ID SECV: 2 (vp1) care cuprind un acid glutamic la poziția 67 și o valină la poziția 157 și cuprind, în plus, subpopulații de proteine vp1 care cuprind aminoacizi modificați pe baza pozițiilor de aminoacizi din NR ID SECV: 2.

în care proteinele de AAVhu68 vp2 sunt aminoacizii 138 până la 736 din NR ID SECV: 2 (vp2) care cuprind o valină la poziția 157 și cuprind, în plus, subpopulații de proteine vp2 care cuprind aminoacizi modificați pe baza pozițiilor de aminoacizi din NR ID SECV: 2, și

în care proteinele de AAVhu68 vp3 sunt aminoacizii 203 până la 736 din NR ID SECV: 2 (vp3), care cuprind subpopulații de proteine vp3 care cuprind aminoacizi modificați pe baza pozițiilor de aminoacizi din NR ID SECV: 2,

în care subpopulațiile de proteine de AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 și AAV hu68 vp3 cuprind cel puțin 50% până la 100% asparagine deamidate (N) în perechile asparagină - glicină la fiecare dintre pozițiile 57, 329, 452, 512, în raport cu aminoacizii din NR ID SECV: 2, în care asparaginele deamidate sunt deamidate în acid aspartic, acid izoaspartic, o pereche de interconversie acid aspartic/acid izoaspartic sau combinații ale acestora, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă.

4. rAAV în conformitate cu revendicarea 2 sau cu revendicarea 3, în care subpopulațiile de proteine de AAVhu68 vp1, vp2 și vp3 cuprind în plus:

(i) una sau mai multe modificări selectate dintre: lizină acetilată, serină și/sau treonină fosforilate, acid aspartic izomerizat, glutamine deamidate, triptofan și/sau metionină oxidate sau un aminoacid amidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă; și/sau

(ii) 1% până la 40% deamidare a asparaginelor la una sau mai multe dintre pozițiile N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709 sau combinații ale acestora, pe baza numerotării NR ID SECV: 2, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă.

5. rAAV în conformitate cu oricare dintre revendicările 2 până la 4, în care subpopulațiile de capsidă de AAVhu68 ale proteinelor de capsidă de AAVhu68 vp1, vp2 și vp3 cuprind în plus

(a) cel puțin 65% din asparaginele (N) în perechile asparagină - glicină localizate la pozițiile 57 ale proteinelor vp1 este deamidat, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă, pe baza numerotării din NR ID SECV: 2; și/sau

(b) cel puțin 75% din N în perechile asparagină - glicină la poziția 329 a proteinelor vp1, vp2 și vp3 este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă, pe baza numerotării reziduurilor din secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2 ; și/sau

(c) cel puțin 50% din N în perechile asparagină - glicină la poziția 452 a proteinelor vp1, vp2 și vp3 este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă, pe baza numerotării reziduurilor din secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2 ; și/sau

(d) cel puțin 75% din N în perechile asparagină - glicină la poziția 512 a proteinelor vp1, vp2 și vp3 este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă, pe baza numerotării reziduurilor din secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2.

6. rAAV în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 5, în care capsida de AAVhu68 cuprinde:

(a) o subpopulație de proteine vp1 în care 75% până la 100% din N la poziția 57 a proteinelor vp1 este deamidat, așa cum a fost determinat prin spectrometrie de masă; și/sau

(b) subpopulații de proteine vp1, proteine vp2 și/sau proteine vp3 în care 75% până la 100% din N la poziția 329, pe baza numerotării NR ID SECV: 2, este deamidat, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă; și/sau

(c) subpopulații de proteine vp1, proteine vp2 și/sau proteine vp3 în care 75% până la 100% din N la poziția 452, pe baza numerotării NR ID SECV: 2, este deamidat, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă; și/sau

(d) subpopulații de proteine vp1, proteine vp2 și/sau proteine vp3 în care 75% până la 100% din N la poziția 512, pe baza numerotării NR ID SECV: 2, este deamidat, așa cum a fost determinat utilizând spectrometrie de masă.

7. rAAV în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 6, în care secvența de acid nucleic care codifică proteinele vp1 este NR ID SECV: 1 sau o secvență cel puțin 80% până la cel puțin 99% identică cu NR ID SECV: 1, care codifică secvența de aminoacizi din NR ID SECV: 2; în mod opțional, în care secvența de acid nucleic este identică cel puțin 80% până la 97% cu NR ID SECV: 1.

8. Compoziție care cuprinde o populație mixtă de virus adeno-asociat recombinant hu68 (rAAVhu68), în care fiecare dintre rAAVhu68 este selectat în mod independent dintr-un rAAV în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 7.

9. rAAV în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 7 sau compoziția în conformitate cu revendicarea 8, în care secvențele ITR de AAV sunt o ITR 5' și o ITR 3' dintr-o altă sursă de AAV decât AAVhu68.

10. Compoziția în conformitate cu oricare dintre revendicările 8 sau 9, în care compoziția este formulată pentru

(i) livrarea intratecală și genomul de vector cuprinde o secvență de acid nucleic care codifică un produs pentru livrare la sistemul nervos central;

(ii) livrare intravenoasă; sau

(iii) livrare intranazală sau intramusculară.

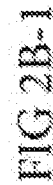
AAV8 hu 68.VP1 hu 31 hu 32	(1)	MAADYLPOMLEEDM SEGRBNWMLKFCQFQNNQCDQNWAGLVLPQNYLGRGKLDGEPVHSDAALEHDKAYDQOLKAGONPYLKNHWDGEF	100
	(1)	MAADYLPOMLEEDM SEGRBNWMLKFCQFQNNQCDQNWAGLVLPQNYLGRGKLDGEPVHSDAALEHDKAYDQOLKAGONPYLKNHWDGEF	
	(1)	MAADYLPOMLEEDTSGRFBWNNKLPFPFNNHNDWGRGLVPQNYLGRGKLDGEPVHSDAALEHDKAYDQOLKAGONPYLKNHWDGEF	
	(1)	MAADYLPOMLEEDTSGRFBWNNKLPFPFNNHNDWGRGLVPQNYLGRGKLDGEPVHSDAALEHDKAYDQOLKAGONPYLKNHWDGEF	
AAV8 hu 68.VP1 hu 31 hu 32	(101)	QERLEDTSPGOILGRAVFQAKNRLLEPLGLVEEAATAPQKRRVVEQSPQEPDSSKSGSGSADPANNRLVFGDTGDTESVPOKQCEPPAAPSGVGS	200
	(101)	QERLEDTSPGOILGRAVFQAKNRLLEPLGLVEEAATAPQKRRVVEQSPQEPDSSKSGSGSADPANNRLVFGDTGDTESVPOKQCEPPAAPSGVGS	
	(101)	QERLEDTSPGOILGRAVFQAKNRLLEPLGLVEEAATAPQKRRVVEQSPQEPDSSKSGSGSADPANNRLVFGDTGDTESVPOKQCEPPAAPSGVGS	
	(101)	QERLEDTSPGOILGRAVFQAKNRLLEPLGLVEEAATAPQKRRVVEQSPQEPDSSKSGSGSADPANNRLVFGDTGDTESVPOKQCEPPAAPSGVGS	
AAV8 hu 68.VP1 hu 31 hu 32	(201)	LTMASSGGAPVADWMEGADGVGSSSGWACDSNMLGDRVITSTRTVALPTNNHLYKQSIHSTSGSSNDWAFQISTPWQGFQHNRFHCHFSPRQWQR	300
	(201)	LTMASSGGAPVADWMEGADGVGSSSGWACDSNMLGDRVITSTRTVALPTNNHLYKQSIHSTSGSSNDWAFQISTPWQGFQHNRFHCHFSPRQWQR	
	(201)	LTMASSGGAPVADWMEGADGVGSSSGWACDSNMLGDRVITSTRTVALPTNNHLYKQSIHSTSGSSNDWAFQISTPWQGFQHNRFHCHFSPRQWQR	
	(201)	LTMASSGGAPVADWMEGADGVGSSSGWACDSNMLGDRVITSTRTVALPTNNHLYKQSIHSTSGSSNDWAFQISTPWQGFQHNRFHCHFSPRQWQR	
AAV8 hu 68.VP1 hu 31 hu 32	(301)	UNNNWGRFRPRRLVFLPFLNCKEVTQNNHCKTANNIL TSTVQFTDSQVQLPYLGSAGEGCLPPFPADYFMPQYGYLTLDQDQDANGRSSYCYLEYF	400
	(301)	UNNNWGRFRPRRLVFLPFLNCKEVTQNNHCKTANNIL TSTVQFTDSQVQLPYLGSAGEGCLPPFPADYFMPQYGYLTLDQDQDANGRSSYCYLEYF	
	(301)	UNNNWGRFRPRRLVFLPFLNCKEVTQNNHCKTANNIL TSTVQFTDSQVQLPYLGSAGEGCLPPFPADYFMPQYGYLTLDQDQDANGRSSYCYLEYF	
	(301)	UNNNWGRFRPRRLVFLPFLNCKEVTQNNHCKTANNIL TSTVQFTDSQVQLPYLGSAGEGCLPPFPADYFMPQYGYLTLDQDQDANGRSSYCYLEYF	
AAV8 hu 68.VP1 hu 31 hu 32	(401)	PSQMLRTQMFQFSYETENPFHSSYAHSSGLDRMLNPLDQVLYLSKTNSSQNNQDTLFSVAGPSMMANQQNNYFQPSYRQGRVSTTYTQNNISE	500
	(401)	PSQMLRTQMFQFSYETENPFHSSYAHSSGLDRMLNPLDQVLYLSKTNSSQNNQDTLFSVAGPSMMANQQNNYFQPSYRQGRVSTTYTQNNISE	
	(401)	PSQMLRTQMFQFSYETENPFHSSYAHSSGLDRMLNPLDQVLYLSKTNSSQNNQDTLFSVAGPSMMANQQNNYFQPSYRQGRVSTTYTQNNISE	
	(401)	PSQMLRTQMFQFSYETENPFHSSYAHSSGLDRMLNPLDQVLYLSKTNSSQNNQDTLFSVAGPSMMANQQNNYFQPSYRQGRVSTTYTQNNISE	

FIG 1-1

AAV9	(501)	FAVPGASSNALVGRISLIMVPGPAMASHKEGEDRFFPLSSSLIFQKQGTGRDINDADKVMITNEEEKTTNPVATESYGGVATNHCSACAOAQTGMVQKGG
hu.88.VP1	(501)	FAVPGASSNALVGRISLIMVPGPAMASHKEGEDRFFPLSSSLIFQKQGTGRDINDADKVMITNEEEKTTNPVATESYGGVATNHCSACAOAQTGMVQKGG
hu.31	(501)	FAVPGASSNALVGRISLIMVPGPAMASHKEGEDRFFPLSSSLIFQKQGTGRDINDADKVMITNEEEKTTNPVATESYGGVATNHCSACAOAQTGMVQKGG
hu.32	(501)	FAVPGASSNALVGRISLIMVPGPAMASHKEGEDRFFPLSSSLIFQKQGTGRDINDADKVMITNEEEKTTNPVATESYGGVATNHCSACAOAQTGMVQKGG
		601
AAV9	(601)	ILPGMWQDRDYVLOGPWAKIPHITDGNFHPSPLMGGFMKHPPPOILKNITPAPAD>PTAFWKOKLNSFTQYSTGVSVIEWELCKENSKRWMPAQ
hu.88.VP1	(601)	ILPGMWQDRDYVLOGPWAKIPHITDGNFHPSPLMGGFMKHPPPOILKNITPAPAD>PTAFWKOKLNSFTQYSTGVSVIEWELCKENSKRWMPAQ
hu.31	(601)	ILPGMWQDRDYVLOGPWAKIPHITDGNFHPSPLMGGFMKHPPPOILKNITPAPAD>PTAFWKOKLNSFTQYSTGVSVIEWELCKENSKRWMPAQ
hu.32	(601)	ILPGMWQDRDYVLOGPWAKIPHITDGNFHPSPLMGGFMKHPPPOILKNITPAPAD>PTAFWKOKLNSFTQYSTGVSVIEWELCKENSKRWMPAQ
		700
		701
AAV9	(701)	YTSNYKSHNWEFANWTEGVSEPRPGITRYLTRNL
hu.88.VP1	(701)	YTSNYKSHNWEFANWTEGVSEPRPGITRYLTRNL
hu.31	(701)	YTSNYKSHNWEFANWTEGVSEPRPGITRYLTRNL
hu.32	(701)	YTSNYKSHNWEFANWTEGVSEPRPGITRYLTRNL
		736

FIG 1-2

FIG 2A-2



AAV9 (1401) ACCACGACACATGCTGTCCAGGGAGAAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACACACAGCTGTCTCACCACCTGTGATCTCAAAACACACACACACCGAA 1500
 hu.68.VP1 (1401) ACCACGACACATGCTGTCCAGGGAGAAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACACACAGCTGTCTCACCACCTGTGATCTCAAAACACACACACACCGAA
 hu.31 (1401) ACCACGACACATGCTGTCCAGGGAGAAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACACACAGCTGTCTCACCACCTGTGATCTCAAAACACACACACACCGAA
 hu.32 (1401) ACCACGACACATGCTGTCCAGGGAGAAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACACACAGCTGTCTCACCACCTGTGATCTCAAAACACACACACACCGAA
 AAV9 (1501) TTTCCTTGGGCTGGAGGCTTCCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGCTGCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAGGAGAGGACCGTT 1600
 hu.68.VP1 (1501) TTTCCTTGGGCTGGAGGCTTCCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGCTGCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAGGAGAGGACCGTT
 hu.31 (1501) TTTCCTTGGGCTGGAGGCTTCCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGCTGCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAGGAGAGGACCGTT
 hu.32 (1501) TTTCCTTGGGCTGGAGGCTTCCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGCTGCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAGGAGAGGACCGTT
 AAV9 (1601) TCTTTCCCTTTGCTCGATCTTTAAATTTTGGCCAAACAAAGGAACTGGAAAGAGACAAAGTGGATGGCGACAAAGTGGATTAACCAACCGAAGAGAAATTAA 1700
 hu.68.VP1 (1601) TCTTTCCCTTTGCTCGATCTTTAAATTTTGGCCAAACAAAGGAACTGGAAAGAGACAAAGTGGATGGCGACAAAGTGGATTAACCAACCGAAGAGAAATTAA
 hu.31 (1601) TCTTTCCCTTTGCTCGATCTTTAAATTTTGGCCAAACAAAGGAACTGGAAAGAGACAAAGTGGATGGCGACAAAGTGGATTAACCAACCGAAGAGAAATTAA
 hu.32 (1601) TCTTTCCCTTTGCTCGATCTTTAAATTTTGGCCAAACAAAGGAACTGGAAAGAGACAAAGTGGATGGCGACAAAGTGGATTAACCAACCGAAGAGAAATTAA
 AAV9 (1701) AACTACTAACCCGGTACGACCGAGTCTCTATGGACAAAGTGGCCACAAACCAACCAAGCTGGCCAAAGCAAGCGCGCTGGCTTCAAAACCAACGGA 1800
 hu.68.VP1 (1701) AACTACTAACCCGGTACGACCGAGTCTCTATGGACAAAGTGGCCACAAACCAACCAAGCTGGCCAAAGCAAGCGCGCTGGCTTCAAAACCAACGGA
 hu.31 (1701) AACTACTAACCCGGTACGACCGAGTCTCTATGGACAAAGTGGCCACAAACCAACCAAGCTGGCCAAAGCAAGCGCGCTGGCTTCAAAACCAACGGA
 hu.32 (1701) AACTACTAACCCGGTACGACCGAGTCTCTATGGACAAAGTGGCCACAAACCAACCAAGCTGGCCAAAGCAAGCGCGCTGGCTTCAAAACCAACGGA

FIG 2B-2

FIG 2C

FIG. 3A

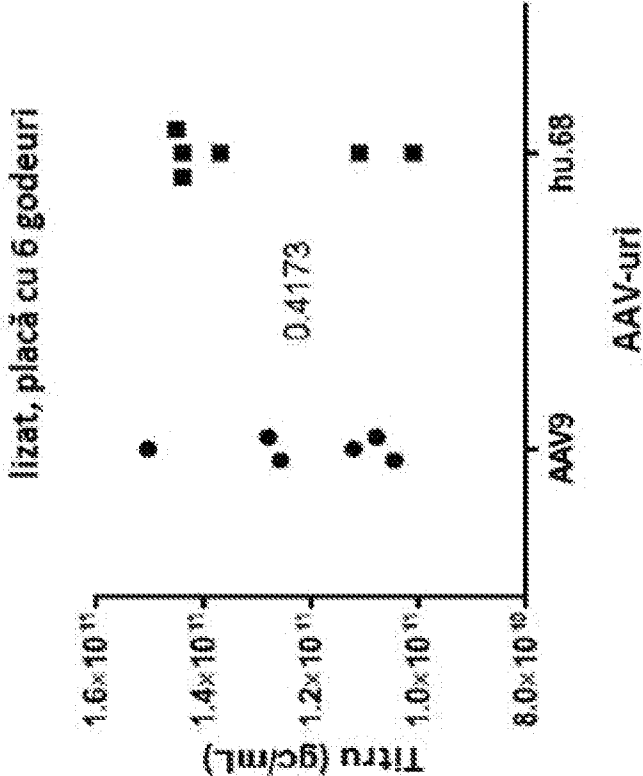


FIG. 3B

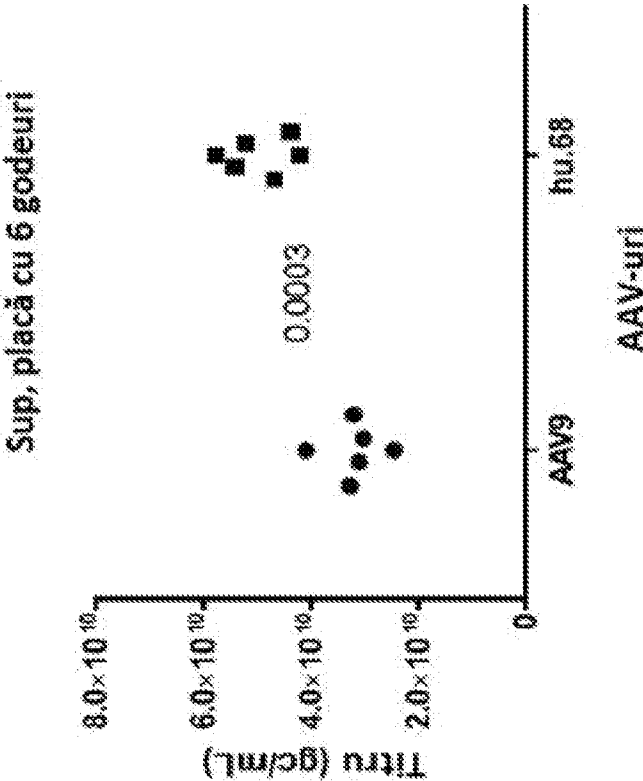
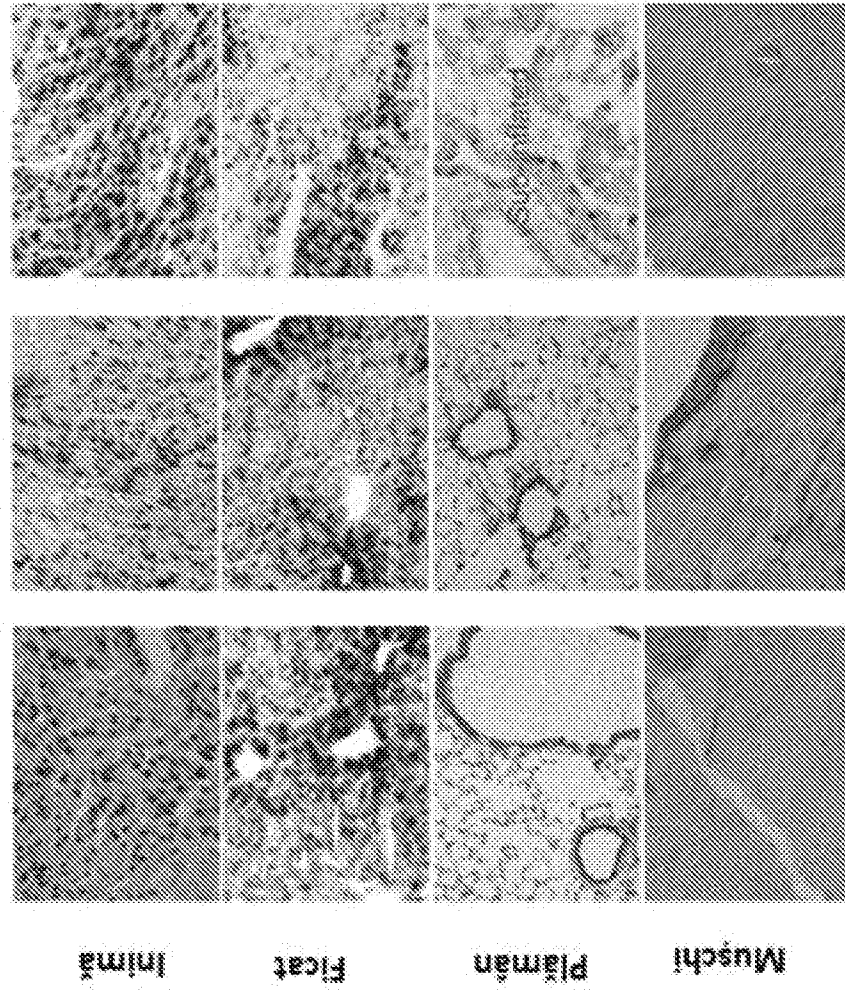


FIG. 4A

5x10¹¹GC AAVhu68.CB7.nLacZ, administrare IV, șoarece



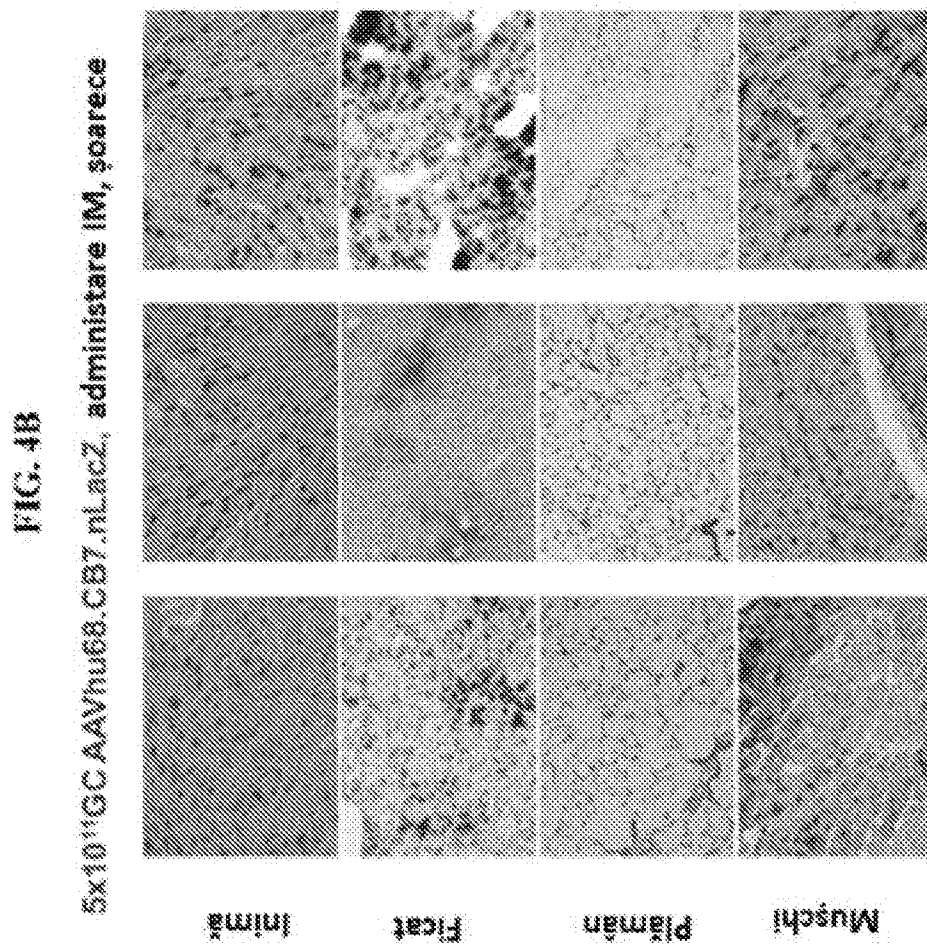


FIG. 4C
5x10¹¹GC AAVhu68.CB7.LacZ, administrare IN, soarece

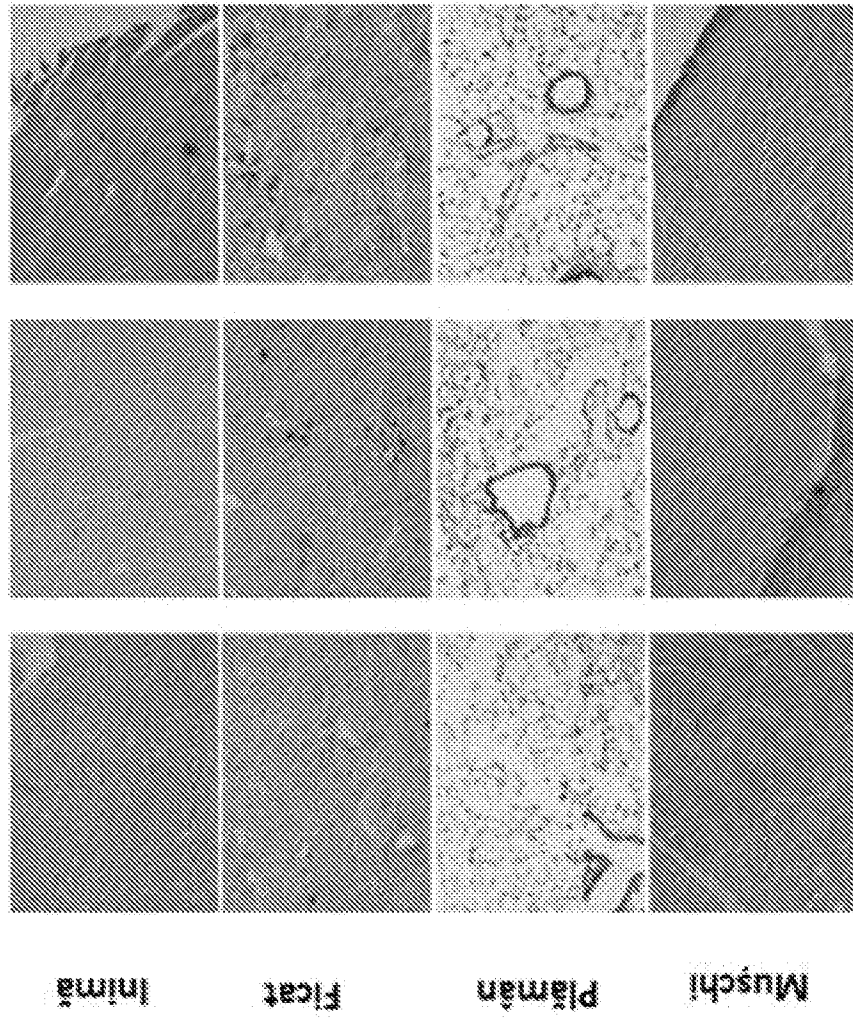


FIG. 5A

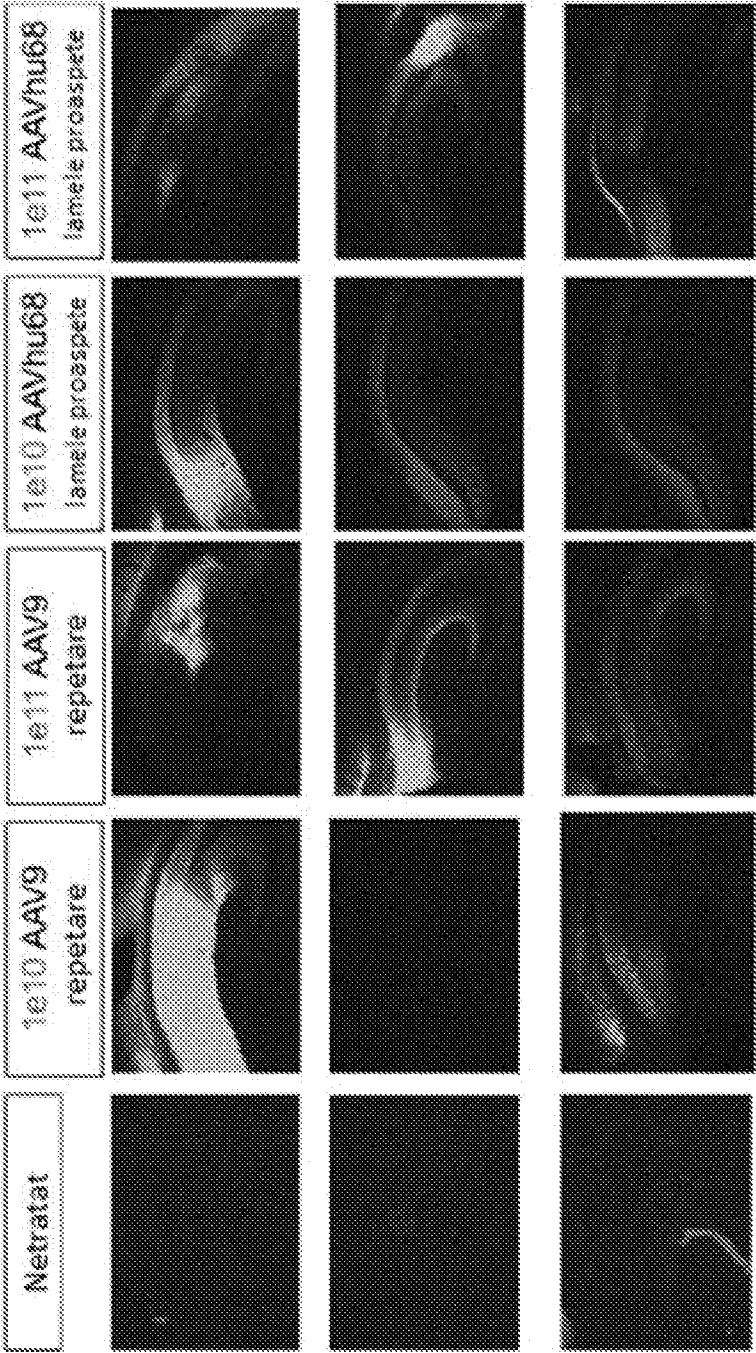


FIG. 5B

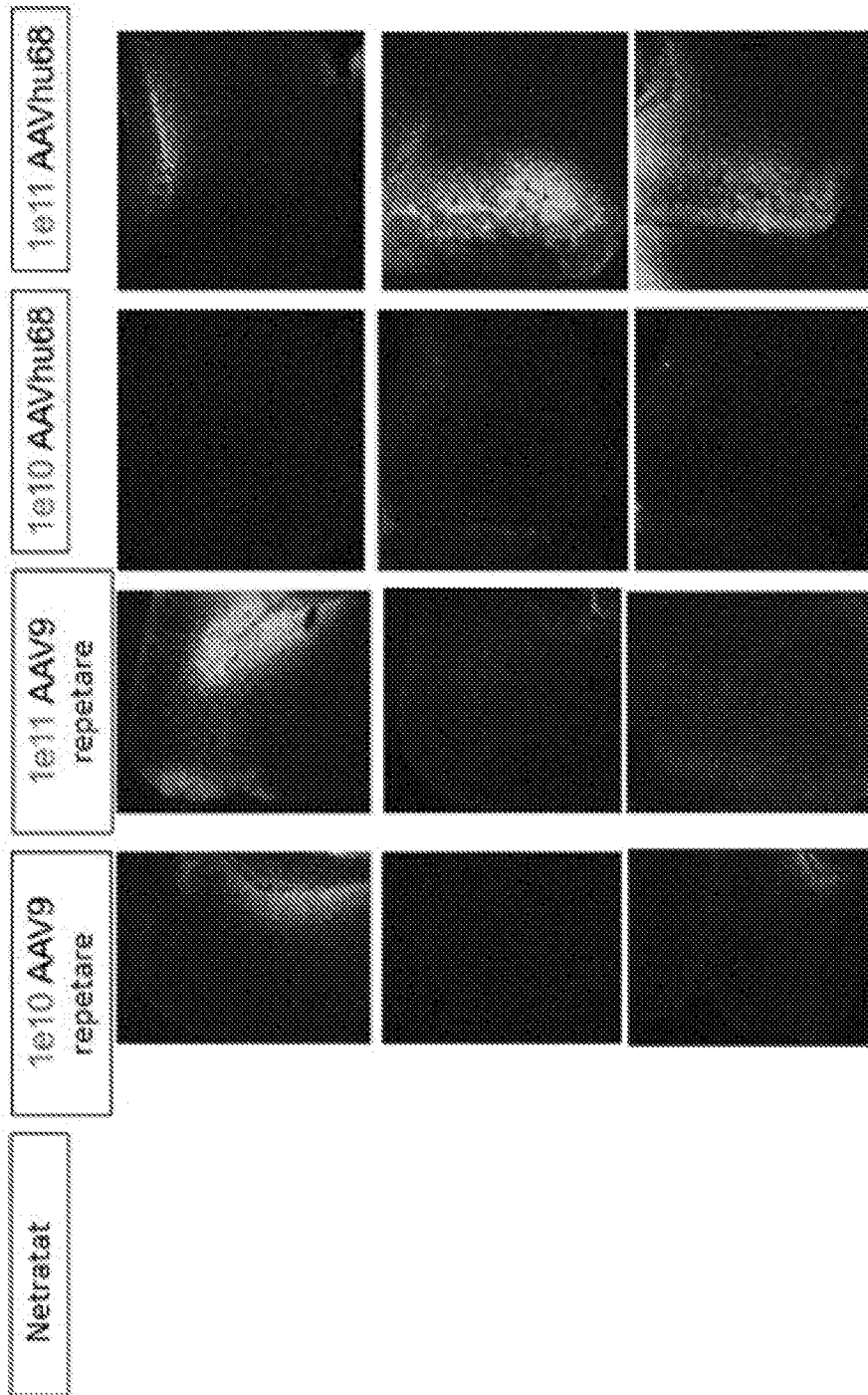


FIG. 5C

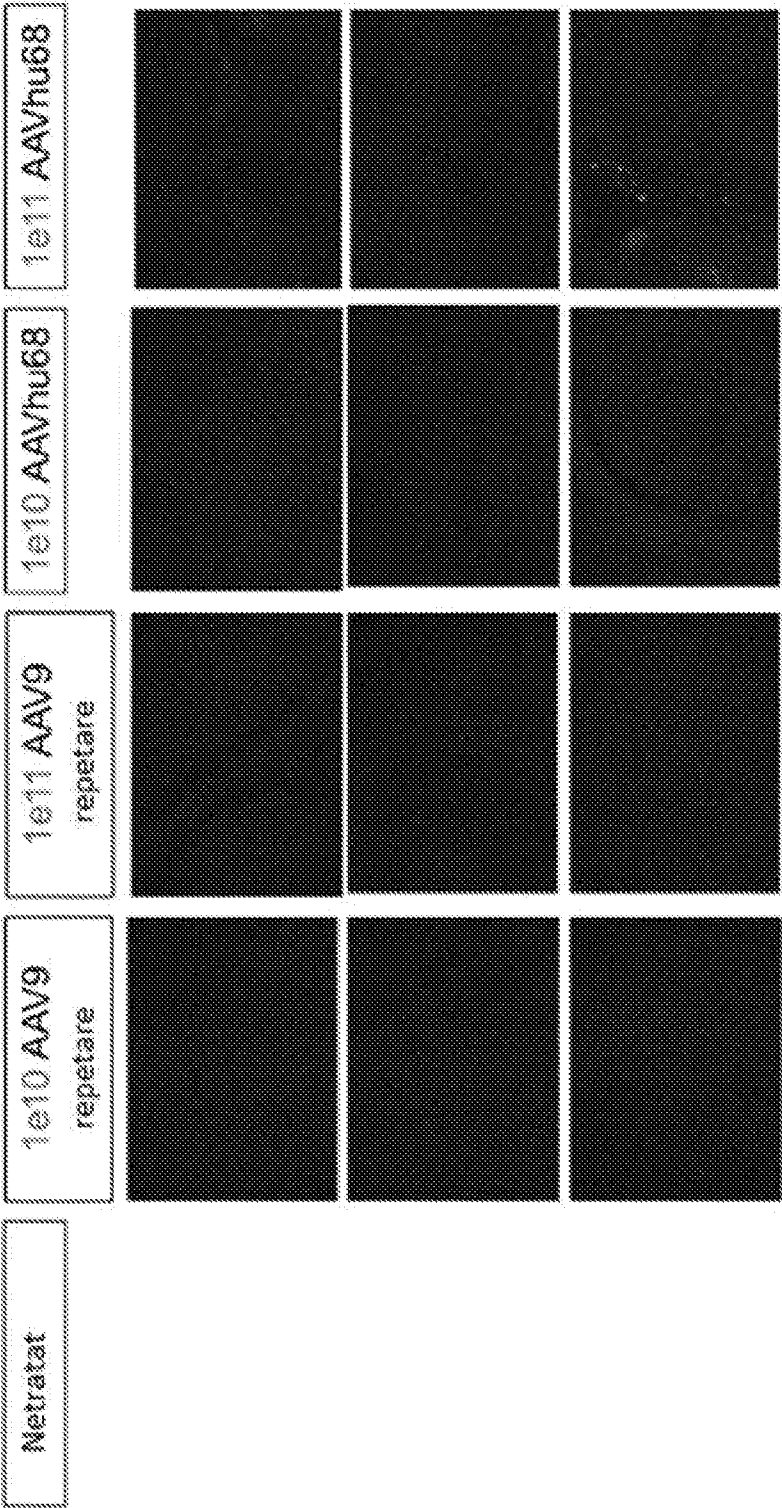
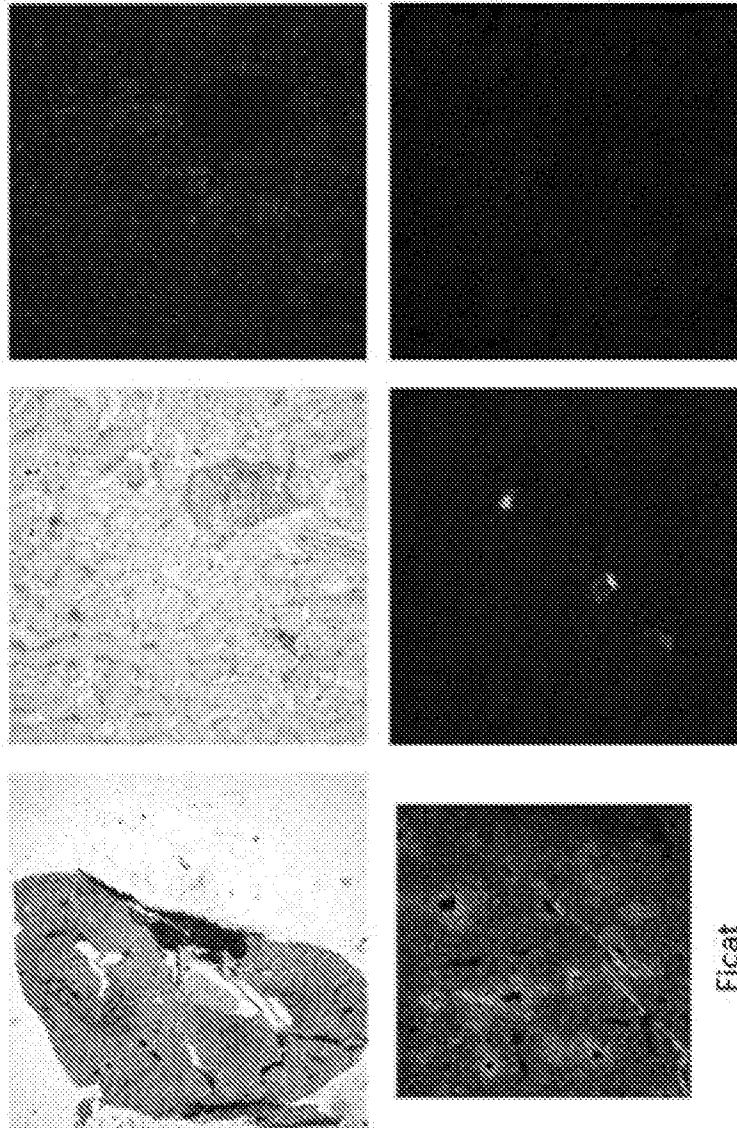


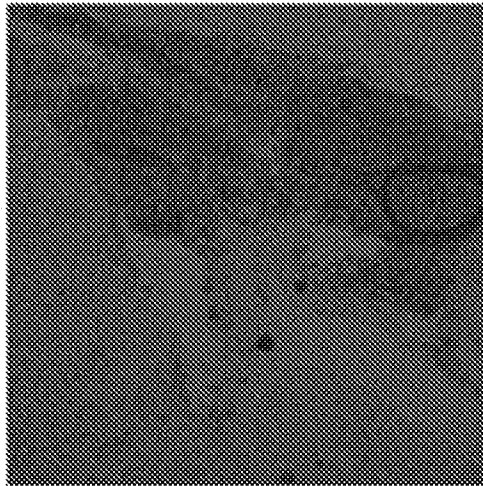
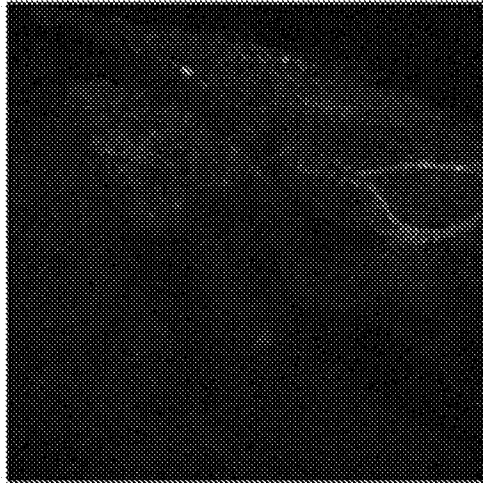
FIG. 6A



Ficat

FIG. 6B

Rinichi



Inimă

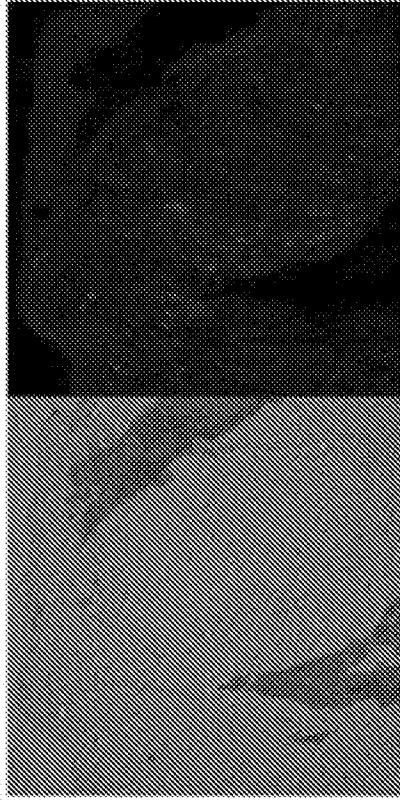


FIG. 6C

Pancreas

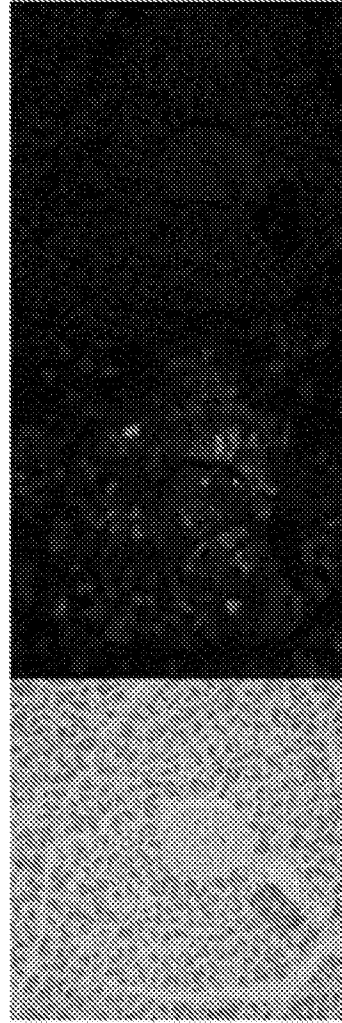


FIG. 6D

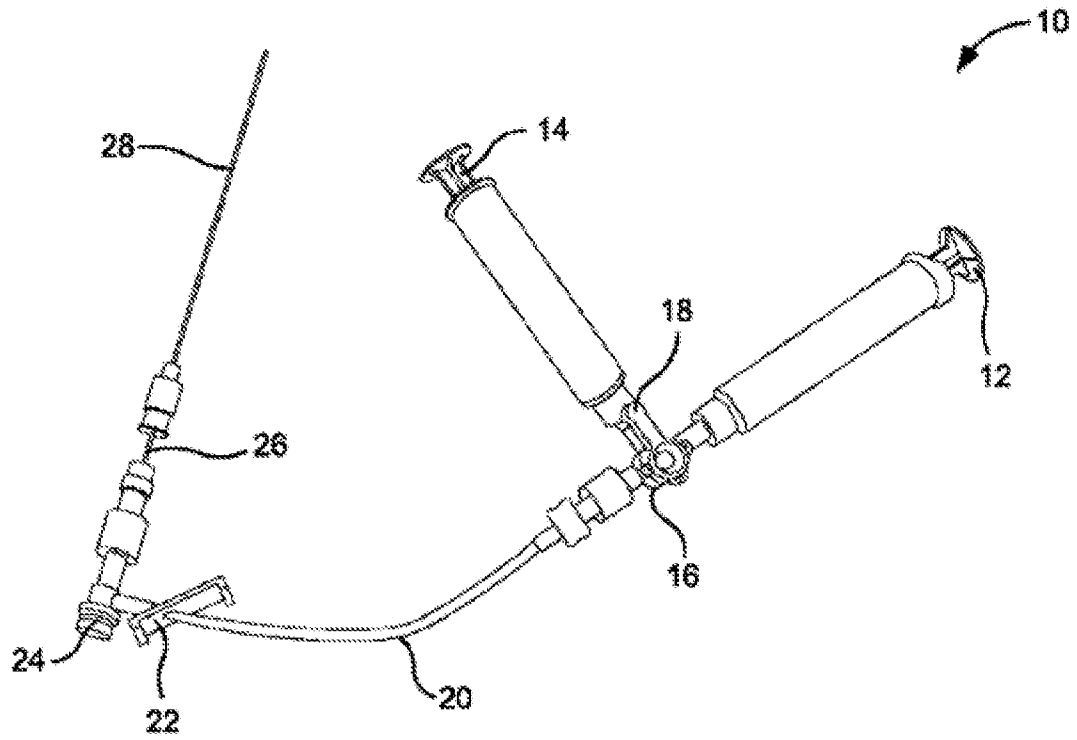


FIG 7

FIG. 8A

Randomentul Preparatelor la Scară Mică
(CMV.βLuciferază.SV40)

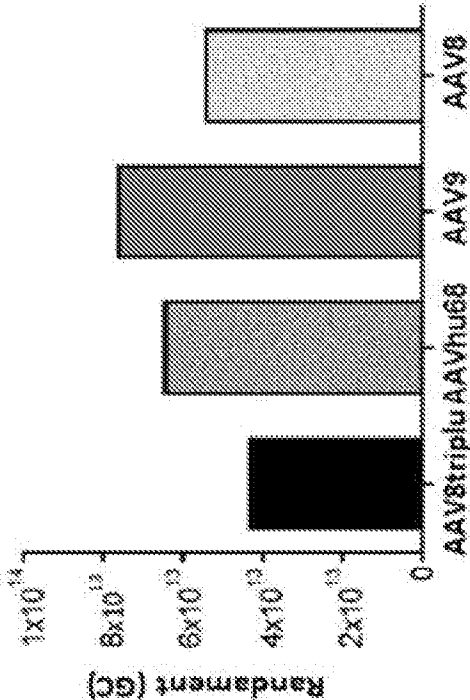


FIG. 8B

Randomentul Preparatelor la Scară Mega
(CMV.PI201lg IA.SV40)

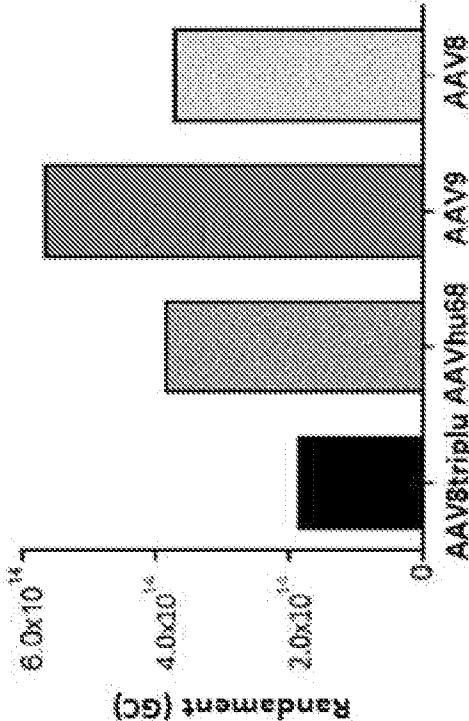


FIG. 9

Puritatea Preparatelor la Scară Mega

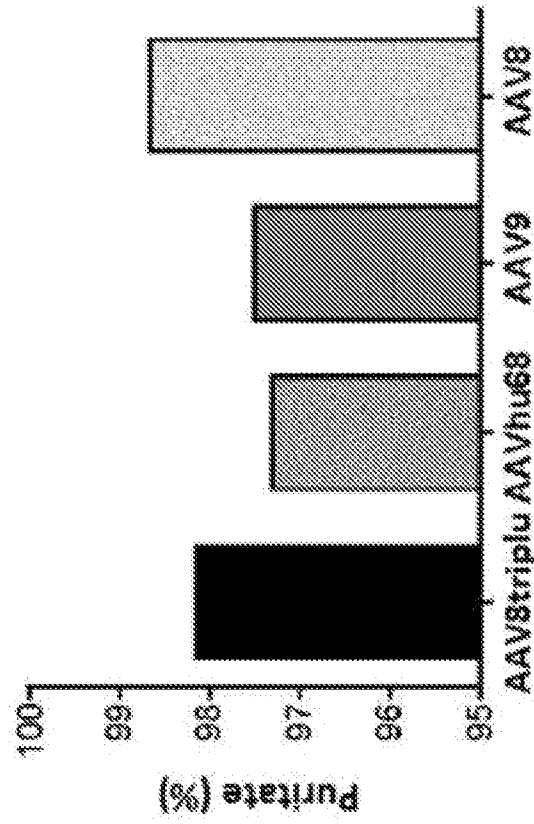


FIG. 10A

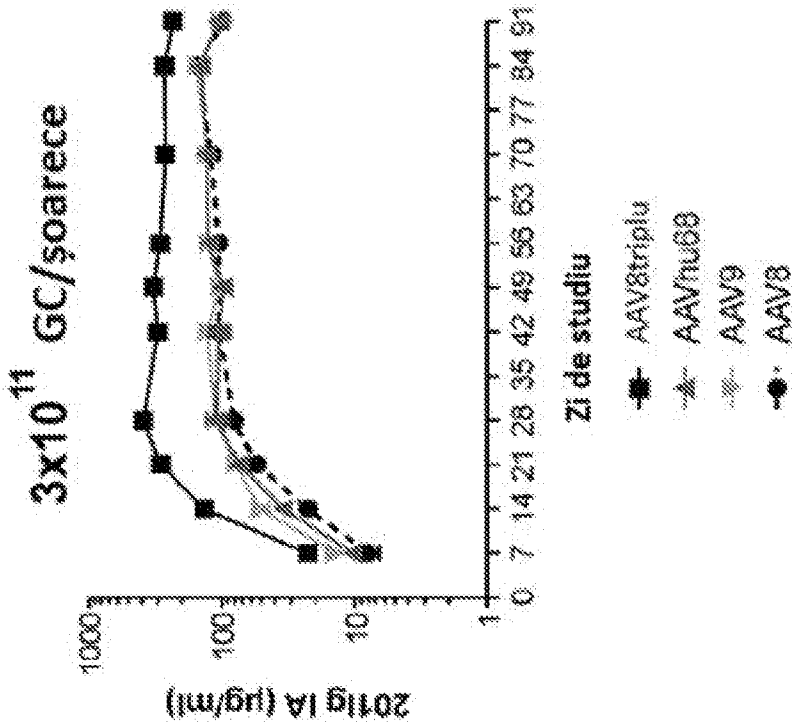


FIG. 10B

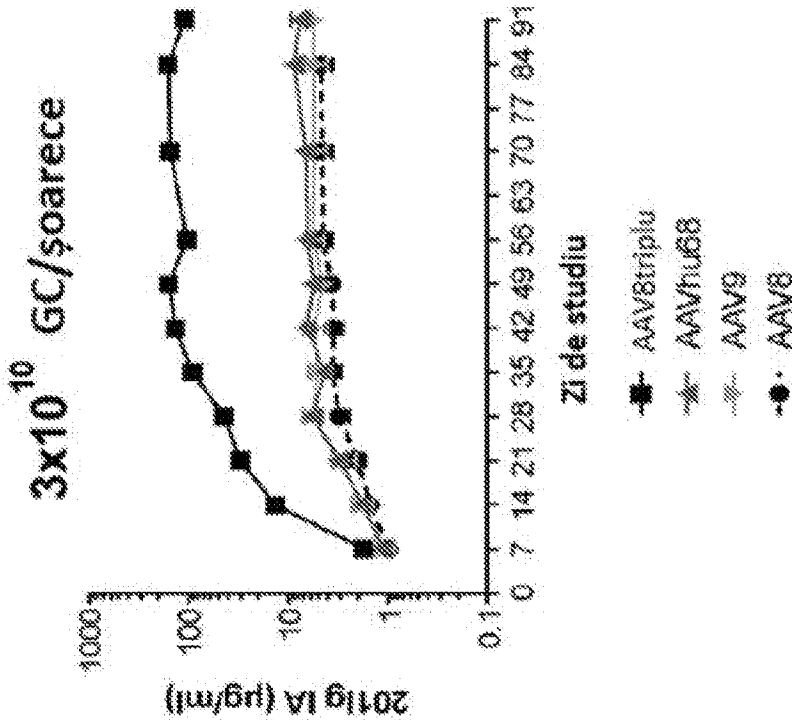


FIG. 11B

Mușchi

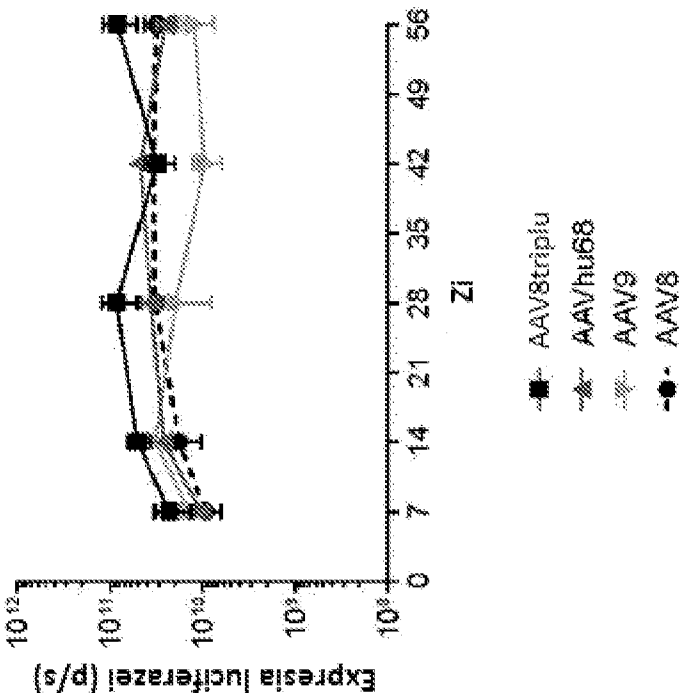


FIG. 11A

Ficat

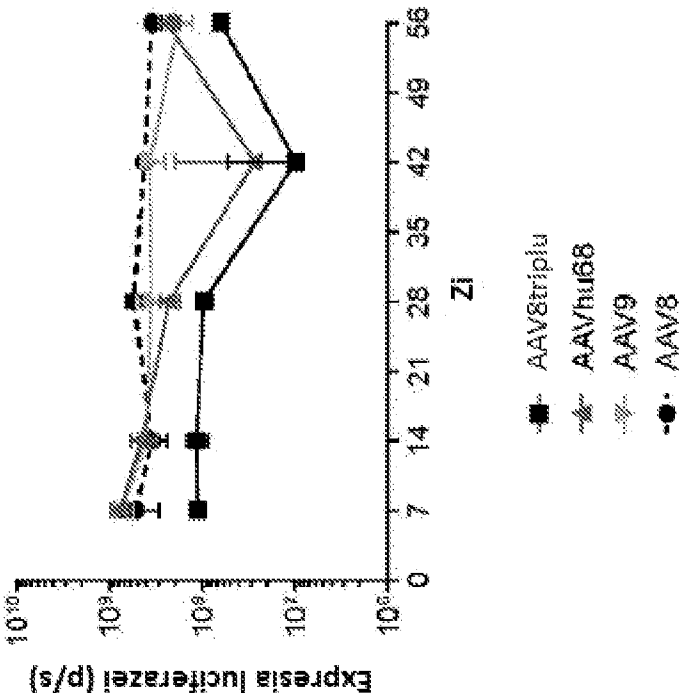


FIG 12

