



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 48/00 (2021.05); A61K 48/005 (2021.05); A61K 48/0075 (2021.05); A61P 1/16 (2021.05); A61P 11/12 (2021.05); A61P 27/02 (2021.05); A61P 3/00 (2021.05); A61P 3/08 (2021.05); A61P 7/04 (2021.05); C07K 14/005 (2021.05); C12N 15/09 (2021.05); C12N 15/102 (2021.05); C12N 15/63 (2021.05); C12N 15/64 (2021.05); C12N 15/66 (2021.05); C12N 2310/531 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2018134295, 03.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.03.2017

Дата регистрации:
11.08.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

03.03.2016 US 62/303,047;

14.09.2016 US 62/394,720;

11.10.2016 US 62/406,913

(43) Дата публикации заявки: 06.04.2020 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 11.08.2021 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 03.10.2018

(86) Заявка РСТ:

US 2017/020828 (03.03.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2017/152149 (08.09.2017)

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский бульвар, 11,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.",
О.В.Строковой

(72) Автор(ы):

КОТИН, Роберт, М. (US),

СЕККИНИ, Сильвейн (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЮНИВЕРСИТИ ОФ МАССАЧУСЕТС
(US),

ВОЯДЖЕ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: WO 2012123430 A1 20.09.2012. A. B.

Hickman, D. R Ronning, Z. N. Perez, R. M. Kotin,

F.Dyda "The Nuclease Domain of Adeno-

Associated Virus Rep Coordinates Replication

Initiation Using Two Distinct DNA Recognition

Interfaces" Mol Cell., 2004 13;13(3):403-14. doi:

10.1016/s1097-2765(04)00023-1. Тарантул В.З.

Толковый биотехнологический словарь. (см.
прод.)

(54) ЛИНЕЙНАЯ ДУПЛЕКСНАЯ ДНК С ЗАКРЫТЫМ КОНЦОМ ДЛЯ НЕВИРУСНОГО ПЕРЕНОСА
ГЕНОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описана группа изобретений, включающая линейную дуплексную ДНК с закрытым концом (ceDNA) для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты, композицию для доставки гетерологичной ceDNA

субъекту, клетку-хозяин для доставки гетерологичной ceDNA субъекту, способ доставки гетерологичной ceDNA в клетку млекопитающего, способ доставки гетерологичной ceDNA субъекту, где способ включает доставку субъекту ceDNA и доставка ceDNA не приводит к иммунному ответу

против ceDNA у субъекта, способ доставки ceDNA субъекту, где способ включает доставку клетки-хозяина и способ получения ceDNA. В одном из вариантов реализации ceDNA содержит вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, где

указанная вставка фланкирована по меньшей мере двумя последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). 7 н. и 38 з.п. ф-лы, 19 ил., 7 пр.

(56) (продолжение):

Русско-английский. М.: Языки славянских культур, 2009 - 936 с., стр. 470.

R U 2 7 5 2 8 8 2 C 2

R U 2 7 5 2 8 8 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)*C12N 15/09* (2006.01)*C12N 15/64* (2006.01)*C12N 15/66* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 48/00 (2021.05); *A61K 48/005* (2021.05); *A61K 48/0075* (2021.05); *A61P 1/16* (2021.05); *A61P 11/12* (2021.05); *A61P 27/02* (2021.05); *A61P 3/00* (2021.05); *A61P 3/08* (2021.05); *A61P 7/04* (2021.05); *C07K 14/005* (2021.05); *C12N 15/09* (2021.05); *C12N 15/102* (2021.05); *C12N 15/63* (2021.05); *C12N 15/64* (2021.05); *C12N 15/66* (2021.05); *C12N 2310/531* (2021.05)

(21)(22) Application: **2018134295**, 03.03.2017(24) Effective date for property rights:
03.03.2017Registration date:
11.08.2021

Priority:

(30) Convention priority:
03.03.2016 US 62/303,047;
14.09.2016 US 62/394,720;
11.10.2016 US 62/406,913(43) Application published: **06.04.2020** Bull. № 10(45) Date of publication: **11.08.2021** Bull. № 23(85) Commencement of national phase: **03.10.2018**(86) PCT application:
US 2017/020828 (03.03.2017)(87) PCT publication:
WO 2017/152149 (08.09.2017)Mail address:
**119019, Moskva, Gogolevskij bulvar, 11, "Gouling
VLG (Interneshnl) Ink.", O.V.Strokovoj**

(72) Inventor(s):

**KOTIN, Robert, M. (US),
SEKKINI, Silvejn (US)**

(73) Proprietor(s):

**YUNIVERSITI OF MASSACHUSETTS (US),
VOYADZHE THERAPYUTIKS, INK. (US)**(54) **CLOSED-END LINEAR DUPLEX DNA FOR NON-VIRAL GENE TRANSFER**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions is described, including closed-end linear duplex DNA (hereinafter – ceDNA) for the delivery of heterologous nucleic acid, a composition for the delivery of heterologous ceDNA to a subject, a host cell for the delivery of heterologous ceDNA to a subject, a method for the delivery of heterologous ceDNA to a mammalian cell, a method for the delivery of heterologous ceDNA to a subject,

where the method involves the delivery of ceDNA to a subject, and the delivery of ceDNA does not lead to an immune response against ceDNA in the subject, a method for the delivery of ceDNA to a subject, where the method includes the delivery of the host cell and the method for obtaining ceDNA. In one implementation, ceDNA contains an insert of heterologous nucleic acid, where the specified insert is flanked by at least two sequences of inverted terminal

repeats (ITR) of the adeno-associated virus (AAV).
EFFECT: obtaining closed-end linear duplex DNA

for non-viral gene transfer.
45 cl, 19 dwg, 7 ex

R U 2 7 5 2 8 8 2 C 2

R U 2 7 5 2 8 8 2 C 2

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В настоящей Заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C.119(e) по дате подачи предварительной заявки США с серийными номерами 62/303,047, поданной 3 марта 2016 года, озаглавленной «ЛИНЕЙНАЯ ДУПЛЕКСНАЯ ДНК С ЗАКРЫТЫМ КОНЦОМ ДЛЯ НЕВИРУСНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ», 62/394,720, поданной 14 сентября 2016 года, озаглавленной «ЛИНЕЙНАЯ ДУПЛЕКСНАЯ ДНК С ЗАКРЫТЫМ КОНЦОМ ДЛЯ НЕВИРУСНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ» и 62/406,913, поданной 11 октября 2016 года, озаглавленной «ЛИНЕЙНАЯ ДУПЛЕКСНАЯ ДНК С ЗАКРЫТЫМ КОНЦОМ ДЛЯ НЕВИРУСНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ». Полное содержание каждой ссылочной заявки включено в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Существующие векторы для доставки генов имеют несколько недостатков. Полученные как из вирусов, так и бактерий векторы для доставки генов могут индуцировать врожденные и адаптивные иммунные ответы пациента. Например, векторы плазмидной ДНК (пДНК) и миникольцевой ДНК (мДНК), как правило, имеют прокариотические структуры метилирования ДНК, которых нет в случае эукариотической ДНК. Кроме того, липополисахариды (LPS) и другие молекулы, полученные из бактерий, распознаются в клетках позвоночных с помощью рецептора распознавания структур (PRR) врожденного иммунного ответа как ассоциированные с патогенами молекулярные структуры (PAMP), что приводит к активации клеточных генов в ответ на инвазивный микробный патоген. Плазмидная ДНК конформационно является уникально бактериальной; наиболее близкой структурой млекопитающих является митохондриальный геном или дуплексная кольцевая ДНК, которая изолирована в органелле и не подвергается воздействию цитозольных PRR. В другом примере рекомбинантные адено-ассоциированные вирусы (rAAV) могут индуцировать Т-клеточный ответ на процессированные капсидные антигены или нейтрализоваться циркулирующими иммуноглобулинами и не-Ig гликопротеинами. Вирусные векторы также имеют ограниченную пропускную способность трансгенов и являются трудными, дорогостоящими и трудоемкими при производстве. Соответственно, необходимы улучшенные композиции и способы доставки генов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах изобретение относится к обнаружению того, что репликация нуклеиновых кислот, кодирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную некоторыми типами асимметричных концов (напр., асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей), приводит к ковалентной связи асимметричных концов (напр., асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей) и приводит к получению новой конформации линейной дуплексной ДНК с закрытым концом (зкДНК, ceDNA). В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, имеющие асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, могут быть легко получены (напр., в больших количествах), избегая при этом проблем с увеличением объемов производства, которые связаны с другими векторами для генной терапии (напр., векторами на основе вирусов). Этот результат является неожиданным с точки зрения сообщений о том, что во внутренней палиндромной области требуется симметрия для целей распространения подобных нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, имеющие асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, как

раскрывается в настоящем документе, могут иметь улучшенную генетическую стабильность по сравнению с другими векторами для генной терапии (напр., нуклеиновыми кислотами, имеющими симметричные прерываемые самокомплементарные последовательности). В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, имеющие асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, как раскрывается в настоящем документе, могут иметь улучшенные профили безопасности по сравнению с другими векторами (напр., нуклеиновыми кислотами, имеющими симметричные прерываемые самокомплементарные последовательности). Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения введение нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, может с меньшей вероятностью приводить к инсерционному мутагенезу по сравнению с другими векторами (напр., нуклеиновыми кислотами с симметричными прерываемыми самокомплементарными последовательностями) из-за асимметричности конструкции.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, имеющие асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, которые сконструированы для экспрессии транскрипта (напр., транскрипта, кодирующего белок или функциональную нуклеиновую кислоту), могут иметь улучшенную экспрессию по сравнению с другими векторами (напр., нуклеиновыми кислотами, имеющими симметричные прерываемые самокомплементарные последовательности), поскольку асимметричный характер конструкций делает их менее подходящими для взаимодействия в клетках с определенными ферментами (напр., геликазами, такими как геликазы RecQ), которые могут уменьшить транскрипционную способность таких векторов.

В некоторых вариантах выполнения изобретения введение нуклеиновой кислоты, имеющей асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, как описано в настоящем документе, менее вероятно индуцирует иммунный ответ у субъекта по сравнению с введением других векторов для генной терапии (напр., векторов плазмидной ДНК и вирусных векторов). Поэтому в некоторых вариантах выполнения изобретения описанную здесь нуклеиновую кислоту можно вводить субъекту несколько раз (напр., в контексте долгосрочной генной терапии), не вызывая существенного иммунного ответа, который бы предотвращал или ингибировал экспрессию и/или активность генного продукта, кодируемого нуклеиновой кислотой.

В некоторых аспектах изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную по меньшей мере одной прерываемой самокомплементарной последовательностью, причем каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного концевоего разрешения и связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона, где самокомплементарная последовательность прерывается поперечной последовательностью, образующей две противоположные продольно-симметричные «петли-на-стебле», каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной в диапазоне от 5 до 15 пар оснований и часть «петля», имеющей от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов.

В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемые самокомплементарные последовательности получают из одного или нескольких организмов или вирусных серотипов, включая парвовирусы, депендоввирусы и т.д. Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота содержит первую прерываемую самокомплементарную последовательность, полученную из серотипа AAV2, и вторую прерываемую самокомплементарную последовательность, полученную из серотипа

AAV9. В другом неограничивающем примере нуклеиновая кислота, как описано здесь, может содержать первую прерванную самокомплементарную последовательность из серотипа AAV2 и вторую прерванную самокомплементарную последовательность из парвовируса (напр., парвовируса В19). В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемые самокомплементарные последовательности получают из одного и того же организма или вирусного серотипа, но они имеют разную длину или комбинации вышеизложенного. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота содержит вторую прерываемую самокомплементарную последовательность, которая прерывается усеченной поперечной последовательностью. Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота содержит первую саморасщепленную самокомплементарную последовательность, полученную из серотипа AAV2, которая составляет 145 пар оснований в длину, а вторая прерываемая самокомплементарная последовательность, полученная из серотипа AAV2, короче, чем 145 пар оснований в длину (напр., усеченная поперечная последовательность).

В некоторых аспектах изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную прерываемыми самокомплементарными последовательностями, причем каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного концевоего разрешения и связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона, где одна самокомплементарная последовательность прерывается поперечной последовательностью, образующей две противоположные продольно-симметричные «петли-на-стебле», каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной в диапазоне от 5 до 15 пар оснований и часть «петля», имеющую от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов, где другая самокомплементарная последовательность прерывается усеченной поперечной последовательностью.

В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемая самокомплементарная последовательность(и) имеет длину в диапазоне от 40 до 1000 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемая самокомплементарная последовательность(и) имеет длину в диапазоне от 100 до 160 нуклеотидов.

В некоторых вариантах выполнения изобретения поперечная последовательность имеет свободную энергию Гиббса (ΔG) разворачивания в физиологических условиях в диапазоне от -12 ккал/моль до -30 ккал/моль. В некоторых вариантах выполнения изобретения поперечная последовательность имеет свободную энергию Гиббса (ΔG) разворачивания в физиологических условиях в диапазоне от -20 ккал/моль до -25 ккал/моль.

В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной в диапазоне от 3 до 15 пар оснований. В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной в диапазоне от 8 до 10 пар оснований.

В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая часть «петля» имеет от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая часть «петля» имеет три дезоксирибонуклеотида.

В некоторых вариантах выполнения изобретения одна часть «петля» имеет три дезокситимидина, а другая часть «петля» имеет три дезоксиаденозина.

В некоторых вариантах выполнения изобретения связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона представляет собой

связывающий Rep элемент (RBE). В некоторых вариантах выполнения изобретения RBE содержит последовательность 5'-GCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах выполнения изобретения оперативный сайт концевой разрешения содержит последовательность 5'-TT-3'. В некоторых вариантах выполнения изобретения 3'-конец оперативного сайта концевой разрешения имеет от 15 до 25 нуклеотидов из 5'-конца связывающего элемента репликационного белка по типу разматывающегося рулона.

В некоторых вариантах выполнения изобретения усеченная поперечная последовательность образует две противоположные продольно-асимметричные «петли-на-стебле». В некоторых вариантах выполнения изобретения одна из противоположных продольно-асимметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной в диапазоне от 8 до 10 пар оснований и часть «петля», имеющую от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения одна продольно-асимметричная «петля-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной менее 8 пар оснований и часть «петля», имеющую от 2 до 5 дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения одна продольно-асимметричная «петля-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной менее 3 пар оснований. В некоторых вариантах выполнения изобретения односегментные асимметричные «петли-на-стебле» имеют часть «петля», имеющую 3 или более дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения усеченная поперечная последовательность имеет свободную энергию Гиббса (ΔG) разворачивания в физиологических условиях в диапазоне от 0 ккал/моль до -22 ккал/моль.

В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты сконструирована для экспрессии белка или функциональной РНК. В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты представляет собой беспромоторную конструкцию в качестве субстрата для редактирования генов. В некоторых вариантах выполнения изобретения беспромоторная конструкция обеспечивает субстрат для TALENS, нуклеаз с цинковыми пальцами (ZFN), мегануклеаз, Cas9 и других редактирующих гены белков. В некоторых вариантах выполнения изобретения беспромоторная конструкция фланкирована нуклеиновой кислотой с гомологией к клеточной ДНК для промотирования гомологичной рекомбинации в геном клетки. В некоторых вариантах выполнения изобретения конструкция фланкирована нуклеиновой кислотой с гомологией к клеточной ДНК для промотирования гомологичной рекомбинации в геном клетки.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота имеет длину в диапазоне от 500 до 50000 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота имеет длину в диапазоне от 500 до 10000 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота имеет длину в диапазоне от 1000 до 10000 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота имеет длину в диапазоне от 500 до 5000 нуклеотидов.

В некоторых аспектах изобретение относится к композиции, содержащей множество нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах выполнения изобретения множество нуклеиновых кислот соединено конец-с-концом. В некоторых аспектах изобретение относится к композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых аспектах изобретение относится к композиции, содержащей: мономерную нуклеиновую кислоту, содержащую одну субъединицу; и по меньшей мере одну мультимерную нуклеиновую кислоту, содержащую две или более субъединицы,

где каждая субъединица мономерной нуклеиновой кислоты и по меньшей мере одной мультимерной нуклеиновой кислоты содержит вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную прерываемыми самокомплементарными последовательностями, каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного концевое разрешения и связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона, причем одна самокомплементарная последовательность прерывается поперечной последовательностью с образованием двух противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле», а другая самокомплементарная последовательность прерывается усеченной поперечной последовательностью. В некоторых вариантах выполнения изобретения каждый мультимер имеет по меньшей мере один, а в некоторых случаях только один, самокомплементарный конечный палиндром.

В некоторых вариантах выполнения изобретения по меньшей мере одна мультимерная нуклеиновая кислота представляет собой две субъединицы. В некоторых вариантах выполнения изобретения многомерная нуклеиновая кислота имеет не более двух субъединиц. В некоторых вариантах выполнения изобретения две субъединицы связаны в конфигурации «хвост-к-хвосту», или конфигурации «голова-к-голове», или конфигурации «голова-к-хвосту».

В некоторых аспектах изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах выполнения изобретения клетка-хозяин дополнительно содержит репликационный белок по типу разматывающегося рулона, который избирательно связывается со связывающим элементом репликационного белка по типу разматывающегося рулона нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах выполнения изобретения относится к способу доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку, где способ включает доставку в клетку нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты субъекту, где способ включает доставку субъекту нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, где доставка нуклеиновой кислоты не приводит к вызыванию приобретенного иммунного ответа на нуклеиновую кислоту у субъекта. В некоторых вариантах выполнения изобретения иммунный ответ представляет собой гуморальный ответ. В некоторых вариантах выполнения изобретения иммунный ответ представляет собой клеточный ответ.

В некоторых вариантах выполнения изобретения гетерологичная нуклеиновая кислота доставляется субъекту многократно. В некоторых вариантах выполнения изобретения количество случаев, когда гетерологичная нуклеиновая кислота доставляется (напр., вводится) субъекту, находится в диапазоне от 2 до 10 раз. В некоторых вариантах выполнения изобретения количество случаев, когда гетерологичная нуклеиновая кислота доставляется субъекту, представляет собой введение еже часно, ежедневно, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, раз в полгода или ежегодно. В некоторых вариантах выполнения изобретения количество случаев, когда гетерологичная нуклеиновая кислота доставляется субъекту, представляет собой количество случаев, необходимых для поддержания клинической (напр., терапевтической) пользы.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты субъекту, где способ включает доставку клетки-хозяина субъекту, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах выполнения изобретения

клетка-хозяин представляет собой клетку крови. В некоторых вариантах выполнения изобретения клетка-хозяин является клеткой-предшественником (напр., гемопоэтической стволовой клеткой, HSC), миелоидной или лимфоидной клеткой. В некоторых вариантах выполнения изобретения клетка-хозяин доставляется многократно. В некоторых вариантах выполнения изобретения частота, с которой клетка-хозяин доставляется многократно, определяется периодом полужизни клетки-хозяина. В некоторых вариантах выполнения изобретения клетка-хозяин доставляется многократно для достижения (напр., достижения и поддержания) терапевтического эффекта.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу получения нуклеиновых кислот, где способ включает: (i) введение в пермиссивную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированной по меньшей мере одной прерываемой самокомплементарной последовательностью, причем каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного конечного разрешения и связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона, причем самокомплементарная последовательность прерывается поперечной последовательностью с образованием двух противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле», причем каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной в диапазоне от 5 до 15 пар оснований и часть «петля», имеющую от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов; и (ii) поддержание пермиссивной клетки в условиях, в которых репликационный белок по типу разматывающегося рулона в пермиссивной клетке инициирует производство множественных копий нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах выполнения изобретения способ дополнительно включает стадию очистки множественных копий нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах выполнения изобретения очистка включает приведение в контакт нуклеиновой кислоты с силикагелевой смолой.

В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационный белок по типу разматывающегося рулона выбирается из группы, состоящей из AAV Rep 78, AAV Rep 52, AAV Rep68 и AAV Rep 40 дикого типа. В некоторых вариантах выполнения изобретения набор репликационных белков по типу разматывающегося рулона включает по меньшей мере один из AAV Rep 78 и AAV Rep 68 и один из AAV Rep 52 и AAV Rep 40. В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационные белки по типу разматывающегося рулона являются функционально эквивалентными производными белков AAV Rep дикого типа, включая усеченные белки или слитые белки.

В некоторых вариантах выполнения изобретения пермиссивная клетка не является клеткой млекопитающего. В некоторых вариантах выполнения изобретения пермиссивная клетка представляет собой линию клеток насекомого или других беспозвоночных, линию клеток дрожжей или линию клеток бактерий. В некоторых вариантах выполнения изобретения пермиссивная клетка, используется для производства, напр., личинки *Spodoptera frugiperda*. В некоторых вариантах выполнения изобретения вкрапленный рекомбинантный множественный нуклеополиэдрозный вирус *Autographa californica* (AcMNPV) используется для инфицирования личинок *S. frugiperda* для производства рекомбинантного белка, например, при текущей надлежащей производственной практике (cGMP) для производства белка у личинок.

В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационный белок по типу разматывающегося рулона кодируется вектором вируса-помощника, необязательно где вектор вируса-помощника представляет собой вектор множественного нуклеополиэдрозного вируса *Autographa californica* (AcMNPV) или векторы экспрессии

бакуловируса (BEV).

В некоторых аспектах изобретение относится к способу получения нуклеиновых кислот, где способ включает введение в пермиссивную клетку нуклеиновой кислоты, содержащей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную прерываемыми самокомплементарными последовательностями, причем каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного концевой
 5 разрешения и связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона, где одна самокомплементарная последовательность прерывается поперечной последовательностью с образованием двух противоположных продольно-симметричных
 10 «петель-на-стебле», причем другая самокомплементарная последовательность прерывается усеченной поперечной последовательностью, где пермиссивная клетка экспрессирует репликационный белок по типу разматывающегося рулона, но не экспрессирует вирусные капсидные белки, способные упаковывать репликативные копии нуклеиновой кислоты в вирусную частицу; и поддержание пермиссивной клетки
 15 в условиях, в которых репликационный белок по типу разматывающегося рулона в пермиссивной клетке реплицирует нуклеиновую кислоту.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу получения нуклеиновых кислот, где способ включает введение в пермиссивную клетку нуклеиновой кислоты, содержащей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную прерываемыми самокомплементарными последовательностями, причем каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного концевой
 20 разрешения и репликационный белок по типу разматывающегося рулона, где одна самокомплементарная последовательность была определена как прерываемая поперечной последовательностью с образованием двух противоположных продольно-
 25 симметричных «петель-на-стебле», где другая самокомплементарная последовательность была определена как прерываемая усеченной поперечной последовательностью, где пермиссивная клетка экспрессирует репликационный белок по типу разматывающегося рулона, но не экспрессирует вирусные капсидные белки, способные упаковывать репликативные копии нуклеиновой кислоты в вирусную частицу; и поддержание
 30 пермиссивной клетки в условиях, в которых репликационный белок по типу разматывающегося рулона в пермиссивной клетке реплицирует нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах выполнения изобретения способ дополнительно включает: выделение реплицированной нуклеиновой кислоты из пермиссивной клетки.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу анализа нуклеиновой
 35 кислоты, включающему: получение состава нуклеиновой кислоты, содержащего продукты репликации нуклеиновой кислоты, выделенные из пермиссивной клетки, где пермиссивная клетка содержит нуклеиновую кислоту, содержащую вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную прерываемыми самокомплементарными последовательностями, где каждая самокомплементарная
 40 последовательность имеет сайт оперативного концевой разрешения и связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона, где одна самокомплементарная последовательность прерывается поперечной последовательностью с образованием двух противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле», где другая самокомплементарная последовательность прерывается
 45 усеченной поперечной последовательностью, где пермиссивная клетка экспрессирует репликационный белок по типу разматывающегося рулона, но не экспрессирует вирусные капсидные белки, способные упаковывать репликативные копии нуклеиновой кислоты в вирусную частицу, и где репликационный белок по типу разматывающегося

рулона связывается со связывающим элементом репликационного белка по типу разматывающегося рулона нуклеиновой кислоты и реплицирует нуклеиновую кислоту с получением продуктов репликации нуклеиновой кислоты; и определение физико-химического свойства одного или нескольких продуктов репликации.

5 В некоторых вариантах выполнения изобретения физико-химическое свойство представляет собой нуклеотидную последовательность одной или каждой самокомплементарной последовательности.

В некоторых вариантах выполнения изобретения физико-химическое свойство представляет собой степень мультимеризации одного или нескольких продуктов
10 репликации. В некоторых вариантах выполнения изобретения физико-химическое свойство представляет собой стехиометрию мономерных и/или мультимерных форм продукта репликации в препарате нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах выполнения изобретения физико-химическое свойство представляет собой восприимчивость одного или нескольких продуктов репликации к
15 перевариванию рестрикционной эндонуклеазой.

В некоторых вариантах выполнения изобретения физико-химическое свойство представляет собой полярность мономеров в димерной форме продукта репликации, где полярность представляет собой полярность «голова-к-голове», «голова-к-хвосту» или «хвост-к-хвосту».

В некоторых вариантах выполнения изобретения физико-химическое свойство представляет собой молекулярную массу одного или нескольких продуктов репликации или фрагмента продукта репликации. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулярная масса представляет собой молекулярную массу фрагмента одного или
20 более продуктов репликации, который содержит одну или каждую самокомплементарную последовательность. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулярная масса определяется на основе электрофоретической подвижности. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулярная масса определяется на основе масс-спектропии.

В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулярная масса представляет собой молекулярную массу фрагмента одного или более продуктов репликации и где
30 до определения молекулярной массы фрагмент амплифицируют реакцией, включающей удлинение праймера с помощью полимеразы. В некоторых вариантах выполнения изобретения реакция, включающая удлинение праймера, представляет собой полимеразную цепную реакцию.

35 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГ. 1А показана теоретическая вторичная структура AAV2 ITR, основанная на максимизации стабильности и уменьшении свободной энергии Гиббса (ΔG , отрицательные значения указывают на спонтанное образование). На ФИГ. 1В показаны несколько неограничивающих примеров усечений в стеблевой области AAV2 ITR,
40 которые приводят к образованию молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей асимметричные концы.

На ФИГ. 2А-2В показаны представления симметричных и асимметричных молекул открытого дуплекса ДНК и с закрытым концом (зкДНК). На ФИГ. 2А показаны несколько неограничивающих примеров нуклеиновых кислот, имеющих симметричные
45 концы (в левой рамке) и несколько неограничивающих примеров нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные концы (напр., зкДНК) (в правой рамке). На ФИГ. 2В показаны асимметричные концевые области, индуцирующие изменение одноцепочечного разрыва нуклеиновой кислоты и разделение нитей, индуцированное во время репликации вируса,

что приводит к образованию замкнутых дуплексных молекул ДНК (справа).

На ФИГ. 3 показано графическое изображение пары асимметричных ITR. Наверху показана полноразмерная AAV2 ITR, а внизу показана AAV2 ITR, имеющая усечение в С-стебеле. Как полноразмерный, так и усеченный ITR содержат оперативный

связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного концевоего разрешения (trs).

На ФИГ. 4 показаны неограничивающие примеры конструкций нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные самокомплементарные последовательности нуклеиновых кислот (напр., AAV2 ITR) и трансген, ассоциированный с глазным заболеванием.

На ФИГ. 5 показаны неограничивающие примеры конструкций нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные самокомплементарные последовательности нуклеиновой кислоты (напр., AAV2 ITR) и трансген, ассоциированный с заболеванием крови.

На ФИГ. 6 показаны неограничивающие примеры конструкций нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные самокомплементарные последовательности нуклеиновой кислоты (напр., AAV2 ITR) и трансген, ассоциированный с заболеванием печени.

На ФИГ. 7 показаны неограничивающие примеры конструкций нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные самокомплементарные последовательности нуклеиновой кислоты (напр., AAV2 ITR) и трансген, ассоциированный с болезнью легких.

На ФИГ. 8А-8D показана доставка зкДНК в глаз. Взрослых мышей анестезировали Кетамин/Ксилазином (100/10 мг/кг), и трансфекционный агент доставляли

интравитреально путем трансклеральной инъекции в объеме 1-2 мкл. Антибиотическую мазь наносили на роговицу для того, чтобы предотвратить высыхание глаз, пока мышь восстанавливалась. Мыши позволяли восстанавливаться при 37 градусах, и затем помещали обратно в клетку для мыши на 2 недели, и подвергали эвтаназии асфиксией CO₂. Сетчатку рассекали и переносили на плоскую поверхность или секцию. Для

обнаружения трансфецированных клеток не требуется окрашивание антител GFP. На ФИГ. 8А показана плоская поверхность флуоресценции GFP на сетчатке мыши. На ФИГ. 8В показана флуоресценция GFP в поперечном сечении сетчатки. На ФИГ. 8С показана флуоресценция GFP и окрашивание глиальных клеток в поперечном сечении сетчатки. На ФИГ. 8D показана флуоресценция GFP в сетчатке мыши после доставки зкДНК (напр., зкДНК, имеющей асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности) с помощью субретинальной электропорации (сверху) и интравитреальной инъекции (снизу).

На ФИГ. 9А-9С показана внутричерепная инъекция зкДНК-GFP (напр., зкДНК, имеющей асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности и кодирующей GFP), объединенная с *in vivo* jetPEI, в стриатум крысы. На ФИГ. 9А показано окрашивание для экспрессии GFP через 3 нед. и 20 нед. после инъекции; аналогичная экспрессия GFP была замечена в 3 нед. и 20 нед. На ФИГ. 9В и 9С показана иммуногистохимия (ИНС) с антителами (Ab) против Iba1 (ФИГ. 9В) и МНСII (ФИГ. 9С); в 3 нед. в отделах головного мозга не было обнаружено МНСII или антигена Iba1.

На ФИГ. 10А-10В показаны результаты анализа последовательности самокомплементарных последовательностей, прерываемых плазмидной ДНК. На ФИГ. 10С показано электрофоретическое разделение зкДНК-GFP на агарозном геле. В левой части фигуры показан исходный гель-электрофорез неразрезанного зкДНК-GFP и переваренного XhoI зкДНК-GFP. В исходном геле наблюдаются мономерные (~ 2,1 кб) и димерные (~ 4,1 кб) конформерные продукты; концевой фрагмент 0,4 затенен флуоресценцией примесей на дне геля. В правой части фигуры показан денатурационный гель-электрофорез неразрезанного зкДНК-GFP и переваренного XhoI зкДНК-GFP. Димерный (~ 4,1 кб) конформерный продукт наблюдается в денатурационном

геле; также наблюдались продукты с денатурированным концом 0,4 кб, которые определяются как одноцепочечные ДНК с 0,8 кб.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В некоторых аспектах изобретение относится к композициям и способам доставки трансгена субъекту (напр., клетке субъекта или ткани субъекта). Изобретение относится, в частности, к обнаружению того, что репликация нуклеиновых кислот, кодирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную некоторыми типами асимметричных концевых последовательностей (напр., асимметричными прерываемыми самокомплементарными последовательностями), приводит к ковалентной связи асимметричных концевых последовательностей и ведет к созданию новой конформации линейной дуплексной ДНК с закрытым концом (зкДНК). В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, имеющие асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, могут иметь улучшенную экспрессию, репликацию (напр., выход продукта) у субъекта по сравнению с используемыми в настоящее время векторами для генной терапии. В некоторых вариантах выполнения изобретения улучшенная экспрессия нуклеиновых кислот, содержащих асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, связана с предпочтением геликаз RecQ (напр., RecQ1) для взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, содержащими симметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, по сравнению с нуклеиновыми кислотами, имеющими асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, имеющие асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности {напр., полученные из другого организма или вирусного серотипа или полученные из одного и того же организма или вирусного серотипа, но имеющие разную длину или комбинацию вышеизложенного), могут иметь снижение вероятности инсерционного мутагенеза у субъекта по сравнению с используемыми в настоящее время векторами для генной терапии. В некоторых вариантах выполнения изобретения введение нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности, индуцирует сниженный иммунный ответ или не индуцирует детектируемый иммунный ответ у субъекта по отношению к векторам плазмидной ДНК.

Последовательность «нуклеиновой кислоты» относится к последовательности ДНК или РНК. В некоторых вариантах выполнения изобретения белки и нуклеиновые кислоты по изобретению являются изолированными. Используемый здесь термин «изолированный» означает искусственно произведенный. В некоторых вариантах выполнения изобретения в отношении нуклеиновых кислот термин «изолированный» относится к нуклеиновой кислоте, которая: (i) амплифицирована *in vitro*, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР); (ii) рекомбинантно получена молекулярным клонированием; (iii) очищена путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой и гель-электрофоретическим фракционированием или колоночной хроматографией; или (iv) синтезирована, например, химическим синтезом. Выделенная нуклеиновая кислота является такой, которая легко поддается манипулированию с помощью методик рекомбинантной ДНК, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, нуклеотидная последовательность, содержащаяся в векторе, в котором известны сайты рестрикции 5' и 3' или для которого были описаны последовательности праймера полимеразной цепной реакции (ПЦР), считается изолированной, но последовательность нуклеиновой кислоты, существующая в ее природном состоянии

в ее естественном хозяине, - нет. Изолированная нуклеиновая кислота может быть по существу очищена, но не обязательно. Например, нуклеиновая кислота, которая выделена внутри клонирующего или экспрессионного вектора, не является чистой, поскольку она может содержать только крошечный процент материала в клетке, в которой она находится. Однако такая нуклеиновая кислота является изолированной, в свете используемого в настоящем документе термина, поскольку она легко поддается манипулированию стандартными методиками, известными специалистам в данной области техники. Как используется в настоящем документе в отношении белков или пептидов, термин «изолированный» относится к белку или пептиду, который был выделен из его естественной среды или искусственно создан (напр., путем химического синтеза, с помощью технологии рекомбинантной ДНК и т.д.).

Специалист в данной области также поймет, что консервативные аминокислотные замены могут быть сделаны для обеспечения функционально эквивалентных вариантов или гомологов капсидных белков. В некоторых аспектах изобретение охватывает изменения последовательности, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам. Используемый здесь термин консервативная аминокислотная замена относится к аминокислотной замене, которая не изменяет относительные характеристики заряда или размера белка, в котором происходит аминокислотная замена. Варианты могут быть получены в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в данной области техники, такими как те, которые могут быть найдены в ссылках, где такие способы скомпилированы, напр., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 или Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Например, в некоторых вариантах консервативные замены аминокислот включают замены, сделанные среди аминокислот в следующих группах: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D. Поэтому специалист в данной области можно делать консервативные аминокислотные замены в аминокислотной последовательности белков и полипептидов, описанных в настоящем документе.

Прерываемые самокомплементарные последовательности

Изобретение основано, в частности, на обнаружении того факта, что нуклеиновые кислоты, имеющие асимметричные концевые последовательности (напр., асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности), образуют линейные дуплексные структуры ДНК с закрытым концом (напр., зкДНК), которые в некоторых вариантах демонстрируют пониженную иммуногенность по сравнению с имеющимися в настоящее время векторами для доставки генов. В некоторых вариантах выполнения изобретения зкДНК ведет себя как линейная дуплексная ДНК в естественных условиях и превращается в одноцепочечную кольцевую ДНК в денатурирующих условиях. Не желая быть связанными с какой-либо конкретной теорией, нуклеиновые кислоты, раскрытые в описании (напр., зкДНК), пригодны в некоторых вариантах выполнения изобретения для доставки вставок гетерологичной нуклеиновой кислоты (напр., трансгенов) субъекту.

В некоторых аспектах изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную прерываемыми самокомплементарными последовательностями, причем каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного концевого разрешения и связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона, где одна самокомплементарная последовательность прерывается поперечной

последовательностью с образованием двух противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле», где каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» и часть «петля», где другая самокомплементарная последовательность прерывается усеченной поперечной последовательностью.

5 Используемый здесь термин «фланкированная» относится к позиционированию первой прерываемой самокомплементарной последовательности выше (напр., 5') относительно вставки гетерологичной нуклеиновой кислоты и второй расщепленной самокомплементарной последовательности ниже (напр., 3') относительно вставки гетерологичной нуклеиновой кислоты. Например, адено-ассоциированный вирусный
10 геном содержит открытые рамки считывания генов *g_{er}* и *g_{ар}*, «фланкированные» инвертированными концевыми повторами (ITR).

Используемый здесь термин «прерываемая самокомплементарная последовательность» относится к полинуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеиновую кислоту, имеющую палиндромные (напр., непрерывное удлинение
15 полинуклеотидов, которое идентично их комплементарной цепи, если оба они «считываются» в тех же направлениях от 5' до 3') терминальные последовательности, которые прерываются одним или более участками непалиндромных полинуклеотидов. Обычно, полинуклеотид, кодирующий одну или более прерываемых палиндромных последовательностей, будет конъюгироваться «в себе», образуя структуру «петля-на-стебле» (напр., петлю «шпилька», «Т»-образную петлю или «Y»-образную петлю),
20 например, как показано в структуре AAV2 ITR, изображенной на ФИГ. 1А и иллюстративных структурах, изображенных на ФИГ. 2А.

В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемая самокомплементарная последовательность образует «Т»-образную структуру, имеющую последовательность
25 «стебля» и поперечную последовательность. В некоторых вариантах выполнения изобретения «поперечная последовательность» образует две противоположные (напр., относительно последовательности «стебля») продольно-симметричные «петли-на-стебле», причем каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» и часть «петля». Например, в некоторых вариантах
30 выполнения изобретения последовательность «стебля» формируется путем гибридизации комплементарных (напр., палиндромных) 5'- и 3'-концов полинуклеотидной последовательности (называемой «А-А»), где палиндром А-А' прерывается полинуклеотидной поперечной последовательностью, образованной парой образующих «петлю» прерываемых палиндромных последовательностей, обозначенных
35 соответственно «В-В» и «С-С», как показано на ФИГ. 1А. В некоторых вариантах выполнения изобретения часть «петля» каждого поперечного плеча (напр., «петли», образованные прерываемыми палиндромными последовательностями В-В' и С-С), образована из неспаренных нуклеотидов (напр., неспаренных дезоксирибонуклеотидов). Следует понимать, что прерываемая самокомплементарная последовательность,
40 описанная в настоящем документе, может содержать более двух (напр., 3, 4 или более) поперечных последовательностей.

Прерываемая самокомплементарная последовательность может быть любого размера при условии, что последовательность образует петлю «шпилька» и функционирует как праймер для репликации нуклеиновых кислот (напр., репликации ДНК). Например,
45 прерываемая самокомплементарная последовательность может иметь длину от около 20 до около 2000 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемая самокомплементарная последовательность находится в пределах от около 40 до около 1000 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения

прерываемая самокомплементарная последовательность составляет по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 700,

по меньшей мере 800, по меньшей мере 900 или вплоть до 1000 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемая самокомплементарная последовательность имеет длину более чем 1000 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемая самокомплементарная последовательность находится в пределах от около 100 до около 160 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемый самокомплементарный нуклеотид имеет длину от около 115 до около 150 нуклеотидов.

В некоторых аспектах изобретение относится к нуклеиновой кислоте, имеющей прерываемую самокомплементарную последовательность, которая образует противоположные продольно-симметричные «петли-на-стебле». В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» в диапазоне от 3 до 15 пар оснований в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» в диапазоне от 8 до 10 пар оснований в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель», которая имеет длину 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов.

Обычно, часть «петля» структуры «петли-на-стебле» содержит по меньшей мере 2 неспаренных нуклеотида. В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая часть «петля» имеет от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов (напр., 2, 3, 4 или 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов). В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая часть «петля» поперечной последовательности, описанная в настоящем документе, имеет три дезоксирибонуклеотида. В некоторых вариантах выполнения изобретения одна часть «петля» поперечной последовательности, описанная в настоящем документе, имеет три дезокситимидина, а другая часть «петля» имеет три дезоксиаденозина.

В некоторых аспектах изобретение относится к прерываемым самокомплементарным последовательностям, фланкирующим вставку нуклеиновой кислоты, где прерываемые самокомплементарные последовательности являются асимметричными по отношению друг к другу (напр., полученными из другого организма или вирусного серотипа или полученными из того же организма или вирусного серотипа, но имеющими разную длину или комбинацию вышеизложенного). В некоторых вариантах выполнения изобретения одна из пары асимметричных самокомплементарных последовательностей содержит усеченную поперечную последовательность. Используемый здесь термин «усеченная поперечная последовательность» относится к поперечной последовательности, которая имеет более короткую длину относительно соответствующей самокомплементарной последовательности, фланкирующей последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты. Усеченная поперечная последовательность может иметь от 1 до 50 (напр., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50) нуклеотидных делеций относительно полноразмерной поперечной последовательности. В некоторых вариантах выполнения изобретения усеченная поперечная последовательность имеет от 1 до 30 нуклеотидных делеций относительно полноразмерной поперечной последовательности. В некоторых

вариантах выполнения изобретения усеченная поперечная последовательность содержит от 2 до 20 нуклеотидных делеций относительно полноразмерной поперечной последовательности.

В некоторых вариантах выполнения изобретения усеченная поперечная последовательность образует две противоположные продольно-асимметричные «петли-на-стебле». В некоторых вариантах выполнения изобретения одна из противоположных продольно-асимметричных «петель-на-стебле» усеченной поперечной последовательности имеет часть «стебель» в диапазоне от 8 до 10 пар оснований в длину и часть «петля», имеющую от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения одна продольно-асимметричная «петля-на-стебле» усеченной поперечной последовательности имеет часть «стебель» менее 8 пар оснований в длину и часть «петля», имеющую от 2 до 5 дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения одна продольно-асимметричная «петля-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной менее 3 пар оснований. В некоторых вариантах выполнения изобретения одна продольно-асимметричная «петля-на-стебле» имеет часть «петля», имеющую 3 или более дезоксирибонуклеотидов.

Обычно, усеченная поперечная последовательность не содержит нуклеотидных делеций (напр., относительно неусеченной поперечной последовательности) в областях А или А', чтобы не мешать репликации ДНК (напр., связыванию с RBE протеином Rep или никированию на сайте концевой разрешения). В некоторых вариантах выполнения изобретения усеченная поперечная последовательность имеет одну или несколько делеций в области В, В', С и/или С. Ниже приведены несколько неограничивающих примеров усеченных поперечных последовательностей:

AAV2 ITR Δ С-область, обозначенная скобками; все или частичные делеций в квадратных скобках могут быть использованы для создания асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей; ниже «RBE» означает «связывающий Rep элемент».

	С-Область	В-Область
30	Δ	RBE'
	5'cggg(cgaccaaaggtc)gcccg-a-cgcccgggctttgcccgggc (SEQ ID NO: 2)	
35	5'cggg(cgaccaaaggtcg)cccg-a-cgcccgggctttgcccgggc (SEQ ID NO: 2)	
	5'gccc(gggcaaagccc)gggcg-t-cgggcgacctttggtcgcccg (SEQ ID NO: 3)	
40	5'gccc(gggcaaagccc)gggcg-t-cgggcgacctttggtcgcccg (SEQ ID NO: 3)	
	5'[cgggcgaccaaaggtcgcccg]-a-cgcccgggctttgcccgggc (SEQ ID NO: 2)	
45	5'[cgggcgaccaaaggtcgcccg]-a-cgcccgggctttgcccgggc (SEQ ID NO: 2)	

5' [gccccgggcaaaagccccgggcg]-t-cgggcgacctttggtcgccccg (SEQ ID NO: 3)

5' [gccccgggcaaaagccccgggcg]-t-cgggcgacctttggtcgccccg (SEQ ID NO: 3)

Как правило, термодинамические свойства нуклеиновой кислоты (напр., свободная энергия Гиббса (ΔG), композиция G+C, композиция A+T, температура плавления, основной состав каждой нити, длина комплементарной последовательности, непарные основания в дуплексной области и непарные основания, составляющие «петлю»), необходимые для образования «шпилек», известны в данной области, например, как описано в Bosco et al., Nucl. Acids Res. (2013) doi: 10.1093/nar/gktd089; First published online: November 12, 2013.

В некоторых вариантах выполнения изобретения поперечная последовательность имеет свободную энергию Гиббса (ΔG) разворачивания в физиологических условиях в диапазоне от -12 ккал/моль до -30 ккал/моль. В некоторых вариантах выполнения изобретения поперечная последовательность имеет свободную энергию Гиббса (ΔG) разворачивания в физиологических условиях в диапазоне от -20 ккал/моль до -25 ккал/моль. В некоторых вариантах выполнения изобретения термодинамические свойства усеченной поперечной последовательности могут быть одинаковыми (напр., идентичными) относительно полноразмерной поперечной последовательности, даже если они могут иметь отличия в последовательностях, которые делают их асимметричными. В некоторых вариантах выполнения изобретения термодинамические свойства усеченной поперечной последовательности могут отличаться от тех, которые имеет полноразмерная поперечная последовательность. Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения усеченная поперечная последовательность имеет свободную энергию Гиббса (ΔG) разворачивания в физиологических условиях в диапазоне от 0 ккал/моль до более чем -22 ккал/моль.

Используемый здесь термин «оперативный» относится к способности последовательности нуклеиновой кислоты выполнять намеченную функцию. Например, «область оперативного связывания» представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая сохраняет функцию связывания для предполагаемой цели (напр., белка или нуклеиновой кислоты). В другом примере «оперативный сайт расщепления» представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая сохраняет свою способность специфически расщепляться конкретным ферментом или ферментами.

Аспекты изобретения связаны с обнаружением того факта, что для формирования линейной дуплексной ДНК с закрытым концом (зкДНК) требуются самокомплементарные последовательности нуклеиновых кислот, содержащие оперативный связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона. Используемый здесь термин «связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона» относится к консервативной последовательности нуклеиновой кислоты (напр., мотиву), которая распознается и связывается репликационным белком по типу разматывающегося рулона, который является вирусным неструктурным белком (белком NS), инициирующим репликацию «разматывающегося рулона» (напр., разматывающейся «шпильки»). Репликация «разматывающегося рулона» (напр., разматывающейся «шпильки») описана в Tattersall et al. Nature 2009, 263, pp. 106-109. Примеры белков NS включают, но без ограничения, белки AAV Rep (напр., Rep78, Rep68, Rep52, Rep40), неструктурные белки парвовируса

(напр., NS2), неструктурные белки ротавируса (напр., NSP1) и неструктурные белки денсовируса (напр., PfdNV NS1). В некоторых вариантах выполнения изобретения связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона представляет собой связывающий Rep элемент (RBE). В некоторых вариантах

5 выполнения изобретения RBE содержит последовательность 5'-GCTCGCTCGCTC-3'.

В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационные белки по типу разматывающегося рулона относятся к роду депендопарвовирусов семейства вирусов Parvoviridae с геномами линейной одноцепочечной ДНК. В некоторых вариантах

10 выполнения изобретения репликационные белки по типу разматывающегося рулона относятся к родам автономных Parvovirinae, включая мышинный вирус minute, вирус Алеутской болезни норки, парвовирус коров, парвовирус собак, парвовирус кур, вирус панлейкопении кошек, парвовирус кошек, парвовирус гусей, парвовирус НВ, парвовирус Н-1, вирус крыс Kilham, парвовирус кроликов, вирус LUIII, вирус энтерита норки, парвовирус мышей, парвовирус свиней, парвовирус енотов, парвовирус RT, онкогенный

15 вирус Х, парвовирус крыс 1a, парвовирус мускусных уток, парвовирус лошадей, пармовирус хомяков и вирус ревматоидного артрита 1. В некоторых вариантах выполнения изобретения род является парвовирусом. В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационные белки по типу разматывающегося рулона относятся к роду Densovirinae, включая бревиденсовирус, денсовирус и итеравирус.

20 В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационный белок по типу разматывающегося рулона относится к роду подсемейства Parvovirinae. Примеры рода Parvovirinae включают, но без ограничения, Амдопараеирус, Аеепараеирус, Бокапарвовирус, Копипарвивирус, Депендопаравирус, Эритропаравирус, Протоарвовирус, Тетрапаравирус. В некоторых вариантах выполнения изобретения

25 репликационные белки по типу разматывающегося рулона относятся к роду подсемейства Densovirinae. Примеры рода Densovirinae включают, но без ограничения, Амдопареиеирус, Аеепараеирус, Бокапарвовирус, Копипарвивирус, Депендопаравирус, Эритропаравирус, Протопарвовирус и Тетрапаравирус. В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационный белок(белки) по типу разматывающегося

30 рулона относятся к Депендоеирусу, такому как Адено-ассоциированный вирус 2 (AAV2), Адено-ассоциированный вирус 3 (AAV3), Адено-ассоциированный вирус 4 (AAV4) или Адено-ассоциированный вирус 5 (AAV5) или любой их комбинации.

В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационные белки по типу разматывающегося рулона получают из одноцепочечных семейств бактериофагов

35 ДНК. В некоторых вариантах выполнения изобретения семейства вирусов представляют собой Microviridae и Inoviridae.

В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационные белки по типу разматывающегося рулона получают из грамположительных бактерий.

Аспекты изобретения относятся к обнаружению того, что прерываемые

40 самокомплементарные последовательности нуклеиновой кислоты, содержащие сайт оперативного конечного разрешения (trs), необходимы для образования линейной дуплексной ДНК с закрытым концом (зкДНК). Как правило, репликация нуклеиновых кислот, содержащих прерываемые самокомплементарные последовательности нуклеиновой кислоты (напр., AAV ITR), инициируется из поперечного 3'-конца (напр.,

45 структуры «шпильки») и генерирует дуплексную молекулу, в которой один из концов ковалентно закрыт; ковалентно закрытые концы дуплексной молекулы затем расщепляются с помощью процесса, называемого конечным разрешением, с образованием двух отдельных одноцепочечных молекул нуклеиновой кислоты. Не

желая быть связанными с какой-либо конкретной теорией, процесс концевое разрешения опосредуется сайт- и нить-специфичным расщеплением эндонуклеазой на сайте концевое разрешения (trs) (напр., репликационного белка по типу разматывающегося рулона, такого как белок AAV Rep). Примеры последовательностей trs включают 3'-CCGGTTG-5' и 5'-ΔGTTGG-3' (распознаваемые белком AAV2 p5). Было высказано предположение о том, что Rep-опосредованная нить никирования находится между центральной частью дитимида («ТТ») последовательности trs. Поэтому в некоторых вариантах выполнения изобретения сайт оперативного концевое разрешения содержит последовательность 5'-ТТ-3'.

Аспекты изобретения относятся к позиционированию сайта концевое разрешения (trs) относительно связывающего элемента репликационного белка по типу разматывающегося рулона. Как правило, trs находится выше (напр., 5') относительно связывающего элемента репликационного белка по типу разматывающегося рулона. Однако в некоторых вариантах выполнения изобретения trs находится ниже (напр., 3') относительно связывающего элемента репликационного белка по типу разматывающегося рулона. В некоторых вариантах выполнения изобретения 3'-конец сайта оперативного концевое разрешения представляет собой от 15 до 25 нуклеотидов (напр., 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов) от 5'-конца связывающего элемента репликационного белка по типу разматывающегося рулона.

В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемая самокомплементарная последовательность представляет собой последовательность AAV с инвертированными концевыми повторами. Последовательность AAV ITR может быть любого серотипа AAV, включая, но без ограничения, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, серотипы AAV приматов, не относящихся к человеку (напр., AAVrh.10), и их варианты. В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемая самокомплементарная последовательность представляет собой AAV2 ITR или его вариант (напр., AAV2 ITR или усеченный ITR AAV2, имеющий делецию в «В-плече» или «С-плече»). В некоторых вариантах выполнения изобретения прерываемая самокомплементарная последовательность представляет собой AAV5 ITR или его вариант (напр., AAV5 ITR или усеченный ITR AAV5, имеющий делецию в «В-плече» или «С-плече»). Используемый здесь термин «вариант» AAV ITR относится к полинуклеотиду, имеющему от около 70% до около 99,9% сходства с последовательностью AAV ITR дикого типа. В некоторых вариантах выполнения изобретения вариант AAV ITR имеет около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или около 99% идентичности с AAV ITR дикого типа.

AAV ITR может существовать в двух конформациях: «flip» и «flop», которые являются результатом механизма репликации AAV «шпильки» по типу разматывающегося рулона. Неограничивающий пример прерываемой самокомплементарной последовательности (напр., AAV2 ITR) в обеих конформациях "flip" и "flop" показан ниже:

GenBank (>gi|110645916|ref|NC_001401.2| Адено-ассоциированный вирус - 2, полный геном)

Конформация flор

(SEQ ID NO: 4)

ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggc cgggcgaccaaagggtcgcccgacgcccgggctttg
 |||
 aaccggtgagggagagacgcgcgagcgagcgagtgactccg gcccgtggtttccagcgggctgccccccgaaac
 (SEQ ID NO: 5)

ccccggc_ggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagggagtgggcaactccatcactaggggttcct
 |||
gggcccg_ccggagtcactcgctcgctcgcgcgctctctccctcaccggttgaggtagtgatccccaagga

Конформация flip

(SEQ ID NO: 6)

aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggcc ggggcgaccaaagggt
 |||
 tccttggggatcactacctaaccggtgagggagagacgcgcgagcgagcgagtgactccgg cccgtggtttcca
 (SEQ ID NO: 7)

cgcccgacgcccgggctttgcccggcg_gcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgggcaa
 |||
gccccgtgccccccgaaacgggcccgc_ccggagtcactcgctcgctcgcgcgctctctccctcaccggtt

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании (напр., зкДНК), содержит прерываемую самокомплементарную последовательность в конформации flip. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании (напр., зкДНК), содержит прерываемую самокомплементарную последовательность в конформации flор.

Аспекты изобретения относятся к композициям, содержащим популяцию нуклеиновых кислот, раскрытых в описании. Как правило, популяции могут быть гомогенными (напр., содержащими несколько копий одной и той же нуклеиновой кислоты) или гетерогенными (напр., содержащими множество различных нуклеиновых кислот).

Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения композиция содержит мономерную нуклеиновую кислоту (напр., популяцию одного вида мономерной нуклеиновой кислоты), содержащую одну субъединицу. В некоторых вариантах выполнения изобретения субъединица содержит вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную прерываемыми самокомплементарными последовательностями, причем каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного концевого разрешения и связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона, в котором одна самокомплементарная последовательность прерывается поперечной последовательностью с образованием двух противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле», а другая из самокомплементарных последовательностей прерывается усеченной поперечной последовательностью.

В некоторых вариантах выполнения изобретения композиция содержит мультимерную нуклеиновую кислоту, содержащую две или более субъединицы (напр., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более субъединиц). В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая субъединица мультимерной нуклеиновой кислоты содержит вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированную прерываемыми самокомплементарными последовательностями, причем каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного концевого разрешения и связывающий элемент

репликационного белка по типу разматывающегося рулона, в котором одна самокомплементарная последовательность прерывается поперечной последовательностью, образующей две противоположные продольно-симметричные «петли-на-стебле», а другая самокомплементарная последовательностей прерывается

5 усеченной поперечной последовательностью. В некоторых вариантах выполнения изобретения мультимерная нуклеиновая кислота содержит две субъединицы (напр., представляет собой димер). В некоторых вариантах выполнения изобретения каждый мультимер имеет по меньшей мере один, а в некоторых случаях только один, самокомплементарный концевой палиндром.

10 В некоторых вариантах выполнения изобретения субъединицы мультиамерной нуклеиновой кислоты образуют конкатамеры. Используемый здесь термин «конкатамер» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей несколько копий той же или по существу той же последовательности нуклеиновой кислоты (напр., субъединиц), которые обычно связаны в серии. В некоторых вариантах выполнения изобретения

15 конкатамеры, раскрытые в описании, могут быть ориентированы либо по полярности «голова-к-голове», либо по полярности «хвост-к-хвосту». В вариантах выполнения изобретения, в которых субъединицы содержат последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты, сконфигурированную для экспрессии транскрипта РНК, полярность «голова-к-голове» относится к конкатамеру, в котором прерываемые

20 самокомплементарные последовательности, наиболее близкие к промоторной последовательности каждой субъединицы, ковалентно связаны (напр., субъединицы связаны 5'-концом с 5'-концом). В таких вариантах выполнения изобретения полярность «хвост-к-хвосту» относится к конкатамеру, в котором прерываемые

25 самокомплементарные последовательности, дистальные к промоторной последовательности каждой субъединицы, ковалентно связаны (напр., субъединицы связаны 5'-концом с 5'-концом). В некоторых вариантах выполнения изобретения две субъединицы связаны в конфигурации «хвост-к-хвосту» (напр., полярность).

В некоторых вариантах выполнения изобретения композиция содержит как мономерные, так и мультимерные нуклеиновые кислоты (напр., содержит гетерогенную

30 популяцию нуклеиновых кислот).

Вставки гетерологичной нуклеиновой кислоты

Состав трансгенной последовательности (напр., вставки гетерологичной нуклеиновой кислоты) нуклеиновой кислоты будет зависеть от применения, к которому будет добавлена результирующая нуклеиновая кислота. Например, один тип трансгенной

35 последовательности включает репортерную последовательность, которая после экспрессии продуцирует детектируемый сигнал. В другом примере трансген кодирует терапевтический белок или терапевтическую функциональную РНК. В другом примере трансген кодирует белок или функциональную РНК, которая предназначена для использования в исследовательских целях, напр., для создания соматической трансгенной

40 модели на животных, экспрессирующей трансген, напр., для изучения функции трансгенного продукта. В другом примере трансген кодирует белок или функциональную РНК, которая предназначена для применения для создания модели заболевания на животных. Специалистам в данной области будут очевидны соответствующие последовательности, кодирующие трансген.

45 Изобретение основано, в частности, на обнаружении того, что в отличие от векторов AAV нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (напр., зкДНК), не ограничены по размеру вставки гетерологичной нуклеиновой кислоты (напр., трансгенной последовательности). В некоторых вариантах выполнения изобретения

трансген (напр., вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты), фланкированный прерываемыми самокомплементарными последовательностями, находится в пределах от около 10 до около 5000 пар оснований, от около 10 до около 10000 пар оснований, от около 10 до около 50000 пар оснований в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения трансген (напр., вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты), фланкированный прерываемыми самокомплементарными последовательностями, находится в пределах от около 10 до около 50 пар оснований в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения трансген (напр., вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты), фланкированный прерываемыми самокомплементарными последовательностями, находится в пределах от около 20 до около 100 пар оснований в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения трансген (напр., вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты), фланкированный прерываемыми самокомплементарными последовательностями, находится в пределах от около 500 до около 1500 пар оснований в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения трансген (напр., вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты), фланкированный прерываемыми самокомплементарными последовательностями, имеет длину от около 1000 до около 5000 пар оснований в длину. В некоторых вариантах выполнения изобретения размер трансгена (напр., вставки гетерологичной нуклеиновой кислоты) превышает емкость традиционного вектора AAV (напр., превышает около 4,8 кб).

Репортерные последовательности, которые могут быть предоставлены в трансгене, включают, без ограничения, последовательности ДНК, кодирующие β -лактамазу, β -галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), люциферазу и другие хорошо известные в данной области техники. Когда они связаны с регуляторными элементами, которые приводят к экспрессии, репортерные последовательности обеспечивают сигналы, детектируемые обычными способами, включая ферментативные, радиографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы, анализы на основе с активированного флуоресценцией клеточного сортинга и иммунологические анализы, включая фермент-связанное иммуносорбентное исследование (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимию. Например, когда маркерная последовательность представляет собой ген LacZ, присутствие вектора, несущего сигнал, детектируется анализом активности β -галактозидазы. Когда трансген представляет собой зеленый флуоресцентный белок или люциферазу, вектор, несущий сигнал, может быть визуально измерен по окраске или производству света в люминометре. Такие репортеры могут, например, быть полезными при проверке способностей к тканеспецифическому нацеливанию и тканеспецифической промотерной регуляторной активности нуклеиновой кислоты.

В некоторых аспектах изобретение относится к нуклеиновым кислотам для применения в способах предотвращения или лечения одного или нескольких генетических дефектов или дисфункций у млекопитающего, таких как, например, дефицит полипептида или избыток полипептида у млекопитающего и, в частности, для лечения или уменьшения тяжести или степени дефицита у человека, имеющего одно или несколько расстройств, связанных с дефицитом таких полипептидов в клетках и тканях. Способ включает введение нуклеиновой кислоты (напр., нуклеиновой кислоты, раскрытой в описании), которая кодирует один или несколько терапевтических пептидов, полипептидов, сиРНК, микроРНК, антисмысловых нуклеотидов и т.д., в фармацевтически приемлемом носителе субъекту в количестве и в течение периода времени, достаточных для лечения дефицита или расстройства у субъекта, страдающего

от такого расстройства.

Таким образом, изобретение охватывает доставку нуклеиновых кислот (напр., нуклеиновых кислот, раскрытых в описании), кодирующих один или несколько пептидов, полипептидов или белков, которые полезны для лечения или профилактики болезненных состояний у субъекта млекопитающего. Типичные терапевтические белки включают один или несколько полипептидов, выбранных из группы, состоящей из факторов роста, интерлейкинов, интерферонов, факторов антиапоптоза, цитокинов, антидиабетических факторов, антиапоптозных агентов, факторов свертывания крови, противоопухолевых факторов. Другие неограничивающие примеры терапевтических белков включают BDNF, CNTF, CSF, EGF, FGF, G-CSF, GM-CSF, гонадотропин, IFN, IFG-1, M-CSF, NGF, PDGF, PEDF, TGF, VEGF, TGF-B2, TNF, пролактин, соматотропин, XIAP1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-10(187A), вирусный IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17 и IL-18.

Нуклеиновые кислоты (напр., нуклеиновые кислоты, раскрытые в описании) могут содержать ген, который должен быть перенесен (напр., экспрессирован) субъекту для лечения заболевания, связанного с уменьшенной экспрессией, отсутствием экспрессии или дисфункцией гена. Примеры генов и связанных с ними болезненных состояний включают, но без ограничения: глюкозо-6-фосфатазу, связанную с дефицитом хранения гликогена типа 1А; фосфоенолпируват-карбоксикиназу, связанную с дефицитом Пепка; галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазу, связанную с галактоземией; фенилаланингидроксилазу, связанную с фенилкетонурией; альфа-кетокислотную дегидрогеназу с разветвленной цепью, связанную с болезнью с запахом кленового сиропа у мочи; фумарилацетоацетатную гидролазу, связанную с тирозинемией типа 1; метилмалонил-СоА-мутаза, связанную с метилмалоновой ацидезией; ацил-коА-дегидрогеназу со средней цепью, связанную с дефицитом ацетил-СоА со средней цепью; омитиновую транскарбамилазу, связанную с дефицитом омитина транскарбамилазы; синтетазу аргининосукциновой кислоты, связанную с цитруллинемией; белок рецептора липопротеинов низкой плотности, связанный с семейной гиперхолестеринемией; UDP-глюкоуронозилтрансферазу, связанную с болезнью Криглера-Найяра; аденозиндезаминазу, связанную с тяжелой комбинированной иммунодефицитной болезнью; гипоксантин гуанинфосфорибозилтрансферазы, связанный с Подагрой и синдромом Леша-Найхана; биотинидазу, связанную с дефицитом биотинидазы; бета-глюкоцереброзидазу, связанную с болезнью Гоше; бета-глюкуронидазу, связанную с синдромом Слая; пероксисомный мембранный белок 70 кДа, связанный с синдромом Зеллвегера; порфобилиногендезаминазу, связанную с острой интермиттирующей порфирией; альфа-1-антитрипсин для лечения дефицита антитрипсина альфа-1 (эмфиземы); эритропоэтин для лечения анемии вследствие талассемии или почечной недостаточности; сосудистый эндотелиальный фактор роста, ангиопоэтин-1 и фактор роста фибробластов для лечения ишемических заболеваний; тромбомодулин и ингибитор пути тканевого фактора для лечения окклюдированных кровеносных сосудов, как это наблюдается, например, при атеросклерозе, тромбозе или эмболиях; ароматическую аминокислотную декарбоксилазу (AADC) и тирозингидроксилазу (TH) для лечения болезни Паркинсона; бета-адренергический рецептор, антисмысловую форму или мутантную форму фосфоламбана, сарко(эндо)плазматическую ретикулум аденозинтрифосфатазу-2 (SERCA2) и кардиальную аденилилциклазу для лечения застойной сердечной недостаточности; ген-предшественник опухоли, такой как p53, для лечения различных видов рака; цитокин, такой как один из различных интерлейкинов, для лечения воспалительных и иммунных расстройств и рака; дистрофии

или минидистрофин и утрофин или миниутрофин для лечения мышечных дистрофий; и инсулин для лечения диабета.

В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или функциональную РНК, полезную для
 5 лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с центральной нервной системой (ЦНС). Ниже приведен неограничивающий список генов, связанных с заболеванием ЦНС: DRD2, GRIA1, GRIA2, GRIN1, SLC1A1, SYP, SYT1, CHRNA7, 3Rtau/4rTUS, APP, BAX, BCL-2, GRIK1, GFAP, IL-1, AGER, связанные с болезнью Альцгеймера; UCH-L1, SKP1, EGLN1, Nurr-1, BDNF, TrkB, gstm1, S106 β , связанные с болезнью
 10 Паркинсона; IT15, PRNP, JPH3, TBP, ATXN1, ATXN2, ATXN3, Atrophin 1, FTL, TITF-1, связанные с болезнью Хантингтона; FXN, связанный с атаксией Фрейдриха; ASPA, связанный с болезнью Канавана; DMD, связанный с мышечной дистрофией; и SMN1, UBE1, DYNC1H1, связанные со спинальной мышечной атрофией. В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты,
 15 которая экспрессирует один или несколько вышеуказанных генов или их фрагментов. В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких вышеуказанных генов.

В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или функциональную РНК, полезную для
 20 лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с сердечнососудистой системой. Ниже приведен неограничивающий список генов, связанных с сердечнососудистым заболеванием: VEGF, FGF, SDF-1, коннексин 40, коннексин 43, SCN4a, HIF1 α , SERCa2a, ADCY1 и ADCY6. В некоторых вариантах выполнения изобретение
 25 относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует один или несколько вышеуказанных генов или их фрагментов. В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких вышеуказанных генов.

В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или функциональную РНК, полезную для
 30 лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с легочной системой. Ниже приведен неограничивающий список генов, связанных с легочным заболеванием: CFTR, AAT, TNF α , TGF β 1, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC, HPS1, HPS3, HPS4, ADTB3A, IL1A, IL1B, LTA, IL6, CXCR1 и CXCR2. В некоторых вариантах выполнения изобретение
 35 относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует один или несколько вышеуказанных генов или фрагментов. В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких вышеуказанных генов. Неограничивающие примеры
 40 вставок гетерологичных нуклеиновых кислот, кодирующих белок или функциональную РНК, полезную для лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с легочной системой, показаны на ФИГ. 10.

В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или функциональную РНК, полезные для
 45 лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с печенью. Ниже приведен неограничивающий список генов, связанных с заболеванием печени: α 1-AT, HFE, ATR7B, фумарилацетоацетатгидролаза (FAH), глюкозо-6-фосфатаза, NCAN, GSKR,

LYPLAL1, PNPLA3, лецитинхолестеринацетилтрансфераза, фенилаланингидроксилаза и G6PC. В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует один или несколько вышеуказанных генов или их фрагментов. В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких вышеуказанных генов. Неограничивающие примеры вставок гетерологичных нуклеиновых кислот, кодирующих белок или функциональную РНК, полезную для лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с печенью, показаны на ФИГ. 9.

В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или функциональную РНК, полезную для лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с почкой. Ниже приведен неограничивающий список генов, связанных с заболеванием почек: PKD1, PKD2, PKHD1, NPHS1, NPHS2, PLCE1, CD2AP, LAMB2, TRPC6, WT1, LMX1B, SMARCAL1, COQ2, PDSS2, SCARB3, FN1, COL4A5, COL4A6, COL4A3, COL4A4, FOX1C, RET, UPK3A, BMP4, SLX2, CDC5L, USF2, ROBO2, SLIT2, EYA1, MYOG, SIX1, SIX5, FRAS1, FREM2, GATA3, KALI, PAX2, TCF2 и SALL1. В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует один или несколько вышеуказанных генов или их фрагментов. В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких вышеуказанных генов.

В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или функциональную РНК, полезные для лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с глазом. Ниже приведен неограничивающий список генов, связанных с глазным заболеванием: ABCA4, VEGF, CEP290, CFH, C3, MT-ND2, ARMS2, TIMP3, CAMK4, FMN1, RHO, USH2A, RPGR, RP2, TMC0, SLX1, SIX6, LRP12, ZFPM2, TBK1, GALC, миоцилин, CYP1B1, CAV1, CAV2, оптинейрин и CDKN2B. В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует один или несколько вышеуказанных генов или их фрагментов. В некоторых вариантах выполнения изобретения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких вышеуказанных генов.

Неограничивающие примеры вставок гетерологичных нуклеиновых кислот, кодирующих белок или функциональную РНК, полезных для лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с глазом, показаны на ФИГ. 7.

В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или функциональную РНК, полезные для лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с кровью (напр., с эритроцитами). Ниже приведен неограничивающий список генов, связанных с заболеваниями и расстройствами крови: Фактор VIII (FVIII), Фактор IX (FIX), фактор фон Виллебранда (VWF). В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует один или несколько вышеуказанных генов или их фрагментов. В некоторых вариантах выполнения изобретения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует одну или несколько функциональных РНК, которые ингибируют

экспрессию одного или нескольких вышеуказанных генов. Неограничивающие примеры вставок гетерологичных нуклеиновых кислот, кодирующих белок или функциональную РНК, полезные для лечения состояния, заболевания или расстройства, связанных с кровью, показаны на ФИГ. 8.

- 5 Нуклеиновые кислоты, раскрытые в описании (например, нуклеиновая кислота, имеющая вставку из гетерологичной нуклеиновой кислоты), могут быть использованы для восстановления экспрессии генов, которые уменьшаются в экспрессии, подавлены или иным образом дисфункциональны у субъекта (например, супрессор опухоли, который был подавлен у пациента, имеющего рак). Нуклеиновые кислоты, раскрытые
- 10 в описании, также могут быть использованы для нокдауна экспрессии генов, которые абберрантно экспрессируются у субъекта (напр., онкогена, который экспрессируется у субъекта, имеющего рак). В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующая генный продукт, связанный с раком (напр., супрессоры опухолей), может быть использована для лечения рака путем
- 15 введения нуклеиновой кислоты, содержащей вставку из гетерологичной нуклеиновой кислоты, субъекту, имеющему рак. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, содержащая вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую малую интерферирующую нуклеиновую кислоту (напр., малые цитоплазматические РНК (shRNA), микроРНК), которая ингибирует экспрессию генного
- 20 продукта, связанного с раком (напр., онкогенов), может быть использована для лечения рака, путем введения нуклеиновой кислоты, содержащей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, субъекту, имеющему рак. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, содержащая вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую генный продукт, связанный с раком (или функциональную РНК,
- 25 которая ингибирует экспрессию гена, связанного с раком), может использоваться для исследовательских целей, например, для изучения рака или выявления терапевтических средств, которые лечат рак. Ниже приводится неограничивающий список примеров генов, которые, как известно, связаны с развитием рака (напр., онкогены и опухолевые супрессоры): AARS, ABCB1, ABCC4, ABI2, ABL1, ABL2, ACK1, ACP2, ACY1, ADSL,
- 30 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,
- 35 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, DHCR7, DHRS2, DHX8, DLG3, DVL1, DVL3, E2F1, E2F3, E2F5, EGFR, EGR1, EIF5, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC3, ETV1, ETV3, ETV6, F2R,
- 40 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, HYAL1, HYOU1, ICAM1, ID1, ID2, IDUA, IER3, IFITM1, IGF1R, IGF2R, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IL1B, ILK, ING1, IRF3,
- 45 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, 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, NINJ1, NMBR, NME1, NME2, NME3, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, NPM1, NQO1, NR1D1, NR2F1, NR2F6, NRAS, NRG1, NSEP1, OSM, PA2G4, PABPC1, PCNA, PCTK1, PCTK2, PCTK3, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDPK1, PEA15, PFDN4, PFDN5, PGAM1, PHB, 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, RBI, RBBP4, RBL2, REA, REL, RELA, RELB, RET, RFC2, RGS19, RHOA, RHOB, RHOC, RHOD, RIPK1, RPN2, RPS6KB1, RRM1, SARS, SELENBP1, SEMA3C, SEMA4D, SEPP1, SERPINH1, SFN, SFPQ, SFRS7, SHB, SHH, SIAH2, SIVA, SIVA TP53, SKI, SKIL, SLC16A1, SLC1A4, SLC20A1, SMO, 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, TNFRSF1B, TNFRSF6, TNFRSF7, TNK1, TOB1, TP53, TP53BP2, TP53I3, TP73, TPBG, TPT1, TRADD, TRAM1, TRRAP, TSG101, TUFM, TXNRD1, TYR03, UBC, UBE2L6, UCHL1, USP7, VDAC1, VEGF, VHL, VIL2, WEE1, WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WT1, XRCC1, YES1, YWHAB, YWHAZ, ZAP70 и ZNF9.

В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей генный продукт, связанный с расстройством ЦНС. Ниже приведен неограничивающий список генов, связанных с расстройством ЦНС: DRD2, GRIA1, GRIA2, GRIN1, SLC1A1, SYP, SYT1, CHRNA7, 3Rtau/4rTUS, APP, BAX, BCL-2, GRIK1, GFAP, IL-1, Δ GER, связанный с болезнью Альцгеймера; UCH-L1, SKP1, EGLN1, Nurr-1, BDNF, TrkB, *gstm1*, S106 β , связанный с болезнью Паркинсона; IT15, PRNP, JPH3, TBP, ATXN1, ATXN2, ATXN3, Atrophin 1, FTL, TITF-1, связанный с болезнью Хантингтона; FXN, связанный с атаксией Фрейдриха; ASPA, связанный с болезнью Канавана; DMD, связанный с мышечной дистрофией; и SMN1, UBE1, DYNC1H1, связанные с атрофией спинальной мышцы.

Вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты может содержать трансген, нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, которая модулирует апоптоз. Ниже приведен неограничивающий список генов, связанных с апоптозом, и нуклеиновых кислот, кодирующих продукты этих генов, и их гомологов и кодирующих малые интерферирующие нуклеиновые кислоты (напр., малые цитоплазматические РНК (shRNA), микроРНК), которые ингибируют экспрессию этих генов, и их гомологов, полезных в качестве трансгенов в определенных вариантах выполнения изобретения: RPS27A, ABL1, AKT1, APAF1, BAD, BAG1, BAG3, BAG4, BAK1, BAX, BCL10, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L11, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L2, 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, CARD8, CARD9, 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, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF14, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF25, CD40, FAS, TNFRSF6B, CD27, TNFRSF9, TNFRSF10, TNFRSF14, TNFRSF18, CD40LG, FASLG, CD70, TNFRSF8, TNFRSF9, TP53, TP53BP2, TP73, TP63, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5 DRD2, GRIA1, GRIA2, GRIN1, SLC1A1, SYP, SYT1,

CHRNA7,3Rtau/4rTUS, APP, BAX, BCL-2, GRIK1, GFAP, IL-1, Δ GER, UCH-L1, SKP1, EGLN1, Nurr-1, BDNF, TrkB, gstm1, S106 β , IT15, PRNP, JPH3, TBP, ATXN1, ATXN2, ATXN3, Atrophin 1, FTL, TITF-1, FXN, ASPA, DMD и SMN1, UBE1, DYNC1H1.

5 Специалист в данной области также поймет, что в случае трансгенов, кодирующих белки или полипептиды, эти мутации, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам, могут быть получены в трансгене для получения функционально эквивалентных вариантов или гомологов белка или полипептида. В некоторых аспектах изобретение охватывает изменения последовательностей, которые приводят к консервативной аминокислотной замене трансгена. В некоторых вариантах 10 выполнения изобретения трансген содержит ген, имеющий доминантно-негативную мутацию. Например, трансген может экспрессировать мутантный белок, который взаимодействует с теми же элементами, что и белок дикого типа, и тем самым блокирует некоторые аспекты функции белка дикого типа.

Пригодные трансгенные продукты также включают микроРНК. МикроРНК и другие 15 малые интерферирующие нуклеиновые кислоты регулируют экспрессию генов посредством расщепления/деградации целевого транскрипта РНК или трансляционной репрессии целевой матричной РНК (мРНК). МикроРНК изначально экспрессируются обычно как конечные 19-25 нетранслируемых продукты РНК. МикроРНК проявляют свою активность посредством последовательно-специфических взаимодействий с 20 3'-нетранслируемыми областями (UTR) целевых мРНК. Эти эндогенно экспрессируемые микроРНК образуют предшественники «шпилек», которые затем перерабатываются в дуплекс микроРНК и далее в «зрелую» одноцепочечную молекулу микроРНК. Эта зрелая микроРНК направляет мультипротеиновый комплекс miRISC, который идентифицирует целевой сайт, напр., в областях 3'-UTR, целевых мРНК на основе их 25 комплементарности к зрелой микроРНК.

Следующий неограничивающий список генов микроРНК и их гомологов полезен в качестве трансгенов или в качестве мишеней для малых интерферирующих нуклеиновых кислот, кодируемых трансгенами (напр., губками микроРНК, антисмысловыми олигонуклеотидами, TuD РНК), в некоторых вариантах выполнения способов: hsa-let- 30 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-7i, hsa-let-7i*, 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, 35 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, 40 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- 45 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-29b-1*, hsa-miR-29b-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 и hsa-miR-99b*.

МикроРНК ингибирует функцию мРНК, которую она нацеливает, и в результате ингибирует экспрессию полипептидов, кодируемых мРНК. Таким образом, блокирование (частичное или полное) активности микроРНК (напр., подавление микроРНК) может эффективно индуцировать или восстанавливать экспрессию полипептида, экспрессия которого ингибируется (дерепрессирование полипептида). В одном варианте выполнения изобретения дерепрессия полипептидов, кодируемых мишенями мРНК из микроРНК, осуществляется путем ингибирования активности микроРНК в клетках с помощью любого из множества способов. Например, блокирование активности микроРНК может быть осуществлено путем гибридизации с малой интерферирующей нуклеиновой кислотой (напр., антисмысловым олигонуклеотидом, губкой микроРНК, TuD РНК), которая комплементарна или по существу комплементарна микроРНК, тем самым блокируя взаимодействие микроРНК с ее целевой мРНК. Используемый здесь термин малая интерферирующая нуклеиновая кислота, которая по существу комплементарна микроРНК, относится к таковой, которая способна гибридизоваться с микроРНК и блокирует активность микроРНК. В некоторых вариантах выполнения изобретения малая интерферирующая нуклеиновая кислота, которая по существу комплементарна микроРНК, представляет собой малую интерферирующую нуклеиновую кислоту, которая комплементарна микроРНК на всех, кроме 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 оснований. В некоторых вариантах выполнения изобретения последовательность малой интерферирующей нуклеиновой кислоты, которая по существу комплементарна микроРНК, представляет собой последовательность малой интерферирующей нуклеиновой кислоты, которая комплементарна микроРНК по меньшей мере на одном основании.

«Ингибитор микроРНК» является агентом, который блокирует функцию, экспрессию и/или процессинг микроРНК. Например, эти молекулы включают, но без ограничения, специфические антисмысловые микроРНК, губки микроРНК, tough decoy РНК (TuD РНК) и олигонуклеотиды микроРНК (двухцепочечные, шпилечные, короткие

олигонуклеотиды), которые ингибируют взаимодействие микроРНК с комплексом Дроша. Ингибиторы микроРНК могут экспрессироваться в клетках из трансгенов нуклеиновой кислоты, как обсуждалось выше. Губки микроРНК специфически ингибируют микроРНК через комплементарную гептамерную затравочную

5 последовательность (Ebert, M.S. Nature Methods, Epub August, 12, 2007;). В некоторых вариантах выполнения изобретения полное семейство микроРНК можно подавить с использованием единственной последовательности губок. TuD РНК обеспечивают эффективное и долговременное подавление специфических микроРНК в клетках млекопитающих (см., напр., Takeshi Naraguchi, et al., Nucleic Acids Research, 2009, Vol.37, 10 No. 6 e43, содержание которой, относящееся к TuD РНК, включено в настоящий документ посредством ссылки). Другие способы подавления функции микроРНК (дерепрессия мишеней микроРНК) в клетках будут очевидны для среднего специалиста в данной области техники.

В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе 15 (напр., зкДНК), могут быть полезны для лечения расстройств, связанных с ЦНС. Используемый здесь термин «расстройство, связанное с ЦНС» относится к заболеванию или состоянию центральной нервной системы. Расстройство, связанное с ЦНС, может влиять на спинной мозг (напр., миелопатия), головной мозг (напр., энцефалопатия) или ткани, окружающие головной и спинной мозг. Расстройство, связанное с ЦНС, может 20 иметь генетическое происхождение, которое либо унаследовано, либо приобретено через соматическую мутацию. Расстройство, связанное с ЦНС, может быть психологическим состоянием или расстройством, напр., Синдромом дефицита внимания с гиперактивностью, Расстройством аутистического спектра, Расстройством настроения, Шизофренией, Депрессией, Синдромом Ретта и т.д. Расстройство, связанное с ЦНС, 25 может быть аутоиммунным расстройством. Расстройство, связанное с ЦНС, также может быть раком ЦНС, напр., раком головного мозга. Расстройство, связанное с ЦНС, которое является раком, может быть первичным раком ЦНС, напр., астроцитомой, глиобластомами и т.д., или может быть раком, который метастазирует в ткани ЦНС, напр., раком легкого, который метастазирует в головной мозг. Другие 30 неограничивающие примеры расстройств, связанных с ЦНС, включают Болезнь Паркинсона, Лизосомную Болезнь Накопления, Ишемию, Нейропатическую Боль, Боковой амиотрофический склероз (ALS), Рассеянный склероз (MS) и болезнь Канавана (CD).

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты (напр., 35 зкДНК), описанные в настоящем документе, могут быть полезны для доставки генной терапии к кардиальным клеткам (напр., тканям сердца). Соответственно, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты (напр., зкДНК), описанные в настоящем документе, могут быть полезны для лечения сердечно-сосудистых расстройств. Используемый здесь термин «сердечно-сосудистое расстройство» относится 40 к заболеванию или состоянию сердечно-сосудистой системы. Сердечно-сосудистые заболевания могут поражать сердце, систему кровообращения, артерии, вены, кровеносные сосуды и/или капилляры. Сердечно-сосудистое расстройство может иметь генетическое происхождение, которое либо унаследовано, либо приобретено посредством соматической мутации. Неограничивающие примеры сердечно-сосудистых 45 расстройств включают ревматическую болезнь сердца, болезнь клапанов сердца, гипертоническую болезнь сердца, аневризму, атеросклероз, гипертонию (напр., высокое кровяное давление), периферическую артериальную болезнь (PAD), ишемическую болезнь сердца, стенокардию, заболевание коронарной артерии, инфаркт миокарда,

сосудистые заболевания головного мозга, транзиторную ишемическую атаку, воспалительную болезнь сердца, кардиомиопатию, перикардальное заболевание, врожденные пороки сердца, сердечную недостаточность, инсульт и миокардит из-за болезни Шагаса.

5 В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (напр., зкДНК), могут быть нацелены на легкие и/или ткани легочной системы. Соответственно, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты (напр., зкДНК), описанные в настоящем документе, могут быть полезны для лечения заболевания легких. Используемый здесь термин «заболевание
10 легких» относится к заболеванию или состоянию легочной системы. Заболевание легких может влиять на легкие или мышцы, участвующие в дыхании. Заболевание легких может иметь генетическое происхождение, которое либо унаследовано, либо приобретено посредством соматической мутации. Заболевание легких может быть раком легкого, включая, но без ограничения, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак
15 легкого и карциноидную опухоль легкого. Другие неограничивающие примеры заболеваний легких включают острый бронхит, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), асбестоз, астму, бронхоэктазу, бронхиолит, облитерирующий бронхиолит с организующейся пневмонией (BOOP), бронхолегочную дисплазию, биссиноз, хронический бронхит, кокцидиоидомикоз (Coccidi), хроническую обструктивную болезнь
20 легких (COPD), криптогенную организующуюся пневмонию (COP), кистозный фиброз, эмфизему, Хантавирусный Легочный Синдром, гистоплазмоз, Метапневмовирус человека, гиперчувствительный пневмонит, грипп, лимфангиоматоз, мезотелиому, Ближневосточный Респираторный Синдром, нетуберкулезную *Mycobacterium*, коклюш, пневмокониоз (Болезнь Черных Легких), пневмонию, первичную цилиарную дискинезию,
25 первичную легочную гипертензию, артериальную легочную гипертензию, легочный фиброз, легочное сосудистое заболевание, Респираторный Синцитиальный Вирус (RSV), саркоидоз, Тяжелый Острый Респираторный Синдром (SARS), силикоз, апноэ во сне, Синдром Внезапной Смерти Ребенка (SIDS) и туберкулез.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные
30 в настоящем документе (напр., зкДНК), могут нацеливать ткань печени. Соответственно, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (напр., зкДНК), могут быть полезны для лечения заболевания печени. Используемый здесь термин «заболевание печени» относится к заболеванию или состоянию печени. Заболевание печени может иметь генетическое происхождение,
35 которое либо унаследовано, либо приобретено посредством соматической мутации. Заболевание печени может быть раком печени, включая, но без ограничения, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), фибролаамеллярную карциному, холангиокарциному, ангиосаркому и гепатобластому. Другие неограничивающие примеры заболеваний легких включают Синдром Алагилла, Дефицит Альфа 1 Анти-
40 Трипсина, аутоиммунный гепатит, билиарную атрезию, цирроз, кистозную болезнь печени, жировую болезнь печени, галактоземию, желчные камни, синдром Жильбера, гемохроматоз, болезнь печени во время беременности, неонатальный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, порфирию, синдром Рея, саркоидоз, токсический гепатит, Нарушение Отложения Гликогена Типа 1, тирозинемия,
45 вирусный гепатит А, В, С, болезнь Вильсона и шистосомоз.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (напр., зкДНК), могут нацеливать ткань почки. Соответственно, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные в

настоящем документе (напр., зкДНК), могут быть полезны для лечения заболеваний почек. Используемый здесь термин «заболевание почек» относится к заболеванию или состоянию печени. Заболевание печени может иметь генетическое происхождение, которое либо унаследовано, либо приобретено посредством соматической мутации.

- 5 Заболевание печени может быть раком почки, включая, но без ограничения, рак клеток почки, светло-клеточный рак, папиллярный рак типа 1, папиллярный рак типа 2, хромофобный рак, онкоцитарный рак, рак собирающих протоков, переходно-клеточный рак почечной лоханки и опухоль Вильма. Другие неограничивающие примеры заболеваний почек включают синдром Abderhalden-Kaufmann-Lignac (Нефропатический
- 10 Цистиноз), Острую Почечную Недостаточность/Острое Почечное Повреждение, Острую Лобарную Нефронию, Острую Фосфатную Нефропатию, Острый Тубулярный Некроз, Дефицит Аденинфосфорибозилтрансферазы, Аденовирусный Нефрит, Синдром Альпорта, Амилоидоз, Ангиомиолипому, Анальгетическую Нефропатию, Ангиотензиновые Антитела и Фокально-сегментарный Гломерулосклероз,
- 15 Антифосфолипидный Синдром, связанный с Терапией Анти-TNF- α Гломерулонефрит, Мутации APO11, Синдром Кажущегося Избытка Минералокортикоидов, Нефропатия Аристолохиевой Кислоты, Балканскую Эндемическую Нефропатию, Синдром Барттера, Бетурию, β -Талассемийное Почечное Заболевание, Желчную Канальцевую Нефропатию, Полному ВК, Нефропатию C1q, Кардиоренальный синдром, Нефропатию CFHR5,
- 20 Холестериновый Эмболи, Синдром Черджа-Стросс, Хилурию, Коллапсирующую Гломерулопатию, Связанную с CMV Коллапсирующую Гломерулопатию, Врожденный Нефротический Синдром, Коноренальный Синдром (Синдром Mainzer-Saldino или Болезнь Mainzer-Saldino), Контрастную Нефропатию, Интоксикацию Сульфатом Меди, Кортикальный Некроз, Криоглобуинемию, Вызванное Кристаллами Острое Почечное
- 25 Повреждение, Кистозную Болезнь Почек, Приобретенную, Цистинурию, Болезнь Плотного Осадка (MPGN Тип 2), Болезнь Dent (X-связанный Рecessивный Нефролитиаз), Синдром Нарушенного Баланса при Диализе, Диабетическую Болезнь Почек, Несахарный Диабет, Синдром EAST, Эктопический Мочеточник, Отек, Болезнь Эрдгейма-Честера, Болезнь Фабри, Семейную Гипокальциурическую Гиперкальциемию,
- 30 Синдром Фанкони, синдром Фразера, Фибронектиновую Гломерулопатию, Фибриллярный Гломерулонефрит и Иммунотактоидную Гломерулопатию, Синдром Фрейли, Фокально-Сегментарным Гломерулосклерозом, Фокальным Склерозом, Фокальным Гломерулосклерозом, синдром Galloway Mowat, Синдромом Гительмана, Гломерулярными Заболеваниями, Гломерулярным Тубулярным Рефлюксом,
- 35 Гликозурией, Синдром Гудпасчера, Гемолитическим Уремическим Синдромом (HUS), Атипичным Гемолитическим Уремическим Синдромом (aHUS), Гемофагоцитарным Синдромом, Геморрагическим Циститом, Гемосидерозом, связанным с Пароксизмальной Ночной Гемоглобинурией и Гемолитической Анемией, Гепатической Вено-Окклюзионной Болезнью, Синдром Синусоидальной Обструкции, Связанной с
- 40 Гепатитом С Болезнью Почек, Гепаторенальным Синдромом, Связанной с ВИЧ Нефропатией (HIVAN), Подковообразной Почкой (Renal Fusion), Язва Ханнера, Гиперальдостеронизмом, Гиперкальциемией, Гиперкалиемией, Гипермагниемией, Гипернатриемией, Гипероксалурией, Гиперфосфатемией, Гипокальциемией, Гипокалиемией, дисфункцией почек, вызванной Гипокалиемией, Гипомагниемией,
- 45 Гипонатриемией, Гипофосфатемией, Нефропатией IgA, Нефропатией IgG4, Интерстициальным Циститом, Синдромом Раздраженного Мочевых Пузыря, Интерстициальным Нефритом, Синдромом Ivemark, Камнями в Почках, Нефролитиазом, Лептоспирозной Почечной Болезнью, Болезнью Отложения Легких Цепей, Болезнью

Отложения Моноклональных Иммуноглобулинов, Синдром Лиддла, синдром Lightwood-Albright, Липопротеиновой Гломерулопатией, Литиевой Нефротоксичностью, Мутациями LMX1B, Вызывающими Наследственный FSGS, Гематурией с Болями в Пояснице, Волчаночной Почечной Болезнью, Волчаночным Нефритом, Гломерулонефритом, 5 Вызванным Болезнью Лайма, Малярийной Нефропатией, Злокачественной Гипертензией, Малакоплакией, Меатальным Стенозом, Медулярно-Спонгиозной Почкой, Мегауретером, Меламиновой Токсичностью и Почкой, Мембрано-Пролиферативным Гломерулонефритом, Мембранозной Нефропатией, МезоАмериканской Нефропатией, Метаболическим Ацидозом, Метаболическим 10 Алкалозом, Микроскопическим Полиангитом, Молочно-Щелочный синдромом, Заболеванием Минимальных Изменений, Мультикистозной Диспластической Почкой, Множественной Миеломой, Миелопролиферативными Новообразованиями и Гломерулопатией, Синдромом Ногтей-Надколенника, Нефрокальцинозом, Нефрогенным Системным Фиброзом, Нефроптозом (Блуждающая Почка, Опускание 15 Почки), Нефротическим Синдромом, Нейрогенным Мочевым Пузырем, Узелковым Гломерулосклерозом, Негонококковым, Синдром Аорто-Мезентериального Пинцета, Орофациодигитальным Синдром, Ортостатической Гипотензией, Ортостатической Протеинурией, Осмотическим Диурезом, Почкой Page, Сосочковым Некрозом, Папиллоренальным Синдромом (Почечно-колобомовый Синдром, Изолированная 20 Гипоплазия Почка), Перитонеальным Почечным Синдромом, Задним Клапаном Уретры, Постинфекционным Гломерулонефритом, Постстрептококковым Гломерулонефритом, Узелковым Полиартериитом, Поликистозной Болезнью Почек, Задним Клапаном Уретры, Презклампсией, Пролиферативным Гломерулонефритом с Отожениями Моноклональных IgG (болезнь Nasr), Протеинурией (Белок в Моче), 25 Псевдогиперпальдостеронизмом, Псевдогипопаратиреозом, Легочно-Почечным Синдромом, Пиелонефритом (Инфекция Почек), Пионефроз, Радиационной Нефропатией, Синдромом Возобновленного Кормления, Рефлюкс-Нефропатией, Быстро Прогрессирующим Гломерулонефритом, Почечным Абсцессом, Перинефральным Абсцессом, Почечным Агенезом, Аневризмой Почечной Артерии, 30 Стенозом Почечной Артерии, Раком Клеток Почки, Кистой Почки, Почечной Гипоурициемией с Вызванной Физической Нагрузкой Острой Почечной Недостаточностью, Инфарктом Почки, Почечной Остеодистрофией, Почечным Тубулярным Ацидозом, Сбросом Осмостата, Ретрокавальным Мочеточником, Ретроперитонеальным Фиброзом, Рабдомиолизом, Рабдомиолизом, связанным с 35 Бариатрической хирургией, Почечным Заболеванием Связанным с Ревматоидным Артритом, Саркоидозной Болезнью Почек, Потерей Соли, Почечной и Церебральной, Иммуно-Костной Дисплазией Schimke, Склеродермическим Почечным Кризом, Почечным Синдромом Змеевидной Фибулы-Поликистоза, Синдром Exner, Нефропатией Серповидных Клеток, Отравлением Кремнеземом и Хронической Болезнью Почек, 40 Заболеванием Почек после Трансплантации Гематопозитических Клеток, Заболеванием Почек, связанным с Трансплантацией Стволовых Клеток, Болезнью Тонкой Базальной Мембраны, Доброкачественной Семейной Гематурией, Тригонитом, Туберозным Склерозом, Тубулярной Дисгенезией, Синдромом Лизиса Опухоли, Уремией, Уремической Оптической Нейропатией, Уретероцеле, Уретральной Карункулой, 45 Стриктурой Уретры, Недержание Мочи у Женщин, Инфекцией Мочевыводящих Путей, Воспалением Мочевых Путей, Мочепузырно-Кишечным Свищом, Везикоуретеральным Рефлюксом, Болезнью фон Гиппеля-Линдау, Связанной с Варфарином Нефропатией, Гранулематоз Вегенера, Гранулематоз с Полиангиитом и Синдром Wunderlich.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (напр., зкДНК), могут быть полезны для доставки генной терапии в ткань глаза. Соответственно, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (напр., зкДНК), могут быть полезны для лечения глазных расстройств. Используемый здесь термин «глазное расстройство» относится к заболеванию или состоянию глаза. Сердечно-сосудистые заболевания могут поражать глаз, склеру, роговицу, переднюю камеру, заднюю камеру, радужную оболочку, зрачок, линзу, стекловидное тело, сетчатку или зрительный нерв. Глазное расстройство может иметь генетическое происхождение, которое либо унаследовано, либо приобретено посредством соматической мутации.

Неограничивающие примеры глазных заболеваний и расстройств включают, но не ограничиваются: возрастную дегенерацию желтого пятна, ретинопатию, диабетическую ретинопатию, макулярный отек, глаукому, пигментную дистрофию сетчатки, болезнь Штаргардта, болезнь Ашера и врожденный амавроз Лебера и рак глаза.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (напр., зкДНК), могут быть полезны для доставки генной терапии в ткань крови (напр., клетки крови). Соответственно, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (напр., зкДНК), могут быть полезны для лечения расстройств крови. Используемый здесь термин «расстройство крови» относится к заболеванию или состоянию крови. Расстройство крови может иметь генетическое происхождение, которое либо унаследовано, либо приобретено посредством соматической мутации.

Неограничивающие примеры заболеваний и расстройств крови включают, но не ограничиваются, анемию (напр., анемию при хроническом заболевании почек, апластическую анемию, миелодиспластическую анемию, серповидноклеточную анемию), тромбоз глубоких вен, гемофилию (напр., гемофилию А, гемофилию В, гемофилию С), Пурпуру Геноха-Шенлейна, легочную эмболию, талассемию и болезнь фон Виллебранда.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (напр., зкДНК), могут быть полезны для доставки молекул, редактирующих ген (напр., нуклеаз), субъекту. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, содержит вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу. Используемые здесь термины «эндонуклеаза» и «нуклеаза» относятся к ферменту, который расщепляет фосфодиэфирную связь или связи внутри полинуклеотидной цепи. Нуклеазы могут быть природными или генетически модифицированными. Генетически сконструированные нуклеазы особенно полезны для редактирования генома и обычно классифицируются на четыре семейства: нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), сконструированные мегануклеазы и CRISPR-ассоциированные белки (Cas-нуклеазы).

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеаза представляет собой ZFN. В некоторых вариантах выполнения изобретения ZFN содержит домен расщепления FokI. В некоторых вариантах выполнения изобретения ZFN содержит кратную группу Cys₂His₂. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеаза представляет собой TALEN. В некоторых вариантах выполнения изобретения TALEN содержит домен расщепления FokI. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеаза представляет собой сконструированную мегануклеазу.

Термин «CRISPR» относится к «кластеризованным регулярно пересекающимся коротким палиндромным повторам», которые представляют собой локусы ДНК,

содержащие короткие повторения последовательностей оснований. Локусы CRISPR образуют часть прокариотической адаптивной иммунной системы, которая придает устойчивость к чужеродному генетическому материалу. Каждый локус CRISPR фланкирован короткими сегментами «спейсерной ДНК», которые получены из геномного материала вируса. В системе CRISPR Типа II спейсерная ДНК гибридизуется с транскрибирующей РНК (tracrRNA, тракрРНК) и перерабатывается в CRISPR-РНК (крРНК, crRNA) и затем ассоциируется с CRISPR-ассоциированными нуклеазами (Cas-нуклеазами) с образованием комплексов, которые распознают и разлагают чужеродную ДНК. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеаза представляет собой CRISPR-ассоциированную нуклеазу (Cas-нуклеазу). Примеры CRISPR-нуклеаз включают, но без ограничения, Cas9, Cas6 и dCas9. dCas9 представляет собой сконструированный белок Cas, который связывается с целевым локусом, но не расщепляет указанный локус. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеазой является Cas9. В некоторых вариантах выполнения изобретения Cas9 получают из бактерий *S. pyogenes* (SpCas9).

Для целей редактирования генома, система CRISPR может быть модифицирована для объединения тракрРНК и крРНК в одну гидовую РНК (огРНК) или просто (гРНК). Используемый здесь термин «гидовая РНК» или «гРНК» относится к полинуклеотидной последовательности, которая комплементарна целевой последовательности в клетке и ассоциирует с Cas-нуклеазой, тем самым направляя Cas-нуклеазу на

последовательность-мишень. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, содержит вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую гидовую РНК (гРНК). В некоторых вариантах выполнения изобретения гРНК имеет длину от 1 до 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения гРНК имеет длину от 5 до 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения гРНК имеет длину от 10 до 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения гРНК имеет длину от 14 до 18 нуклеотидов. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, содержит вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую гРНК и CRISPR-нуклеазу.

В некоторых аспектах изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая не кодирует функциональный белок. Например, в контексте генной терапии интеграция трансгенного промотора может вызывать активацию онкогена. Соответственно, в некоторых вариантах выполнения изобретение относится к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей беспромоторную конструкцию. Не желая быть связанными с какой-либо конкретной теорией, в некоторых вариантах выполнения изобретения беспромоторная экспрессирующая конструкция полезна в качестве субстрата для редактирования генов.

Используемый здесь термин «редактирование генома» относится к добавлению, разрушению или изменению геномных последовательностей {напр., последовательности генов}. В некоторых вариантах выполнения изобретения редактирование генома выполняется с использованием сконструированных белков и связанных молекул. В некоторых аспектах редактирование генома включает применение сконструированных нуклеаз для расщепления целевого геномного локуса. В некоторых вариантах выполнения изобретения редактирование генома дополнительно включает вставку, делецию, мутацию или замещение остатков нуклеиновой кислоты в расщепленном локусе. В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка, делеция, мутация или замещение остатков нуклеиновой кислоты в расщепленном локусе осуществляется посредством эндогенных клеточных механизмов, таких как гомологичная рекомбинация

(HR) и не гомологичное концевое соединение (NHEJ). Иллюстративные технологии редактирования генома включают, но без ограничения, Эффекторные Нуклеазы, Подобные Активаторам Транскрипции (TALEN), Нуклеазы «Цинковые Пальцы» (ZFN), сконструированные мегануклеазы переделанные хоуминг-эндонуклеазы, систему CRISPR/Cas. В некоторых вариантах выполнения изобретения технологии редактирования генов представляют собой белки или молекулы, относящиеся к TALEN, включая, но без ограничения, эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE) и рестрикционные эндонуклеазы {напр., FokI}. В некоторых вариантах выполнения изобретения технологии редактирования генов представляют собой белки или молекулы, относящиеся к ZFN, включая, но без ограничения, белки, содержащие кратную группу Cys₂His₂ {напр., Zif268 (EGR1)} и рестрикционные эндонуклеазы {напр., FokI}. В некоторых вариантах выполнения изобретения технологии редактирования генов представляют собой белки или молекулы, связанные с системой CRISPR/Cas, включая, но без ограничения, Cas9, Cas6, dCas9, CRISPR-РНК (крРНК) и транс-активирующую крРНК (тракрРНК). В некоторых вариантах выполнения изобретения промоторная конструкция обеспечивает субстрат для TALENS, нуклеаз «цинковые пальцы» (ZFN), мегануклеаз, Cas9 и других белков, редактирующих ген.

В некоторых аспектах изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая кодирует ДНК-вакцину.

Используемый здесь термин «ДНК-вакцина» относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей антиген, который стимулирует иммунный ответ {напр., клеточный иммунный ответ или гуморальный иммунный ответ} против этого антигена в хозяине. В некоторых вариантах выполнения изобретения иммунный ответ является защитным ответом, который защищает от будущей инфекции или состояния. Однако в некоторых вариантах выполнения изобретения иммунный ответ лечит {напр., уничтожает или ослабляет} существующую инфекцию или состояние. Примеры ДНК-вакцин включают цепь Ig с HL, scFv, однодоменный Ig, полученный от верблюдов (VhH) или хрящевых рыб (Vnar), нанотело и другие распознающие паратоп пептиды и слитые пептиды, которые в совокупности называются молекулами Ig (или подобными Ig).

В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты кодирует Ig или подобную Ig молекулу. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулы Ig (или подобные Ig) представляют собой немодифицированные белковые последовательности, полученные из последовательностей моноклональных антител. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулы Ig (или подобные Ig) представляют собой немодифицированные белковые последовательности, полученные из последовательностей моноклональных антител мыши или других млекопитающих.

В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулы Ig (или подобные Ig) представляют собой немодифицированные белковые последовательности, полученные из синтетических случайно генерируемых пептидных библиотек. В некоторых вариантах выполнения изобретения библиотеки были получены из комплементарной ДНК, полученной от наивных видов позвоночных. Эти виды включают, но без ограничения, млекопитающих, таких как приматы (напр., люди и не являющиеся человеком приматы), грызуны (напр., мыши, крысы), копытные, верблюды, лошади, собаки, кошки, сумчатые и животные, представляющие сельскохозяйственный интерес; виды птиц, включая цыплят, уток и гусей; виды рыб, включая хрящевую рыбу, миногу, угря и виды челюстных рыб.

В некоторых вариантах выполнения изобретения гетерологичная нуклеиновая

кислота кодирует тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина (Ig), так что при введении в пермиссивную клетку собранный Ig секретируется в систему кровообращения. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекула Ig не секретируется и действует внутренне как так называемое «внутреннее тело».

5 В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты кодирует молекулу Ig, которая представляет собой сконструированное одноцепочечное антитело, состоящее из переменных областей тяжелой и легкой цепей в одном полипептиде (scFv). ScFv сохраняет avidность и специфичность для целевого антигена.

10 В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты кодирует молекулу Ig, которая связывается с микробными агентами и влияет на инфекционность микроба. В некоторых вариантах выполнения изобретения микробные агенты являются прокариотическими организмами. В некоторых вариантах выполнения изобретения микробными агентами являются риккетция, 15 микопlasма или другие внутриклеточные формы жизни.

В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты кодирует молекулу Ig, которая связывается с вирусным структурным белком(ами) патогенных вирусов человека, включая, но без ограничения, вирусный белок вируса Эбола, вирусный белок иммунодефицита человека, вирусный 20 белок папилломы, вирусный белок простого вируса герпеса 1, вирусный белок простого вируса герпеса 2, вирусный белок HCV A, вирусный белок HCV B, вирусный белок HCV C, вирусный белок HCV не-A, вирусный белок HCV не-B или вирусный белок геморрагической лихорадки денге. В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты кодирует молекулу Ig, которая 25 связывается с вирусным структурным белком(ами) зоонозного патогена, включая, но без ограничения, вирус ящура и вирус бешенства.

В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты, раскрытые в описании, полезны для получения модифицированных клеток, таких как клетки, модифицированные *ex vivo*. Используемый здесь термин «модифицированная клетка *ex vivo*» относится к клетке 30 (напр., к клетке млекопитающего), которая удалена из субъекта, генетически модифицирована (напр., трансфицирована или трансдуцирована экзогенными нуклеиновыми кислотами или генетически перепрограммирована), культивирована или размножена, и, необязательно, возвращена субъекту (напр., либо тому же субъекту, либо другому субъекту). Как правило, модифицированные *ex vivo* клетки полезны для 35 аутологичной клеточной терапии или аллогенной клеточной терапии. Например, клетки могут быть удалены из субъекта, имеющего заболевание, связанное с определенным генетическим дефектом (напр., сверхэкспрессией конкретного белка), трансфицированы нуклеиновой кислотой, которая корректирует генетический дефект (напр., уменьшает экспрессию белка) и повторно введены субъекту. В другом неограничивающем примере 40 клетки удалены из субъекта, генетически перепрограммированы (напр., дедифференцированы или трансдифференцированы в стволовые клетки), размножены и повторно введены субъекту. В некоторых вариантах выполнения изобретения модифицированные *ex vivo* клетки, полученные путем трансфекции нуклеиновой кислотой, описанной в настоящем документе, имеют улучшенный профиль безопасности 45 по сравнению с клетками *ex vivo*, получаемыми доступными в настоящее время векторами для генной терапии.

В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты, раскрытые в описании, пригодны для получения химерных антигенов Т-клеток (CART). Химерные Антигенные Рецепторы

(CAR) представляют собой сконструированные рецепторы Т-клеток, проявляющие специфичность против целевых антигенов на основе одноцепочечного фрагмента FV (scFv). Как правило, CART производится путем трансдукции Т-клеток с лентивирусными векторами, содержащими ДНК, кодирующую CAR. Лентивирусная трансдукция в некоторых вариантах выполнения повышает риск инсерционного мутагенеза, приводящего к раку. Описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты, имеющие асимметричные расщепленные самокомплементарные последовательности, демонстрируют уменьшенную вероятность инсерционного мутагенеза по сравнению с другими методами генной терапии. Соответственно, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, содержит вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты (напр., трансген), кодирующую CAR. В некоторых вариантах выполнения изобретения CART, получаемые путем трансдукции с нуклеиновой кислотой, раскрытой в описании, демонстрирует улучшенный профиль безопасности по сравнению с CART, получаемых лентивирусной трансдукцией.

Дополнительные Компоненты

В дополнение к основным элементам, указанным выше для нуклеиновой кислоты, нуклеиновая кислота также содержит обычные необходимые контрольные элементы, которые функционально связаны со вставкой гетерологичной нуклеиновой кислоты (напр., трансгеном) способом, который позволяет транскрибировать, транслировать и/или экспрессировать в клетке, трансфицированной нуклеиновой кислотой, описанной в настоящем документе. Используемый здесь термин «функционально связанные» последовательности включает как последовательности контроля экспрессии, которые смежны с интересующим геном, так и последовательности контроля экспрессии, которые действуют в транс-положении или на расстоянии, контролируя представляющий интерес ген.

Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминирующие, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессирования РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (polyA); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусную последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию кодированного продукта. В данной области известно и может быть использовано множество последовательностей контроля экспрессии, включая промоторы, которые являются нативными, конститутивными, индуцируемыми и/или тканеспецифическими.

В некоторых вариантах выполнения изобретения вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты (напр., трансген) содержит последовательность, кодирующую белок, которая функционально связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями. Как используется в настоящем документе, кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты и регуляторные последовательности называются «функционально» связанными, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы выполнять экспрессию или транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты (напр., трансгена) под воздействием или контролем регуляторных последовательностей. Если желательно, чтобы последовательность нуклеиновой кислоты (напр., трансген) была транслирована в функциональный белок, две последовательности ДНК называют функционально связанными, если индукция промотора в 5'-регуляторных последовательностях приводит к транскрипции кодирующей последовательности и

если природа связи между двумя последовательностями ДНК (1) не приводит к введению мутации со сдвигом рамки считывания, (2) не препятствует способности промоторной области направлять транскрипцию кодирующих последовательностей или (3) не мешает способности соответствующего транскрипта РНК транслироваться в белок. Таким образом, промоторная область была бы функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, если бы промоторная область могла осуществлять транскрипцию этой последовательности ДНК так, что полученный транскрипт мог бы быть транслирован в желаемый белок или полипептид. Аналогично, две или более кодирующих областей функционально связаны, когда они связаны таким образом, что их транскрипция из общего промотора приводит к экспрессии двух или более белков, которые были транслированы в рамку. В некоторых вариантах выполнения изобретения функционально связанные кодирующие последовательности приводят к слитому белку. В некоторых вариантах выполнения изобретения функционально связанные кодирующие последовательности приводят к функциональной РНК (напр., гРНК).

Для кодирующих белок нуклеиновых кислот (напр., трансгенов) последовательность полиаденилирования обычно вводится после трансгенных последовательностей и перед последовательностью 3'-AAV ITR. Вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты (напр., трансген), пригодная для настоящего изобретения, может также содержать интрон, желательно расположенный между последовательностью промотор/энхансер и трансгеном. Одна возможная интронная последовательность получена из SV-40 и упоминается как интронная последовательность SV-40 T. Другим векторным элементом, который может быть использован, является внутренний участок посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES используется для получения более чем одного полипептида из одного транскрипта гена. Последовательность IRES была бы использована для получения белка, который содержит более одной полипептидной цепи. Выбор этих и других общих векторных элементов является общепринятым, и многие такие последовательности доступны (см., напр., Sambrook et al., и ссылки, цитируемые там, например, на страницах 3.18 3.26 и 16.17 16.27 и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989]. В некоторых вариантах выполнения изобретения последовательность вируса ящура 2А включена в полипротеин; это маленький пептид (приблизительно 18 аминокислот в длину), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, M D et al, EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p.8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459). Активность расщепления последовательности 2А ранее была продемонстрирована в искусственных системах, включающих плазмиды и векторы генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan, MD et al, EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N Met at, J Virology, November 1996; p.8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et al., Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et al., Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931.; и Klump, H et al., Gene Therapy, 2001; 8: 811-817).

Конкретная природа регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии генов в клетках-хозяевах, может варьироваться между видами, типами тканей или клеток, но в общем случае должна включать по мере необходимости 5'-нетранскрибированные и 5'-нетранслированные последовательности, связанные с инициацией транскрипции и трансляции соответственно, такие как ТАТА-бокс, последовательность экзонирования, последовательность СААТ, элементы энхансера и тому подобное. В частности, такие 5'-нетранскрибированные регуляторные

последовательности будут содержать промоторную область, которая содержит промоторную последовательность для транскрипционного контроля функционально присоединенного гена. Регуляторные последовательности могут также содержать энхансерные последовательности или вышележащие активаторные последовательности, как того требуется. Векторы по изобретению могут необязательно содержать 5'-лидерную или сигнальную последовательности. Выбор и дизайн соответствующего вектора находятся в пределах способностей и усмотрения специалиста в данной области техники.

Примеры конститутивных промоторов включают, без ограничения, ретровирусный промотор LTR вирус саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) [см., напр., Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)], промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор (3-актина, промотор фосфоглицерин-киназы (PGK) и промотор EFla [Invitrogen].

Индукцируемые промоторы позволяют регулировать экспрессию генов и могут регулироваться экзогенно с помощью подпитывающих соединений, факторов окружающей среды, таких как температура или наличие определенного физиологического состояния, напр., острая фаза, конкретное дифференцированное состояние клетки, или только в реплицирующих клетках. Индуцируемые промоторы и индуцируемые системы доступны из различных коммерческих источников, включая, без ограничений, Invitrogen, Clontech и Ariad. Многие другие системы описаны и могут быть легко подобраны специалистом в данной области техники. Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно питающими промоторами, включают цинк-индуцируемый промотор металлотионина барана (MT), дексаметазон (Dex)-индуцируемый промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), T7 полимеразную промоторную систему (WO 98/10088); экдизонный промотор насекомых (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), тетрациклин-подавляемую систему, Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), тетрациклин-индуцируемую систему (Gossen et al., Science, 268:1766-1769 (1995), смотри также Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), Ru486-индуцируемую систему Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) и Wang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997)) и рапамицин-индуцируемую систему (Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Другими видами индуцируемых промоторов, которые могут быть полезны в этом контексте, являются те, которые регулируются определенным физиологическим состоянием, напр., температурой, острой фазой, конкретным дифференцированным состоянием клетки, или только в реплицирующих клетках.

В другом варианте выполнения изобретения будет использоваться нативный промотор для трансгена. Нативный промотор может быть предпочтительным, когда требуется, чтобы экспрессия трансгена должна имитировать нативную экспрессию. Нативный промотор можно использовать, когда экспрессию трансгена необходимо регулировать во времени или в процессе развития, или тканеспецифичным образом, или в ответ на специфические транскрипционные стимулы. В следующем варианте выполнения изобретения другие элементы, осуществляющие контроль нативной экспрессии, такие как энхансерные элементы, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Козак, могут также использоваться для имитации нативной экспрессии.

В некоторых вариантах выполнения изобретения регуляторные последовательности придают тканеспецифические возможности экспрессии генов. В некоторых случаях тканеспецифические регуляторные последовательности связывают тканеспецифические

транскрипционные факторы, которые индуцируют транскрипцию специфическим для ткани образом. Такие тканеспецифические регуляторные последовательности (напр., промоторы, энхансеры и т.д.) хорошо известны в данной области техники. Типичные тканеспецифические регуляторные последовательности включают, но без ограничения, следующие тканеспецифические промоторы: специфичный для печени промотор глобулина сыворотки, связывающего тироксин (TBG), промотор инсулина, промотор глюкогона, промотор соматостатина, промотор панкреатического полипептида (PPY), промотор синапсин-1 (Syn), промотор креатинкиназы (МСК), промотор десмина млекопитающего (DES), промотор тяжелой цепи α -миозина (α -МНС) или промотор кардиотропонина (сTnT). Другие иллюстративные промоторы включают промотор Бета-актина, промотор ядра вируса гепатита В, Sandig et al., *Gene Ther.*, 3:1002-9 (1996); промотор альфа-фетопротейна (AFP), Arbuthnot et al., *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996)), промотор костного остеокальцина (Stein et al., *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96 (1997)); промотор костного сиалопротеина (Chen et al., *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64 (1996)), промотор CD2 (Hansal et al., *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998); промотор тяжелой цепи иммуноглобулина, промотор α -цепи рецептора Т-клеток, нейронный промотор, такой как нейронспецифической эналазы (NSE) (Andersen et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), промотор легкой цепи нейрофиламентного гена (Piccioli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)), и промотор нейроспецифического гена *vgf* (Piccioli et al., *Neuron*, 15:373-84 (1995)) среди прочих, которые будут очевидным для специалиста в данной области техники.

Получение линейной дуплексной ДНК с закрытым концом (зкДНК) В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу получения нуклеиновой кислоты, раскрытой в описании (напр., зкДНК), включающему: (i) введение в перmissiveную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, фланкированной по меньшей мере одной прерываемой самокомплементарной последовательностью, причем каждая самокомплементарная последовательность имеет сайт оперативного концевого разрешения и связывающий элемент репликационного белка по типу разматывающегося рулона, в котором самокомплементарная последовательность прерывается поперечной последовательностью, образующей две противоположные продольно-симметричные «петли-на-стебле», каждая из противоположащих продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» в диапазоне от 5 до 15 пар оснований в длину и часть «петля», имеющую от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов; и (ii) поддержание перmissiveной клетки в условиях, в которых репликационный белок по типу разматывающегося рулона в перmissiveной клетке инициирует продуцирование множественных копий нуклеиновой кислоты.

Количество копий, полученных в результате продуцирования нуклеиновой кислоты, может быть выражено как кратное первоначальному количеству копий нуклеиновой кислоты (напр., 1, 2, 10, 100 или более первоначальных копий), вводимых в перmissiveную клетку. В некоторых вариантах выполнения изобретения получение множественных копий нуклеиновой кислоты приводит к увеличению копий нуклеиновой кислоты в перmissiveной клетке в от 2- до 10000-кратном количестве. В некоторых вариантах выполнения изобретения получение множественных копий нуклеиновой кислоты приводит к увеличению копий нуклеиновой кислоты в перmissiveной клетке в более чем 10000-кратном количестве.

В некоторых аспектах изобретение относится к трансфицированным клеткам (напр., трансфицированным перmissiveным клеткам). Термин «трансфекция» используется для

обозначения поглощения чужеродной ДНК клеткой, и клетка была «трансфицирована», когда экзогенная ДНК была введена внутрь клеточной мембраны. В данной области техники известен ряд методик трансфекции. Смотри, напр., Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier и Chu et al. (1981) *Gene* 13:197. Такие методики могут быть использованы для введения одной или нескольких экзогенных нуклеиновых кислот, таких как вектор интеграции нуклеотидов и другие молекулы нуклеиновой кислоты, в подходящие клетки (напр., пермиссивные клетки).

«Пермиссивная клетка» относится к любой клетке, в которой раскрытая в описании нуклеиновая кислота реплицируется, или которая способна поддерживать репликацию нуклеиновой кислоты, как раскрыто в описании. В некоторых вариантах выполнения изобретения пермиссивная клетка не экспрессирует вирусные капсидные белки, способные упаковывать репликативные копии нуклеиновой кислоты в вирусную частицу. Аспекты изобретения частично связаны с неожиданным обнаружением того, что в некоторых вариантах выполнения клетки млекопитающих не являются пермиссивными для репликации нуклеиновых кислот, раскрытых в описании. Соответственно, в некоторых вариантах выполнения изобретения пермиссивная клетка представляет собой клетку, не относящуюся к млекопитающим (напр., пермиссивная клетка не является клеткой млекопитающего). В некоторых вариантах выполнения изобретения пермиссивная клетка представляет собой линию клеток насекомых, линию клеток дрожжей или линию клеток бактерий.

Примеры пермиссивных клеток насекомых включают, но без ограничения, *Spodoptera frugiperda* (напр., Sf9, Sf21), *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis subflexa*, *Anticarsia gemmatilis*, *Trichopulsia ni* (напр., клетки High-Five), *Drosophila melanogaster* (напр., S2, S3), *Antheraea eucalypti*, *Bombyx mori*, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* и др.

Примеры пермиссивных бактериальных клеток включают, но без ограничения, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* и *Pseudomonas fluorescens*.

Примеры пермиссивных дрожжевых клеток включают, но без ограничения, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Myceliophthora thermophila* C1.

Примеры пермиссивных растительных клеток включают, но без ограничения, *Nicotiana* sp., *Arabidopsis thaliana*, *Mays zea*, *Solarium* sp. или *Lemna* sp.

В некоторых вариантах выполнения изобретения пермиссивная клетка представляет собой клетку млекопитающего. Примеры пермиссивных клеток млекопитающих включают опухолевые клетки Генриетты Лакс (HeLa) и клетки почки хомячка (ВНК-21).

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, содержится внутри вектора и доставляется в пермиссивную клетку.

Используемый здесь термин «вектор» включает любой генетический элемент, такой как плазида, фаг, транспозон, космида, хромосома, искусственная хромосома, вирус, вирион и т.д., который имеет способность к репликации, когда он связан с подходящими элементами управления, и который может переносить последовательности генов между клетками. Таким образом, этот термин включает транспортные средства для клонирования и экспрессии, а также вирусные векторы. В некоторых вариантах выполнения изобретения пригодными векторами считаются те векторы, в которых сегмент нуклеиновой кислоты, подлежащий транскрибированию, помещается под

транскрипционный контроль промотора.

В некоторых вариантах выполнения изобретения способ включает экспрессию репликационного белка по типу разматывающегося рулона (напр., вирусного неструктурного белка, такого как белок AAV Rep) в пермиссивной клетке. В некоторых вариантах выполнения изобретения более чем один (напр., 2, 3, 4 или более) репликационный белок по типу разматывающегося рулона экспрессируется в пермиссивной клетке. Не желая быть связанными с какой-либо конкретной теорией, вирусный неструктурный белок(белки), экспрессируемый в пермиссивной клетке, опосредует(ют) репликацию нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе.

Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения AAV Rep78 и Rep52 экспрессируются в пермиссивной клетке, содержащей нуклеиновую кислоту, имеющую асимметричные прерываемые самокомплементарные последовательности на основе AAV2 ITR. В некоторых вариантах выполнения изобретения неструктурный вирусный белок выбирают из группы, состоящей из AAV78, AAV52, AAV Rep68 и AAV Rep 40.

В некоторых вариантах выполнения изобретения репликационный белок по типу разматывающегося рулона (напр., вирусный неструктурный белок, такой как белок AAV Rep), экспрессируемый в пермиссивной клетке, кодируется вектором вируса-помощника.

Используемый здесь термин «вектор вируса-помощника» относится к вирусному вектору, который экспрессирует молекулу(ы) (напр., один или несколько белков), необходимую для репликации нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения вектор вируса-помощника экспрессирует один или несколько репликационных белков по типу разматывающегося рулона, которые связываются с RBE прерываемой самокомплементарной

последовательности нуклеиновой кислоты и иницируют репликацию нуклеиновой кислоты, содержащей прерываемую последовательность самокомплементарной нуклеиновой кислоты. Векторы вируса-помощника, как правило, известны и включают, например, бакуловирус, аденовирус, герпесвирус, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барра и векторы на основе вируса осповакцины. В некоторых вариантах выполнения изобретения вектор вируса-помощника представляет собой экспрессионный вектор бакуловируса (BEV). Экспрессионные векторы бакуловируса, как правило, известны в данной области, например, как описано в Passer et al. Methods Mol Biol. 2007;388:55-76. Примеры векторов бакуловируса включают, но без ограничения, вектор вируса множественного ядерного полиэдроза совки калифорнийской люцерновой (Autograph californica multiple nucleopolyhedrosis virus, AcMNPV), BmNPV и вируса множественного ядерного полиэдроза совки малой (Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus). В некоторых вариантах выполнения изобретения вектор вируса-помощника представляет собой вектор вируса множественного ядерного полиэдроза совки калифорнийской люцерновой (AcMNPV).

В некоторых вариантах выполнения изобретения способы получения нуклеиновых кислот, раскрытых в описании, дополнительно включают стадию очистки множественных копий нуклеиновой кислоты из клетки (напр., пермиссивной клетки). Как правило, может быть использован любой подходящий способ очистки нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения множественные копии нуклеиновой кислоты, раскрытые в описании, очищаются наборами для плазмидной очистки, такими как набор Qiagen MiniPrep, осаждение этанолом, очистка фенол-хлороформом и т.д. Однако изобретение относится, в частности, к обнаружению того, что нуклеиновые кислоты, содержащие прерываемые самокомплементарные

последовательности, проявляют низкую эффективность связывания с хроматографическими средами с низким катионообменом (напр., диэтиламиноэтильными средами, DEAE), и что очистка с использованием силикагельных сред дает хорошо разделенные молекулярные образцы при одновременном снижении образования высокомолекулярных комплексов. Таким образом, в некоторых вариантах выполнения изобретения очистка включает контактирование нуклеиновой кислоты с силикагелевой смолой.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты, представленные здесь, могут быть использованы для доставки гетерологичной вставки в клетку, напр., для терапевтических целей. Кроме того, в некоторых аспектах изобретение относится к доставке нуклеиновых кислот, содержащих гетерологичные вставки, которые кодируют терапевтические продукты (напр., терапевтические белки, терапевтические РНК) субъекту. Чтобы избежать введения нечистых или загрязненных нуклеиновых кислот или иначе характеризовать степень или чистоту, качество или состав препарата нуклеиновой кислоты, такие препараты могут подвергаться контролю качества (КК) или другой процедуре анализа перед использованием, напр., перед введением в клетку или субъект. Например, способы анализа нуклеиновой кислоты в некоторых вариантах выполнения изобретения включают получение препарата нуклеиновой кислоты, раскрытого в описании, и определение физио-химического свойства одного или нескольких компонентов нуклеиновой кислоты в препарате, напр., продуктов репликации нуклеиновой кислоты.

Примеры физио-химических свойств, которые могут быть определены, включают, но без ограничения, растворимость, стабильность, структуру (напр., первичная структура, вторичная структура, третичная структура, четвертичная структура и т.д.), гидрофобность, содержание GC, молекулярную массу (напр., молекулярная масса одного или нескольких фрагментов или частей нуклеиновой кислоты, например, после рестрикционного переваривания) и т.д. В некоторых вариантах выполнения изобретения физио-химическое свойство представляет собой нуклеотидную последовательность одной или каждой самокомплементарной последовательности (напр., определение того, содержит ли нуклеиновая кислота, описанная в настоящем документе, усеченную поперечную последовательность).

В некоторых вариантах выполнения изобретения физио-химическое свойство представляет собой степень мультимеризации (напр., мономер, димер, тример, 4-мер или другой мультимер или конкатамер) нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах выполнения изобретения физио-химическое свойство представляет собой стехиометрию мономерных и/или мультимерных форм продукта репликации в препарате нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах выполнения изобретения физио-химическое свойство представляет собой восприимчивость одного или нескольких продуктов репликации (напр., полученных из препарата нуклеиновой кислоты) для переваривания рестрикционной эндонуклеазой. Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, расщепляется одним или несколькими рестрикционными ферментами, и фрагменты нуклеиновой кислоты анализируются для определения размера каждого фрагмента. Таким образом, в некоторых вариантах выполнения изобретения физио-химическое свойство представляет собой молекулярную массу одного или нескольких продуктов репликации или фрагмента продукта репликации. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулярная масса представляет собой массу фрагмента одного или более продуктов репликации,

который содержит одну или несколько самокомплементарных последовательностей. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулярная масса определяется на основе электрофоретической подвижности. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулярная масса определяется на основе масс-спектропии.

5 В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулярная масса представляет собой массу фрагмента одного или более продуктов репликации. В некоторых вариантах выполнения изобретения молекулярная масса представляет собой массу фрагмента продукта репликации, который амплифицируется по реакции, включающей удлинение праймера с помощью полимеразы. Примеры способов удлинения на основе полимеразы
10 включают, но без ограничения, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), рекомбиназную полимеразную амплификацию, петлевую изотермическую амплификацию (LAMP) и т.д.

В некоторых вариантах выполнения изобретения физио-химическое свойство представляет собой полярность мономеров в димерной форме продукта репликации,
15 где полярность представляет собой полярность «голова-к-голове», «голова-к-хвосту» или «хвост-к-хвосту».

Как правило, могут быть использованы подходящие анализы для определения физио-химических свойств. Подходящие анализы могут включать анализ рестрикционного переваривания, гель-электрофорез (напр., нативный гель-электрофорез, денатурирующий
20 гель-электрофорез, гель-электрофорез с высоким разрешением), спектрометрию (напр., масс-спектрометрию, такую как LC/MS, HPLC/MS, ESI-MS, MALDI-TOF и т.д.) и секвенирование нуклеиновой кислоты (напр., секвенирование Maxam-Gilbert, пиросеквенирование, терминирующее секвенирование, массивно-параллельное опознавательное секвенирование, одномолекулярное секвенирование, нанопоровое
25 секвенирование, секвенирование Illumina и т.д.).

Композиции

В некоторых аспектах изобретение относится к композициям, содержащим нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах выполнения изобретения композиции, содержащие нуклеиновые кислоты, описанные
30 в настоящем документе, доставляются субъекту, нуждающемуся в этом. Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены субъекту в композициях в соответствии с любыми подходящими способами, известными в данной области. Следует принимать во внимание, что композиции могут содержать одну или несколько (напр., множество) нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах
35 выполнения изобретения множество нуклеиновых кислот представляет собой 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах выполнения изобретения каждая из одной или нескольких нуклеиновых кислот из множества ковалентно связана (напр., соединена конец-к-концу). В некоторых вариантах выполнения изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически
40 приемлемый носитель.

Нуклеиновая кислота, предпочтительно суспендированная в физиологически совместимом носителе (т.е. в композиции), может вводиться субъекту, то есть животному-хозяину, такому как человек, мышь, крыса, кошка, собака, овца, кролик, лошадь, корова, коза, свинья, морская свинка, хомяк, курица, индейка или примат, не
45 относящийся к человеку (напр., Макак). В некоторых вариантах выполнения изобретения животное-хозяин не включает человека.

Доставка нуклеиновых кислот (напр., зкДНК) субъекту-млекопитающему может быть, например, посредством внутримышечной инъекции или путем введения в кровотоки

субъекта-млекопитающего. Введение в кровоток может быть посредством инъекции в вену, артерию или любой другой сосудистый канал. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновые кислоты вводят в кровоток посредством изолированной перфузии конечностей, методики, хорошо известной в области хирургии, причем способ по существу позволяет специалисту изолировать конечность от системной циркуляции перед введением нуклеиновой кислоты. Вариант методики изолированной перфузии конечностей, описанный в Патенте США No. 6,177,403, также может быть использован квалифицированным специалистом для введения нуклеиновой кислоты (кислот) в сосудистую сеть изолированной конечности для того, чтобы потенциально улучшить трансфекцию мышечных клеток или ткани. Более того, в некоторых случаях может быть желательно доставить нуклеиновую кислоту(ы) в ЦНС субъекта. Под «ЦНС» понимаются все клетки и ткань головного мозга и спинного мозга позвоночного. Таким образом, этот термин включает в себя, но без ограничения, нейронные клетки, глиальные клетки, астроциты, цереброспинальную жидкость (CSF), интерстициальные пространства, кость, хрящ и тому подобное. Рекомбинантные AAV могут быть доставлены непосредственно в ЦНС или головной мозг путем инъекции, например, в желудочковую область, а также в полосатое тело (напр., хвостатое ядро или путамен полосатого тела), спинной мозг и нервно-мышечный узел или мозжечковую долю, с помощью иглы, катетера или связанного с ними устройства, с использованием нейрохирургических методик, известных в данной области, таких как стереотактическая инъекция (см., напр., Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993; и Alisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000).

Подходящие носители могут быть легко выбраны специалистом в данной области с учетом показания, для которого направляется нуклеиновая кислота(ы). Например, один подходящий носитель включает физиологический раствор, который может быть приготовлен с использованием множества буферных растворов (напр., забуференного фосфатом физиологического раствора). Другие иллюстративные носители включают стерильный физиологический раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло и воду. Выбор носителя не является ограничением настоящего раскрытия.

Необязательно, композиции по изобретению могут содержать, помимо нуклеиновой кислоты (кислот) и носителя(ей), другие обычные фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы. Подходящие иллюстративные консерванты включают хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновую кислоту, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол и параклорфенол. Подходящие химические стабилизаторы включают желатин и альбумин.

Нуклеиновую кислоту(ы) вводят в количествах, достаточных для трансфекции клеток желаемой ткани и обеспечения достаточных уровней трансфера и экспрессии гена без чрезмерных побочных эффектов. Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают, но без ограничения, прямую доставку в выбранный орган (напр., интрапортальную доставку в печень), пероральный, ингаляционный (включая интраназальную и внутритрахеальную доставку), внутриглазной, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный, внутриутробный и другие родительские пути введения. Пути введения могут быть скомбинированы, если это необходимо.

Доза нуклеиновой кислоты (кислот), необходимая для достижения определенного «терапевтического эффекта», будет варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая, но без ограничения: путь введения нуклеиновой кислоты, уровень

экспрессии гена или РНК, необходимый для достижения терапевтического эффекта, специфичность заболевания или расстройства, подвергаемого лечению, и стабильности гена или продукта РНК. Специалист в данной области может легко определить диапазон доз нуклеиновой кислоты для лечения пациента, имеющего конкретное заболевание или расстройство, на основе вышеупомянутых факторов, а также других факторов, которые хорошо известны в данной области.

Режимы дозирования можно регулировать для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, олигонуклеотид может вводиться повторно, напр., несколько доз могут вводиться ежедневно или доза может быть пропорционально уменьшена, как показано в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Специалист в данной области легко сможет определить соответствующие дозы и схемы введения олигонуклеотидов, должны ли олигонуклеотиды вводиться в клетки или субъектам.

Состав растворов фармацевтически приемлемых эксципиентов и носителей хорошо известен специалистам в данной области, как и разработка подходящих схем дозирования и лечения для применения конкретных композиций, описанных в настоящем документе, в различных режимах лечения.

Как правило, эти составы могут содержать по меньшей мере около 0,1% активного соединения или более, хотя процентное содержание активного ингредиента(ов) может, разумеется, варьироваться и может составлять от около 1 до около 2% и около 70% или около 80% или более от массы или объема общего состава. Естественно, количество активного соединения в каждой терапевтически полезной композиции может быть получено таким образом, что подходящая дозировка будет получена в любой заданной единичной дозе соединения. Специалисты в данной области могут предложить такие факторы, как растворимость, биологическая доступность, биологический период полужизни, способ введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические соображения в области получения таких фармацевтических композиций и такие как различные дозировки и схемы лечения, которые могут быть желательны.

В определенных обстоятельствах желательно доставлять терапевтические конструкции на основе нуклеиновой кислоты в подходящим образом составленных фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, подкожно, интраопанкреатикально, интраназально, парентерально, внутривенно, внутримышечно, интратекально или перорально, внутрибрюшинно или путем ингаляции. В некоторых вариантах выполнения изобретения для доставки нуклеиновых кислот могут быть использованы способы введения, описанные в Патентах США No. 5,543,158; 5,641,515 и 5,399,363 (каждый из которых конкретно включен в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах выполнения изобретения предпочтительным способом введения является инъекция в воротную вену.

Фармацевтические формы, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Дисперсии могут быть также приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Во многих случаях форма является стерильной и текучей до такой степени, чтобы было возможно ее поместить в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей,

например, воду, этанол, полиол (напр., глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть предотвращено различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобными. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия.

Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обусловлена применением в композициях агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Для введения инъекционного водного раствора, например, раствор может быть соответствующим образом забуферен, если необходимо, и жидкий разбавитель сначала подвергается изотоническому воздействию достаточным количеством солевого раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривентриального введения. В связи с этим, стерильная водная среда, которая может быть использована, будет известна специалистам в данной области. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлена в 1000 мл гиподермоклизисной жидкости, либо введена в предлагаемую область инфузии (смотри, например, «Remington's Pharmaceutical Sciences» 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Некоторое изменение дозировки обязательно будет иметь место в зависимости от состояния хозяина. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять соответствующую дозу для индивидуального хозяина.

Стерильные растворы для инъекций получают путем включения нуклеиновой кислоты в требуемом количестве в подходящем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными в настоящем документе, при необходимости, с последующей фильтровальной стерилизацией. Как правило, дисперсии получают включением различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются методики вакуумной сушки и сушки вымораживанием, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Представленные здесь композиции нуклеиновых кислот также могут быть составлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (образованные со свободными аминокислотами белка) и которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и тому подобные. Соли, образованные с помощью свободных карбоксильных групп, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и тому подобных. После приготовления растворы вводят способом, совместимым с дозированным составом, и в таком количестве, которое терапевтически эффективно. Композиции легко вводятся во множество лекарственных форм, таких как инъекционные

растворы, капсулы с высвобождением лекарственного средства и тому подобных.

Используемый здесь термин «носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и абсорбирующие агенты, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и тому подобное. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным объектам и композициям, которые не вызывают аллергическую или подобную неблагоприятную реакцию при введении хозяину.

Транспортные средства для доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и т.п., могут быть использованы для введения композиций по настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, нуклеиновые кислоты могут быть составлены для доставки либо инкапсулированными в липидную частицу, липосому, везикулу, наносферу или наночастицу, либо тому подобное.

Такие составы могут быть предпочтительными для введения фармацевтически приемлемых композиций нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. Образование и применение липосом, как правило, известно специалистам в данной области. В последнее время были разработаны липосомы с улучшенной стабильностью в сыворотке крови и полупериодом циркуляции (Патент США No. 5,741,516). Кроме того, были описаны различные способы получения липосомных и подобных липосомам препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственных средств (Патенты США No. 5,567,434; 5,552,157; 5,565,213; 5,738,868 и 5,795,587).

Липосомы успешно использовались с рядом типов клеток, которые обычно устойчивы к трансфекции с помощью других процедур. Кроме того, липосомы свободны от ограничений по длине ДНК, которые характерны для систем доставки на основе вирусов. Липосомы эффективно использовались для введения генов, лекарственных средств, радиотерапевтических агентов, вирусов, транскрипционных факторов и аллостерических эффекторов в различные культивируемые клеточные линии и животным. Кроме того, было завершено несколько успешных клинических испытаний, посвященных оценке эффективности доставки лекарственных средств, опосредованных липосомами.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергируются в водной среде и спонтанно образуют многослойные концентрические двухслойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (MLV)). MLV обычно имеют диаметры от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию небольших моноламеллярных везикул (SUV) с диаметрами в диапазоне от 200 до 500 Å., содержащих водный раствор в ядре.

В некоторых вариантах выполнения изобретения липосома содержит катионные липиды. Термин «катионный липид» включает липиды и синтетические липиды, имеющие как полярные, так и неполярные домены, и которые могут быть положительно заряжены при или около физиологического pH, и которые связываются с полианионами, такими как нуклеиновые кислоты, и облегчают доставку нуклеиновых кислот в клетки. В некоторых вариантах выполнения изобретения катионные липиды содержат насыщенные и ненасыщенные алкильные и алициклические простые и сложные эфиры аминов, амидов или их производных. В некоторых вариантах выполнения изобретения катионные липиды содержат неразветвленные, разветвленные алкильные, алкенильные группы или любую комбинацию вышеизложенного. В некоторых вариантах выполнения

изобретения катионные липиды содержат от 1 до около 25 атомов углерода (напр., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 атомов углерода. В некоторых вариантах выполнения изобретения катионные липиды содержат более 25 атомов углерода.

В некоторых вариантах выполнения изобретения линейные или разветвленные алкильные или алкеновые группы имеют шесть или более атомов углерода. Катионный липид также может содержать в некоторых вариантах выполнения одну или несколько алициклических групп. Неограничивающие примеры алициклических групп включают холестерин и другие стероидные группы. В некоторых вариантах выполнения изобретения катионные липиды получают с помощью одного или нескольких противоионов. Примеры противоионов (анионов) включают, но без ограничения, Cl^- , Br^- , I^- , F^- , ацетат, трифторацетат, сульфат, нитрит и нитрат.

Неограничивающие примеры катионных липидов включают полиэтиленмин, полиамидоаминовые (ПАММ) звездообразные дендримеры, Липофектин (комбинация DOTMA и DOPE), Липофектазу, LIPOFECTAMINE™ (напр., LIPOFECTAMINE™ 2000), DOPE, Цитофектин (Gilead Sciences, Foster City, Calif.) и Эуфектины (JBL, San Luis Obispo, Calif.). Типичные катионные липосомы могут быть получены из N-[1-(2,3-диолеолокси)пропил]-N,N,N-триметиламмонийхлорида (DOTMA), N-[1-(2,3-диолеолокси)пропил]-N,N,N-триметиламмонийметилсульфата (DOTAP), 3β -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил]холестерина (DC-Chol), 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанамина трифторацетата (DOSPA), 1,2-димиристилоксипропил-3-диметилгидроксиэтиламмонийбромид; и диметилдиоктадециламмонийбромид (DDAB). Нуклеиновые кислоты (напр., зкДНК) также могут быть комплектованы, напр., с поли(L-лизином) или авидином, и липиды могут или не могут быть включены в эту смесь, напр., стерил-поли(L-лизин).

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, доставляется с использованием катионного липида, описанного в Патенте США No. 8,158,601, или полиаминового соединения или липида, описанного в патенте США No. 8,034,376, содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, конъюгирована (напр., ковалентно связана с агентом, который увеличивает поглощение клетками). «Агент, который увеличивает поглощение клетками» представляет собой молекулу, которая облегчает перенос нуклеиновой кислоты через липидную мембрану. Например, нуклеиновая кислота может быть конъюгирована с липофильным соединением (напр., холестерином, токоферолом и т.д.), проникающим в клетку пептидом (CPP) (напр., пентратином, TAT, Syn1B и т.д.) и полиаминами (напр., спермином). Другие примеры агентов, которые увеличивают поглощение клетками, раскрыты, например, в Winkler (2013). Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. Ther. Deliv. 4(7); 791-809, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, конъюгирована с полимером (напр., полимерной молекулой) или молекулой фолата (напр., молекулой фолиевой кислоты). Как правило, доставка нуклеиновых кислот, конъюгированных с полимерами, известна в данной области, например, как описано в WO 2000/34343 и WO 2008/022309, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, конъюгирована с поли(амидным)

полимером, например, как описано в Патенте США No. 8,987,377. В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, конъюгирована с молекулой фолиевой кислоты, как описано в Патенте США No. 8507455, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

5 В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, конъюгирована с углеводом, например, как описано в Патенте США No. 8,450,467, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В качестве альтернативы можно использовать нанокапсульные составы нуклеиновой кислоты. Нанокапсулы могут, как правило, захватывать вещества стабильным и
10 воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных эффектов вследствие внутриклеточной полимерной перегрузки, такие ультрадисперсные частицы (размером около 0,1 мкм) должны быть сконструированы с использованием полимеров, способных деградировать *in vivo*. Рассматриваются для применения биоразлагаемые наночастицы полиалкилцианоакрилата, которые отвечают этим требованиям.

15 В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, раскрытая в описании, вводится в липидной наночастице. Как правило, липидные наночастицы содержат ионизируемый аминоклипид (напр., гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат, DLin-MC3-DMA, фосфатидилхолин (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин, DSPC), холестерин и липид оболочки (полиэтиленгликоль γ -
20 димиристолглицерин, PEG-DMG), например, как описано в Tarn et al. (2013). *Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery*. *Pharmaceuticals* 5(3): 498-507. В некоторых вариантах выполнения изобретения липидная наночастица имеет средний диаметр от около 10 до около 1000 нм. В некоторых вариантах выполнения изобретения липидная наночастица имеет диаметр менее чем 300 нм. В некоторых вариантах выполнения
25 изобретения липидная наночастица имеет диаметр от около 10 до около 300 нм. В некоторых вариантах выполнения изобретения липидная наночастица имеет диаметр менее чем 200 нм. В некоторых вариантах выполнения изобретения липидная наночастица имеет диаметр от около 25 до около 200 нм. В некоторых вариантах выполнения изобретения препарат липидной наночастицы (напр., композиция,
30 содержащая множество липидных наночастиц) имеет распределение по размеру, в котором средний размер (напр., диаметр) составляет от около 70 нм до около 200 нм, и более типично средний размер составляет около 100 нм или менее.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нуклеиновая кислота, описанная в настоящем документе, вводится в наночастице золота. Как правило, нуклеиновая
35 кислота может быть ковалентно связана с наночастицей золота или нековалентно связана с наночастицей золота (напр., связана взаимодействием заряд-заряд), например, как описано в Dinget al. (2014). *Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery*. *Mol. Ther.* 22 (6); 1075-1083. В некоторых вариантах выполнения изобретения конъюгаты наночастицы золота-нуклеиновая кислота получают с использованием способов, описанных,
40 например, в Патенте США No. 6,812,334, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В дополнение к способам доставки, описанным выше, следующие способы также рассматриваются как альтернативные способы доставки композиций нуклеиновых кислот хозяину. Сонофорез (напр., ультразвук) был использован и описан в Патенте
45 США No. 5,656,016 в качестве устройства для повышения скорости и эффективности проникновения лекарственного средства в и через систему кровообращения. Другими альтернативными доставками лекарственных средств являются внутрикостная инъекция (Патент США No. 5,779,708), МНКро4HноBst устройства (Патент США No. 5,797,898),

офтальмологические составы (Bourlais et al., 1998), трансдермальные матрицы (Патенты США No. 5,770,219 и 5,783,208) и доставка с обратной связью (Патент США No. 5,697,899).

Доставка/Введение

5 В некоторых вариантах выполнения изобретение относится к способу доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку (напр., клетку-хозяин), где способ включает доставку в клетку нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе.

В некоторых аспектах изобретение относится к трансфицированным клеткам-хозяевам. «Клетка-хозяин» относится к любой клетке, которая содержит или может собирать представляющее интерес вещество. Клетку-хозяина можно использовать в качестве реципиента нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе. Термин включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, «клетка-хозяин», как используется в настоящем документе, может относиться к клетке, которая была трансфицирована экзогенной последовательностью ДНК (напр., 10 нуклеиновой кислотой, описанной в настоящем документе). Понятно, что потомство одной родительской клетки не обязательно должно быть полностью идентичным по морфологии, или геномному, или полному комплементу ДНК как исходный родитель из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации.

В некоторых вариантах выполнения изобретения клетка-хозяин является перmissiveй клеткой. В некоторых вариантах выполнения изобретения клетка-хозяин не является перmissiveй клеткой. Часто клетка-хозяин является клеткой 20 млекопитающего. В некоторых аспектах изобретение относится к способу доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты субъекту, включающему введение клетки-хозяина, имеющей нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, субъекту.

25 Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку крови, такую как клетку крови человека, содержащую нуклеиновую кислоту, раскрытую в описании (напр., нуклеиновую кислоту, имеющую вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей трансген). Не желая быть связанными с какой-либо конкретной теорией, доставка такой клетки-хозяина полезна 30 в некоторых вариантах для лечения заболевания или расстройства крови.

Аспекты изобретения относятся к обнаружению того, что нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, вызывают снижение иммунного ответа (напр., не вызывают иммунного ответа) у хозяина по сравнению с применяемыми в настоящее время полученными из вирусов и бактерий векторами для генной терапии. В некоторых 35 аспектах изобретение относится к способу доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты субъекту, где способ включает доставку субъекту нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, где доставка нуклеиновой кислоты не приводит к иммунному ответу против нуклеиновой кислоты у субъекта. В некоторых вариантах выполнения изобретения иммунный ответ представляет собой гуморальный ответ.

40 Гуморальный иммунный ответ относится к продуцированию антигенспецифических антител В-лимфоцитами. В некоторых вариантах выполнения изобретения иммунный ответ является клеточной реакцией. Клеточный иммунный ответ относится к иммунному ответу, который не включает антитела, а включает активацию иммунных клеток (напр., фагоцитов, антигенспецифических Т-клеток, макрофагов, естественных клеток-киллеров и т.д.) антигеном (напр., экзогенной нуклеиновой кислотой). 45

Не желая быть связанными с какой-либо конкретной теорией, отсутствие иммунного ответа, вызванное введением нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, позволяет многократно вводить нуклеиновые кислоты хозяину. В некоторых вариантах

выполнения изобретения количество случаев, когда гетерологичная нуклеиновая кислота доставляется субъекту, находится в диапазоне от 2 до 10 раз (напр., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз). В некоторых вариантах выполнения изобретения гетерологичная нуклеиновая кислота доставляется субъекту более чем 10 раз.

5 В некоторых вариантах выполнения изобретения дозу нуклеиновой кислоты (напр., зкДНК) вводят субъекту не более одного раза в календарный день (напр., в 24-часовой период). В некоторых вариантах выполнения изобретения дозу нуклеиновой кислоты (напр., зкДНК) вводят субъекту не более одного раза в 2, 3, 4, 5, 6 или 7 календарных дней. В некоторых вариантах выполнения изобретения дозу нуклеиновой кислоты
10 (напр., зкДНК) вводят субъекту не более одного раза в календарную неделю (напр., 7 календарных дней). В некоторых вариантах выполнения изобретения дозу нуклеиновой кислоты (напр., зкДНК) вводят субъекту не более чем один раз в две недели (напр., один раз в течение двух календарных недель). В некоторых вариантах выполнения изобретения дозу нуклеиновой кислоты (напр., зкДНК) вводят субъекту не чаще одного
15 раза в календарный месяц (напр., один раз в 30 календарных дней). В некоторых вариантах выполнения изобретения дозу нуклеиновой кислоты (напр., зкДНК) вводят субъекту не более одного раза в шесть календарных месяцев. В некоторых вариантах выполнения изобретения дозу нуклеиновой кислоты (напр., зкДНК) вводят субъекту не более одного раза в течение календарного года (напр., 365 дней или 366 дней в
20 високосный год).

Как раскрывается в настоящем документе, нуклеиновые кислоты (включая конструкции экспрессии ДНК, которые могут быть использованы для их экспрессии) могут вводиться любым подходящим путем. Для применения в терапии эффективное количество нуклеиновой кислоты (напр., олигонуклеотида) и/или другого
25 терапевтического агента можно вводить субъекту любым способом, который доставляет агент в желаемую ткань, напр., мышечную ткань. В некоторых вариантах выполнения изобретения агенты (напр., нуклеиновые кислоты) вводят внутримышечно. Другие подходящие пути введения включают, но без ограничения, пероральный, парентеральный, внутривенный, внутривенный, интраназальный, подъязычный,
30 интратрахеальный, ингаляционный, подкожный, глазной, вагинальный и ректальный. Системные пути включают пероральный и парентеральный. Несколько типов устройств регулярно используются для введения путем ингаляции. Эти типы устройств включают дозирующие ингаляторы (MDI), активируемые вдохом MDI, порошковый ингалятор (DPI), разделительные/удерживающие камеры в сочетании с MDI и небулайзеры.

35 Для перорального введения агенты могут быть легко приготовлены путем объединения активного соединения(ий) с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области. Такие носители позволяют вводить агенты по изобретению в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, кашеи, суспензий и т.п. для перорального приема субъекту, подлежащему лечению.

40 Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены в виде твердого эксципиента необязательно с измельчением полученной смеси и обработкой смеси гранул после добавления подходящих вспомогательных веществ, если желательно, для получения таблеток или драже. Подходящими эксципиентами являются, в частности, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; целлюлозные препараты, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метил целлюлоза а, гидроксипропилметилцеллюлоза,
45 натрийкарбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (PVP). При желании

могут быть добавлены дезинтегрирующие агенты, такие как перекрестно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия. Необязательно, пероральные препараты также могут быть приготовлены в физиологическом растворе или буфере для нейтрализации внутренних кислотных состояний или могут вводиться без каких-либо носителей.

Фармацевтические препараты, которые можно использовать перорально, включают твердые (push fit) капсулы, изготовленные из желатина, а также мягкие запечатанные капсулы из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Твердые капсулы могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующим, таким как крахмалы, и/или смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат магния, и необязательно стабилизаторами. В мягких капсулах активные агенты могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли. Кроме того, могут быть добавлены стабилизаторы. Также могут быть использованы микросферы, приготовленные для перорального введения. Такие микросферы хорошо известны в данной области техники. Препараты для перорального введения обычно находятся в дозировках, подходящих для такого введения.

Для трансбуккального введения композиции могут принимать форму таблеток или леденцов, приготовленных обычным способом.

Для введения путем ингаляции агенты (напр., нуклеиновые кислоты) для использования в соответствии с настоящим изобретением могут быть удобно доставлены в виде аэрозольного спрея из устройств под давлением или небулайзера с использованием подходящего пропеллента, напр., дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением дозировочная единица может быть определена путем обеспечения клапана для доставки отмеренного количества. Капсулы и картриджи, напр., из желатина для использования в ингаляторе или инсуффляторе, могут быть изготовлены с использованием порошковой смеси соединения и подходящей порошкообразной основы, такой как лактоза или крахмал.

Агенты (напр., нуклеиновые кислоты), когда желательно вводить их системно, могут быть приготовлены для парентерального введения путем инъекции, напр., путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Составы для инъекций могут находиться в единичной дозированной форме, напр., в ампулах или в контейнерах с несколькими дозами, с добавлением консерванта. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать формообразующие агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Фармацевтические составы для парентерального введения включают водные растворы агентов (напр., антисмысловых нуклеиновых кислот) в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии агентов могут быть приготовлены в виде подходящих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Водные инъекционные суспензии могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Необязательно, суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые увеличивают растворимость агентов для получения высококонцентрированных растворов.

Альтернативно, агенты (напр., нуклеиновые кислоты) могут быть в виде порошка для

приготовления раствора с использованием подходящего носителя, напр., стерильной апиrogenной воды, перед применением. Агенты (напр., нуклеиновые кислоты) также могут быть составлены в ректальные или вагинальные композиции, такие как суппозитории или клизмы с удержанием, напр., содержащие обычные суппозиторальные основы, такие как масло какао или другие глицериды.

Другие системы доставки могут включать системы высвобождения по времени, с отсроченным высвобождением или с пролонгированным высвобождением. Такие системы помогают избежать повторного введения агентов (напр., антисмысловых нуклеиновых кислот), повышая удобство для субъекта и врача. Доступны многие типы систем доставки. Они включают системы на основе полимера, такие как поли(лактидглицерид), сополиоксалаты, поликапролактоны, полиэфирамиды, полиортоэфиры, полигидроксимасляную кислоту и полиангидриды. Системы доставки также включают неполимерные системы: липиды, включая стерины, такие как холестерин, сложные эфиры холестерина и жирных кислот, или нейтральные жиры, такие как моно-, ди- и триглицериды; системы высвобождения на основе гидрогелей; силиконовые системы; системы на основе пептидов; восковые покрытия; прессованные таблетки с использованием обычных связующих и наполнителей; частично слитые имплантаты; и другие, раскрытые в настоящем документе.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Прерываемые самокомплементарные последовательности нуклеиновых кислот

На ФИГ. 1А показан неограничивающий пример прерываемой самокомплементарной последовательности нуклеиновой кислоты (которая представляет собой AAV2 ITR). Как показано на ФИГ. 1А, нуклеиновая кислота образует Т-образную структуру «шпильки», имеющую часть «стебель» (D-A-A') и поперечную последовательность, имеющую противоположные продольные «петли-на-стебле» (B-B' и C-C'). Также изображены Trs и RBE прерываемой самокомплементарной последовательности нуклеиновой кислоты. На ФИГ. 1В показаны несколько неограничивающих примеров усечений в «С-плече» прерываемой самокомплементарной последовательности нуклеиновой кислоты. Графическое изображение одного примера асимметричных AAV2 ITR показано на ФИГ. 3.

Репликация зкДНКиз асимметричных AAVITR

Геномы адено-ассоциированного вируса (AAV) представляют собой линейную одноцепочечную ДНК, фланкированную концевыми палиндромами, обычно называемыми инвертированными концевыми повторами (ITR) (ФИГ. 2А, левая сторона). За исключением 7 неспаренных оснований, последовательность 145 nt ITR является самокомплементарной и образует энергетически устойчивую Т-образную «шпильку» ($\Delta G \approx -72,4$ ккал на моль, $T_m > 80^\circ\text{C}$) (ФИГ. 1А). Во время репликации вирусной ДНК комплекс клеточной ДНК-полимеразы инициирует синтез на 3'-конце шаблонной нити, где частичный дуплекс, образованный ITR, служит в качестве праймера для удлинения праймера. Репликативный промежуточный продукт представляет собой внутримолекулярный дуплекс с матрицей и зарождающимися нитями, ковалентно связанными с ITR. Во время продуктивного инфицирования процесс, называемый концевым разрешением, расщепляет внутрисетевой ITR, что приводит к получению полноразмерных комплементарных геномов вируса (ФИГ. 2В, левая сторона).

В отсутствие экспрессии кэп-гена AAV векторный геном AAV, имеющий асимметричные ITR, подвергается неэффективной репликации, и продукты репликации накапливаются в новой конформации линейной дуплексной ДНК с закрытым концом

(зкДНК). Из-за неэффективной репликации (напр., неполного концевого разрешения) комплементарные нити внутримолекулярного промежуточного соединения становятся ковалентно связаны через ITR на обоих концах генома (Фиг. 2В, правая сторона). Таким образом, в естественных условиях, зкДНК ведет себя как линейная дуплексная ДНК, однако в денатурирующих условиях нити зкДНК расходятся друг от друга, но остаются связанными, поэтому превращают линейную дуплексную молекулу в одноцепочечную кольцевую ДНК.

В некоторых вариантах выполнения изобретения получение зкДНК из асимметричных AAV ITR зависит от усеченного ITR на одном конце и оперативного (напр., функционального), дикого типа (wt) или wt-подобного ITR на противоположном конце трансгенной кассеты. В некоторых вариантах выполнения изобретения усеченный ITR неэффективно обрабатывается во время циклов репликации зкДНК в клетках Sf9, что приводит к накоплению промежуточных продуктов репликации, дуплексного мономера, дуплексных димеров и т.д. В отсутствие структурной (капсидной) белковой экспрессии Rep 78 (или Rep 68) собирается на интактных ITR и катализирует сайт-специфическое никирование на сайте концевого разрешения. Реакция приводит к образованию переходного тирозин-фосфодиэфира (Y156 для AAV2 Rep 78, ковалентно связанного с 5'-тимидином сайта концевого разрешения 5'AGTTGG). Затем переходный нуклеопротеиновый комплекс переносит донорную нить на свободный 3'-конец комплементарной нити. Следовательно, конформация зкДНК является следствием дефектного ITR на одном конце векторного генома, интактного или оперативного ITR на противоположном конце и совместной экспрессии белков p5 и p19 Rep, где по меньшей мере один p5 и один p19 Rep экспрессированы. Другие парвовирусные «небольшие» Rep или NS-белки могут заменять белок AAV p19 Rep (Rep 52 и Rep 40). Поскольку эти небольшие белки Rep являются непротективными, мономерными геликазами, возможно, что геликазы непар во вирусного суперсемейства 2 (SF2) могут быть заменены белками AAV Rep.

Депендовирусы существовали относительно неизменными в течение десятков миллионов (и, вероятно, сотен миллионов) лет. Предполагается, что они разработали гомеостатические или симбиотические отношения со своими хозяевами, в которых провирус в латентно инфицированных клетках часто локализуется в локусе AAVS1 на хромосоме человека 19q, что, как представляется, не оказывает отрицательного влияния на клетку-хозяина. При латентности экспрессия гена AAV подавляется клеточными факторами, напр., YY1, и белками p5 Rep, которые действуют сервомеханически, отрицательно регулирует экспрессию из промоторов p5 и p40. Таким образом, латентно инфицированные клетки имеют малое количество белков AAV или они вообще не обнаруживаются и ограничивают приобретенный иммунный ответ на клетки, которые синтезируют вирусные белки.

Пример 2. Очистка зкДНК

В протоколах плазмидной очистки обычно используют силикагели для препаратов с небольшими количествами плазмид или анионообменную хроматографию с диэтиламиноэтилсефарозой (DEAE-сефароза, например) для больших количеств. Для крупномасштабной очистки пДНК бактерии *Escherichia coli* лизируют додецилсульфатом натрия (SDS), а клеточные белки и геномную ДНК осаждают в цикле денатурации/нейтрализации, сохраняя плазмиду в растворе. Ренатурированная двухцепочечная пДНК связывается с положительно заряженной группой DEAE и после стадий промывания пДНК вытесняется и элюируется буферным раствором с высоким содержанием соли.

Альтернативно, мембраны из силикагеля могут быть использованы для селективной адсорбции пДНК из осветленного бактериального лизата в условиях с высоким содержанием солей и элюированы буфером с низким содержанием или без ионичности.

Было обнаружено, что зкДНК может быть легко очищена мелкомасштабным методом на основе силикагеля. При использовании широкомасштабного протокола анионного обмена выделение зкДНК было очень неэффективным и приводило к низким выходам.

Описан способ крупномасштабной очистки зкДНК из клеток Sf9 беспозвоночных с использованием мембран из силикагеля. Увеличение площади поверхности модифицированной мембраны из силикагеля (или хроматографической среды) является одним из подходов к улучшению скорости потока, адсорбции и выделения зкДНК. Стандартные фильтровальные капсулы доступны в широком диапазоне конфигураций по размеру от 0,5 см в диаметре до 20 см в диаметре или более. Капсула может содержать один слой мембраны из силикагеля на химически инертной подложке или слои мембран, разделенные инертными носителями, или плиссированные мембраны с использованием конструкции горизонтального потока. Тангенциальная потоковая фильтрация (TFF) и фильтрация на полых волокнах (HFF) являются альтернативными коаксиальной потоковой капсульной фильтрации.

Пример 3: конструкции зкДНК для лечения заболевания

На ФИГ. 4 показаны неограничивающие примеры конструкций нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные самокомплементарные последовательности нуклеиновых кислот (напр., AAV2 ITR), и трансгена, связанных с глазным заболеванием. Первая конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 4 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения болезни Старгардта. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновых кислот (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующую АТФ-Связывающую Кассету, Подсемейство А (ABC1), белок Член 4 (ABCA4). AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Реп элемент (RBE) и сайт оперативного концевого разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует интрон 2 hBglobin, расположенный на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал hGH poly(A), расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Вторая конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 4 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения болезни Ашера. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновой кислоты (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок ушерин (USH2A) вариант 1. AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Реп элемент (RBE) и сайт оперативного концевого разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует промотор CMV и промотор Т7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(А) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Третья конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 4 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения макулярной дегенерации/неоваскуляризации. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновых кислот (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR). AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного конечного разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует промотор CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Четвертая конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 4 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения врожденного амароза Лебера. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновой кислоты (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей центросомальный белок 290 (CER290). AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя оперативный связывательный элемент (RBE) и сайт оперативного конечного разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует промотор CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

На ФИГ. 5 показаны неограничивающие примеры конструкций нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные самокомплементарные последовательности нуклеиновой кислоты (напр., AAV2 ITR), и трансгена, связанные с заболеванием крови. Первая конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 5 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения Гемофилии А. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновых кислот (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок В-домена с удаленным фактором VIII (BDD-FVIII). AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного конечного разрешения (trs).

Нуклеиновая кислота также кодирует промотор/энхансер CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Вторая конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 5 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения Гемофилии А. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновой кислоты (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей

полноразмерный белок фактора VIII (FVIII), который имеет превосходящую способность клонирования по сравнению с традиционными векторами AAV. AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного концевое разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует промотор/энхансер CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Третья конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 5 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения заболевания с фактором фон Виллебранда. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновой кислоты (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей фактор фон Виллебранда (vWF). AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного концевое разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует промотор CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

На ФИГ. 6 показаны неограничивающие примеры конструкций нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные самокомплементарные последовательности нуклеиновой кислоты (напр., AAV2 ITR), и трансгена, связанных с заболеванием печени. Первая конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 6 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения гиперхолестеринемии. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновой кислоты (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей лецитин-холестерин-ацетилтрансферазу. AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного концевое разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует промотор/энхансер CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Вторая конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 6 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения фенилкетонурии (PKU). Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновой кислоты (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей фенилаланингидроксилазу (ПАН). AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного концевое разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует

промотор/энхансер CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Третья конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 6 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения Болезни Накопления Гликогена 1 (GSD1). Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновой кислоты (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей каталитическую субъединицу глюкозо-6-фосфатазы (G6PC). AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного концевого разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует промотор/энхансер CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

На ФИГ. 7 показаны неограничивающие примеры конструкций нуклеиновых кислот, имеющих асимметричные самокомплементарные последовательности нуклеиновой кислоты (напр., AAV2 ITR), и трансгена, связанных с заболеванием легких. Первая конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 7 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения кистозного фиброза. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновой кислоты (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей трансмембранный регулятор проводимости при муковисцидозе (CFTR). AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного концевого разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует промотор/энхансер CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Вторая конструкция нуклеиновой кислоты на ФИГ. 7 изображает неограничивающий пример молекулы нуклеиновой кислоты для лечения дефицита альфа-1 антитрипсина. Нуклеиновая кислота содержит пару асимметричных прерываемых самокомплементарных последовательностей нуклеиновой кислоты (напр., асимметричных AAV2 ITR), фланкирующих вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей альфа-1 антитрипсин (AAT). AAV2 ITR являются асимметричными, потому что одна из AAV2 ITR (правая сторона) содержит делецию в области С-стебля. Каждая прерываемая самокомплементарная последовательность нуклеиновой кислоты содержит оперативный связывающий Rep элемент (RBE) и сайт оперативного концевого разрешения (trs). Нуклеиновая кислота также кодирует промотор/энхансер CMV и промотор T7, расположенные на 5' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, и сигнал поли(A) bGH, расположенный на 3' по отношению к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Пример 4. Исследования *in vivo*: Гидродинамическая доставка «оголенной» ДНК у нормальных самцов мышей ICR

После введения пДНК в хвостовые вены мыши экспрессия lacZ непрерывно снижалась

между 24 ч и 5 неделями, что соответствовало количеству пДНК на диплоидный геном. В печени мыши, обработанной зкДНК с асимметричными прерываемыми самокомплементарными последовательностями, не обнаруживалось изменений активности *lacZ* между 24 ч и 1 неделей, однако экспрессия была существенно снижена на 5 нед. Тем не менее зкДНК в гепатоцитах оставалась практически неизменной в точке 5 нед. Аналогичные результаты были получены с кассетами GFP промотора глобулина сыворотки, связывающего тироксин (TBG): мало или вообще не было детектировано экспрессии GFP и пДНК через 10 нед., тогда как экспрессия зкДНК TBG-GFP и уровни ДНК оставались неизменными между 1 и 10 неделями.

Пример 5. Доставка зкДНК в глаз

Прямая флуоресценция GFP наблюдалась равномерно в клетках, охватывающих ширину сетчатки. На ФИГ. 8А-8D показана доставка зкДНК с асимметричными прерываемыми самокомплементарными последовательностями в глаз. Взрослых мышей анестезировали Кетамином/Ксилазином (100/10 мг/кг), и доставляли трансфекционный агент интравитреально путем трансклеральной инъекции объемом 1-2 мкл. Антибиотическую мазь наносили на роговицу для того, чтобы предотвратить высыхание глаз, пока мышь восстанавливалась. Мыши позволяли восстанавливаться при 37 градусах, а затем помещали обратно в клетку для мыши на 2 недели и подвергали эвтаназии асфиксией CO₂. Сетчатку рассекали и переносили на плоскую поверхность или секцию. Для обнаружения трансфецированных клеток не требуется окрашивание антител GFP. На ФИГ. 8А показана плоская поверхность флуоресценции GFP на сетчатке мыши. На ФИГ. 8В показана флуоресценция GFP в поперечном сечении сетчатки. На ФИГ. 8С показана флуоресценция GFP и окрашивание глиальных клеток в поперечном сечении сетчатки. На ФИГ. 8D показана флуоресценция GFP в сетчатке мыши после доставки зкДНК с помощью субретинальной электропорации (сверху) и интравитреальной инъекции (снизу).

Пример 6: Исследования *in vivo*: Интрастриатальная доставка у крыс

Готовили зкДНК-GFP (зкДНК с асимметричными прерываемыми самокомплементарными последовательностями) с коммерчески доступным трансфекционным реагентом, *in vivo* jetPEI, с соответствующей концентрацией (Polyplus Corp.) и вводили интракраниально в стриатум крысы (ФИГ. 9А). Крыс умерщвляли через 3 нед и 20 нед после инъекции с последующей обработкой, срезы головного мозга анализировали с использованием иммуногистохимии (ИХ) с антителами (Ab) против GFP, МНСП и Iba1. Подобная экспрессия GFP наблюдалась в 3 нед и 20 нед. На 3 нед ни антиген МНСП, ни антиген Iba1 не были обнаружены в срезах головного мозга, как показано на ФИГ. 9В-9С.

Пример 7: Инфицирование Sf9 для получения зкДНК

Транспозиция в Бакмиду

Компетентные клетки DH10Bac (Invitrogen) оттаивали на льду. 50 мкл клеток распределяли в 14 мл пробирки, добавляли 50 нг плазмидной ДНК (напр., плазмиду, содержащую кодирующий белок трансген, фланкированный асимметричными прерываемыми самокомплементарными последовательностями) и осторожно перемешивали. Последовательность ДНК плазмиды, описанной в этом примере, представляет собой SEQ ID NO: 25. Последовательность ДНК области плазмиды, содержащей кодирующий белок трансген, фланкированный асимметричными прерываемыми самокомплементарными последовательностями, представляет собой SEQ ID NO: 26.

Анализ последовательности самокомплементарных последовательностей,

прерываемых плазмидной ДНК, показан на ФИГ. 10А-10В. самокомплементарная последовательность 5' (называемая головной частью, которая находится выше кодирующей последовательности трансгена) показана на ФИГ. 10А. Ее секвенировали с использованием праймера, комплементарного промотору CMV плазмидной конструкции. На ФИГ. 10А показана карта рестрикции плазмиды в области 5' самокомплементарной последовательности. Два прогона плазмидной последовательности приводят к выравниванию с эталонной последовательностью, которая представляет собой последовательность AAR2 ITR дикого типа.

Самокомплементарная последовательность 3' (называемая хвостовой частью, которая находится ниже кодирующей последовательности трансгена) показана на ФИГ. 10В. Ее секвенировали с использованием праймера, комплементарного промотору SV40 плазмидной конструкции. На ФИГ. 10В показана карта рестрикции плазмиды в области самокомплементарной последовательности 3'. Два прогона плазмидной последовательности приводят к выравниванию с эталонной последовательностью, которая представляет собой последовательность AAR2 ITR дикого типа. Результаты показывают усечение внутри самокомплементарной последовательности, соответствующее одному плечу поперечной структуры.

Эти результаты подтверждают, что конструкция плазмидной ДНК кодирует трансген, фланкированный асимметричными прерываемыми самокомплементарными последовательностями. Асимметрия возникает из-за того, что самокомплементарная последовательность 5' кодирует полную поперечную; тогда как самокомплементарная последовательность 3' кодирует усеченную поперечную.

Затем пробирки инкубировали на льду в течение 30 мин и затем подвергали тепловому шоку на водяной бане с температурой 42°C в течение 45 сек. Затем пробирки охлаждали на льду в течение 2 мин. В пробирки добавляли 450 мкл среды SOC и встряхивали в инкубаторе при 37°C в течение 4 ч. Аликвоты разводили 1:10 и 50 мкл высевали в планшеты с агаром, содержащие 50 мкг/мл канамицина, 7 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл тетрациклина, 100 мкг/мл Bluо-gal и 40 мкг/мл IPTG. Планшеты инкубировали 48 ч при 37°C или 72 ч при 30°C. Была выбрана одна белая колония и ее переносили по новому планшет для того, чтобы убедиться, что она не была заражена синей колонией, и затем инкубировали в течение ночи. Были созданы запасы глицерина.

Получение ДНК из Бакмиды

Бакмиду инкубировали в 10 мл среды LB с 50 мкг/мл канамицина, 7 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл тетрациклина и выращивали в инкубаторе при 37°C в течение ночи. Культуру центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант удаляли и пеллету ресуспендировали в 1,5 мл буфера Р1 из набора для экстракции Qiagen. Добавляли 1,5 мл Буфера 2 и пробирку переворачивали 4-6 раз. Добавляли 2,1 мл Буфера Р3 и пробирку переворачивали 4-6 раз. Осадки пропускали через шприцевой фильтр Qiagen и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Чистый лизирующий раствор переносили в пробирку, содержащую 5 мл изопропанола, и хорошо перемешивали и центрифугировали при 4°C в течение 30 мин с максимальной скоростью. Супернатант удаляли и добавляли 3 мл 70% этанола для промывки пеллеты. Затем пеллету центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Затем пеллету промывали и сушили на воздухе. Затем ДНК ресуспендировали в 200 мкл буфера TE. Аликвоту удаляли и считывали оптическую плотность (OD) при 260 нм для количественной оценки концентрации ДНК.

Получение векторов экспрессии бакуловируса Р1 (BEV)

Всего 4×10^6 клеток Sf9 высевали в 5 мл среды в колбе T25 TC. Колбу помещали на

горизонтальную поверхность во время прикрепления клеток, чтобы клетки были равномерно распределены. Как правило, клетки прикрепляются в течение 15 мин. 1 мкг Бакмиды ДНК разбавляли 75 мкл воды. 6 мкл Promega Eugene HD разбавляли 69 мкл воды в отдельной пробирке. Разбавленный Eugene HD смешивали с разбавленной ДНК путем пипетирования вверх и вниз несколько раз. Через 15 мин к клеткам Sf9 добавляли ДНК/липидные комплексы. Экспрессионный вектор бакуловируса PI (BEV) собирали через 4 дня. Вкратце, всю среду удаляли из колбы с использованием 5 мл пипетки и переносили в 15 мл полистирольную пробирку. Контейнер центрифугировали при 1200 g в течение 10 мин для осаждения клеток или дебриса, которые могли быть собраны. BEV декантировали в свежую 15 мл пробирку и вирус хранили при 4°C.

Получение инфицированных бакуловирусом клеток насекомых (Biics)

50 мл клеток Sf9 инфицировали в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл с помощью 1 мл BEV (1:50). Клетки подсчитывали и их диаметр проверяли на 1-й день (напр., проверяли, достигает ли количество клеток 2×10^6 /мл, и диаметр клетки составлял ~15-16 мкм) и 2-й день (напр., проверяли, достигает ли количество клеток $4-5 \times 10^6$ клеток/мл и диаметр клетки составлял ~18-19 мкм). Клетки центрифугировали, когда они выглядели инфицированными, при 300 xg в течение 5 мин. Супернатант удаляли и пеллету ресуспендировали в замораживающих средах с конечной концентрацией 20×10^7 клеток/мл. Клетки можно замораживать при -80°C в штативе с изопропанолом для хранения.

Тест эффективности на инфекционность для безтитровой инфицированной линии бакуловируса (TIPS)

Подготавливали четыре колбы по 20 мл с $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки инфицировали 4 различными разведениями безтитровой инфицированной бакуловирусной линии (TIPS), например, 1/1000, 1/10000, 1/50000, 1/100000. Клетки выращивали и оценивали диаметр, жизнеспособность и количество клеток в течение 3 дней. Для того чтобы определить эффективность линии TIPS, проверяют, какое разведение достигнуто через 3 дня по следующим критериям: жизнеспособные клетки от 4 до 5×10^5 клеток/мл, жизнеспособность от 85 до 95%, диаметр от 18 до 20 мкм.

Получение зкДНК:

$2,5 \times 10^6$ клеток/мл клеток Sf9 было совместно инфицировано TIPS для белка Rep и представляющего интерес трансгена (напр., GFP). Через 4-5 дней определяли диаметр и жизнеспособность клеток. Клетки в пеллете собирали путем разделения на центрифуге при 4150 об/мин в течение 30 мин. Затем клетки замораживали или экстрагировали зкДНК, например, по протоколу очистки Qiagen Midi Plus.

Анализ зкДНК

зкДНК анализировали нативным гель-электрофорезом и/или денатурирующим гель-электрофорезом с рестрикционным расщеплением. Например, был выбран одониточный рестрикционный фермент приблизительно 2/3 последовательности зкДНК между ITR, и полученные продукты рестрикционного расщепления переносили на агарозный гель.

На ФИГ. 10С показана ~4,5 kb зкДНК, содержащая трансген GFP (зкДНК-GFP), которую электрофоретически разделяли на различные конформеры (напр., мономер, димер, тример и т.д.) в нативных (левых) и денатурирующих (правых) условиях после расщепления расщепителем, XhoI.

На нативном геле (ФИГ. 10С, слева) мономеры разделяли на два продукта: 2,1 kb и 0,4 kb. Димеры разделяли либо на продукты 4,1 kb/0,4 kb, либо на продукты 4,1 kb/0,8

kb в зависимости от ориентации (напр., «хвост-к-хвосту» или «голова-к-голове») субъединиц димера. Продукты, являющиеся результатом организации димера с хвост-к-хвосту, указаны стрелками вниз. Концевой фрагмент 0,4 kb затемнен флуоресценцией примесей на дне геля. Стрелки вверх указывают на продукты, полученные из димера «голова-к-голове». Толстые линии указывают положение усеченного ITR. В мономере удаленный ITR находился на правой стороне молекулы зкДНК, а в димере хвост-к-хвосту усеченный ITR был внутренним (в зеркальной плоскости). В конформации «голова-к-голове» усеченный ITR будет на концах молекулы.

На денатурирующем геле (ФИГ. 10С, справа) димерная зкДНК-GFP продуцировала полосу при 4,1 kb и 0,8 kb (которая коррелирует с денатурированными концевыми продуктами 0,4 kb, получающимися на геле в виде одноцепочечной ДНК 0,8 kb). Как описано выше, предсказанные продукты димеров зкДНК-GFP «голова-к-голове» составляли 0,8 kb и 4,1 kb на нативных гелях и 0,8 kb и 8,2 kb на денатурирующих гелях. Денатурирующий гель не имеет полосы 8,2 kb и поэтому указывает на то, что преобладающая форма димера зкДНК-GFP была хвост-к-хвосту.

Хотя некоторые варианты выполнения настоящего изобретения описаны и проиллюстрированы в настоящем документе, специалисты в данной области легко найдут множество других средств и/или структур для выполнения функций, и/или получения результатов, и/или одного или нескольких из преимуществ, описанных в настоящем документе, и каждое из таких изменений и/или модификаций считается находящимся в пределах объема настоящего изобретения. В более общем плане, специалисты в данной области легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящем документе, приводятся в качестве примера и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного приложения или приложений, для которых используется настоящее изобретение. Специалисты в данной области будут знать или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов выполнения изобретения, описанных в настоящем документе. Поэтому следует понимать, что приведенные выше варианты выполнения представлены только в качестве примера и что в рамках прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов изобретение может быть осуществлено на практике иначе, чем здесь конкретно описано и заявлено. Настоящее изобретение направлено на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал и/или способ, описанные в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы и/или способы не являются взаимоисключающими, включена в объем настоящего изобретения.

Неопределенные артикли «а» и «ан», используемые здесь в описании и в формуле изобретения, если явно не указано обратное, следует понимать как «по меньшей мере одно».

Фразу «и/или», используемую здесь в описании и в формуле изобретения, следует понимать как «либо или оба» из элементов, соединенных таким образом, т.е. элементы, которые совместно присутствуют в некоторых случаях и раздельно присутствуют в других случаях. Другие элементы могут необязательно присутствовать, кроме элементов, конкретно определенных как «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно указаны, если явно не указано обратное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на «А и/или В» при использовании в сочетании с открытой конструкцией, например, «содержащий», может относиться в одном варианте к А без В (необязательно включая элементы, отличающиеся

от В); в другом варианте выполнения - к В без А (необязательно включая элементы, отличающиеся от А); в еще одном варианте выполнения - к обоим А и В (необязательно включая другие элементы); и т.п.

Как используется здесь в описании и в формуле изобретения, «или» следует понимать как имеющее такое же значение, как «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в списке «или» или «и/или» должны интерпретироваться как включающие, т.е. включение по меньшей мере одного, но также включение более чем одного из числа или списка элементов, и, необязательно, дополнительные не перечисленные элементы. Только термины, явно обозначенные противоположным образом, такие как «только один из» или «точно один из», или, если они используются в формуле изобретения, «состоящий из», будут ссылаться на включение только одного элемента из числа или списка элементов. В общем, используемый здесь термин «или» должен толковаться как указание на исключаящие альтернативы (т.е. «одно или другое, но не оба»), когда им предшествуют условия исключительности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «точно один из». «Состоящий по существу из», когда он используется в формуле изобретения, имеет свое обычное значение, которое используется в области патентного права.

Как используется здесь в описании и формуле изобретения, фраза «по меньшей мере один» в отношении перечня из одного или нескольких элементов должна пониматься как означающая по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов из списка элементов, но необязательно включающий по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно указанного в списке элементов и не исключая каких-либо комбинаций элементов в списке элементов. Это определение также допускает, что элементы могут необязательно присутствовать помимо элементов, конкретно идентифицированных в списке элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны ли они или не связаны с теми элементами, которые конкретно идентифицированы. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере один из А и В» (или эквивалентно «по меньшей мере один из А или В», или эквивалентно «по меньшей мере один из А и/или В») может ссылаться в одном варианте на по меньшей мере один, необязательно включающий более одного А, без присутствия В (и необязательно включая элементы, отличающиеся от В); в другом варианте выполнения - на по меньшей мере один, необязательно включающий более одного В без присутствия А (и необязательно включая элементы, отличающиеся от А); в еще одном варианте выполнения - на по меньшей мере один, необязательно включающий более одного А и по меньшей мере один необязательно включающий более одного В (и необязательно включая другие элементы); и т.п.

В формуле изобретения, как и в вышеприведенном описании, все переходные фразы, такие как «содержащий», «включающий», «несущий», «имеющий», «содержащий», «включающий», «удерживающий» и тому подобные, следует понимать как открытые, т.е. означающие включение, но без ограничения. Только переходные фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из» должны быть закрытыми или полузакрытыми переходными фразами, соответственно, как это указано в Руководстве Патентного ведомства США по Процедурам Патентной Экспертизы, Раздел 2111.03.

Использование порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и т.д. в формуле изобретения для изменения элемента пункта формулы само по себе не означает любого приоритета, превалирования или порядка следования одного элемента пункта над другим или временного порядка, в котором выполняются действия способа, но они используются просто как метки для различения одного элемента пункта

формулы, имеющего определенное наименование, от другого элемента, имеющего такое же наименование (но для использования порядкового термина) для различения элементов формулы изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

5	<110> University of Massachusetts	
	<120> ЛИНЕЙНАЯ ДУПЛЕКСНАЯ ДНК С ЗАКРЫТЫМ КОНЦОМ ДЛЯ НЕВИРУСНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ	
	<130> U0120.70077W000	
	<140> Not Yet Assigned	
	<141> 2017-03-03	
10	<150> US 62/303,046	
	<151> 2016-03-03	
	<150> US 62/394,720	
	<151> 2016-09-14	
	<150> US 62/406,913	
15	<151> 2016-10-11	
	<160> 26	
	<170> PatentIn версия 3.5	
	<210> 1	
	<211> 12	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Polynucleotide	
	<400> 1	
25	gctcgctcgc tc	12
	<210> 2	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
30	<220>	
	<223> Synthetic Polynucleotide	
	<400> 2	
	cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gc	42
	<210> 3	
35	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Polynucleotide	
40	<400> 3	
	gccccgggcaa agccccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc cg	42
	<210> 4	
	<211> 145	
	<212> DNA	
45	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Polynucleotide	
	<400> 4	

	ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc	60
	cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg	120
	gccaaactcca tctactagggg ttcct	145
	<210> 5	
5	<211> 145	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Polynucleotide	
10	<400> 5	
	aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg	60
	ccgcccgggc aaagcccggg cgtcgggcga cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc	120
	gagcgcgag agagggagtg gccaa	145
	<210> 6	
15	<211> 145	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Polynucleotide	
20	<400> 6	
	aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg	60
	ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc	120
	gagcgcgag agagggagtg gccaa	145
	<210> 7	
25	<211> 145	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Polynucleotide	
30	<400> 7	
	ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgcccgggc aaagcccggg	60
	cgtcgggcga cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg	120
	gccaaactcca tctactagggg ttcct	145
	<210> 8	
35	<211> 144	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Polynucleotide	
40	<400> 8	
	aggaacccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tctactgaggc	60
	cgcccgggca aagcccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag tgagcgagcg	120
	agcgcgagc gagggagtgg ccaa	144
	<210> 9	
45	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	

<223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 9
 cccgtgcggg cccaaagggc ccgc 24
 <210> 10
 5 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Polynucleotide
 10 <400> 10
 gcccgctggt ttccagcggg ctgcggggccc gaaacggggc cgc 43
 <210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 11
 cgggcccgtg cgggccc aaa gggcccgc 28
 20 <210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 12
 gcccgggcac gcccgggttt cccgggcg 28
 <210> 13
 <211> 22
 30 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 13
 35 cgtgcggggcc caaagggccc gc 22
 <210> 14
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 14
 gcggggccgga aacggggccc ctgcccgtg gtttccagcg ggc 43
 <210> 15
 45 <211> 142
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Synthetic polynucleotide
 <400> 15
 aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gtcactgag 60
 gccgggacgac caaaggctcg cgcacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag 120
 5 cgagcgcgca gctgcctgca gg 142
 <210> 16
 <211> 142
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Synthetic polynucleotide
 <400> 16
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggagtc 60
 gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
 15 actccatcac taggggttcc tt 142
 <210> 17
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Synthetic polynucleotide
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (84)..(84)
 25 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 17
 aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gtcactgag 60
 gccgggacgac caaaggctcg cgcacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag 120
 cgagcgcgca gctgcctgca ggctc 144
 30 <210> 18
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Synthetic polynucleotide
 <400> 18
 aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gtcactgag 60
 gccgggacgac caaaggctcg cgcacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag 120
 cgagcgcgca gctgcctgca gggg 144
 40 <210> 19
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> Synthetic polynucleotide
 <400> 19
 aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggacgacc aaaggctcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag ctgcctgcag ggg 143

<210> 20

<211> 148

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<400> 20

tctcagacct gcaggcagct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccc ggcaaagccc 60

10 gggcgctcggg cgaccttttg tcgcccggcc tcagtgcgcg agcgagcgcg cagagagggga 120

gtggccaact ccatcactag gggttcct 148

<210> 21

<211> 148

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<400> 21

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctcgc cgctcgctcg ctactgagg 60

20 ccgggcgacc aaaggctcgc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag ctgcctgcag gtctgaga 148

<210> 22

<211> 130

<212> DNA

25 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<400> 22

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgctc ggcgaccttt 60

30 ggctcgcccgg cctcagtgcg cgagcgagcg cgagagagg gaggggccaa ctccatcact 120

aggggttcct 130

<210> 23

<211> 145

<212> DNA

35 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<400> 23

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

40 gggcgacctt tggctgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc tgcgg 145

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

45 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<400> 24

cgccccgggaa acccgggcgt gccccgggc

<210> 25

<211> 7255

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<400> 25

10 cattcgccat tcaggctgca aataagcgtt gatattcagt caattacaaa cattaataac 60

gaagagatga cagaaaaatt ttcattctgt gacagagaaa aagtagccga agatgacggt 120

ttgtcacatg gagttggcag gatgtttgat taaaaacata acaggaagaa aaatgccccg 180

ctgtgggcgg acaaaatagt tgggaactgg gaggggtgga aatggagttt ttaaggatta 240

tttagggaag agtgacaaaa tagatgggaa ctgggtgtag cgtcgtaagc taatacgaaa 300

attaaaaatg acaaaatagt ttggaactag atttcactta tctggttcgg atctcctagg 360

15 cgatatcagt gatcagatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaacccaca 420

actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaatth gtgatgctat tgctttatth 480

gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgtth 540

caggttcagg gggaggtgtg ggaggtthth taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt 600

atggctgatt atgatcctct agtacttctc gacaagctta cattattgaa gcatttatca 660

20 gggttattgt ctacagacctg caggcagctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgccccg 720

gcaaagcccc ggcgtcgggc gacctttggt cgccccgcct cagtgcgcga gcgagcgcg 780

agagagggag tggccaactc catcactagg ggttccttgt agttaatgat taaccgcga 840

tgctacttat ctacgtagcc atgctctaga gcggccgcac gcgtactagt tattaatagt 900

aatcaattac ggggtcatta gtatcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 960

25 cggtaaatgg ccgcctggc tgaccgcca acgacccccg ccattgacg tcaataatga 1020

cgatatgtcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt 1080

tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta 1140

ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg acctatggg 1200

actttcctac ttggcagtag atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt 1260

30 tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc 1320

acccattga cgtcaatggg agtttgttht ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat 1380

gtcgtaacaa ctccgccccca ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct 1440

atataagcag agctcgthta gtgaaccgtc agatcgcttg gagacgcat ccacgctgtt 1500

ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg taccggttcg aacaggttaag 1560

35 cgccccctaaa atcccttttg gcacaatgtg tcctgagggg agaggcagcg acctgtagat 1620

gggacggggg cactaacctt caggtttggg gcttctgaat gtgagtatcg ccatgtaagc 1680

ccagtatttg gccaatctca gaaagctcct ggtccctgga gggatggaga gagaaaaaca 1740

aacagctcct ggagcaggga gagtgtggtc ctcttgctct ccggctccct ctgttgccct 1800

ctggthtctc ccaggttcg aagcgcgcaa ttaacctca ctaaaggga caaaagctgg 1860

40 agctcaatcg gaccgaaatt aatacgactc actatagggg aattgtgagc ggataacaat 1920

tccccggagt taatccggga cttttaattc aaccaaacac aatatattat agttaaataa 1980

gaattattat caaatcatth gtatattaat taaaatacta tactgtaaat tacatthtat 2040

ttacaatcaa aggagatata ccatggtgag caagggcgag gagctgttca ccgggggtgt 2100

gcccattcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga 2160

45 gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcactctga ccaccggcaa 2220

gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag 2280

ccgtacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgcatgac ccgaaggcta 2340

cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgccgaggt 2400

	gaagttcgag	ggcgacaccc	tggatgaaccg	catcgagctg	aagggcatcg	acttcaagga	2460
	ggacggcaac	atcctggggc	acaagctgga	gtacaactac	aacagccaca	acgtctatat	2520
	catggccgac	aagcagaaga	acggcatcaa	ggtgaacttc	aagatccgcc	acaacatcga	2580
	ggacggcagc	gtgcagctcg	ccgaccacta	ccagcagaac	acccccatcg	gcgacggccc	2640
5	cgtgctgctg	cccagacaacc	actacctgag	caccaggtcc	gccctgagca	aagaccccaa	2700
	cgagaagcgc	gatcacatgg	tccctgctgga	gttcgtgacc	gccgccggga	tcactctcgg	2760
	catggacgag	ctgtacaagt	aaagcggccg	gccgcacagc	tgtatacacg	tgcaagccag	2820
	ccagaactcg	ccccggaaga	ccccgaggat	ctcgagcacc	accatcacca	tcaccatcac	2880
	taagtgatta	acctcaggtg	caggctgcct	atcagaaggt	ggtggctggg	gtgggtaccc	2940
10	aattcgccct	atagttagtc	gtattacgcg	cgcagcggcc	gacctgggcc	caacttgttt	3000
	attgcagctt	ataatgggta	caaataaagc	aatagcatca	caaatttcac	aaataaagca	3060
	tttttttcac	tgcatcttag	ttgtgggttg	tccaaaactca	tcaatgtatc	ttatcatgtc	3120
	tggatctccg	gaccacgtgc	ggaccgagcg	gccgctctag	agcatggcta	cgtagataag	3180
	tagcatggcg	ggtaaatcat	taactacaag	gaacccttag	tgatggagtt	ggccactccc	3240
15	tctctgcgcg	ctcgctcgct	cactgaggcc	gggcgaccaa	aggtcgcccc	acgcccgggc	3300
	ggcctcagtg	agcgagcgag	cgcgcagctg	cctgcaggtc	tgagacaata	accctgataa	3360
	atgcttcaat	aatgtagcca	accactagaa	ctatagctag	agtccctggc	gaacaaacga	3420
	tgctcgcctt	ccagaaaacc	gaggatgcga	accacttcat	ccggggtcag	caccaccggc	3480
	aagcgccgcg	acggccgagg	tcttccgatc	tcctgaagcc	agggcagatc	cgtgcacagc	3540
20	accttgccgt	agaagaacag	caaggccgcc	aatgcctgac	gatgcgtgga	gaccgaaacc	3600
	ttgcgctcgt	tcgccagcca	ggacagaaaat	gcctcgactt	cgctgctgcc	caaggttgcc	3660
	gggtgacgca	caccgtggaa	acggatgaag	gcacgaaccc	agttgacata	agcctgttcg	3720
	gttcgtaaac	tgtaatgcaa	gtagcgtatg	cgctcacgca	actggtccag	aaccttgacc	3780
	gaacgcagcg	gtggtaacgg	cgcagtggcg	gttttcatgg	cttgttatga	ctgttttttt	3840
25	gtacagtcta	tgctcggggc	atccaagcag	caagcgcgtt	acgccgtggg	tcgatgtttg	3900
	atgttatgga	gcagcaacga	tgttacgcag	cagcaacgat	gttacgcagc	agggcagtcg	3960
	ccctaaaaca	aagttagggtg	gctcaagtat	gggcatcatt	cgcacatgta	ggctcggccc	4020
	tgaccaagtc	aaatccatgc	gggctgctct	tgatcttttc	ggtcgtgagt	tcggagacgt	4080
	agccacctac	tcccaacatc	agccggactc	cgattacctc	gggaacttgc	tccgtagtaa	4140
30	gacattcatc	gcgcttgctg	ccttcgacca	agaagcgggt	gttggcgctc	tcgcggctta	4200
	cgttctgccc	aagtttgagc	agccgcgtag	tgagatctat	atctatgatc	tcgcagtctc	4260
	cggcgagcac	cggaggcagg	gcattgccac	cgcgctcatc	aatctcctca	agcatgaggc	4320
	caacgcgctt	ggtgcttatg	tgatctacgt	gcaagcagat	tacggtgacg	atcccgcagt	4380
	ggctctctat	acaaagttgg	gcatacggga	agaagtgatg	cactttgata	tcgacccaag	4440
35	taccgccacc	taacaattcg	ttcaagccga	gatcggcttc	ccggccgcgg	agttgttcgg	4500
	taaattgtca	caacgcgcg	aatatagtct	ttaccatgcc	cttgccacg	cccctcttta	4560
	atacgacggg	caatttgcac	ttcagaaaat	gaagagtttg	ctttagccat	aacaaaagtc	4620
	cagtatgctt	tttcacagca	taactggact	gatttcagtt	tacaactatt	ctgtctagtt	4680
	taagacttta	ttgtcatagt	ttagatctat	tttgttcagt	ttaagacttt	attgtccgcc	4740
40	cacacccgct	tacgcagggc	atccatttat	tactcaaccg	taaccgattt	tgccaggtta	4800
	cgcggctggg	ctatgcggtg	tgaaataaccg	cacagatgcg	taaggagaaa	ataccgcac	4860
	aggcgctctt	ccgcttcctc	gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcgttcg	gctgcggcga	4920
	gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggttaata	cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	4980
	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	5040
45	ctggcggtttt	tccataggct	ccgccccctt	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	5100
	cagagggtggc	gaaacccgac	aggactataa	agataaccagg	cgtttccccc	tggaagctcc	5160
	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	5220
	tcgggaagcg	tggcgctttc	tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	5280

	gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccggtc agcccgaccg ctgcgcctta	5340
	tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca	5400
	gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag	5460
	tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgctc tctgctgaag	5520
5	ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac caccgctggt	5580
	agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa	5640
	gaccccttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg	5700
	attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga	5760
	agtttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta	5820
10	atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgctgactc	5880
	cccgctcgtg agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg	5940
	ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga	6000
	agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt	6060
	tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt	6120
15	gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc	6180
	caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc	6240
	ggctcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat gggttatggca	6300
	gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag	6360
	tactcaacca agtcattctg agaatagttg atgcggcgac cgagttgctc ttgcccgcg	6420
20	tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa	6480
	cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa	6540
	ccactcgtg caccctaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga	6600
	gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa ggcgcacacg gaaatgttga	6660
	atactcatatc tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg	6720
25	agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaata taggggttcc gcgcacattt	6780
	ccccgaaaag tgccacctaa attgtaagcg ttaatatattt gttaaaattc gcgttaaatt	6840
	tttgttaaat cagctcattt tttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc cttataaat	6900
	caaaagaata gaccgagata ggggttgagt ttgttccagt ttggaacaag agtccactat	6960
	taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc gatggccac	7020
30	tacgtgaacc atcacccata tcaagttttt tggggctcag gtgccgtaaa gcactaaatc	7080
	ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga	7140
	gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcgggtca	7200
	cgtcgcgcgt aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc gcgtc	7255
	<210> 26	
35	<211> 2651	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic polynucleotide	
40	<400> 26	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc	60
	gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca	120
	actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatctacgt	180
	agccatgctc tagagcggcc gcacgcgtac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggctc	240
45	attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc	300
	tggtgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt	360
	aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgccca	420
	cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg	480

	taaatggccc	gcctggcatt	atgcccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	540
	gtacatctac	gtattagtca	tcgctattac	catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	600
	tgggcgtgga	tagcggtttg	actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	660
	tgggagtttg	ttttggcacc	aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	720
5	cccattgacg	caaatgggcg	gtaggcgtgt	acggtgggag	gtctatataa	gcagagctcg	780
	tttagtgaac	cgtcagatcg	cctggagacg	ccatccacgc	tgttttgacc	tccatagaag	840
	acaccgggac	cgatccagcc	tccgtaccgg	ttcgaacagg	taagcgcccc	taaaatccct	900
	ttgggcacaa	tgtgtcctga	ggggagaggg	agcgacctgt	agatgggacg	ggggcactaa	960
	ccctcagggt	tggggcttct	gaatgtgagt	atcgccatgt	aagcccagta	tttggccaat	1020
10	ctcagaaagc	tcctggtccc	tggaggggatg	gagagagaaa	aacaaacagc	tcctggagca	1080
	gggagagtgc	tggcctcttg	ctctccggct	ccctctgttg	ccctctgggt	tctccccagg	1140
	ttcgaagcgc	gcaattaacc	ctcactaaag	ggaacaaaag	ctggagctca	atcggaccga	1200
	aattaatacg	actcactata	ggggaattgt	gagcggataa	caattccccg	gagttaatcc	1260
	gggaccttta	attcaaccga	acacaatata	ttatagttaa	ataagaatta	ttatcaaadc	1320
15	atltgtatat	taattaaaaat	actataactgt	aaattacatt	ttattttacaa	tcaaaggaga	1380
	tataccatgg	tgagcaaggg	cgaggagctg	ttcaccgggg	tggtgcccat	cctggtcgag	1440
	ctggacggcg	acgtaaacgg	ccacaagttc	agcgtgtccg	gagagggcga	gggcgatgcc	1500
	acctacggca	agctgaccct	gaagttcatc	tgcaccaccg	gcaagctgcc	cgtgccctgg	1560
	cccaccctcg	tgaccaccct	gacctacggc	gtgcagtgtc	tcagccgcta	ccccgaccac	1620
20	atgaagcagc	acgacttctt	caagtccgcc	atgcccgaag	gctacgtcca	ggagcgcacc	1680
	atcttcttca	aggacgacgg	caactacaag	acccgcgccg	aggtgaagtt	cgagggcgac	1740
	accctggtga	accgcatcga	gctgaagggc	atcgacttca	aggaggacgg	caacatcctg	1800
	gggcacaagc	tggagtacaa	ctacaacagc	cacaacgtct	atatcatggc	cgacaagcag	1860
	aagaacggca	tcaaggtgaa	cttcaagatc	cgccacaaca	tcgaggacgg	cagcgtgcag	1920
25	ctcgccgacc	actaccagca	gaacaccccc	atcggcgacg	gccccgtgct	gctgcccgcg	1980
	aaccactacc	tgagcaccca	gtccgcccctg	agcaaagacc	ccaacgagaa	gcgcgatcac	2040
	atggtcctgc	tggagttcgt	gaccgcccgc	gggatcactc	tcggcatgga	cgagctgtac	2100
	aagtaaagcg	gccggccgca	cagctgtata	cacgtgcaag	ccagccagaa	ctcgcccccg	2160
	aagaccccg	ggatctcgag	caccaccatc	accatcacca	tcactaagtg	attaacctca	2220
30	gggtgcaggct	gcctatcaga	aggtggtggc	tgggtgtgggt	acccaattcg	ccctatagtg	2280
	agtcgtatta	cgcgcgacgc	ggccgaccat	ggcccaactt	gtttattgca	gcttataatg	2340
	gttacaaata	aagcaatagc	atcacaaaatt	tcacaaaataa	agcattttttt	tcactgcatt	2400
	ctagtgtgtg	tttgtccaaa	ctcatcaatg	tatcttatca	tgtctggatc	tccggaccac	2460
	gtgcggaccg	agcggccgct	ctagagcatg	gctacgtaga	taagtagcat	ggcgggttaa	2520
35	tcattaacta	caaggaaccc	ctagtgtatg	agttggccac	tccctctctg	cgcgctcgct	2580
	cgctcactga	ggccggggcg	ccaaagggtcg	cccgcgcccc	ggcgggcctc	agtgcgcgag	2640
	cgagcgcgca	g					2651

(57) Формула изобретения

40 1. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом (сеDNA) для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты, причем сеDNA содержит вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты,

где указанная вставка фланкирована по меньшей мере двумя последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV),

45 причем по меньшей мере две последовательности ITR являются асимметричными и ковалентно связанными друг с другом;

причем каждая из по меньшей мере двух последовательностей ITR имеет сайт оперативного концевого разрешения и элемент, с которым связывается белок гер,

принимаящий участие в механизме репликации по типу катящегося кольца (RBE), причем первая последовательность ITR прерывается поперечной последовательностью с образованием двух противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле», причем каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной в диапазоне от 5 до 15 пар оснований и часть «петля», имеющую от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов, причем вторая последовательность ITR прерывается усеченной поперечной последовательностью, имеющей одну или более делеций длиной от 11 до 20 нуклеотидов в области петли палиндромных последовательностей В-В' и/или области петли палиндромных последовательностей С-С'.

2. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по п. 1, в которой по меньшей две последовательности ITR имеют длину в диапазоне от 40 до 1000 нуклеотидов.

3. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по п. 2, в которой прерывается самокомплементарная последовательность(и) имеет длину в диапазоне от 100 до 160 нуклеотидов.

4. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому одному из пп. 1-3, в которой усеченная поперечная последовательность имеет свободную энергию Гиббса (ΔG) разворачивания в физиологических условиях в диапазоне от -12 ккал/моль до -30 ккал/моль.

5. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по п. 4, в которой поперечная последовательность имеет свободную энергию Гиббса (ΔG) разворачивания в физиологических условиях в диапазоне от -20 ккал/моль до -25 ккал/моль.

6. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой каждая из противоположных продольно-симметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной в диапазоне от 8 до 10 пар оснований.

7. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой каждая часть «петля» имеет от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов.

8. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой каждая часть «петля» имеет три дезоксирибонуклеотида.

9. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой одна часть «петля» имеет три дезокситимидина, а другая часть «петля» имеет три дезоксиаденозина.

10. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой RBE содержит последовательность 5'-GCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO. 1).

11. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой сайт оперативного концевого разрешения содержит последовательность 5'-TT-3'.

12. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой 3'-конец сайта оперативного концевого разрешения составляет от 15 до 25 нуклеотидов из 5'-конца элемента RBE.

13. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой усеченная поперечная последовательность образует две противоположные продольно-асимметричные «петли-на-стебле».

14. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по п. 13, в которой одна из противоположных продольно-асимметричных «петель-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной в диапазоне от 8 до 10 пар оснований и часть «петля», имеющую от 2 до 5 неспаренных дезоксирибонуклеотидов.

15. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по п. 14, в которой одна продольно-асимметричная «петля-на-стебле» имеет часть «стебель» длиной менее чем 8 пар оснований и часть «петля», имеющую от 2 до 5 дезоксирибонуклеотидов.

5 16. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по п. 14, в которой одна продольно-асимметричная «петля-на-стебле» имеет часть «петля», имеющую 3 или менее дезоксирибонуклеотидов.

10 17. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому одному из пп. 13-16, в которой усеченная поперечная последовательность имеет свободную энергию Гиббса (ΔG) разворачивания в физиологических условиях в диапазоне от 0 ккал/моль до более чем -22 ккал/моль.

18. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты сконструирована для экспрессии белка или функциональной РНК.

15 19. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, в которой вставка гетерологичной нуклеиновой кислоты представляет собой беспромоторную конструкцию в качестве субстрата для редактирования генов.

20 20. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по п. 19, в которой беспромоторная конструкция обеспечивает субстрат для эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALENs), нуклеаз «цинковые пальцы» (ZFN), мегануклеаз, Cas9 и других белков, редактирующих ген.

21. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, где линейная дуплексная ДНК с закрытым концом имеет длину в диапазоне от 500 до 50000 нуклеотидов.

25 22. Линейная дуплексная ДНК с закрытым концом по любому из предыдущих пунктов, где линейная дуплексная ДНК с закрытым концом содержится внутри вектора.

23. Композиция для доставки одной или более гетерологичных ceDNA субъекту, содержащая одну или более ceDNA по любому из пп. 1-22.

24. Композиция по п. 23, в которой одна или более линейных дуплексных ДНК с закрытым концом связаны конец-к-концу.

30 25. Композиция по п. 23 или 24, содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

26. Клетка-хозяин для доставки гетерологичной ceDNA субъекту, содержащая ceDNA по любому из пп. 1-22.

35 27. Клетка-хозяин по п. 26, где клетка-хозяин дополнительно содержит репликационный белок по типу разматывающегося рулона, который селективно связывается с элементом RBE ceDNA.

28. Способ доставки гетерологичной ceDNA в клетку млекопитающего, включающий доставку в клетку ceDNA по любому из пп. 1-22.

40 29. Способ доставки гетерологичной ceDNA субъекту, где способ включает доставку субъекту ceDNA по любому из пп. 1-22, где доставка ceDNA не приводит к иммунному ответу против ceDNA у субъекта.

30. Способ по п. 29, где иммунный ответ представляет собой гуморальный ответ.

31. Способ по п. 29, где иммунный ответ представляет собой клеточный ответ.

32. Способ по п. 29, где гетерологичная ceDNA доставляется субъекту несколько раз.

45 33. Способ по п. 29, где количество случаев, при которых гетерологичная линейная дуплексная ДНК с закрытым концом доставляется субъекту, находится в диапазоне от 2 до 10 раз.

34. Способ по п. 32 или 33, где гетерологичная линейная дуплексная ДНК с закрытым

концом доставляется субъекту ежечасно, ежедневно, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, раз в полгода или ежегодно.

35. Способ доставки гетерологичной линейной дуплексной ДНК с закрытым концом субъекту, где способ включает доставку клетки-хозяина по п. 26 или 27 субъекту.

36. Способ по п. 35, где клетка-хозяин представляет собой клетку крови.

37. Способ по п. 35 или 36, где клетка-хозяин доставляется несколько раз.

38. Способ по п. 37, где клетка-хозяин доставляется субъекту ежечасно, ежедневно, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, раз в полгода или ежегодно.

39. Способ получения сеDNA, где способ включает:

(i) введение в пермиссивную клетку линейной дуплексной ДНК с закрытым концом по любому из пп. 1-22; и

(ii) поддержание пермиссивной клетки в условиях, при которых репликационный белок по типу разматывающегося рулона в пермиссивной клетке инициирует продуцирование множественных копий линейной дуплексной ДНК с закрытым концом, причем пермиссивная клетка не экспрессирует вирусные капсидные белки, способные упаковывать репликативные копии линейной дуплексной ДНК с закрытым концом в вирусную частицу.

40. Способ по п. 39, дополнительно включающий стадию очистки множественных копий линейной дуплексной ДНК с закрытым концом.

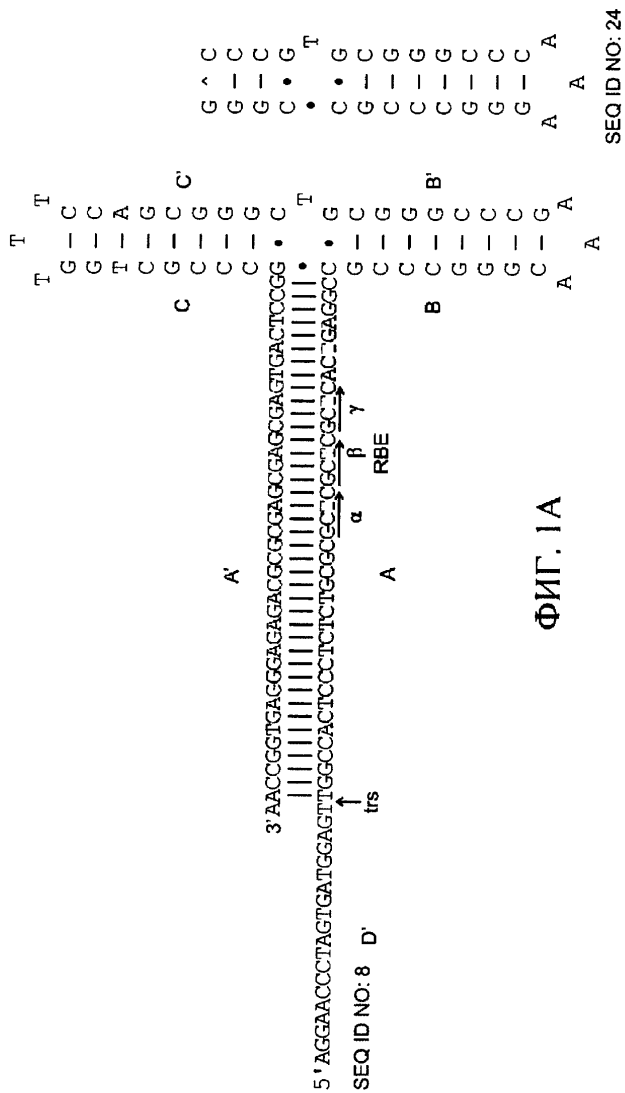
41. Способ по п. 39, где стадия очистки включает контактирование линейной дуплексной ДНК с закрытым концом с силикагелевой смолой.

42. Способ по любому одному из пп. 39-41, где репликационный белок по типу разматывающегося рулона выбирается из группы, состоящей из AAV78, AAV52, AAV Rep68 и AAV Rep40.

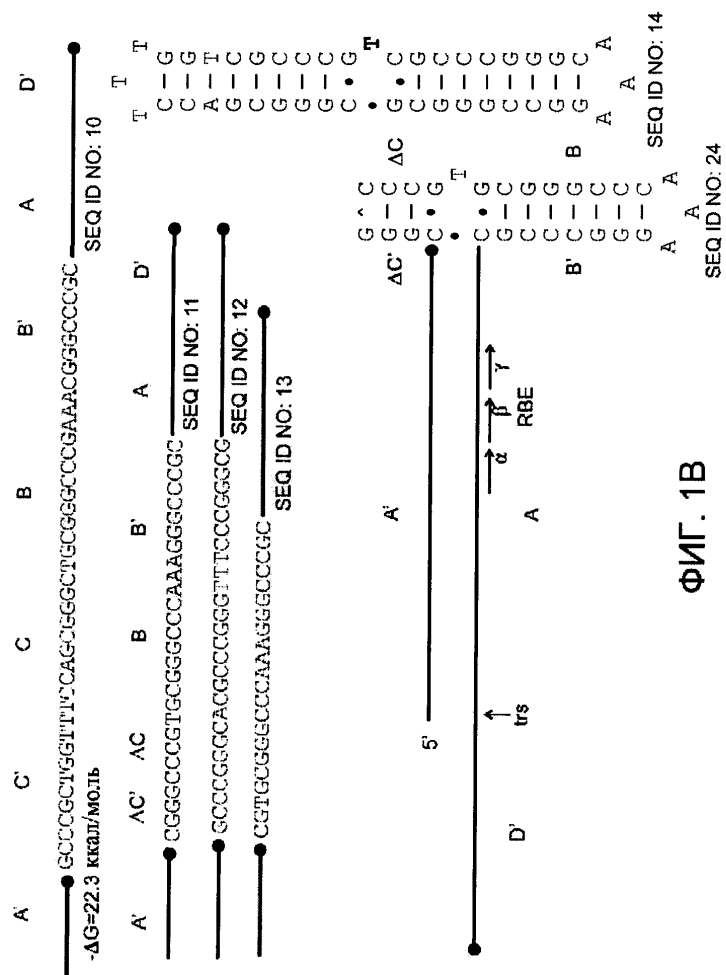
43. Способ по любому одному из пп. 39-42, где пермиссивная клетка не является клеткой млекопитающего.

44. Способ по п. 43, где пермиссивная клетка представляет собой линию клеток насекомых, линию клеток дрожжей или линию клеток бактерий.

45. Способ по любому одному из пп. 39-44, где репликационный белок по типу разматывающегося рулона кодируется вектором вируса-помощника, необязательно где вектор вируса-помощника представляет собой вектор вируса множественного ядерного полиэдроза Autograph californica (AcMNPV) или векторы экспрессии бакуловируса (BEV).

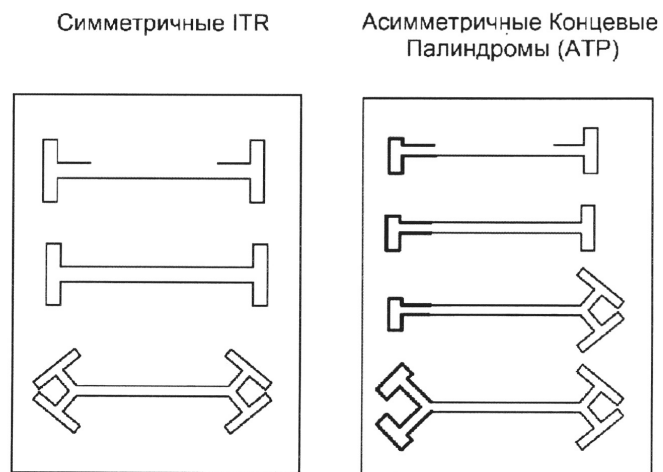


ФИГ. 1А

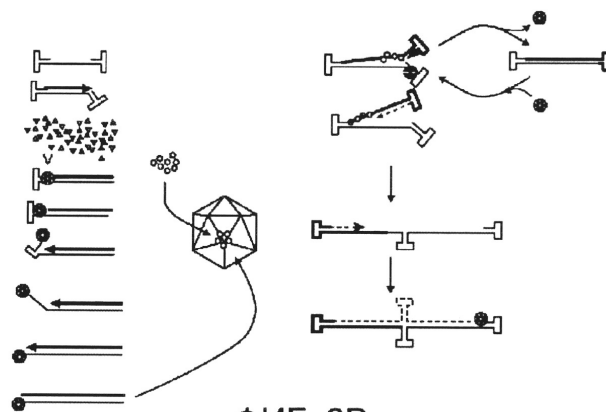


ФИГ. 1В

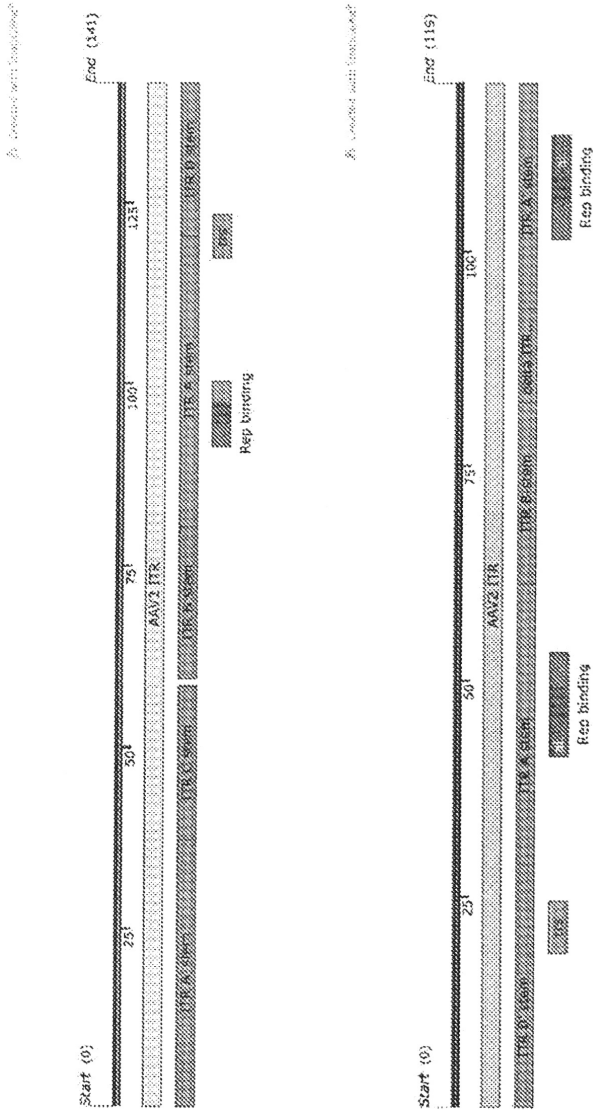
3/18



ФИГ. 2А

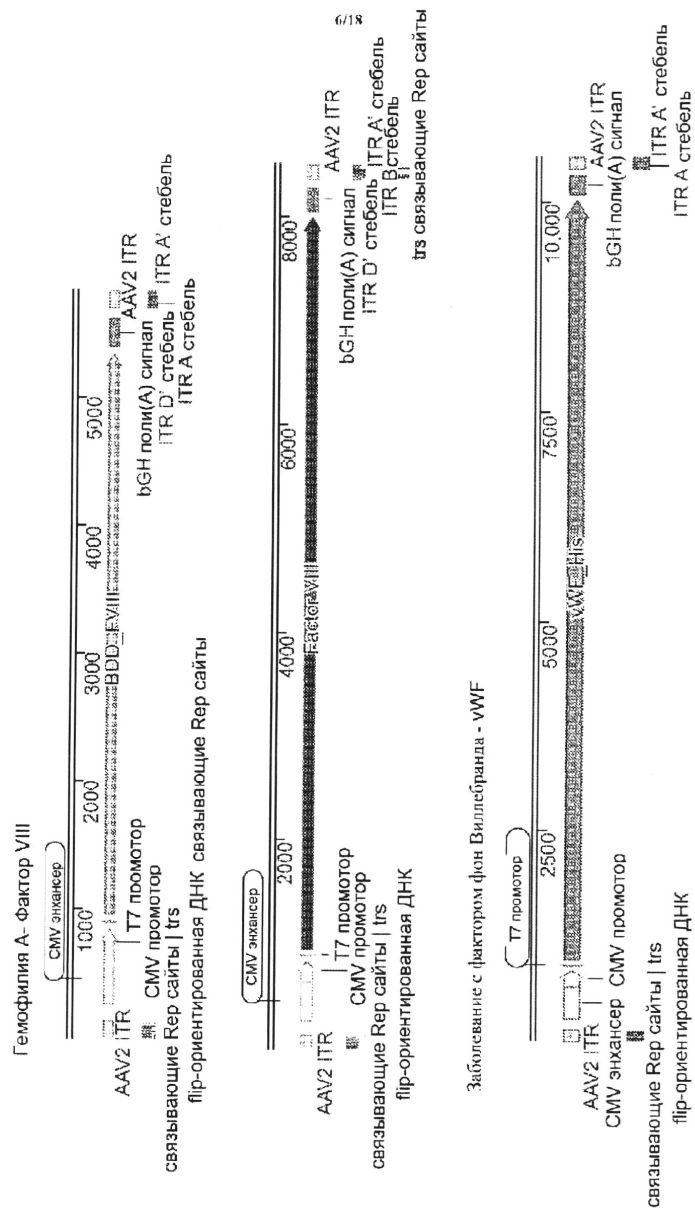


ФИГ. 2В



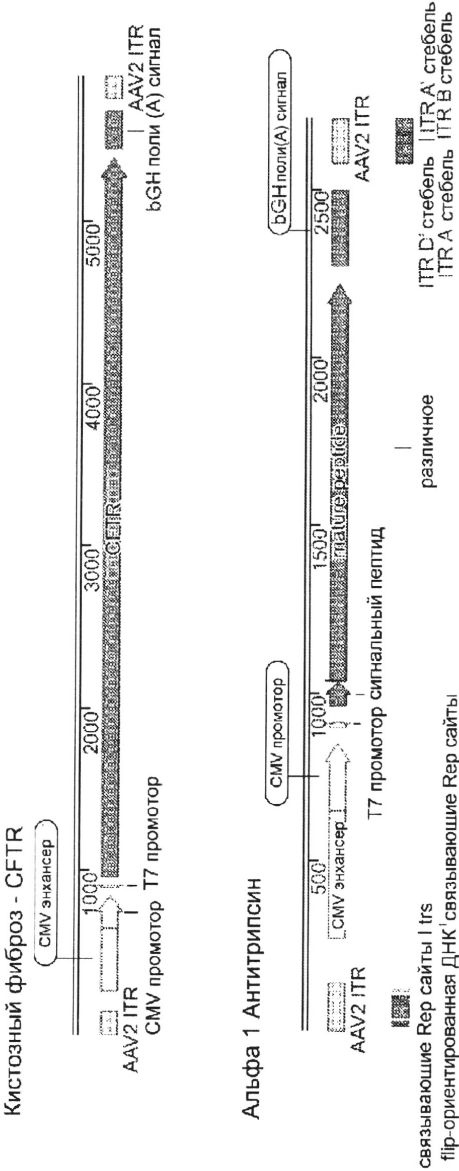
ФИГ. 3





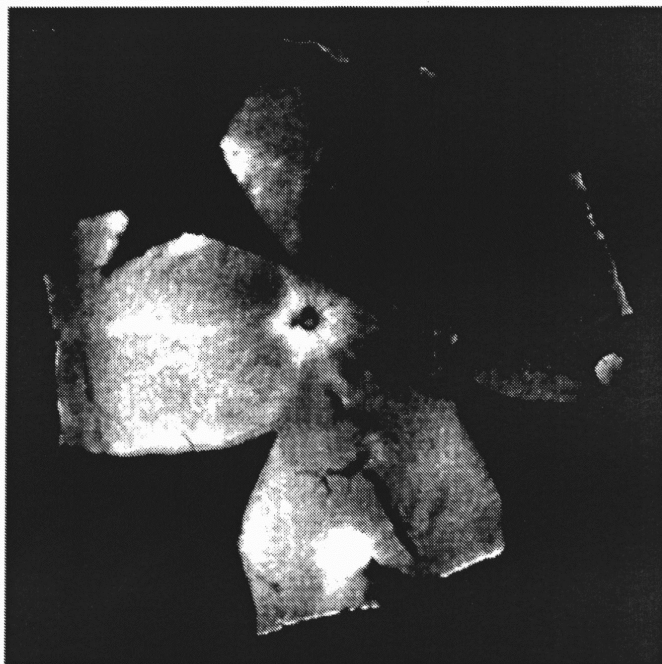
ФИГ. 5





ФИГ. 7

9/18



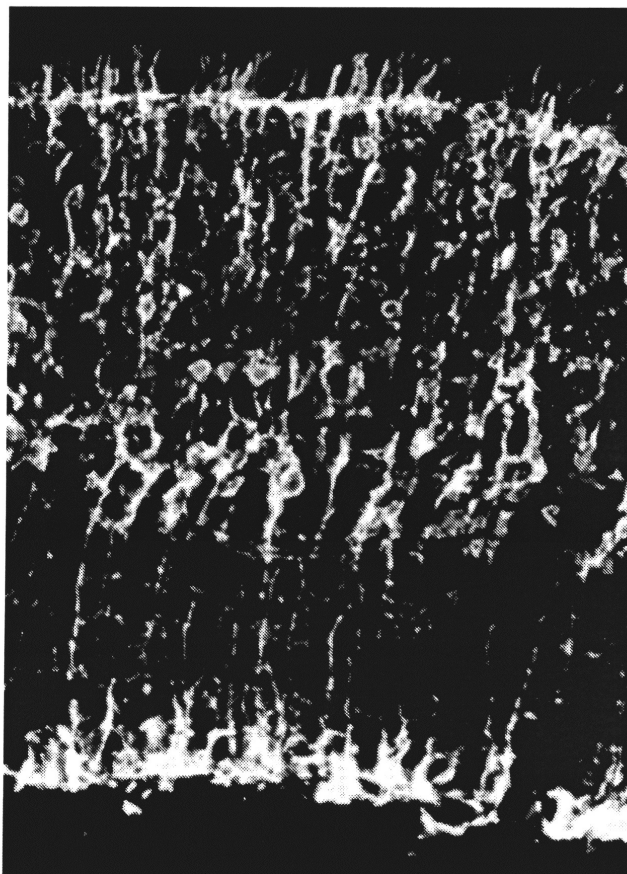
ФИГ. 8А

10/18



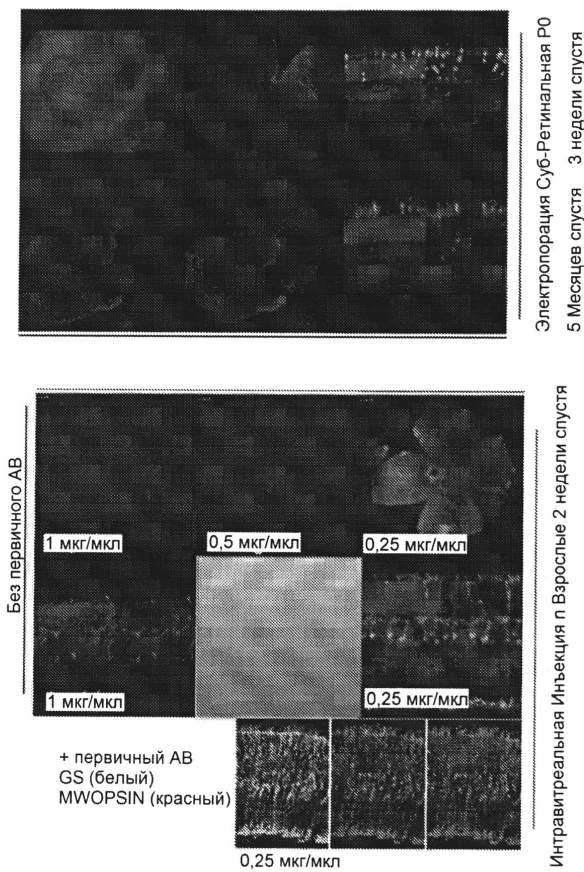
ФИГ. 8В

11/18

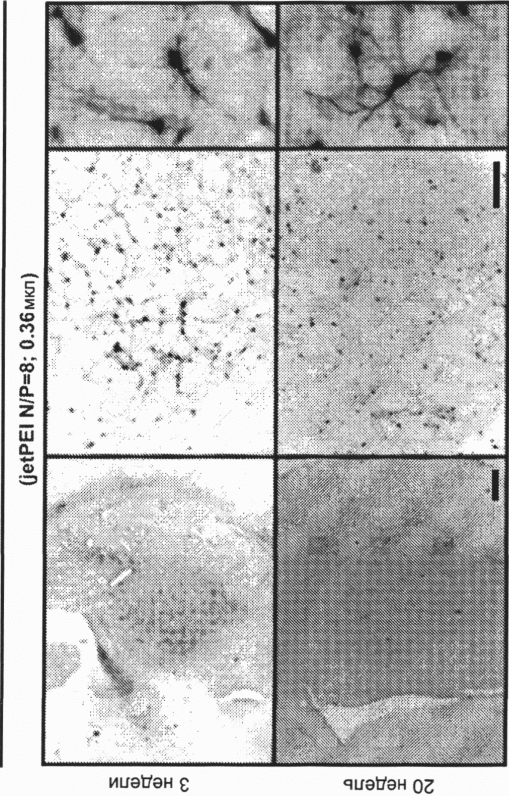


ФИГ. 8С

12/18

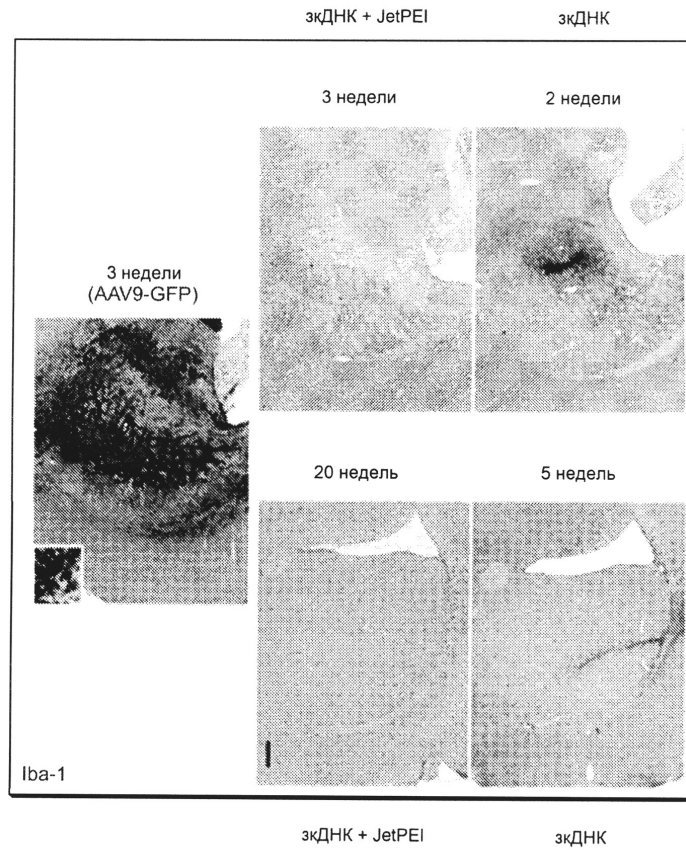


ФИГ. 8D



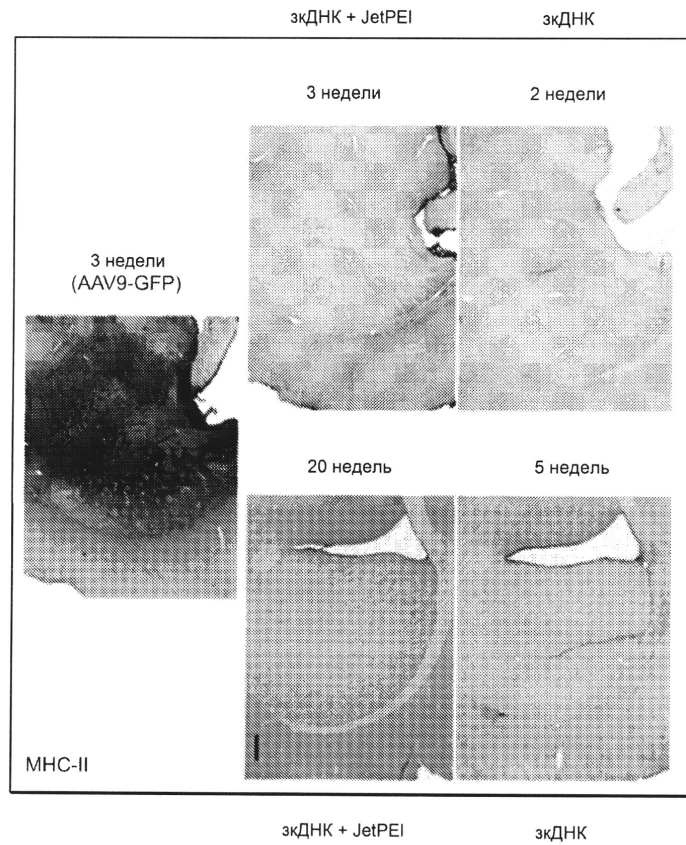
ФИГ. 9А

14/18



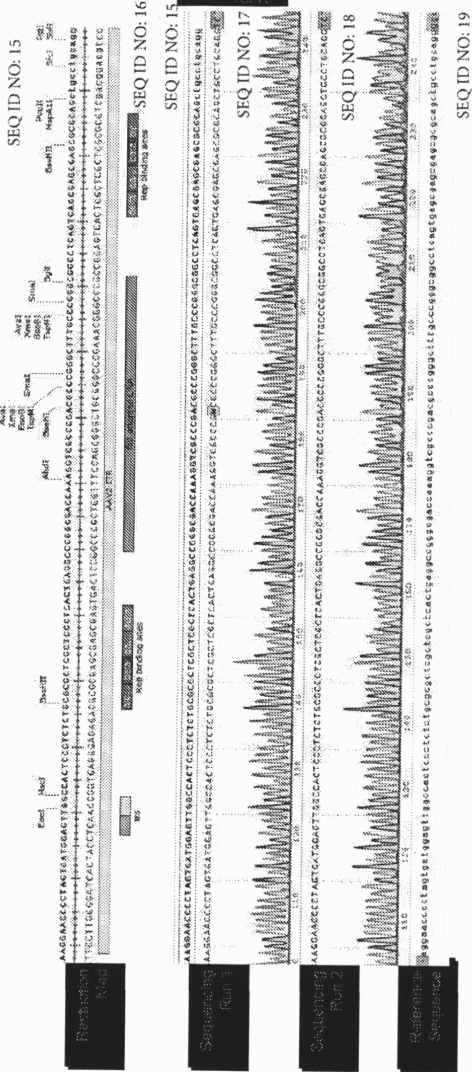
ФИГ. 9В

15/18



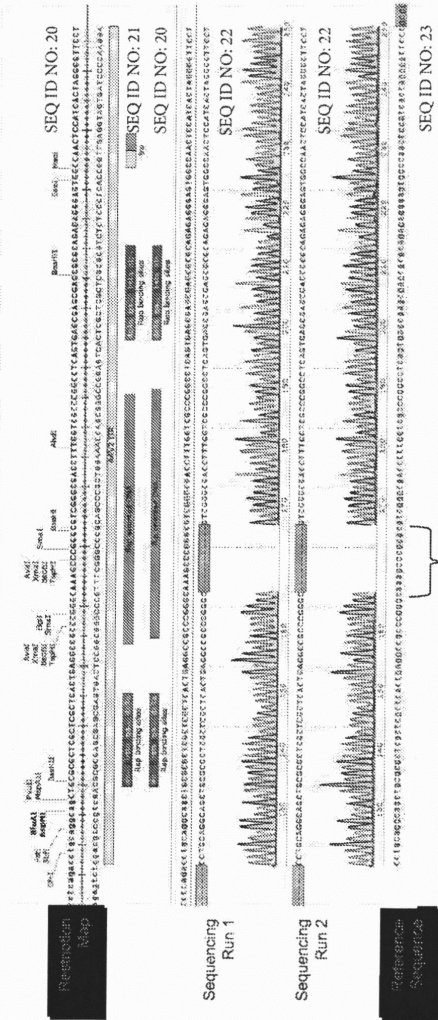
ФИГ. 9С

Неусеченная Самокомплементарная Последовательность
(Голова)

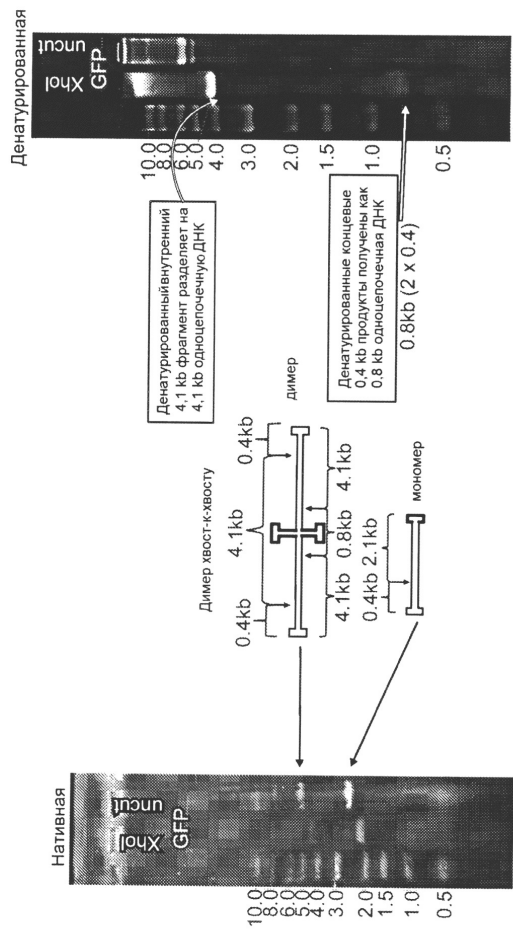


ФИГ. 10А

Усеченная Самокомплементарная Последовательность
(Хвост)



ФИГ. 10В



ФИГ. 10С