



MD/EP 3645551 T2 2024.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3645551 (13) T2

(51) Int. Cl: C07K 14/015 (2006.01.01)
C12N 15/35 (2006.01.01)
C12N 15/864 (2006.01.01)
A61K 35/76 (2015.01.01)
A61K 48/00 (2006.01.01)
C12N 5/10 (2006.01.01)
C07K 16/18 (2006.01.01)
C07K 16/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0492 (22) Data de depozit: 2018.06.27 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18749635.1, 2018.06.27 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3645551, 2020.05.06 (31) Numărul cererii prioritare: 201762525704 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.06.27 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 08/2024, 2024.08.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 11/2024, 2024.03.13 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 05/2020, 2020.05.31
(71) Solicitant: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (72) Inventatori: KYRATSOUS Christos, US; MURPHY Andrew J., US; WANG Cheng, CN; SABIN Leah, US (73) Titular: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

(54) Vectori virali recombinanți modificați cu tropism și utilizările acestora pentru introducerea țintită a materialului genetic în celulele umane

(57) Rezumat:

1
Sunt prezentate compoziții și metode pentru reorientarea proteinelor capsidice/capsidelor/vectorilor virali recombinanți, de exemplu, *in vivo*, cu o

2
moleculă de legare multispecifică, cum ar fi un anticorp bispecific, care se leagă în mod specific

MD/EP 3645551 T2 2024.08.31

cu un epitop heterolog afișat de proteina capsidică și o proteină exprimată pe celula de interes pentru livrarea direcționată a unui nucleotid de interes.

Secvențe: 40

Revendicări: 21

Figuri: 15



FIG. 11

(54) Tropism-modified recombinant viral vectors and uses thereof for the targeted introduction of genetic material into human cells

(57) Abstract:

1

Provided herein are compositions and methods for retargeting recombinant viral capsid proteins/capsids/vectors, e.g., *in vivo*, with a multispecific binding molecule, such as a bispecific antibody, that specifically binds a heterologous epitope displayed by the capsid protein and a protein expressed on the cell of

2

interest for the targeted delivery of a nucleotide of interest.

Sequences: 40

Claims: 21

Fig.: 15

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Lista de secvențe scrisă în fișierul 10335WO01_ST25.txt are 88 kiloocteți, a fost creată pe 27 iunie 2018.

DOMENIUL TEHNIC

Dezvăluirea de aici se referă, în general, la vectori virusuri asociate adenovirusului recombinant (AAV) modificate cu tropism și compoziții care îi cuprind, care sunt utile pentru introducerea țintită a materialului genetic în celule și/sau țesuturi.

STADIUL TEHNICII AL INVENȚIEI

Livrarea genelor în anumite celule țintă a devenit una dintre cele mai importante tehnologii din medicina modernă pentru diagnosticarea și terapia genică a unei varietăți de boli cronice și genetice. Până acum, progresul în aplicarea clinică a terapiei genice a fost limitat de lipsa vehiculelor ideale de livrare a genelor. Pentru a obține succesul terapeutic, vehiculele de livrare a genelor trebuie să fie capabile să transducă celulele țintă evitând în același timp transducția celulelor non-țintă. În mod specific, atunci când tropismul nativ al virusului nu satisface nevoile terapeutice instantanee, există o nevoie de vectori virali recombinanți în care tropismul natural este eliminat sau diminuat și tropismul dorit este conceput cu succes. (Buchholz et al.).

În ultimii ani, cele mai multe progrese în dezvoltarea vectorilor s-au realizat folosind viruși liberi (de exemplu, viruși care cuprind o capsidă formată din proteine capsid virale fără înveliș (de exemplu, bistrat lipidic)), cum ar fi virușii adeno-asociați (AAV) și adenovirusurile (Ads), precum și viruși înveliți (de exemplu, viruși pentru care capsida este înconjurată de un strat dublu lipidic), cum ar fi retrovirusurile, lentivirusurile și virusul herpes simplex. Vectorii bazați pe AAV au fost în centrul multor cercetări, deoarece AAV-urile sunt viruși neînveliți care sunt doar ușor imunogeni, dar capabili să transduce o gamă largă de specii și țesuturi in vivo, fără dovezi de toxicitate.

AAV-urile sunt mici, virusuri ADN, neînveliți, monocatenar. Genomul AAV are 4,7 kb și este caracterizat de două repetiții terminale inversate (ITR) și două cadre de citire deschise care codifică proteinele Rep și, respectiv, proteinele Cap. Cele două ITR sunt singurele elemente cis esențiale pentru replicarea, ambalarea și integrarea AAV. Cadrul de citire Rep codifică patru proteine cu greutate moleculară 78 kD, 68 kD, 52 kD și 40 kD. Aceste proteine funcționează în principal în reglarea replicării AAV și a integrării AAV în cromozomii celulei gazdă. Cadrul de citire Cap codifică trei proteine virale structurale (capside) (VP) având greutăți moleculare de 83-85 kD (VP1), 72-73 kD (VP2) și 61-62 kD (VP3). Mai mult de 80% din proteinele totale din virionul AAV cuprind VP3; în virionii maturi VP1, VP2 și VP3 se găsesc la abundență relativă de aproximativ 1:1:10. In vitro, cele trei proteine se assemblează spontan în structuri asemănătoare virionilor, de exemplu, capsid virale. Prin urmare, se pare că formarea capsidului viral în celulele infectate are loc independent de sinteza ADN-ului viral (revizuit de Kotin și colab. 1994) Zumzet. Gene Ther. 5:793).

Dintre toate serotipurile AAV cunoscute, AAV2 este poate cel mai bine caracterizat serotip, deoarece clona sa infecțioasă a fost prima realizată. (Samulski și colab. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. SUA 79:2077-2081). Ulterior, secvențele complete pentru AAV3A, AAV3B, AAV4 și AAV6 au fost de asemenea determinate. (Rutledge et al. (1998) J. Virol. 72:309-319; Chiorini et al. (1997) J. Virol. 71:6823-6833; S. Muramatsu și colab. (1996) Virol. 221:208-217). În general, toate AAV-urile au mai mult de 80% identitate în secvența de nucleotide.

AAV este un vector promițător pentru terapia genetică umană, deoarece, spre deosebire de alți vectori virali, AAV nu s-a dovedit a fi asociat cu nicio boală umană cunoscută și, în general, nu sunt considerate patogeni. (Muzyczka și colab. (1992) Subiecte curente în microbiologie și imunologie 158:97-129). Mai mult, AAV transduce în siguranță țesuturile postmitotice cu imunogenitate relativ scăzută și este capabil să se integreze în cromozomii gazdă într-o manieră specifică locului și în celulele cultivate de țesut din cromozomul 19 dacă proteinele Rep sunt furnizate în trans. (Kotin și colab. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2211-2215; Samulski și colab. (1991) EMBO J. 10(12):3941-3950; Balague et al. (1997) J. Virol. 71:3299-3306; Surosky și colab. (1997) J. Virol. 71:7951-7959). S-a dovedit că genomii integrați ai AAV permit exprimarea genelor pe termen lung într-un număr de țesuturi, inclusiv mușchi, ficat și creier (Fisher (1997) Nature Med. 3(3):306-312; Snyder și colab. (1997) Nature Genetics 16:270-276; Xiao și colab. (1997) Experimental Neurology 144:113-124; Xiao și colab. (1996) J. Virol. 70(11):8098-8108).

Un număr de viruși, inclusiv AAV, infectează celulele printr-o interacțiune virus/ligand:celulă/receptor, ducând în cele din urmă la endocitoza virusului de către celula infectată. Acest ligand: interacțiune receptor este în centrul multor cercetări în vectorii virali, de exemplu, poate fi

manipulată pentru a redirecționa tropismul natural al unui virus de la o celulă permisivă în mod natural la infecția cu virusul sălbatic către o celulă țintă, de exemplu, printr-un receptor. exprimată de celula țintă.

Teoretic, redirecționarea unui vector către orice proteină sau marker de suprafață celulară ar trebui să ducă la infecția de către o celulă țintă, deoarece majoritatea receptorilor sau markerilor de suprafață celulară sunt implicați în căile de endocitoză, fie constitutive (de exemplu, pentru reciclare) fie induse de ligand (de exemplu, mediate de receptori). Acești receptori se grupează în gropi acoperite cu clatrină, intră în celulă prin intermediul veziculelor acoperite cu clatrină, trec printr-un endozom acidificat în care receptorii sunt sortați și apoi fie se reciclează la suprafața celulei, fie sunt stocați intracelular sau sunt degradați în lizozomi. Ca atare, platformele pentru redirecționarea vectorilor virali urmăresc adesea să elimine tropismul natural al vectorului viral și să redirecționeze vectorul viral către un receptor sau un marker exprimat exclusiv sau în principal de celula țintă. Multe dintre progresele în terapia genică țintită folosind vectori virali pot fi rezumate ca modificări nerecombinatorii (negenetice) sau recombinatorii (genetice) ale vectorului viral, care au ca rezultat pseudotipizarea, extinderea și/sau redirecționarea tropismului natural. a vectorului viral. (Revizuit în Nicklin și Baker (2002) *Curr. Gene Ther.* 2 :273-93 ; Verheij și Rottier (2012) *Advances Virol* 2012:1-15).

Abordările non-genetice utilizează de obicei un adaptor, care recunoaște atât o proteină de suprafață a virusului de tip sălbatic (nemodificat), cât și o celulă țintă.

Pseudo-receptori solubili (pentru virusul de tip sălbatic), polimeri cum ar fi polietilen glicol și anticorpi sau porțiuni ale acestora au fost utilizați ca domenii de legare a virusului al adaptorilor, în timp ce peptide naturali sau liganzi de vitamine și anticorpi și porțiuni ale acestora au fost utilizați. pentru domeniul de legare celulară al adaptoarelor descrise mai sus. Cu această abordare, redirecționarea vectorului viral către o celulă țintă poate fi realizată la legarea complexului vector: adaptor la o proteină exprimată pe suprafața celulei țintă, de exemplu, o proteină de suprafață celulară.

O astfel de abordare a fost utilizată pentru AAV (Bartlett et al. (1999) *Nat. Biotehnologia.* 74: 2777-2785), adenovirusuri (Heminki și colab. (2001) *Cancer Res.* 61: 6377-81; van Beusechem et al. (2003) *Gene Therapy* 10:1982-1991; Einfeld și colab. (2001) *J. Virol.* 75:11284-91 ; Glasgow și colab. (2009) *PLOS One* 4:e8355), herpesvirusuri (Nakano et al. (2005) *Mol. Acolo.* 11:617-24) și paramixovirusuri (Bian și colab. (2005) *Gena cancerului Ther.* 12:295-303 ; Bian și colab. (2005) *Int. J. Oncol.* 29:1359-69), Coronavirus (Haijema et al. (2003) *J. Virol.* 77:4528-43]8; Wurdinger și colab. (2005) *Gene Therapy* 12:1394-1404).

O abordare mai populară a fost modificarea genetică recombinatorie a proteinelor capsidului viral și, prin urmare, a suprafeței capsidului viral.

În abordările indirecte recombinatorii, o capsidă virală este modificată cu o „schelă” heterolog, care apoi se leagă de un adaptor. Adaptorul se leagă de schelă și de celula țintă. (Arnold și colab. (2006) *Mol. Acolo.* 5:125-132; Ponnazhagen și colab. (2002) *J. Virol.* 76:12900-907; vezi, de asemenea, WO 97/05266). Structuri precum (1) molecule de legare la Fc (de exemplu, receptorii Fc, proteina A etc.), care se leagă la Fc al adaptorilor de anticorpi, (2) (strept)avidină, care se leagă de adaptorii biotinați, (3) biotina, care se leagă de adaptoare fuzionate cu (strept)avidină și (4) perechi de legare proteină:proteină care formează legături peptidice izometrice, cum ar fi SpyCatcher, care leagă un adaptor SpyTagged, au fost încorporate în Ad (Pereboeva și colab. (2007) *Gene Therapy* 14: 627-637; Park și colab. (2008) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366: 769-774; Henning și colab. (2002) *Human Gene Therapy* 13:1427-1439; Banerjee și colab. (2011) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 21:4985-4988), AAV (Gigout et al. (2005) *Molecular Therapy* 11:856-865; Stachler și colab. (2008) *Molecular Therapy* 16:1467-1473) și togavirus (Quetglas și colab. (2010) *Virus Research* 153:179-196; Ohno și colab. (1997) *Nature Biotechnology* 15:763-767; Klimstra și colab. (2005) *Virologie* 338:9-21).

Într-o abordare de țintire recombinatorie directă, un ligand de țintire este inserat direct într-o capsidă virală sau cuplat la o capsidă virală, adică capsidul viral proteic sunt modificate pentru a exprima un ligand de țintire heterolog.

Ligandul care redirecționează, de exemplu, leagă, un receptor sau un marker exprimat preferențial sau exclusiv pe o celulă țintă. (Stachler et al. (2006) *Gene Ther.* 13:926-931 ; White și colab. (2004) *Circulation* 109:513-519.). Abordările recombinatorii directe au fost utilizate în AAV (Park și colab., (2007) *Frontiers in Bioscience* 13:2653-59; Girod și colab. (2007) 1999 *Nature Medicine* 5:1052-56; Grifman et al. (2001) *Molecular Therapy* 3:964-75; Shi și colab. (2001) *Human Gene Therapy* 12:1697-1711; Shi și Bartlett (2003) *Molecular Therapy* 7:515-525), retrovirus (Dalba și colab. *Current Gene Therapy* 5:655-667; Tai și Kasahara (2008) *Frontiers in Bioscience* 13:3083-3095; Russell și Cosset (1999) *Journal of Gene Medicine* 1:300-311; Erlwein și colab. (2002) *Virology* 302:333-341; Chadwick și colab. (1999) *Journal of Molecular Biology* 285:485-494; Pizzato și colab. (2001) *Gene Therapy* 8:1088-1096), poxvirus (Guse et al. (2011) *Expert Opinion on Biological Therapy* 11:595-608; Galmiche și colab. (1997) *Journal of General Virology* 78:3019-3027; Paul și colab. (2007) *Viral Immunology*

20:664-671), paramixovirus (Nakamura and Russell (2004) Expert Opinion on Biological Therapy 4:1685-1692; Hammond et al. (2001) Journal of Virology 75:2087-2096; Galanis (2010) Clinical Pharmacology and Therapeutics 88:620-625; Blechacz și Russell (2008) Current Gene Therapy 8:162-175; Russell și Peng (2009) Current Topics in Microbiology and Immunology 330:213-241) și herpesvirus (Shah și Breakefield (2006) Current Gene Therapy 6:361-370; Campadelli-Fiume și colab. (2011) Reviews in Medical Virology 21:213-226).

Fiecare dintre cele trei abordări are avantaje și dezavantaje. Un avantaj principal al unei abordări recombinatorii directe este specificitatea vectorului viral este inerentă în genomul viral și poate fi menținută la replicare. Cu toate acestea, pentru aceasta și pentru abordările recombinatorii indirecte, capacitatea de a modifica genetic virusul necesită menținerea structurii capsidului, iar ligandul de țintire sau schela să fie plasat într-o poziție care să tolereze și să afișeze în mod corespunzător ligandul sau schela de țintire, limitând astfel repertoriul de liganzi adecvați sau schele care pot fi utilizați. Ca atare, metodele de redirectionare recombinatorie sunt limitate de molecule existente în mod natural utile ca liganzi de țintire, conducând la încorporarea altor liganzi de legare, cum ar fi anticorpi sau porțiuni ale acestora. Atât platformele de adaptoare nerecombinatorii, cât și cele recombinatorii sunt avantajoase prin flexibilitatea adaptorului utilizat. Cu toate acestea, eficiența optimă a transducției este dificil de atins cu aceste sisteme cu două componente.

De asemenea, este menționat Wickham și colab. (1997) Journal of Virology, 71(10): 7663-7669 care se referă la livrarea genei mediată de adenovirus țintit către celulele T prin CD3.

Aici este furnizată o strategie de redirectionare AAV care rezolvă problemele inerente strategiilor de redirectionare recombinatorie anterioare prin inserarea unui epitop heterolog într-o capsidă AAV. Capsida AAV recombinantă prezintă un tropism natural redus la abolit, care este restaurat și redirectionat prin combinație cu o moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică, care cuprinde un paratop de anticorp, de exemplu, Fv, care leagă în mod specific epitopul heterolog și un ligand de redirectionare care se leagă în mod specific o celulă țintă, în special în cadrul anumitor rapoarte de vector viral: molecule de legare multispecifice.

REZUMATUL INVENȚIEI

Aici sunt dezvăluite proteine a capsidului virus adeno-asociat (AAV) recombinant, capsidul AAV cuprinzând proteine a capsidului AAV recombinant, vectori AAV cuprinzând nucleotide de interes încapsulate a capsidului AAV recombinant; în care respectivele proteine a capsidului AAV, capsidul AAV și vectori AAV sunt modificate genetic pentru a cuprinde (afișa) un epitop heterolog, în care epitopul heterolog (porțiune a acestuia sau în combinație cu proteina capsidului AAV) formează o pereche de legare cu un paratop de anticorp, și în care proteina/capsidul/vectorul recombinant AAV mai poate cuprinde o mutație, inserare sau deleție la o poziție de aminoacid implicată cu legarea receptorului, de exemplu, tropismul (natural) al proteinei/capsidului/vectorului AAV, astfel încât recombinantul Proteina capsidul AAV sau o capsidă AAV care cuprinde proteina AAV recombinantă are un tropism redus la abolit (natural) (de exemplu, are, în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice, o eficiență de transducție care este mai mică decât eficiența de transducție a o proteină/capsidul/vector de referință AAV care nu are epitopul heterolog sau o eficiență de transducție nedetectabilă în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice). Un astfel de tropism redus la eliminat (natural) al proteinei/capsidului/vectorului recombinant AAV poate fi intensificat sau restaurat în prezența unei porțiuni de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate. În consecință, sunt de asemenea descrise compoziții care cuprind (1) vectorii AAV recombinanți având o capsidă care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinantă descrisă aici și (2) o moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică, care cuprinde paratopul de anticorp și un ligand de țintire, incluzând compoziții care cuprind anumite raporturi vector viral:molecule de legare multispecifică; și utilizări ale acestora pentru a direcționa și/sau introduce material genetic într-o celulă țintă sunt de asemenea descrise aici. De asemenea, sunt descrise metode de redirectionare a unui vector AAV recombinant, de exemplu, pentru livrarea țintită a unei nucleotide de interes către o celulă țintă, cuprinzând punerea în contact a vectorului AAV recombinant cu o moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică, și metode de producere a AAV recombinant. vector, sunt de asemenea descrise.

În consecință, prezenta invenție furnizează o compoziție care cuprinde:

(i) un vector de virus recombinant adeno-asociat (AAV) care cuprinde o capsidă AAV care încapsulează o nucleotidă de interes, în care capsida AAV cuprinde o proteină recombinantă a capsidului AAV modificată pentru a cuprinde un epitop heterolog, în care proteina recombinantă a capsidului AAV este derivată din o genă a capsidului AAV modificată pentru a exprima epitopul heterolog;

(ii) o moleculă de legare multispecifică care cuprinde

(a) un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul heterolog; și

(b) un ligand de redirecționare care leagă în mod specific o proteină sau un marker de suprafață celulară; și optional

(iii) un purtător acceptabil farmaceutic, în care capsida AAV prezintă:

- tropism redus la eliminat în absența moleculei de legare multispecifică; și
- 5 - tropism modificat la combinarea cu molecula de legare multispecifică în comparație cu o capsidă AAV de referință, în care capsidă AAV de referință cuprinde o proteină capsidă AAV de referință care este identică cu proteina capsidă AAV recombinantă, dar pentru lipsa epitopului heterolog.

Prezenta invenție furnizează în plus o compoziție a prezentei invenții pentru utilizare într-o metodă *in vivo* de terapie sau diagnostic prin eliberarea nucleotidei de interes la o celulă țintă care exprimă o proteină de suprafață celulară cuprinzând punerea în contact a celulei țintă cu compoziția, în care legarea multispecifică. molecula cuprinde un ligand de redirecționare care leagă proteina de suprafață celulară.

Prezenta invenție oferă, de asemenea, o metodă *in vitro* sau *ex vivo* de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă care exprimă o proteină de suprafață celulară cuprinzând punerea în contact a celulei țintă cu compoziția prezentei invenții, în care molecula de legare multispecifică cuprinde un ligand de redirecționare care leagă proteina de suprafață celulară.

Aici sunt descrise proteine a capsidei AAV recombinante cuprinzând un epitop care este heterolog cu proteina capsidei, în care epitopul sau o porțiune a acestuia leagă în mod specific un paratop al anticorpului și în care proteina capsidă AAV recombinantă sau o capsidă AAV care cuprinde proteina capsidă AAV recombinantă are o proteină redusă. pentru a elimina tropismul natural, de exemplu, în absența unui fragment de legare multispecific, opțional bispecific.

În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat (afișat) de către proteina recombinantă a capsidei AAV, astfel încât inserarea și/sau afișarea epitopului heterolog să reducă sau să elimine tropismul (natural) al capsidei AAV în comparație cu o capsidă AAV de referință lipsită de epitop heterolog, de exemplu, capsida AAV cuprinde o mutație care cuprinde o inserare a epitopului la poziția de aminoacid și/sau o substituție a unui aminoacid cu epitopul la poziția de aminoacid, în care mutația reduce sau elimină (natural) tropism al proteinei capsidei AAV, de exemplu, în absența unui fragment de legare multispecific, opțional bispecific. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat (afișat de) proteina capsidei AAV astfel încât inserția și/sau afișarea reduce parțial tropismul (natural) al capsidei AAV recombinante în comparație cu o capsidă AAV de referință lipsită de epitopul heterolog, de exemplu, în absența unui fragment de legare multispecific, opțional bispecific, și capsidul AAV mai cuprinde o mutație suplimentară (de exemplu, o substituție, deleție, inserție, alta decât inserarea unui epitop heterolog) care reduce în continuare și/sau elimină tropismul (natural) al capsidei AAV recombinante sau al vectorilor AAV recombinanți care îi cuprind, de exemplu, în absența unui fragment de legare multispecific, opțional bispecific, în comparație cu o capsidă AAV de referință lipsită de mutație.

În general, proteinele a capsidei AAV recombinante descrise aici pot fi derivate dintr-o genă a capsidei AAV, de exemplu, este codificată de o genă a capsidei AAV modificată pentru a exprima epitopul și/sau este un AAV modificat genetic. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă descrisă aici este derivată dintr-o genă a capsidei AAV, de exemplu, este codificată de o genă a capsidei modificată pentru a exprima epitopul și/sau este o proteină a capsidei a virusului adeno-asociat (AAV) modificată genetic a unui Serotipul AAV care infectează primatele, opțional în care AAV este selectat din grupul constând din AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV2, AAV6, AAV8 sau AAV9, de exemplu, este o proteină capsidă AAV2 modificată genetic, o proteină capsidă AAV6 modificată genetic, o proteină capsidă AAV8 modificată genetic sau o proteina capsidă AAV9 modificată genetic. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV2, de exemplu, este codificată de o genă a capsidei AAV2 modificată pentru a exprima epitopul și/sau este o proteină a capsidei AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic, pentru care secvența de aminoacizi a unei proteine AAV2 VP1 de tip sălbatic este prezentată, respectiv, ca SECV ID NR:1. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV6, de exemplu, este codificată de o genă a capsidei AAV6 modificată pentru a exprima epitopul și/sau este o proteină a capsidei AAV6 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic, pentru în care secvențele de aminoacizi ale AAV6 VP1 de tip sălbatic sunt prezentate ca SECV ID NR:3. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV8, de exemplu, este codificată de o genă a capsidei AAV8 modificată pentru a exprima epitopul și/sau este o proteină a capsidei AAV8 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic, pentru care secvența de aminoacizi a unei proteine AAV VP1 de tip sălbatic este prezentată, respectiv, ca SECV ID NR:21. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV9, de exemplu, este codificată de

o genă a capsidei AAV9 modificată pentru a exprima epitopul și/sau este o proteină a capsidei AAV9 VP1, VP2 sau VP3 modificată genetic, pentru care tipul sălbatic Secvența de aminoacizi a AAV9 VP1 este prezentată, respectiv, ca SECV ID NR:5. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV2, de exemplu, este codificată de o genă a capsidei AAV2 modificată pentru a exprima epitopul și/sau este o proteină a capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic a AAV2. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV6, de exemplu, este codificată de o genă a capsidei AAV6 modificată pentru a exprima epitopul și/sau este o proteină a capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic a AAV6. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV8, de exemplu, este codificată de o genă a capsidei AAV8 modificată pentru a exprima epitopul și/sau este o proteină a capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic a AAV8. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV9, de exemplu, este codificată de o genă a capsidei AAV9 modificată pentru a exprima epitopul și/sau este o proteină a capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic a AAV9.

În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată de la, de exemplu, este codificată de o genă himerică a capsidei AAV modificată pentru a exprima epitopul, în care gena capsidei AAV himerică cuprinde o multitudine de secvențe de acid nucleic, în care fiecare dintre multitudinea de secvențe de acid nucleic codifică o porțiune a unei proteine a capsidei AAV a unui serotip diferit de AAV și în care multitudinea de secvențe de acid nucleic codifică împreună o proteină a capsidei AAV himerică. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă himerică a capsidei AAV2. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă himerică a capsidei AAV6. În unele exemple de realizare, proteina capsidei AAV este derivată dintr-o genă himerică a capsidei AAV8. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă himerică a capsidei AAV9.

În general, o proteină a capsidei AAV recombinantă, așa cum este descrisă aici, cuprinde un epitop heterolog inserat în și/sau afișat de proteina capsidă AAV recombinantă, astfel încât epitopul heterolog însuși reduce și/sau elimină tropismul natural al proteinei recombinante a capsidei AAV sau al capsidei care o cuprinde. , în comparație cu o proteină a capsidei AAV de referință lipsită de epitopul heterolog sau respectiv capsid AAV care cuprinde proteina a capsidei AAV de referință.

În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat într-o regiune a proteinei capsidei AAV implicată cu tropismul natural al proteinei capsidei AAV de referință de tip sălbatic, de exemplu, o regiune a proteinei capsidei AAV implicată cu țintirea celulelor. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat în și/sau afișat de către un domeniu buton al unei proteine din fibră Ad. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat în și/sau afișat de bucla HI a unei proteine din fibră Ad. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat în și/sau afișat în situsul de legare a heparinei al unei proteine a capsidei AAV. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat în și/sau afișat în situsul de legare la heparină al unei proteine a capsidei AAV2. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat în și/sau afișat în situsul de legare a heparinei al unei proteine a capsidei AAV6. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat în și/sau afișat în situsul de legare a heparinei al unei proteine capsidă AAV8. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat în și/sau afișat în situsul de legare a heparinei al unei proteine a capsidei AAV9. În unele exemple de realizare, (i) proteina capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV2 și epitopul este inserat după și/sau înlocuiește un aminoacid în poziția I-453 sau I-587 a proteinei capsidei AAV2 VP1 și/sau amino. acizi în pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidă AAV2 VP2 și/sau VP3; (ii) proteina capsidei AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV6 și epitopul este inserat după și/sau înlocuiește un aminoacid în pozițiile 1-585 a proteinei capsidei AAV6 VP1 și/sau aminoacizii în pozițiile corespunzătoare ale AAV6 VP2 și/sau proteine capsidă VP3; (iii) capsida AAV este derivată dintr-o genă a capsidei AAV8 și epitopul este inserat după și/sau înlocuiește un aminoacid în poziția 1-590 a proteinei capsidei AAV8 VP1 și/sau aminoacizi în pozițiile corespunzătoare ale AAV8 VP2 și /sau proteine capsidă VP3 sau (iv) proteina capsidă AAV este derivată dintr-o genă capsidă AAV9 și epitopul este inserat după și/sau înlocuiește un aminoacid în poziția I-453 sau I-589 a proteinei capsidă AAV9 VP1 și /sau aminoacizi în pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidă AAV9 VP2 și/sau VP3. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat imediat după (de exemplu, este fuzionat la capătul C-terminal al) unui aminoacid selectat din grupul constând din G-453 al proteinei capsidei AAV2 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale VP2 și/sau Proteinele capsidă VP3 codificate din aceeași genă a capsidei sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidă VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, și AAV9), N587 al proteinei capsidei AAV2 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidă VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidă VP1, VP2

și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9), Q585 al proteinei capsidei AAV6 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei, sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8 și AAV9), N-590 din capsidă AAV8 proteina VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei, sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 ai unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 și AAV9), G453 al proteinei capsidei AAV9 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei sau aminoacizii corespunzători ai VP1, Proteinele capsidei VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 și AAV8) sau A-589 din proteina capsidă AAV9 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 și AAV8). În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat imediat după (de exemplu, este fuzionat la capătul C-terminal al) G-453 al proteinei capsidei AAV2 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei), sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidă VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9). În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat imediat după (de exemplu, este fuzionat la capătul C-terminal al) N587 al proteinei capsidei AAV2 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei, sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9). În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat imediat după (de exemplu, este fuzionat la capătul C-terminal al) Q-585 al proteinei capsidei AAV6 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei), sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8 și AAV9). În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat imediat după (de exemplu, este fuzionat la capătul C-terminal al) N-590 al proteinei capsidei AAV8 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei), sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 și AAV9). În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat imediat după (de exemplu, este fuzionat la capătul C-terminal al) G453 al proteinei capsidei AAV9 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei, sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 și AAV8). În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat imediat după (de exemplu, este fuzionat la capătul C-terminal al) A-589 al proteinei capsidei AAV9 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidei VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei), sau aminoacizii corespunzători ai proteinelor capsidă VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 și AAV8). În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat și/sau afișat între aminoacizii N-587 și R-588 ai unei proteine a capsidei AAV2 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale capsidelor VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidei). În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV care cuprinde o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:2. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV cuprinzând o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:4. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV cuprinzând o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprind o secvență de aminoacizi codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:25. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV cuprinzând o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprinde o secvență de aminoacizi codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:26. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV1 care cuprinde o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprind o secvență de aminoacizi codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:27.

În unele exemple de realizare, o proteină capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde o a doua mutație diferită, în plus față de epitopul heterolog. De exemplu, în unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă așa cum este descrisă aici poate fi o proteină a capsidei AAV2 modificată genetic, poate cuprinde un epitop heterolog și poate cuprinde în plus o mutație, de exemplu, o mutație R-585-A și/sau R-588-A. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidei AAV2, de exemplu, este o proteină a capsidei AAV2 VP1 modificată genetic, cuprinde un epitop heterolog inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) G-453 al proteinei AAV2 VP1 și mai cuprinde o mutație selectată din grupul constând din R-585A și/sau R-5889A. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidei AAV2, de exemplu, este o proteină a capsidei AAV2 VP1 modificată genetic, cuprinde un epitop heterolog inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) N587 al AAV2. proteina VP1 și mai cuprinde o mutație selectată din grupul constând din R-585A și/sau R-588A. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidei AAV9, de exemplu, este o proteină a capsidei AAV9 VP1 modificată genetic, cuprinde un epitop heterolog inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) G453 al AAV9. proteina VP1 și mai cuprinde o mutație W503A. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidei AAV9, de exemplu, este o proteină a capsidei AAV9 VP1 modificată genetic, cuprinde un epitop heterolog inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) A589 al AAV9 VP1 proteină capsidă și mai cuprinde o mutație W503A.

În general, o proteină a capsidei AAV recombinantă și/sau un vector AAV care cuprinde capsida AAV recombinată cuprinde un epitop heterolog care are lungimea de cel puțin un aminoacid. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog poate fi între aproximativ 5 aminoacizi și aproximativ 35 de aminoacizi în lungime și formează o pereche de legare cu un paratop de anticorp, de exemplu, un domeniu variabil de imunoglobulină. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog cuprinde cel puțin 10 aminoacizi în lungime. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog cuprinde o etichetă de afinitate. În unele aspecte, epitopul heterolog și/sau eticheta de afinitate nu formează o pereche de legare cu un domeniu constant de imunoglobulină. În unele aspecte, epitopul heterolog și/sau eticheta de afinitate nu formează o pereche de legare cu un ion metalic, de exemplu, Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , etc. În unele realizări, epitopul heterolog nu este o polipeptidă selectată din grupul constând din Streptavidină, Strep II, HA, L14, 4C-RGD, LH și proteina A. În unele realizări, eticheta de afinitate este selectată din grupul constând din FLAG (SECV ID NR:7), HA (SECV ID NR:8) și c-myc (EQKLISEEDL; SECV ID NR:6). În unele exemple de realizare, epitopul heterolog cuprinde c-myc (EQKLISEEDL; SECV ID NR:6).

În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă este o proteină a capsidei AAV2 VP1 modificată genetic și cuprinde un epitop heterolog care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) inserată imediat după (de exemplu, fuzionată la capătul C-terminal al) G-453 a proteinei capsidei AAV2 VP1.

În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă (i) este derivată dintr-o genă capsidă AAV2, de exemplu, este o proteină capsidă AAV2 VP1 modificată genetic, (ii) cuprinde un epitop heterolog care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SEQ ID NR:6) și este inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) G-453 al proteinei capsidei AAV2 VP1 și (iii) mai cuprinde o mutație selectată din grupul constând din R-585A și/sau R-5889- A. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă este o proteină a capsidei AAV2 VP1 modificată genetic și cuprinde un epitop heterolog care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) inserată imediat după (de exemplu, fuzionată la capătul C-terminal al) N587 Proteina capsidei AAV2 VP1. În unele exemple de realizare, o proteină capsidă AAV recombinantă (i) este derivată dintr-o genă capsidă AAV2, de exemplu, este o proteină capsidă AAV2 VP1 modificată genetic, (ii) cuprinde un epitop heterolog care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SEQ ID NR:6) și este inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) N587 al proteinei capsidei AAV2 VP1 și (iii) mai cuprinde o mutație selectată din grupul constând din R585A și/sau R588A. În unele exemple de realizare, o proteină capsidă AAV recombinantă (i) este derivată dintr-o genă capsidă AAV6, de exemplu, este o proteină capsidă AAV6 VP1 modificată genetic, (ii) cuprinde un epitop heterolog care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SEQ ID NR:6) și este inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) Q-585 al proteinei capsidei AAV6 VP1. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă este o proteină a capsidei AAV8 VP1 modificată genetic și cuprinde un epitop heterolog care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) inserată imediat după (de exemplu, fuzionată la capătul C-terminal al) N590 Proteina capsidei AAV8 VP1. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă este o proteină a capsidei AAV9 VP1 modificată genetic și cuprinde un epitop heterolog

care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) inserată imediat după (de exemplu, fuzionată la capătul C-terminal al) G453 Proteina capsidei AAV9 VP1. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă (i) este derivată dintr-o genă a capsidei AAV9, de exemplu, este o proteină a capsidei AAV9 VP1 modificată genetic, (ii) cuprinde un epitop heterolog care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) și este inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) G453 al proteinei capsidei AAV9 VP1 și (iii) mai cuprinde o mutație W503A. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă este o proteină a capsidei AAV9 VP1 modificată genetic și cuprinde un epitop heterolog care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) inserată imediat după (de exemplu, fuzionată la capătul C-terminal al) A589 Proteina capsidei AAV9 VP1. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă (i) este derivată dintr-o genă a capsidei AAV9, de exemplu, este o proteină a capsidei AAV9 VP1 modificată genetic, (ii) cuprinde un epitop heterolog care cuprinde secvența EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) și este inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) A589 al proteinei capsidei AAV9 VP1 și (iii) mai cuprinde o mutație W503A.

În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată de și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteine a capsidei AAV VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată de și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteine a capsidei AAV2 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I587 a unei proteine a capsidei AAV2 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între N587 și R588 a unei proteine a capsidei AAV2 VP1, de exemplu, cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 2 .

În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată de și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteine a capsidei AAV6 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I585 a unei proteine a capsidei AAV6 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între Q585 și S586 a unei proteine a capsidei AAV6 VP1, de exemplu, cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 4 .

În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) flancată de și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei capsde AAV8 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, așa cum cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I590 a unei proteine a capsidei AAV8 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între N590 și T591 a unei proteine a capsidei AAV8 VP1, de exemplu, cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:25.

În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată de și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteine a capsidei AAV9 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, așa cum cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I453 a unei proteine a capsidei AAV9 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între G-453 și S-454 a unei proteine a capsidei AAV9 VP1, de exemplu, cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR. :26. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, așa cum cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I589 a unei proteine a capsidei AAV9 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, așa cum cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între A-589 și Q-590 a unei proteine a capsidei AAV9 VP1, de exemplu, cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR. :27.

În unele exemple de realizare, epitopul heterolog cuprinde o etichetă de afinitate și unul sau mai mulți linkeri. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog cuprinde o etichetă de afinitate flancată de un linker, de exemplu, epitopul heterolog cuprinde de la capătul N-terminal la capătul C-terminal un prim linker, o etichetă de afinitate și un al doilea linker. În unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt fiecare independent o polipeptidă cu lungimea de cel puțin 1 aminoacid. În unele exemple de realizare, un epitop heterolog așa cum este descris aici, de exemplu, o etichetă de afinitate în sine sau în

combinație cu unul sau mai mulți linkeri, are o lungime între aproximativ 5 aminoacizi și aproximativ 35 aminoacizi. În unele exemple de realizare, primul și al doilea linker au lungimi identice și/sau cuprind secvențe de aminoacizi identice.

În general, în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinantă cuprinzând o proteină capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici s-a redus la un tropism natural abolit, de exemplu, are o capacitate redusă sau nu este capabilă să țintească și să lege un celulă de referință permisivă în mod natural la transducție în comparație cu cea a unei capside AAV de referință, de exemplu, o capsidă care cuprinde o proteină capsidă AAV de referință, de exemplu, o proteină capsidă AAV care ar fi identică cu proteina capsidă AAV recombinantă, dar pentru lipsa epitopului heterolog. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinată care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 10% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinată care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 20% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinantă care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 30% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinată care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 40% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinată care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 50% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinată care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere cu cel puțin 60% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinată care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 70% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinată care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 75% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinantă care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 80% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinată care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 85% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinantă care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 90% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinantă care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 95% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă AAV 1 de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, o capsidă AAV recombinantă care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici prezintă o scădere de cel puțin 99% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă AAV de referință. În unele exemple de realizare și în absența unei molecule de legare multispecifice, opțional bispecifice adecvate, transducția unei celule de control printr-o capsidă AAV recombinantă care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinată așa cum este descrisă aici este abolită, de exemplu, nedetectabilă.

În unele exemple de realizare, o capsidă AAV care cuprinde o proteină a capsidei AAV recombinantă așa cum este descrisă aici este o capsidă mozaic, de exemplu, cuprinde o proteină capsidă AAV recombinantă care cuprinde un epitop heterolog și o proteină a capsidei AAV de referință care nu cuprinde epitopul heterolog într-un anumit raport. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV de referință este o proteină a capsidei AAV de referință de tip sălbatic prin aceea că aceasta

cuprinde o secvență de aminoacizi a unei proteine a capsidei AAV de tip sălbatic având același serotip ca și proteina a capsidei AAV recombinantă.

În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei de referință este o proteină a capsidei AAV de referință de control prin aceea că aceasta cuprinde o secvență de aminoacizi a proteinei a capsidei AAV recombinantă, cu excepția faptului că proteina a capsidei AAV de referință de control nu are epitopul heterolog. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV de referință este o proteină de referință de tip sălbatic mutant prin aceea că cuprinde o secvență de aminoacizi substanțial identică cu cea a unei proteine a capsidei AAV de tip sălbatic având același serotip ca și proteina a capsidei AAV recombinantă, dar pentru o mutație (de ex., o inserție a unei secvențe de aminoacizi, himerizare etc.) care reduce tropismul proteinei capsidă AAV de tip sălbatic. În unele exemple de realizare, o compoziție descrisă aici cuprinde, sau o metodă descrisă aici combină, o proteină a capsidei AAV recombinantă și o proteină a capsidei de referință la un raport care variază de la 1:1 la 1:15. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:2. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:3. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:4. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:5. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:6. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:7. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:8. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:9. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:10. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:11. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:12. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:13. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:14. În unele exemple de realizare, raportul este de 1:15.

De asemenea, sunt dezvăluite aici acizi nucleici care codifică o proteină recombinantă a capsidei AAV descrise aici, compoziții care cuprind astfel de acizi nucleici (de exemplu, care pot fi utilizați în metode de fabricare a unei capsidă AAV recombinate) și/sau proteine recombinate ale capsidei AAV (de exemplu, compoziții constând în mod esențial). a unei proteine a capsidei AAV recombinantă, compoziții care cuprind numai vectori AAV încapsulați de o capsidă cuprinzând o proteină capsidă AAV descrisă aici, compoziții cuprinzând astfel de vectori AAV și o moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică (de exemplu, la un anumit vector AAV la multispecific, opțional bispecific, raporturi de moleculă de legare (moleculă:moleculă)), compoziții cuprinzând astfel de vectori AAV, fragmente de redirectionare și un purtător acceptabil farmaceutic, etc.). În unele exemple de realizare, un acid nucleic descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică secvența de aminoacizi a lui EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) și o secvență de nucleotide care codifică cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteine a capsidei virală adeno-asociată.

În unele exemple de realizare, un acid nucleic, așa cum este descris aici, cuprinde o secvență de nucleotide care codifică secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei capsidă AAV2 VP1 proteină. În unele realizări, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I587 a unei proteine capsidă AAV2 VP1. În unele realizări, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între N587 și R588 a unei proteine capsidă AAV2 VP1, de exemplu, în unele exemple, un acid nucleic așa cum este descris. codifică o secvență de aminoacizi care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:2.

În unele exemple de realizare, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai proteinei unei capsidă AAV6 VP1. În unele realizări, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I-585 a unei proteine a capsidei AAV6 VP1. În unele exemple de realizare, un acid nucleic, așa cum este descris aici, cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între Q-585 și S-586 a unei proteine capsidă AAV6 VP1, de exemplu, în unele realizări, o acidul nucleic așa cum este descris codifică o secvență de aminoacizi care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:4.

În unele exemple de realizare, un acid nucleic, așa cum este descris aici, cuprinde o secvență de nucleotide care codifică secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteinei a capsidei AAV8 VP1. În unele realizări, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I-590 a unei proteine a capsidei AAV8 VP1. În unele realizări, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între N-590 și T-591 a unei proteine a capsidei AAV8 VP1, de exemplu, în unele realizări, o acidul nucleic așa cum este descris codifică o secvență de aminoacizi care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:25.

În unele exemple de realizare, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteine a capsidei AAV9 VP1. În unele exemple de realizare, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I453 a unei proteine a capsidei AAV9 VP1. În unele exemple de realizare, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între G453 și S454 a unei proteine a capsidei AAV9 VP1, de exemplu, în unele exemple de realizare, un acid nucleic așa cum este descris codifică o secvență de aminoacizi care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:26. În unele exemple de realizare, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată la I589 a unei proteine capsidă AAV9 VP1. În unele exemple de realizare, un acid nucleic așa cum este descris aici cuprinde o secvență de nucleotide care codifică EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6) inserată între A589 și Q590 a unei proteine capsidă AAV9 VP1, de exemplu, în unele exemple de realizare, un acid nucleic așa cum este descris codifică o secvență de aminoacizi care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:27.

În general, vectorii AAV recombinanți așa cum sunt descriși aici cuprind o capsidă AAV cuprinzând o proteină a capsidei AAV recombinată așa cum este descrisă aici, în care capsida AAV încapsulează o nucleotidă de interes. În unele exemple de realizare, nucleotida de interes este sub controlul unui promotor selectat din grupul constând dintr-un promotor viral, un promotor bacterian, un promotor de mamifer, un promotor aviar, un promotor de pește, un promotor de insectă și orice combinație a acestora. În unele exemple de realizare, nucleotida de interes este sub controlul unui promotor non-uman. În unele exemple de realizare, promotorul este un promotor de citomegalovirus (CMV). În unele exemple de realizare, promotorul este un promotor EF1 α .

În general, o nucleotidă de interes poate fi una sau mai multe gene, care pot codifica un marker detectabil, de exemplu, reporter sau o polipeptidă terapeutică.

În unele realizări, nucleotida de interes este o genă reporter. În unele exemple de realizare, nucleotida de interes este o genă reporter care codifică un marker detectabil selectat din grupul constând din proteină verde fluorescentă, luciferază, β -galactozidază etc. În unele exemple de realizare, markerul detectabil este proteina verde fluorescentă. În alte exemple de realizare, nucleotida de interes este selectată din grupul constând dintr-o genă sinucigașă, o nucleotidă care codifică un anticorp sau un fragment al acestuia, o nucleotidă care codifică un sistem CRISPR/Cas sau o porțiune(e) a acestuia, o nucleotidă care codifică ARN antisens, o nucleotide care codifică ARNsi, o enzimă secretată etc. Într-o variantă de realizare, nucleotida de interes codifică o terapie multidomeniu, de exemplu, o proteină care cuprinde cel puțin două domenii care asigură două funcții distincte.

Compozițiile descrise aici cuprind în general un vector AAV care cuprinde o proteină a capsidei AAV recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, cuprinde o capsidă care cuprinde proteina a capsidei AAV recombinantă, în care capsida încapsulează o nucleotidă de interes. În unele exemple de realizare, o compoziție descrisă aici cuprinde (1) un vector AAV având o capsidă care cuprinde o proteină recombinantă a capsidei AAV modificată genetic pentru a cuprinde un epitop heterolog, (2) o moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică, care cuprinde (i) un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul și (ii) un ligand de redirecționare care leagă în mod specific un receptor și opțional (3) un purtător acceptabil farmaceutic.

Un paratop de anticorp așa cum este descris aici cuprinde în general cel puțin o regiune de determinare a complementarității (CDR) care recunoaște în mod specific epitopul heterolog, de exemplu, o regiune CDR3 a unui domeniu variabil al lanțului greu și/sau ușor. În unele exemple de realizare, o moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică, cuprinde un anticorp (sau o porțiune a acestuia) care cuprinde paratopul anticorpului care leagă în mod specific epitopul heterolog. De exemplu, o moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică, poate cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cu un singur domeniu sau o regiune variabilă a lanțului ușor cu domeniu unic, în care regiunea variabilă a lanțului greu cu un singur domeniu sau regiunea variabilă a lanțului ușor cu un singur domeniu cuprinde un paratop de anticorp care specific leagă epitopul heterolog. În unele exemple de realizare, o moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică poate cuprinde o regiune Fv, de exemplu, o moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică poate cuprinde un scFv, care cuprinde un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul heterolog. În unele exemple de realizare, molecula de legare multispecifică, opțional bispecifică, cuprinde un anticorp (sau o porțiune a acestuia) care cuprinde un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul heterolog, în care anticorpul (sau o porțiune a acestuia) cuprinde în plus unul sau mai multe domenii constante de anticorp (de ex. , un domeniu constant al lanțului greu (de exemplu, CH1, balama, CH2, CH3, CH4 etc.) și/sau un domeniu constant al lanțului

ușor (de exemplu, CL), în care unul sau mai multe domenii constante ale anticorpului nu se leagă la heterolog, epitop.

O moleculă de legare multispecifică, opțional bispecifică, așa cum este descrisă aici, mai cuprinde un ligand de redirecționare, în plus față de un paratop (de exemplu, un anticorp sau o porțiune a acestuia cuprinzând paratopul) care leagă în mod specific epitopul heterolog inserat în/afișat de o proteină recombinantă a capsidei AAV. În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă în mod specific un receptor pe suprafața unei bile (de exemplu, pentru izolarea și/sau purificarea unei proteine a capsidei AAV recombinante așa cum este descris aici). În unele exemple de realizare, ligand de redirecționare leagă în mod specific o proteină de suprafață celulară, de exemplu, un receptor, un marker de suprafață celulară, etc., exprimată pe suprafața unei celule eucariote de mamifer (de exemplu, umană), de exemplu, o celulă țintă. În unele exemple de realizare, un ligand de redirecționare leagă o celulă hepatică (umană), o celulă a creierului (umană), o celulă T (umană), o celulă renală (umană), o celulă intestinală (umană), o celulă pancreatică (umană), o celulă canceroasă (umană) și/sau o celulă (umană) infectată cu patogen heterolog. În unele exemple de realizare, un ligand de redirecționare leagă un marker specific celulei hepatice (umane), un marker specific al celulei cerebrale (umane), un marker specific al celulei T (umane), un marker specific al celulei renale (umane), o celulă intestinală (umană) marker specific, un marker specific celulei pancreasului (uman), un marker specific celulei tumorale (umane) și/sau epitop patogen.

În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă hepatică (umană), de exemplu, un receptor de asialoglicoproteină, de exemplu, hASGR1. În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă neuronală (umană), de exemplu, GABA, transferină etc. În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă T (umană), de exemplu, CD3, de exemplu, CD3ε. În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă stem hematopoietică (umană), de exemplu, CD34.

În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă de rinichi (umană). În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă musculară (umană), de exemplu, o integrină. În unele exemple de realizare, ligand de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă canceroasă (umană), de exemplu, un antigen asociat tumorii, de exemplu, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, alfa-actinină-4, alfa-fetoproteină ("AFP"), ARTC1, B-RAF, BAGE-1, BCLX (L), proteina de fuziune BCR-ABL b3a2, beta-catenina, BING-4, CA-125, CALCA, antigen carcinoembrionar ("CEA"), CASP-5, CASP -8, CD274, CD45, Cdc27, CDK12, CDK4, CDKN2A, CEA, CLPP, COA-1, CPSF, CSNK1A1, CTAG1, CTAG2, ciclina D1, Ciclin-A1, proteina de fuziune dek-can, DKK1, EFTUD2, factor de alungire 2, ENAH (hMena), Ep-CAM, EpCAM, EphA3, antigen tumoral epitelial ("ETA"), proteina de fuziune ETV6-AML1, EZH2, E6, E7, FGF5, FLT3-ITD, FN1, G250/MN/CAIX, GAGE-1,2,8, GAGE-3,4,5,6,7, GAS7, glypican-3, GnTV, gp100/Pme117, GPNMB, HAUS3, Hepsin, HER-2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A11, HLA-A2, HLA-DOB, hsp70-2, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, carboxil esterază intestinală, K-ras, Kallikrein 4, KIF20A, KK-LC-1, KKLC1, KM-HN-1, KMHN1 (cunoscut și ca CCDC110), LAGE-1, proteina de fuziune LDLR-fucosyltransferaseAS, Lengsin, M-CSF, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-C1, MAGE-C2, enzimă malică, mammaglobin-A, MART2, MATN, MC1R, MCSP, mdm-2, ME1, Melan-A/MART-1, Meloe, Midkine, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, mucină, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miozină, miozină clasa I, N-ras, NA88-A, neo-PAP, NFYC, NY-BR-1, NY-ESO-1/LAGE-2, OA1, OGT, OS-9, polipeptidă P, p53, PAP, PAX5, PBF, proteina de fuziune pml-RARalpha, mucină epitelială polimorfă ("PEM"), PPP1R3B, PRAME, PRDX5, PSA, PSMA, PTPRK, RAB38/NY-MEL-1, RAGE-1, RBAF600, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, SAGE, secernin 1, SIRT2, SNRPD1, SOX10, Sp17, SPA17, SSX-2, SSX-4, STEAP1, supraviețuire, proteină de fuziune SYT-SSX1 sau -SSX2, TAG-1, TAG-2, Telomeraza, TGF-betaRII, TPBG, TRAG-3, Triozofosfat izomeraza, TRP-1/gp75, TRP-2, TRP2-INT2, tirozinaza, tirozinaza ("TYR"), VEGF, WT1, XAGE-1b/GAGED2a, Kras, NY-ESO1, MAGE-A3, HPV E2, HPV E6, HPV E7, antigenul WT-1 (în limfom și alte tumori solide), Receptori ErbB, Melan A [MART1], gp 100, tirozinaza, TRP-1/gp 75 și TRP-2 (în melanom); MAGE-1 și MAGE-3 (în vezica urinară, cap și gât și carcinomul non-microcelular); proteinele HPV EG și E7 (în cancerul de col uterin); Mucină [MUC-1] (în cancerul de sân, pancreas, colon și prostată); antigenul specific de prostată [PSA] (în cancerul de prostată); antigen carcinoembrionar [CEA] (în cancerul de colon, sân și gastrointestinale) și astfel de antigene specifice tumorii comune precum MAGE-2, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-10, MAGE-12, BAGE-1, CAGE-1,2,8, CAGE-3 TO 7, LAGE-1, NY-ESO-1/LAGE-2, NA-88, GnTV, TRP2-INT2 etc. În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă E6 și/sau E7. În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă Her2. În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare se leagă la receptorul

uman de glucagon (hGCGR). În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă ectonucleozidul trifosfat difosfohidrolaza 3 umană (hENTPD3).

În unele exemple de realizare, paratopul (de exemplu, un anticorp sau o porțiune a acestuia) și ligandul de redirecționare sunt fuzionate direct unul cu celălalt. În unele exemple de realizare, paratopul (de exemplu, un anticorp sau o porțiune a acestuia) care leagă în mod specific epitopul heterolog și ligandul de redirecționare sunt legați covalent unul de celălalt.

În unele exemple de realizare, molecula de legare multispecifică este o moleculă de legare bispecifică, de exemplu, un anticorp care cuprinde primul și al doilea domeniu de legare la antigen, în care primul domeniu de legare la antigen cuprinde un paratop care leagă în mod specific epitopul heterolog inserat în/afișat de un recombinant. Proteina capsidă AAV și al doilea domeniu de legare la antigen leagă în mod specific o proteină de suprafață celulară sau un marker exprimat de o celulă țintă. În unele exemple de realizare, molecula de legare bispecifică este un anticorp bispecific care cuprinde primul și al doilea domeniu de legare la antigen, în care primul domeniu de legare la antigen cuprinde un paratop care leagă în mod specific epitopul heterolog inserat în/afișat de o proteină recombinantă a capsidăi AAV și al doilea domeniu de legare la antigenului leagă în mod specific un receptor exprimat de o celulă țintă, în care primul domeniu de legare la antigenului este legat operabil la o primă regiune a lanțului greu care cuprinde un prim domeniu CH₃, în care al doilea domeniu de legare la antigenului este legat operațional la un al doilea domeniu greu, regiune de lanț cuprinzând un al doilea domeniu CH₃, în care primul și al doilea domeniu Ig C_{H3} diferă unul de celălalt prin cel puțin un aminoacid și în care cel puțin o diferență de aminoacid reduce legarea anticorpului bispecific la proteina A în comparație cu un anticorp bispecific lipsită de diferența de aminoacizi. Într-un exemplu de realizare, primul domeniu Ig C_{H3} leagă proteina A și al doilea domeniu Ig C_{H3} conține o mutație care reduce sau elimină legarea proteinei A, cum ar fi o modificare H-95-R (prin numerotarea exonului IMGT; H435R prin numerotarea UE). Al doilea domeniu C_{H3} poate cuprinde în plus o modificare Y-96-F (prin IMGT; Y-436-F de către EU). Alte modificări care pot fi găsite în al doilea domeniu C_{H3} includ: D-16-E, L-18-M, N-44-S, K-52-N, V-57-M și V-82-I (de IMGT; D-356-E, L-358-M, N-384-S, K-392-N, V-397-M și V-422-I de EU) în cazul anticorpilor IgG1; N-44-S, K-52-N și V-82-I (IMGT; N-384-S, K-392-N și V-422-I de către EU) în cazul anticorpilor IgG2; și Q-15-R, N-44-S, K-52-N, V-57-M, R-6-9K, E-79-Q și V-82-I (prin IMGT; Q-355 -R, N-384-S, K-392-N, V-397-M, R-409-K, E-419-Q și V-422-I de către UE) în cazul anticorpilor IgG4.

În unele exemple de realizare, molecula de legare multispecifică este o moleculă de legare bispecifică, de exemplu, un anticorp bispecific cuprinzând primul și al doilea domeniu de legare la antigen, în care primul domeniu de legare la antigen leagă o etichetă de afinitate afișată de o proteină a capsidăi AAV recombinantă așa cum este descris aici, și în care al doilea domeniu de legare la antigen se leagă la un receptor exprimat pe suprafața unei celule țintă. În unele exemple de realizare, molecula de legare multispecifică este o moleculă de legare bispecifică, de exemplu, un anticorp bispecific care cuprinde primul și al doilea domeniu de legare la antigen, în care primul domeniu de legare la antigen leagă secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) afișată de o proteină capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici, și în care al doilea domeniu de legare la antigen se leagă la un receptor exprimat pe suprafața unei celule țintă. În unele exemple de realizare, molecula de legare multispecifică este o moleculă de legare bispecifică, de exemplu, un anticorp bispecific care cuprinde primul și al doilea domeniu de legare la antigen, în care primul domeniu de legare la antigen leagă secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) afișată de o proteină capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici, și în care al doilea domeniu de legare la antigen se leagă de hASGR1. În unele exemple de realizare, molecula de legare multispecifică este o moleculă de legare bispecifică, de exemplu, un anticorp bispecific care cuprinde primul și al doilea domeniu de legare la antigen, în care primul domeniu de legare la antigen leagă secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) afișată de o proteină capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici, și în care al doilea domeniu de legare la antigen se leagă la o proteină CD3, de exemplu, CD3ε. În unele exemple de realizare, molecula de legare multispecifică este o moleculă de legare bispecifică, de exemplu, un anticorp bispecific care cuprinde primul și al doilea domeniu de legare la antigen, în care primul domeniu de legare la antigen leagă secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) afișată de o proteină capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici, și în care al doilea domeniu de legare la antigen se leagă la o integrină. În unele exemple de realizare, molecula de legare multispecifică este o moleculă de legare bispecifică, de exemplu, un anticorp bispecific care cuprinde primul și al doilea domeniu de legare la antigen, în care primul domeniu de legare la antigen leagă secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) afișată de o proteină capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici, și în care al doilea domeniu de legare la antigen se leagă la un receptor uman de glucagon, de exemplu, hGCGR. În unele exemple de realizare, molecula de legare multispecifică este o moleculă de legare bispecifică, de

exemplu, un anticorp bispecific care cuprinde primul și al doilea domeniu de legare la antigen, în care primul domeniu de legare la antigen leagă secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) afișată de o proteină capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici și în care al doilea domeniu de legare la antigen se leagă de ENTPD3.

De asemenea, aici sunt descrise metode de fabricare și utilizare a proteinelor capside AAV recombinante, vectori AAV care îi cuprind, compoziții etc. În unele exemple de realizare, o metodă de redirecționare a unui virus adeno-asociat, etc.; livrarea încărcăturii diagnostice/terapeutice la o celulă țintă, etc. cuprinde combinarea unui vector AAV recombinant care cuprinde o proteină a capsidei AAV recombinantă așa cum este descris aici, de exemplu, un vector AAV care cuprinde o capsidă care cuprinde o capsidă AAV recombinată care prezintă un epitop heterolog, cu o legare bispecifică moleculă, în care molecula de legare bispecifică cuprinde (i) un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul și (ii) un ligand de redirecționare care leagă în mod specific un receptor. Astfel de metode pot include ca primă etapă producerea unui vector AAV recombinant, de exemplu, cultivarea unei celule de ambalare în condiții suficiente pentru producerea de vectori AAV, în care celula de ambalare cuprinde o plasmidă care codifică proteina capsidă AAV care cuprinde epitopul. Atunci când se livrează încărcătură diagnostică/terapeutică la o celulă țintă, metodele descrise aici pot cuprinde punerea în contact a celulei țintă cu combinația unui vector AAV care cuprinde o capsidă AAV cuprinzând o capsidă AAV recombinată care prezintă un epitop heterolog și o moleculă de legare multispecifică, în care legarea multispecifică molecula cuprinde (i) un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul și (ii) un ligand de redirecționare care leagă în mod specific un receptor exprimat de celula țintă. În unele exemple de realizare, celula țintă este *in vitro*. În alte exemple de realizare, prezenta invenție oferă, de asemenea, o compoziție a prezentei invenții pentru utilizare într-o metodă *in vivo* de tratament sau diagnostic, metoda cuprinzând eliberarea nucleotidei de interes la o celulă țintă care exprimă o proteină de suprafață celulară cuprinzând contactarea celulei țintă cu compoziția, în care molecula de legare multispecifică cuprinde un ligand de redirecționare care leagă proteina de suprafață celulară. Prin urmare, în astfel de exemple de realizare, celula țintă este *in vivo* la un subiect, de exemplu, un om.

În unele exemple de realizare, o compoziție descrisă aici cuprinde, sau o metodă descrisă aici combină, un vector AAV recombinant care cuprinde o nucleotidă de interes încapsulată cu o capsidă care cuprinde o proteină recombinată a capsidei așa cum este descrisă aici și o moleculă de legare multispecifică la un raport moleculă:moleculă care restabilește eficiența de transducție a vectorului AAV similar cu cea a unui vector AAV de referință. În unele exemple de realizare, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) variază de la 1:0,5 la 1:100. În unele exemple de realizare, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) variază de la 1:4 la 1:20. În unele exemple de realizare, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare bispecifică (moleculă:moleculă) variază de la 1:8 la 1:15. În unele realizări, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este 1:4. În unele realizări, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este 1:8. În unele exemple de realizare, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este 1:15. În unele realizări, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este 1:20.

De asemenea, aici sunt descrise metode de inactivare a unei capsidă AAV și/sau producere de vectori AAV, metode care cuprind în general (a) inserarea unui acid nucleic care codifică o proteină heterologă într-o secvență de acid nucleic care codifică o proteină a capsidei AAV pentru a forma o secvență de nucleotide care codifică o proteină genetică. proteina capsidă AAV modificată care cuprinde proteina heterologă și/sau (b) cultivarea unei celule de ambalare în condiții suficiente pentru producerea de vectori AAV, în care celula de ambalare cuprinde secvența de nucleotide. În unele exemple de realizare, celula de ambalare mai cuprinde o plasmidă auxiliară și/sau o plasmidă de transfer care cuprinde o nucleotidă de interes. În unele exemple de realizare, metodele cuprind în plus izolarea vectorilor virali adeno-asociați auto-complementari din supernatantul culturii. În unele exemple de realizare, metodele cuprind în plus lizarea celulei de ambalare și izolarea vectorilor virali adeno-asociați monocatenar din lizatul celular. În unele exemple de realizare, metodele mai includ (a) curățarea resturilor celulare, (b) tratarea supernatantului care conține vectori AAV cu ADNază I și MgCl₂, (c) concentrarea vectorilor AAV, (d) purificarea vectorilor AAV și (e) orice combinație de (a)-(d).

De asemenea, aici sunt furnizați vector AAV realizat conform metodei descrise aici și celulă de ambalare utilă pentru producerea unui vector AAV așa cum este descris aici, de exemplu, celule de ambalare cuprinzând o plasmidă care codifică o proteină a capsidei AAV recombinată descrisă.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Dosarul brevetului sau al cererii conține cel puțin un desen executat color.

Copii ale acestei publicații de brevet sau cerere de brevet cu desene color vor fi furnizate de Oficiu la cerere și la plata taxei necesare.

Figura 1 oferă imagini de microscopie cu imunofluorescență (**panoul de sus**) sau histograme obținute din sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) (**panoul de jos**) care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) de către celulele HepG2 incubate cu (**A**) vectori virali scAAV2-CMV-eGFP de tip sălbatic; (**B**) doar vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-hrGFP; Vectori virali scAAV2-N587Myc amestecați cu anticorpi anti-Myc-ASGR1 bispecfici la următoarele rapoarte: (**C**) 1:0,5, (**D**) 1:1, (**E**) 1:2, (**F**) 1:4, (**G**) 1:8, (**H**) 1:15, (**I**) 1:20, (**J**) 1:50 sau (**K**) 1:100; (**L**) sau vectori virali scAAV-N587Myc amestecați cu anticorp monospecific anti-Myc într-un raport de 1:8.

Figura 2A oferă diagrame cu puncte obținute din sortarea celulelor activate cu fluorescență (FACS) care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) de către celulele 29T3-hASGR1 incubate cu vectori virali scAAV2 de tip sălbatic numai (**i**), numai vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP (**ii**), vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP amestecați cu anticorpi bispecfici anti-Myc-ASGR1 la următoarele rapoarte: 1:0,5 (**iii**), 1:1 (**iv**), 1:2 (**v**), 1:4 (**vi**), 1:8 (**vii**), 1:15 (**viii**), 1:20 (**ix**) sau 1:100 (**x**) sau scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP vectori virali amestecați cu anti-Myc- bispecific irelevanți Anticorp GCGR într-un raport de 1:8 (**xii**). Exprimarea GFP de către celulele 29T3 incubate cu vectori virali scAAV-N587Myc amestecați cu anticorpi bispecfici anti-Myc-ASGR1 la un raport de 1:8 este de asemenea prezentată (**xi**). Pentru fiecare experiment, s-au folosit 2×10^5 celule și 5×10^9 vectori virali.

Figura 2B oferă histograme obținute din sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) de către celulele 29T3-hASGR1 incubate numai cu vectori virali AAV9-CAGG-GFP nemodificați (**i**) numai vectori virali AAV9-A589Myc -CAGG-eGFP (**ii**), vectori virali AAV9-A589Myc-CAGG-eGFP amestecați cu anticorpi bispecfici anti-Myc-ASGR1 cu următoarele rapoarte: 1:1 (**iii**), 1:2 (**iv**), 1:4 (**v**), 1: 8 (**vi**), 1:20 (**vii**), 1:50 (**viii**) sau 1:100 (**ix**). Pentru fiecare experiment, s-au folosit 2×10^5 celule și 1×10^{10} vectori virali (titrați prin qPCR).

Figura 3 oferă diagrame de puncte obținute din sortarea celulelor activate cu fluorescență (FACS) care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) de către celulele 29T3-hASGR1 pre-incubate cu anticorp bivalent anti-ASGR1 la o concentrație de 0 nM (**C**), 50 nM (**D**), 10 nM (**E**), 2 nM (**F**), 0,4 nM (**G**), 0,08 nM (**H**), 0,016 nM (**I**) sau 0,0032 nM (**J**) și ulterior infectat cu vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP amestecat cu anticorpi bispecfici anti-Myc-ASGR1 la un raport de 1:8 (**L**). Celulele 29T3-hASGR1 incubate doar cu vectori virali scAAV de tip sălbatic (**A**) sau doar vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP (**B**) servesc drept martori. Pentru fiecare experiment, s-au folosit 2×10^5 celule și 5×10^9 vectori virali (așa cum sunt titrați prin qPCR).

Figura 4 oferă imagini de microscopie cu imunofluorescență care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) de către celulele 29T3-hASGR1 incubate numai cu vectori virali scAAV de tip sălbatic (**A**), doar vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP (**B**) sau incubate secvențial cu 1×10^9 (**C**), 2×10^9 (**D**), 4×10^9 (**E**), 8×10^9 (**F**), 2×10^{10} (**G**), 1×10^{11} (**H**), 1×10^{12} (**I**) bispecific anti-Myc- Anticorpi ASGR1 urmați de vectori virali 1×10^9 scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP. De asemenea, sunt prezentate imagini de microscopie cu imunofluorescență ale celulelor 29T3 incubate secvențial cu 1×10^{11} molecule de anticorpi anti-myc-ASGR1 urmate de 1×10^9 scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP vectori virali (**J**) și celulele incubate sequential 29T3-hASGR1 cu 1×10^{11} molecule de anticorp anti-Myc-GCGR bispecific irelevante urmate de vectori virali 1×10^9 scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP (**K**).

Figura 5 oferă diagrame cu puncte obținute din sortarea celulelor activate cu fluorescență (FACS) care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) de către celulele 29T3-hASGR1 incubate doar cu vectori virali ssAAV de tip sălbatic (**A**), numai vectori virali ssAAV2-N587Myc-CMV-hrGFP (**B**), vectori virali ssAAV2-N587Myc-CMV-hrGFP amestecați cu anticorpi bispecfici anti-Myc-ASGR1 la următoarele rapoarte: 1:1 (**C**), 1:2 (**D**), 1:4 (**E**), 1:8 (**F**), 1:20 (**G**), 1:100 (**H**), 1:1000 (**I**) sau vectori virali ssAAV-N587Myc amestecați cu anticorpi anti-Myc-GCGR bispecfici irelevanți într-un raport de 1:8 (**K**). Exprimarea GFP de către celulele 29T3 incubate cu vectori virali ssAAV-N587Myc amestecați cu anticorpi bispecfici anti-Myc-ASGR1 la un raport de 1:8 este de asemenea prezentată (**J**). Pentru fiecare experiment, s-au folosit 2×10^5 celule și 5×10^9 vectori virali.

Figura 6 oferă diagrame de puncte obținute din sortarea celulelor activate cu fluorescență (FACS) care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) de către celulele 29T3-hGCGR incubate cu vectori virali scAAV de tip sălbatic numai (**A**), doar vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP (**B**), vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP amestecați cu anticorpi anti-Myc-GCGR bispecfici la următoarele rapoarte: 1:0,5 (**C**), 1:1 (**D**), 1:2 (**E**), 1:4 (**F**), 1:8 (**G**), 1:15 (**H**), 1:20 (**I**), 1:50 (**J**) sau 1:100 (**K**), sau vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP amestecați cu un anticorp monospecific anti-Myc irelevant (Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY) la un raport de 1:8 (**L**). Pentru fiecare experiment, s-au folosit 2×10^5 celule și 5×10^9 vectori virali.

Figura 7 oferă diagrame cu puncte obținute din sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) numai de celule Jurkat (**A**) sau celule Jurkat incubate cu vectori virali scAAV6-EF1-eGFP de tip sălbatic doar (**B**), AAV6-Q585Myc -Numai vectori virali EF1a-eGFP (**C**), vectori virali AAV6-Q585Myc-EF1a-eGFP amestecați cu anticorpi bispecfici anti-Myc-CD3 la următoarele rapoarte: 1:1 (**D**), 1:5 (**E**), 1: 10 (**F**), 1:100 sau (**G**), 1:1000 (**H**). Pentru fiecare experiment, s-au folosit 2×10^5 celule și 1×10^9 vectori virali.

Figura 8A oferă imagini de microscopie cu imunofluorescență ale ficatului. **Figura 8B** oferă imagini de microscopie cu imunofluorescență ale splinei. **Figura 8C** oferă imagini de microscopie cu imunofluorescență ale rinichilor. Toate probele sunt prelevate de la șoareci C57BL/6 modificați transgenic pentru a exprima ASGR1 uman de către celule hepatice (**i-iv**) sau de la șoareci C57BL/6 de tip sălbatic (**v-viii**) la zece zile după injecția intravenoasă cu 1×10^{11} de tip sălbatic scAAV2-CMV-eGFP (**i, v**), ser fiziologic (**ii, vi**), vectori virali 1×10^{11} scAAV2-N587myc-CMV-eGFP singuri (**iii, vii**) sau vectori virali scAAV2-N587myc-CMV-eGFP cu anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 (**iv, viii**).

Figura 9 oferă imagini de microscopie cu imunofluorescență ale probelor de ficat prelevate de la șoareci C57BL/6 modificați transgenic pentru a exprima ASGR1 uman pe celule hepatice (DF, J-L, P-R) sau șoareci C57BL/6 de tip sălbatic (AC, G-I, M-O) la patru săptămâni după injectarea intravenoasă cu $2,18 \times 10^{11}$ ssAAV2-CAGG-eGFP de tip sălbatic (B, C, E, F), soluție salină (A, D), $2,18 \times 10^{11}$ ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP vectori virali singuri (G-I, J-L) sau vectori virali ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP cu anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 (M-O, P-R). Fiecare imagine reprezintă un șoarece.

Figura 10 oferă imagini de microscopie cu imunofluorescență ale probelor de ficat prelevate de la șoareci C57BL/6 modificați transgenic pentru a exprima ASGR1 uman de către celulele hepatice la zece zile după injecția intravenoasă cu (**A**) AAV9 de tip sălbatic, (**B**) 250 nM NaCl (**C**) AAV9-A589myc-CAGG - particule virale eGFP în combinație cu anticorp bispecific anti-myc-hCD3 sau (**D**) particule virale AAV9-A589myc-CAGG-eGFP în combinație cu anticorp bispecific anti-myc-ASGR1.

Figura 11 furnizează formate ilustrative de molecule de legare multispecifice exemplificative, nu la scară și nelimitative, utile în unele exemple de realizare ale invenției.

Figura 12 oferă diagrame cu puncte obținute din sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) de către celulele 29T3-hASGR1 incubate cu (**A**) numai vectori virali AAV8 de tip sălbatic, (**C**) numai vectori virali AA8-N590 -myc, sau vectori virali pAAV RC8 N590myc amestecați cu molecule bispecifice anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc la următoarele rapoarte (**D**) 1:1, (**E**) 1:2, (**F**) 1:4, (**G**) 1:8, (**H**) 1:12, (**I**) 1:15, (**J**) 1:50 sau (**K**) 1:100. Expriarea GFP de către celulele 29T3-hASGR1 simulate transfectate este, de asemenea, prezentată (**B**). Pentru fiecare experiment, s-au folosit 2×10^5 celule și 1×10^9 vectori virali.

Figura 13 oferă imagini de microscopie cu imunofluorescență ale probelor de ficat prelevate de la șoareci C57BL/6 modificați transgenic pentru a exprima ASGR1 uman de către celulele hepatice la zece zile după injectarea intravenoasă cu AAV8 de tip sălbatic (**A**)-(C), (**D**)-(F) vectori virali AA8-N590-myc și moleculă de legare bispecifică de control sau particule virale (**G**)-(I) AAV8 N590myc-CAGG-eGFP în combinație cu moleculele de legare bispecifică anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc.

Figura 14 oferă diagrame cu puncte obținute din sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) care evaluează expresia fluorescenței verzi (GFP) de către celulele incubate ENTPD3 29T3-h (**A**) doar cu vectori virali AAV2 de tip sălbatic, (**B**) virali AAV2-N587Myc-CAGG-eGFP numai vectori sau vectori virali AAV2-N587Myc-CAGG-eGFP amestecați cu molecule bispecifice anti-hENTPD3-IgG4-Fc/anti-myc bispecifice la următoarele rapoarte (**C**) 1:1, (**D**) 1:2, (**E**) 1:4, (**F**) 1:8, (**G**) 1:20, (**H**) 1:50, (**I**) 1:100 sau (**K**) 1:200. Pentru fiecare experiment, s-au folosit 2×10^5 celule și 1×10^9 vectori virali

Figura 15A furnizează imagini de microscopie imunofluorescență ale probelor de ficat, **Figura 15B** oferă imagini de microscopie de imunofluorescență ale probelor de intestin și **Figura 15C** oferă imagini de microscopie de imunofluorescență ale probelor de pancreas. Toate probele sunt prelevate de la șoareci de tip sălbatic C57BL/6 la zece zile după injectarea intravenoasă cu PBS (**15A(i)**, **15B(i)** și **15C(i)**), 5×10^{11} wildtype AAV9 (**15A(ii)**, **15B(ii)**, și **15C(ii)**), 5×10^{11} AAV2-N587myc-CAGG-eGFP vectori virali cu 1×10^3 proteine de legare IgG4-Fc/anti-myc bispecifice irelevante (**15A(iii)**, **15B(iii)** și **15C(iii)**), sau 5×10^{11} AAV2-N587myc-CAGG-eGFP vectori virali cu 1×10^{13} proteine de legare hENTPD3-IgG4-Fc/anti-myc bispecifice (**15A(iv)**, **15B(iv)** și **15C(iv)**).

DESCRIERE DETALIATA

O problemă comună cu abordările adaptorului care utilizează capsid virale nemodificate sau capsid virale modificate de schelă a fost eficiența de transducție suboptimă a capsidelor modificate. (Grifman et al. (2001) Mol. Ther. 3 :964-75). De exemplu, Curiel et al. descrie generarea și caracterizarea vectorului adenoviral recombinant care conține fibre cu o secvență RGD-4C încorporată genetic în bucla HI a domeniului butonului carboxi terminal și demonstrează utilitatea buclei HI a butonului fibrei ca loc optim pentru încorporarea peptidului scurte liganzi. A se vedea, de exemplu, S.U.A. brevet nr. 7,297,542;

vezi și Beatty și Curiel (2012) Adv. Cancer. Res. 115:39-67. În mod similar, inserarea peptidelor ligand în proteinele capsidei AAV a dus la capsidă care au fost capabile să afișeze ligandul pe suprafața capsidei și să medieze transducția prin interacțiunea ligandului cu receptorul său, redirectionând astfel tropismul viral prin modificări genetice ale capsidei (Girod și colab. (1999) Nat. Med. 5(9):1052-6, 1438 (erată inclusă) (1999); Grifman et al. (2001) Mol. Ther. 3(6):964-75; Nicklin și colab. (2001) Mol. Ther. 4(3):174-81; Shi și colab. (2001) Hum Gene Ther. 17(3):353-61 (2006); Wu și colab. (2000) J. Virol. 74(18):8635-47). În special, s-a demonstrat că inserarea unui motiv de legare a integrinei Arg-Gly-Asp (RGD) la locul de inserție I-587 al proteinei capsidă AAV VP1 a permis vectorilor virali AAV să transducă celulele prin integrinele $\alpha_v\beta_1$ (Girod și colab. (1999) supra). În schimb, deși inserția peptidei L14 cu 14 aminoacizi după aminoacidul R447 (I-447) a condus la capsidă încă recunoscută de anticorpul sensibil la conformație A20, astfel de vectori virali recombinanți nu au fost capabili să transducă celulele care exprimă L-14, (Girod și colab., 1999; vezi Wu și colab. (2000) (raportând inserția unei peptide hemaglutinină (HA) la poziția I-447 și transducția cu succes a celulelor care exprimă peptida HA). Inserția unui epitop Myc între T448 și N449 a fost recunoscută de un anticorp anti-Myc și, prin urmare, a fost prezentă pe suprafața capsidei, dar a condus la vectori virali inactivați. (Grifman et al., 2001). În schimb, redirectionarea cu succes a fost raportată din nou pentru inserarea unui motiv NGR după N587, dar nu și pentru inserarea c-myc după N587. (Grifman et al., 2001). Brevetul U.S. Nr. 9,624,274 descrie I-453 al unei proteine a capsidei AAV ca un situs de inserare adecvat pentru un epitop heterolog. Deși aceste studii demonstrează inserarea și afișarea cu succes a unei peptide heterologe, de exemplu, epitop, de către proteinele capsidă AAV, niciunul dintre aceste studii nu oferă nicio așteptare că o moleculă de legare multispecifică, de exemplu, o moleculă de legare bispecifică, cum ar fi un anticorp bispecific, care în mod specific leagă peptida heterologă și o proteină de suprafață celulară, poate redirectiona vectorii virali modificați către celulele care exprimă proteina de suprafață celulară și restabili eficiența lor de transducție.

Aici sunt dezvoltate proteine a capsidei AAV recombinante care sunt modificate cu un epitop heterolog, care poate fi utilizat în legătură cu o moleculă de legare multispecifică care cuprinde un paratop, de exemplu, domeniul Fv, care leagă în mod specific epitopul și un ligand care leagă un receptor exprimat pe suprafața unei celule țintă. După cum se arată aici, contactarea vectorilor AAV având capsidă formate cu proteinele capsidă AAV descrise aici cu o moleculă de legare multispecifică la anumite rapoarte restabilește eficiența de transducție a capsidei AAV la niveluri comparabile cu virusul de tip sălbatic, vezi, de exemplu, Exemplul 2. Proteinele capsidelor modificate cu epitopi heterologi așa cum este descris aici sunt derivate din adenovirus (Ad) și virus adeno-asociat (AAV).

Deși invenția a fost prezentată și descrisă în mod special cu referire la un număr de exemple de realizare, ar fi înțeles de către specialiștii în domeniu că diferitele exemple de realizare dezvoltate aici nu sunt destinate să acționeze ca limitări ale domeniului de aplicare al revendicărilor.

Deși orice metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise aici pot fi utilizate în practica sau testarea prezentei invenții, unele metode și materiale preferate sunt acum descrise. Dacă nu este definit altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație pe care o înțeleg în mod obișnuit de către o persoană cu calificare obișnuită în domeniul căruia îi aparține această invenție.

Definiții

Dacă nu este definit altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație pe care o înțeleg în mod obișnuit de către o persoană cu calificare obișnuită în domeniul căruia îi aparține această invenție.

Formele singulare „un”, „o” și „articol hotărât” includ referințe la plural, cu excepția cazului în care contextul dictează în mod clar altfel. Astfel, de exemplu, o referire la „o metodă” include una sau mai multe metode și/sau etape de tipul descris aici și/sau care vor deveni evidente pentru persoanele calificate în domeniu la citirea acestei dezvoltări.

Termenul "anticorp" include molecule de imunoglobulină cuprinzând patru lanțuri polipeptidice, două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare (L) interconectate prin legături disulfură. Fiecare lanț greu cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (V_H) și o regiune constantă a lanțului greu (C_H). Regiunea constantă a lanțului greu cuprinde cel puțin trei domenii, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} și opțional C_{H4} . Fiecare lanț ușor cuprinde un domeniu variabil al lanțului ușor (C_H) și o regiune constantă a lanțului ușor (C_L). Domeniile variabile ale lanțului greu și al lanțului ușor pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, numite regiuni de determinare a complementarității (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, numite regiuni cadru (FR). Fiecare domeniu variabil de lanț greu și ușor cuprinde trei CDR și patru FR, aranjate de la capătul amino-terminal la capătul carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR-urile cu lanț greu pot fi abreviate ca HCDR1, HCDR2 și HCDR3; CDR-urile cu lanț ușor pot fi abreviate ca LCDR1, LCDR2 și LCDR3. Structurile tipice de anticorpi tetramerici cuprind două domenii identice de legare la antigen, fiecare dintre ele format

prin asocierea domeniilor V_H și V_L și fiecare dintre acestea împreună cu domeniile C_H și C_L respective formează regiunea Fv a anticorpului. Anticorpul cu un singur domeniu cuprind un singur domeniu de legare la antigen, de exemplu, un V_H sau un V_L . Termenul „anticorp” cuprinde anticorpi monoclonali, anticorpi multispecifici (de exemplu, bispecifici), anticorpi umani, anticorpi umanizați, anticorpi himerici, Fvs cu un singur lanț (scFv), anticorpi cu un singur lanț, fragmente Fab, fragmente F(ab'), Fvs disulfură legate (sdFv), intracorpi, minicorpi, diacorpi și anticorpi anti-idiotipici (anti-Id) (incluzând, de exemplu, anticorpi anti-Id la TCR specific pentru antigen) și fragmente de legare a epitopului din oricare dintre cele de mai sus. Termenii "anticorp" și "anticorpi" se referă, de asemenea, la diacorpi covalenți, cum ar fi cei dezvoltăți în brevetul U.S. Appl. Pub. 2007/0004909 și Ig-DARTS, cum ar fi cele descrise în brevetul U.S. Appl. Pub. 2009/0060910. Anticorpul include molecule de imunoglobulină și fragmente active din punct de vedere imunologic de molecule de imunoglobulină, adică molecule care conțin un situs de legare a antigenului. Moleculele de imunoglobuline pot fi de orice tip (de exemplu, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA și IgY), clasă (de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 și IgA2) sau subclasă.

Domeniul de legare a antigenului al unui anticorp, de exemplu, partea unui anticorp care recunoaște și se leagă la epitopul unui antigen, este denumit și „paratop”. „Este o regiune mică (de 5 până la 10 aminoacizi) a regiunii Fv a unui anticorp, parte a fragmentului de legare a antigenului (regiunea Fab) și poate conține părți din lanțurile grele și/sau ușoare ale anticorpului. Un paratop leagă în mod specific un epitop atunci când paratopul leagă epitopul cu o afinitate mare. Termenul „anticorp de mare afinitate” se referă la un anticorp care are un K_D în raport cu epitopul său țintă de aproximativ 10^{-9} M sau mai mic (de exemplu, aproximativ 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M sau aproximativ 1×10^{-12} M). Într-un exemplu de realizare, K_D este măsurată prin rezonanța plasmonilor de suprafață, de exemplu, BIACORE™, într-un alt exemplu de realizare, K_D este măsurat prin ELISA.

Expresia "regiune care determină complementaritatea" sau termenul "CDR" include o secvență de aminoacizi codificată de o secvență de acid nucleic a genelor de imunoglobuline ale unui organism care în mod normal (adică, la un animal de tip sălbatic) apare între două regiuni cadru într-o regiune variabilă a unui lanț ușor sau greu al unei molecule de imunoglobulină (de exemplu, un anticorp sau un receptor de celule T). Un CDR poate fi codificat, de exemplu, printr-o secvență de linie germinală sau o secvență rearanjată sau nerearanjată și, de exemplu, printr-o celulă B naivă sau matură sau o celulă T. O CDR poate fi mutată somatic (de exemplu, variază de la o secvență codificată în linia germinativă a unui animal), umanizat și/sau modificat cu substituții, adăugiri sau deleții de aminoacizi. În anumite circumstanțe (de exemplu, pentru un CDR3), CDR-urile pot fi codificate de două sau mai multe secvențe (de exemplu, secvențe de linie germinală) care nu sunt contigue (de exemplu, într-o secvență de acid nucleic nerearanjată), dar sunt contigue într-un acid nucleic al celulei B. secvență, de exemplu, ca rezultat al îmbinării sau conectării secvențelor (de exemplu, recombinarea V-D-J pentru a forma un lanț greu CDR3).

Un „epitop” este partea unei macromolecule care este recunoscută de sistemul imunitar, în special de anticorpi, celule B sau celule T citotoxice. Deși se crede de obicei că epitopii sunt derivați din proteine nonself, secvențele derivate de la gazdă care pot fi recunoscute sunt, de asemenea, clasificate ca epitopi. Epitopii au o lungime de cel puțin 4 aminoacizi, de preferință 4 până la 30 aminoacizi, mai preferabil 5 până la 20 aminoacizi, în special 5 până la 15 aminoacizi. Epitopii pot fi liniari sau tridimensionali formați în mod obișnuit din aminoacizi care sunt îndepărtați unul de celălalt în structura proteinei primare, dar devin strâns înrudiți într-o structură secundară și/sau terțiară. Epitopii care sunt recunoscuți în mod specific de celulele B sunt denumiți epitopi de celule B.

Expresia "Repetare terminală inversată" sau "ITR" include secvențe simetrice de acid nucleic în genomul virusurilor adeno-asociate necesare pentru replicarea eficientă. Secvențele ITR sunt situate la fiecare capăt al genomului ADN AAV. ITR-urile servesc ca origini de replicare pentru sinteza ADN-ului viral și sunt componente cis esențiale pentru generarea de vectori integratori AAV.

Expresia "lanț ușor" include o secvență de lanț ușor de imunoglobulină din orice organism și, dacă nu se specifică altfel, include lanțuri ușoare κ și λ umane și un VpreB, precum și lanțuri ușoare surogat. Domeniile variabile ale lanțului ușor includ în mod obișnuit trei CDR-uri ale lanțului ușor și patru regiuni cadru (FR), dacă nu se specifică altfel. În general, un lanț ușor de lungime completă include, de la capătul amino până la capătul carboxil, un domeniu variabil care include FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 și o regiune constantă a lanțului ușor. Un domeniu variabil al lanțului ușor este codificat de o secvență de genă a regiunii variabile a lanțului ușor, care cuprinde în general segmente V_L și J_L , derivate dintr-un repertoriu de segmente V și J prezente în linia germinativă. Secvențele, locațiile și nomenclatura pentru segmentele de lanț ușor V și J pentru diferite organisme pot fi găsite în baza de date IMGT, www.imgt.org. Lanțurile ușoare le includ pe acelea, de exemplu, care nu leagă selectiv nici un prim, nici un al doilea epitop legat selectiv de proteina de legare a epitopului în care apar. Lanțurile ușoare le includ, de asemenea, pe cele care leagă și recunosc, sau asistă lanțul greu sau alt lanț ușor la

legarea și recunoașterea unuia sau mai multor epitopi legați selectiv de proteina de legare a epitopului în care apar. Lanțurile ușoare comune sau universale le includ pe cele derivate dintr-o genă umană $V_{\kappa 1-39J_{\kappa}}$ sau o genă umană $V_{\kappa 3-20J_{\kappa}}$ și includ versiuni ale acestora cu mutații somatice (de exemplu, maturate în afinitate). Exemple de segmente umane V_L includ un segment de genă umană $V_{\kappa 1-39}$, un segment de genă umană $V_{\kappa 3-20}$, un segment de genă umană $V_{\lambda 1-40}$, un segment de genă umană $V_{\lambda 1-44}$, un segment de genă umană $V_{\lambda 2-8}$, un segment uman $V_{\lambda 2-14}$ segment de genă și segment de genă uman $V_{\lambda 3-21}$ și includ versiuni ale acestora cu mutații somatice (de exemplu, maturate în afinitate). Lanțurile ușoare pot fi realizate care cuprind un domeniu variabil de la un organism (de exemplu, om sau rozătoare, de exemplu, șobolan sau șoarece; sau pasăre, de exemplu, pui) și o regiune constantă din același organism sau dintr-un alt organism (de exemplu, om sau rozătoare). , de exemplu, șobolan sau șoarece; sau pasăre, de exemplu, pui).

Termenul „aproximativ” sau „în mod aproximativ” include a fi într-un interval semnificativ statistic al unei valori. Un astfel de interval poate fi într-un ordin de mărime, de preferință în intervalul 50%, mai preferabil în intervalul 20%, încă mai preferabil în intervalul 10%, și chiar mai preferabil în intervalul 5% dintr-o valoare sau un interval dat. Variația admisibilă cuprinsă în termenul „aproximativ” sau „în mod aproximativ” depinde de sistemul particular studiat și poate fi apreciată cu ușurință de către un specialist în domeniu.

Termenul "etichetă de afinitate" include o secvență de polipeptidă care este membru al unei perechi de legare specifică, de exemplu, care se leagă în mod specific cu o altă secvență de polipeptidă, de exemplu, un paratop de anticorp, cu afinitate mare. Etichetele de afinitate exemplificative și nelimitative includ eticheta de hexahistidină, eticheta FLAG, eticheta Strep II, eticheta de peptidă de legare a streptavidinei (SBP), peptida de legare a calmodulină (CBP), glutatión S-transferaza (GST), proteina de legare a maltozei (MBP), S -etichetă, etichetă HA și etichetă c-Myc. (Examinat în Zhao et al. (2013) J. Analitic Meth. Chim. 1-8).

Termenul "proteină capsidă" include o proteină care face parte din capsida virusului. Pentru virusurile adeno-asociate, proteinele capsidelor sunt denumite în general VP1, VP2 și/sau VP3 și fiecare este codificat de o singură genă cap. Pentru AAV, cele trei proteine a capsidei AAV sunt produse într-o manieră suprapusă din cadrul de citire deschis a capacului (ORF) prin splicing alternativă a ARNm și/sau utilizarea alternativă a codonului de pornire translațional, deși toate cele trei proteine folosesc un codon stop comun. Warrington și colab. (2004) J. Virol. 78:6595. VP1 al AAV2 este, în general, tradus dintr-un codon de pornire ATG (aminoacid M1) pe un ARNm de 2,4 kb, în timp ce VP2 și VP3 din AAV2 provin dintr-un ARNm mai mic de 2,3 kb, folosind un codon de pornire ACG mai slab pentru producția de VP2 (aminoacid). T138) și traducerea readthrough la următorul codon ATG disponibil (aminoacid M203) pentru producerea celei mai abundente proteine capsidă, VP3. Warrington, supra; Rutledge et al. (1998) J. Virol. 72:309-19. Secvențele de aminoacizi ale proteinelor capsidă ale virusurilor adeno-asociate sunt bine cunoscute în domeniu și în general conservate, în special pe dependeoparvovirusurile. Vezi, Rutledge și colab., supra. De exemplu, Rutledge et al. (1998), supra, furnizează în Figura 4B alinieri ale secvenței de aminoacizi pentru proteinele capsidă VP1, VP2 și VP3 ale AAV2, AAV3, AAV4 și AAV6, în care situsurile de pornire pentru fiecare dintre proteinele capsidă VP1, VP2 și VP3 sunt indicate. prin săgeți și domeniile variabile sunt în casete. În consecință, deși pozițiile de aminoacizi furnizate aici pot fi furnizate în legătură cu proteina capsidă VP1 a AAV, iar pozițiile de aminoacizi furnizate aici care nu sunt specificate în continuare se referă la secvența AAV2 a proteinei principale de înveliș VP1 prezentată ca SECV ID NR. :1, un specialist în domeniu ar putea, respectiv, să determine cu ușurință poziția aceluiași aminoacid în cadrul proteinei capsidă VP2 și/sau VP3 a AAV și poziția corespunzătoare a aminoacizilor dintre diferitele serotipuri. În plus, un specialist în domeniu ar fi capabil să schimbe domenii între proteinele capsidelor unor serotipuri AAV diferite pentru formarea unei „proteine a capsidă himerice”.

Schimbarea domeniului între două construcții de proteine a capsidă AAV pentru generarea unei „proteine a capsidă AAV himeric” a fost descrisă, a se vedea, de exemplu, Shen și colab. (2007) Mol. Therapy 15(11):1955-1962. O "proteină a capsidă AAV himerică" include o proteină a capsidă AAV care cuprinde secvențe de aminoacizi, de exemplu, domenii, de la două sau mai multe serotipuri AAV diferite și care este capabilă să formeze și/sau să formeze o capsidă virală/particulă virală asemănătoare AAV. O proteină himerică a capsidă AAV este codificată de o genă himerică a capsidă AAV, de exemplu, o nucleotidă care cuprinde o multitudine, de exemplu, cel puțin două, secvențe de acid nucleic, fiecare dintre ele fiind identică cu o porțiune a unei gene a capsidă care codifică o proteină capsidă a serotipuri distincte de AAV și care, împreună, codifică o proteină a capsidă AAV himerică funcțională. Referirea la o proteină capsidă himerică în legătură cu un serotip specific AAV indică faptul că proteina capsidă cuprinde unul sau mai multe domenii dintr-o proteină a capsidă a acelui serotip și unul sau mai multe domenii dintr-o proteină a capsidă a unui serotip diferit. De exemplu, o proteină a capsidă

himerică AAV2 include o proteină a capsidei care cuprinde unul sau mai multe domenii ale unei proteine a capsidei AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 și unul sau mai multe domenii ale unei proteine a capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 ale unei alte proteine AAV.

O "capsidă mozaic" cuprinde cel puțin două seturi de proteine VP1, VP2 și/sau VP3, fiecare set fiind codificat de o genă cap diferită.

În unele exemple de realizare, o capsidă mozaic descrisă aici cuprinde proteine recombinante VP1, VP2 și/sau VP3 codificate de o genă cap modificată genetic cu o inserție a unei secvențe de acid nucleic care codifică un epitop heterolog și mai cuprinde VP1, VP2 și/sau Proteine VP3 codificate de o genă cap de referință, de exemplu, o genă cap de referință de tip sălbatic care codifică proteinele de tip sălbatic VP1, VP2 și/sau VP3 ale aceluiași serotip AAV ca și proteinele recombinante VP1, VP2 și/sau VP3, o limită de referință de control genă care codifică proteinele VP1, VP2 și/sau VP3 identice cu proteinele recombinante VP1, VP2 și VP3, dar pentru absența epitopului heterolog, o genă de referință de tip sălbatic mutant care codifică substanțial proteinele VP1, VP2 și/sau VP3 de tip sălbatic ale același serotip AAV ca și proteinele recombinante VP1, VP2 și/sau VP3, dar pentru o mutație (de exemplu, inserție, substituție, deleție), mutație care reduce de preferință tropismul proteinelor VP1, VP2 și VP3 de tip sălbatic. În unele exemple de realizare, proteina capsidă de referință este o proteină de referință himerică care cuprinde cel puțin un domeniu al proteinelor VP1, VP2 și/sau VP3 cu același serotip AAV ca și proteinele recombinante VP1, VP2 și/sau VP3. În unele exemple de realizare, gena cap de referință codifică o proteină himerică VP1, VP2 și/sau VP3.

Expresia "lanț greu" sau "lanț greu de imunoglobulină" include o secvență de lanț greu de imunoglobulină, incluzând secvența de regiune constantă a lanțului greu de imunoglobulină, de la orice organism. Domeniile variabile de lanț greu includ trei CDR-uri de lanț greu și patru regiuni FR, dacă nu se specifică altfel. Fragmentele de lanțuri grele includ CDR-uri, CDR-uri și FR-uri și combinații ale acestora.

Un lanț greu tipic are, după domeniul variabil (de la N-terminal la C-terminal), un domeniu C_{H1} , o balama, un domeniu C_{H2} și un domeniu C_{H3} . Un fragment funcțional al unui lanț greu include un fragment care este capabil să recunoască în mod specific un epitop (de exemplu, recunoașterea epitopului cu un K_D în intervalul micromolar, nanomolar sau picomolar), care este capabil să exprime și să secrete dintr-o celulă și care cuprinde cel puțin un CDR. Domeniile variabile ale lanțului greu sunt codificate de secvența de nucleotide a regiunii variabile, care cuprinde în general segmente V_H , D_H și J_H derivate dintr-un repertoriu de segmente V_H , D_H și J_H prezente în linia germinativă. Secvențele, locațiile și nomenclatura pentru segmentele de lanț greu V, D și J pentru diferite organisme pot fi găsite în baza de date IMGT, care este accesibilă prin internet pe World Wide Web (www) la adresa URL „imgt.org.”

Termenul „anticorp numai cu lanț greu”, „proteină care leagă antigen numai cu lanț greu”, „proteină de legare a antigenului cu un singur domeniu”, „proteină care leagă un singur domeniu” sau altele asemenea se referă la o moleculă de imunoglobulină monomerică sau homodimerică care cuprinde un lanț asemănător imunoglobulinei care cuprinde un domeniu variabil legat operabil la o regiune constantă a lanțului greu, care este incapabil să se asocieze cu un lanț ușor deoarece regiunea constantă a lanțului greu îi lipsește de obicei un domeniu C_{H1} funcțional. În consecință, termenul „anticorp numai cu lanț greu”, „proteină care leagă antigen numai cu lanț greu”, „proteină de legare a antigenului cu un singur domeniu”, „proteină care leagă un singur domeniu” sau altele asemenea cuprinde atât (i) o proteină monomerică de legare a antigenului cu un singur domeniu, cuprinzând unul dintre lanțurile asemănătoare imunoglobulinei cuprinzând un domeniu variabil legat operabil la o regiune constantă a lanțului greu lipsit de un domeniu funcțional C_{H1} , sau (ii) o proteină homodimerică de legare la antigen cu un singur domeniu care cuprinde două lanțuri asemănătoare imunoglobulinei, fiecare dintre acestea cuprinzând o variabilă domeniu legat operabil la o regiune constantă a lanțului greu care nu are un domeniu funcțional C_{H1} . În diferite aspecte, o proteină homodimerică de legare a antigenului cu un singur domeniu cuprinde două lanțuri asemănătoare imunoglobulinei identice, fiecare dintre acestea cuprinzând un domeniu variabil identic legat operațional la o regiune constantă identică a lanțului greu lipsită de un domeniu C_{H1} funcțional. În plus, fiecare lanț asemănător imunoglobulinei dintr-o proteină de legare a antigenului cu un singur domeniu cuprinde un domeniu variabil, care poate fi derivat din segmente de genă a regiunii variabile a lanțului greu (de exemplu, V_H , D_H , J_H), segmente de genă a lanțului ușor (de exemplu, V_L , J_L), sau o combinație a acestora, legată de o secvență de genă a regiunii constante a lanțului greu (C_H) care cuprinde o mutație de deleție sau inactivare într-o secvență care codifică C_{H1} (și, opțional, o regiune balama) a unei gene a regiunii constante a lanțului greu, de exemplu, IgG, IgA, IgE, IgD sau o combinație a acestora. O proteină de legare a antigenului cu un singur domeniu care cuprinde un domeniu variabil derivat din segmente de genă a lanțului greu poate fi denumită „anticorp cu un singur domeniu - V_H ” sau „proteină care leagă antigenul cu un singur domeniu - V_H ”, vezi, de exemplu, U.S. brevet nr. 8,754,287; Publicația de brevet SUA nr. 20140289876; 20150197553; 20150197554; 20150197555;

20150196015; 20150197556 și 20150197557. O proteină de legare a antigenului cu un singur domeniu care cuprinde un domeniu variabil derivat din segmente de genă a lanțului ușor poate fi denumită „proteină de legare a antigenului cu un singur domeniu V_L”, vezi, de exemplu, U.S. Publicație Nr. 20150289489.

Expresia "lanț ușor" include o secvență de lanț ușor de imunoglobulină din orice organism și, dacă nu se specifică altfel, include lanțuri ușoare kappa (κ) și lambda (λ) umane și un VpreB, precum și lanțuri ușoare surogat. Domeniile variabile ale lanțului ușor includ în mod obișnuit trei CDR-uri ale lanțului ușor și patru regiuni cadru (FR), dacă nu se specifică altfel. În general, un lanț ușor de lungime completă include, de la capătul amino până la capătul carboxil, un domeniu variabil care include FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 și o secvență de aminoacizi din regiunea constantă a lanțului ușor. Domeniile variabile ale lanțului ușor sunt codificate de secvența de nucleotide a regiunii variabile a lanțului ușor, care cuprinde în general segmente de gene de lanț ușor V_L și lanț ușor J_L, derivate dintr-un repertoriu de segmente de genă de lanț ușor V și J prezente în linia germinativă.

Secvențele, locațiile și nomenclatura pentru segmentele genelor V și J ale lanțului ușor pentru diferite organisme pot fi găsite în baza de date IMGT, care este accesibilă prin internet pe World Wide Web (www) la adresa URL „imgt.org.” Lanțurile ușoare le includ pe acelea, de exemplu, care nu leagă selectiv nici un prim, nici un al doilea epitop legat selectiv de proteina de legare a epitopului în care apar. Lanțurile ușoare le includ, de asemenea, pe cele care leagă și recunosc, sau asistă lanțul greu în legarea și recunoașterea, a unui sau mai multor epitopi legați selectiv de proteina de legare a epitopului în care apar. Lanțurile ușoare le includ, de asemenea, pe cele care leagă și recunosc, sau asistă lanțul greu în legarea și recunoașterea, a unui sau mai multor epitopi legați selectiv de proteina de legare a epitopului în care apar. Lanțurile ușoare comune sau universale le includ pe cele derivate dintr-o genă umană V_k1-39J_k5 sau o genă umană V_k3-20J_k1 și includ versiuni ale acestora cu mutații somatice (de exemplu, maturate în afinitate).

Expresia „legat operabil”, așa cum este folosită aici, include o juxtapunere fizică (de exemplu, în spațiul tridimensional) a componentelor sau elementelor care interacționează, direct sau indirect unul cu celălalt, sau se coordonează în alt mod unul cu celălalt pentru a participa la un eveniment biologic, care juxtapunere realizează sau permite o astfel de interacțiune și/sau coordonare. Pentru a da doar un exemplu, se spune că o secvență de control (de exemplu, o secvență de control a expresiei) dintr-un acid nucleic este „legată operabil” la o secvență de codificare atunci când este localizată în raport cu secvența de codificare, astfel încât prezența sau absența sa influențează expresia, și/sau activitatea secvenței de codificare. }n multe exemple de realizare, "legarea operabilă" implică legarea covalentă a componentelor sau elementelor relevante unele cu altele. Oamenii de specialitate în domeniu vor aprecia cu ușurință, totuși, că în unele exemple de realizare, nu este necesară legătura covalentă pentru a realiza o legătură operabilă eficientă. De exemplu, în unele exemple de realizare, secvențele de control ale acidului nucleic care sunt legate operabil cu secvențe de codificare pe care le controlează sunt învecinate cu nucleotida de interes. Alternativ, sau suplimentar, în unele exemple de realizare, una sau mai multe astfel de secvențe de control acționează în trans sau la distanță pentru a controla o secvență de codificare de interes. În unele exemple de realizare, termenul "secvență de control al expresiei" așa cum este utilizat aici se referă la secvențe de polinucleotide care sunt necesare și/sau suficiente pentru a afecta expresia și procesarea secvențelor de codificare la care sunt legate. În unele exemple de realizare, secvențele de control al expresiei pot fi sau pot cuprinde secvențe adecvate de inițiere, terminare, promotor și/sau amplificator a transcripției; semnale eficiente de procesare a ARN, cum ar fi semnalele de splicing și poliadenilare; secvențe care stabilizează ARNm citoplasmatic; secvențe care sporesc eficiența traducerii (de exemplu, secvența consens Kozak); secvențe care sporesc stabilitatea proteinelor; și/sau, în unele exemple de realizare, secvențe care sporesc secreția de proteine. În unele exemple de realizare, una sau mai multe secvențe de control sunt active preferențial sau exclusiv într-o anumită celulă gazdă sau organism, sau tipul acestuia. Pentru a da doar un exemplu, la procariote, secvențele de control includ de obicei promotorul, situsul de legare ribozomal și secvența de terminare a transcripției; la eucariote, în multe exemple de realizare, secvențele de control includ de obicei promotori, amplificatori și/sau secvențe de terminare a transcripției. Cei cu calificare obișnuită în domeniu vor aprecia din context că, în multe exemple de realizare, termenul „secvențe de control” se referă la componente a căror prezență este esențială pentru exprimare și procesare și, în unele exemple de realizare, include componente a căror prezență este avantajoasă pentru exprimare (inclusiv , de exemplu, secvențe lider, secvențe de țintire și/sau secvențe partener de fuziune).

Termenul "proteină a capsidului recombinantă" include o proteină a capsidului care are cel puțin o mutație în comparație cu proteina capsidului corespunzătoare a virusului de tip sălbatic, care poate fi un virus de referință și/sau martor pentru studiu comparativ. O proteină a capsidului recombinantă include o proteină a capsidului care cuprinde un epitop heterolog, care poate fi inserat în și/sau afișat de către

proteina capsidei. „Heterolog” în acest context înseamnă heterolog în comparație cu virusul, din care este derivată proteina capsidei. Aminoacizii inserați pot fi inserați pur și simplu între doi aminoacizi dați ai proteinei capsidei. O inserție de aminoacizi poate merge, de asemenea, împreună cu o ștergere a aminoacizilor dați ai proteinei capsidei la locul de inserție, de ex. 1 sau mai mulți aminoacizi ai proteinei capsidei sunt substituiți cu 5 sau mai mulți aminoacizi heterologi).

Termenii "moleculă de legare multispecifică" și "moleculă de legare bispecifică" și altele asemenea, în general și respectiv, se referă la o moleculă de legare care cuprinde cel puțin două și numai două componente de legare neidentice, fiecare componentă de legare legând în mod specific un epitop diferit - fie pe două componente diferite, molecule (de exemplu, epitopi diferiți pe doi imunogeni diferiți) sau pe aceeași moleculă (de exemplu, epitopi diferiți pe același imunogen). În general, una dintre componentele de legare ale unei molecule de legare bispecifică de aici leagă în mod specific un epitop heterolog afișat de o proteină capsidă AAV și a doua componentă de legare este specifică pentru o proteină, de exemplu, un marker de suprafață celulară, exprimat în primul rând și/sau preferențial de către un celula țintă, de exemplu, un marker de celule T (de exemplu, CD3, CD28, etc.). Moleculele de legare bispecifice pot fi realizate, de exemplu, prin combinarea componentelor de legare care recunosc epitopi diferiți ai aceluiași imunogen. De exemplu, secvențele de acid nucleic care codifică componente de legare (de exemplu, secvențe variabile ale lanțului ușor sau greu) care recunosc epitopi diferiți pot fi fuzionate cu secvențe de acid nucleic care codifică aceleași regiuni constante ale lanțului greu, aceleași sau diferite regiuni constante ale lanțului ușor sau respectiv o regiune constantă a lanțului greu și o regiune constantă a lanțului ușor și astfel de secvențe pot fi exprimate într-o celulă ca o proteină multispecifică de legare a antigenului într-un format care este similar cu o structură Fab, o structură scFab, o structură diabody, o structură scFv, o structură scFv-Fc, o structură scFv-fermoar, o structură tetramerică similară unui anticorp tipic care include lanțul ușor universal înrudit, o structură tetramerică care cuprinde un anticorp bivalent tipic care include lanțul ușor universal înrudit și/sau o legare suplimentară component (de exemplu, scFv, scFv-zipper, scFab etc.) atașat la unul sau ambele lanțuri grele (de exemplu, la capătul N- și/sau capătul C-) și/sau la unul sau ambele lanțuri ușoare (de exemplu, la capătul N- și/sau capătul C-). Diferitele formate de molecule de legare multispecifice, în special bispecifice, sunt binecunoscute, vezi, de exemplu, Brinkmann și Kontermann (2017) mAbs 9:182-212.

Un exemplu de moleculă de legare multispecifică are două lanțuri grele fiecare având CDR-uri ale lanțului greu, urmate de (de la capătul N- la capătul C-) un domeniu CH_1 , o balama, un domeniu CH_2 și un domeniu CH_3 și un lanț ușor de imunoglobulină care fie are nu conferă specificitate de legare a epitopului, dar care se poate asocia cu fiecare lanț greu (de exemplu, lanț ușor comun) sau care se poate asocia cu fiecare lanț greu și care poate lega unul sau mai mulți dintre epitopii legați de regiunile de legare a epitopului lanțului greu; sau care se poate asocia cu fiecare lanț greu și permite legarea unuia sau a ambelor catene grele la unul sau ambii epitopi. În unele exemple de realizare, o moleculă de legare multispecifică cuprinde: (1) un domeniu variabil al lanțului greu de imunoglobulină legat operabil la o primă regiune constantă a lanțului greu care cuprinde o primă secvență de aminoacizi CH_3 a unei IgG umane selectate dintre IgG1, IgG2, IgG4 și o combinație a acestuia; și (2) un domeniu variabil al lanțului greu al imunoglobulinei, în care al doilea domeniu variabil al lanțului greu al imunoglobulinei este legat operațional la o a doua regiune constantă a lanțului greu cuprinzând o a doua secvență de aminoacizi CH_3 a IgG umane selectată dintre IgG1, IgG2, IgG4 și o combinație a acestora, în care primul sau al doilea domeniu variabil al lanțului greu (cu sau fără un lanț ușor înrudit) leagă un epitop heterolog așa cum este descris aici și celălalt domeniu variabil al lanțului greu (cu sau fără un lanț ușor înrudit) leagă un receptor pe un celula țintă și în care prima regiune constantă a lanțului greu se asociază cu cea de-a doua regiune a lanțului constant într-o manieră care asigură izolarea mai ușoară a proteinei de legare multispecifică, de exemplu, în care prima și a doua regiune constantă a lanțului greu formează un buton în gaură (KIH) sau în care a doua secvență de aminoacizi CH_3 cuprinde o modificare care reduce sau elimină legarea celei de-a doua secvențe de aminoacizi CH_3 la proteina A (vezi, de exemplu, brevetul US Nr. 8,586,713). În unele exemple de realizare, o moleculă de legare multispecifică cuprinde: (1) un domeniu variabil al lanțului greu de imunoglobulină legat operabil la o primă regiune constantă a lanțului greu care cuprinde o primă secvență de aminoacizi CH_3 a unei IgG umane selectate dintre IgG1, IgG2, IgG4 și o combinație a acestuia; și (2) un domeniu variabil al lanțului greu al imunoglobulinei, în care al doilea domeniu variabil al lanțului greu al imunoglobulinei este legat operațional la o a doua regiune constantă a lanțului greu cuprinzând o a doua secvență de aminoacizi CH_3 a IgG umane selectată dintre IgG1, IgG2, IgG4 și o combinație a acestora, în care primul și al doilea domeniu variabil al lanțului greu (cu sau fără un lanț ușor înrudit) leagă același antigen sau diferiți, în care prima sau a doua regiune constantă a lanțului greu sunt modificate pentru a cuprinde în plus un domeniu de legare suplimentar (de ex., un scFv sau Fv care se leagă la un epitop heterolog așa cum este descris aici, de exemplu, în care domeniul de legare suplimentar este atașat la capătul C- sau capătul N- al unuia sau ambelor lanțuri grele) și în care prima

regiune constantă a lanțului greu se asociază cu a doua regiune a lanțului constant într-o manieră care asigură izolarea mai ușoară a proteinei de legare multispecifică, de exemplu, în care prima și a doua regiune constantă a lanțului greu formează un format butoane în gaură (KIH) sau în care a doua secvență de aminoacizi CH3 cuprinde o modificare care reduce sau elimină legarea pentru a doua secvență de aminoacizi CH3 la proteina A. În unele exemple de realizare în care a doua secvență de aminoacizi CH3 cuprinde legarea redusă sau eliminată la proteina A, a doua secvență de aminoacizi CH3 cuprinde o modificare H95R (prin numerotarea exonilor IMGT; H435R prin numerotare UE). Într-un exemplu de realizare, a doua secvență de aminoacizi CH3 mai cuprinde o modificare Y96F (prin numerotarea exonului IMGT; H436F de către EU). Într-un alt exemplu de realizare, a doua secvență de aminoacizi CH3 cuprinde atât o modificare H95R (prin numerotarea exonului IMGT; H435R prin numerotarea EU) cât și o modificare Y96F (prin numerotarea exonului IMGT; H436F prin EU). În unele realizări, a doua secvență de aminoacizi CH3 este dintr-o IgG1 umană modificată și mai cuprinde o mutație selectată din grupul constând din D16E, L18M, N44S, K52N, V57M și V82I (IMGT; D356E, L38M, N384S, K392N, V397M și V422I de către UE). În unele realizări, a doua secvență de aminoacizi CH3 este dintr-o IgG2 umană modificată și mai cuprinde o mutație selectată din grupul constând din N44S, K52N și V82I (IMGT; N384S, K392N și V422I de către EU). În unele realizări, a doua secvență de aminoacizi CH3 este dintr-o IgG4 umană modificată și mai cuprinde o mutație selectată din grupul constând din Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q și V82I (IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q și V422I de către UE). În unele exemple de realizare, secvența de aminoacizi a regiunii constante a lanțului greu este o secvență de aminoacizi a regiunii constante a lanțului greu, iar secvența de aminoacizi a regiunii constante a lanțului greu cuprinde unul sau mai multe dintre oricare dintre tipurile de modificări descrise mai sus.

În diferite exemple de realizare, domeniile Fc sunt modificate pentru a avea legarea modificată la receptorul Fc, care la rândul său afectează funcția efector.

În unele exemple de realizare, o regiune constantă a lanțului greu (CH), care include domeniul Fc, este himerică. Ca atare, o regiune CH himerică combină domenii CH derivate din mai mult de un izotip de imunoglobulină. De exemplu, o regiune CH himerică cuprinde o parte sau tot dintr-un domeniu CH2 derivat dintr-o moleculă IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană, combinată cu o parte sau tot dintr-un domeniu CH3 derivat dintr-o moleculă IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană. În unele exemple de realizare, o regiune CH himerică conține o regiune balama himeric. De exemplu, o balama himerică poate cuprinde o secvență de aminoacizi „balama superioară” (reziduuri de aminoacizi din pozițiile 216 până la 227 conform numerotării UE; resturi de aminoacizi din pozițiile 226 până la 240 conform numerotării Kabat) derivate dintr-o IgG1 umană, un IgG2 umană sau o regiune balama IgG4 umană, combinată cu o secvență „balama inferioară” (reziduuri de aminoacizi din pozițiile 228 până la 236 conform numerotării UE; pozițiile aminoacizilor din pozițiile 241 până la 249 conform numerotării Kabat) derivate dintr-o IgG1 umană, o regiune balama IgG2 umană sau IgG4 umană. În unele exemple de realizare, regiunea balama himerică cuprinde resturi de aminoacizi derivate dintr-o balama superioară IgG1 umană sau IgG4 umană și resturi de aminoacizi derivate dintr-o balama inferioară IgG2 umană.

În unele exemple de realizare, domeniul Fc poate fi proiectat pentru a activa toate, unele sau nici una dintre funcțiile efectoare Fc normale, fără a afecta proprietățile farmacocinetice dorite ale proteinei care conțin Fc (de exemplu, anticorpii). Pentru exemple de proteine care cuprind regiuni CH himerice și care au funcții efectoare modificate, vezi WO2014022540.

Termenul "celule țintă" include orice celule în care se dorește exprimarea unei nucleotide de interes. De preferință, celulele țintă prezintă pe suprafața lor o proteină, de exemplu un receptor, care permite celulei să fie țintită cu un ligand de redirectionare, așa cum este descris mai jos. De preferință, proteina țintă, de exemplu, receptorul este specific pentru celula țintă, de exemplu, este un "marker specific celulei", "antigen specific celulei" sau altele asemenea. Termenul „marker specific celulei”, „antigen specific al celulei”, „marker specific unui organ”, „marker specific unui țesut” sau altele asemenea se referă la și include acele proteine pentru care expresia este îmbogățită de celulă, țesut și/sau organ pentru care este un marker specific. „Îmbogățit” în contextul expresiei proteinei se referă la și include expresia sau supraexprimarea proteinei specifice celulei/țesutului/organului în primul rând, preferențial sau exclusiv de către celula/țesutul/organul pentru care proteina este un marker specific, deși un astfel de marker poate fi exprimat și de alte celule/țesuturi/sau organe la niveluri minime. Atlasul proteinelor umane poate fi utilizat pentru a determina dacă o proteină este un marker specific pentru celulă/țesut/organ și oferă, de asemenea, un depozit de proteine specifice celulei/țesutului/organului. Vezi, www.proteinatlas.org; vezi, de asemenea, Uhlen et al. (2010) Nat. Biotehnologie. 28:1248-50.

Termenul "transducție" sau "infecție" sau altele asemenea se referă la introducerea unui acid nucleic într-o celulă țintă de către un vector viral. Termenul de eficiență în relație cu transducție sau altele asemenea, de exemplu, „eficiență de transducție” se referă la fracția (de exemplu, procentul) de celule

care exprimă o nucleotidă de interes după incubare cu un număr stabilit de vectori virali care cuprind nucleotida de interes. Metodele binecunoscute de determinare a eficienței de transducție includ sortarea celulelor activate prin fluorescență a celulelor transduse cu o genă reporter fluorescentă, PCR pentru exprimarea nucleotidei de interes etc.

Termenul "de tip sălbatic", așa cum este utilizat aici, include o entitate având o structură și/sau activitate așa cum se găsește în natură într-o stare sau context "normal" (spre deosebire de mutant, bolnav, alterat etc.). Cei cu calificare obișnuită în domeniu vor aprecia că vectorii virali de tip sălbatic, de exemplu, proteinele a capsidă de tip sălbatic, pot fi utilizați ca vector viral de referință în studii comparative. În general, o proteină/capsidă/vector viral de referință sunt identice cu proteina/capsidă/vectorul capsidă virale de testare, dar pentru modificarea pentru care efectul urmează să fie testat. De exemplu, pentru a determina efectul, de exemplu, asupra eficienței de transducție, al inserării unui epitop heterolog într-un vector viral de testare, eficiența de transducție a vectorului viral de testat (în absența sau prezența unei molecule de legare multispecifică adecvată) pot fi comparate cu eficiența de transducție a unui vector viral de referință (în absența sau prezența unei molecule de legare multispecifică adecvată, dacă este necesar) care este identic cu vectorul viral testat în fiecare caz (de exemplu, mutații suplimentare, nucleotide de interes, numărul de vectori virali și țintă). celule etc.) cu excepția prezenței unui epitop heterolog.

Proteine recombinante ale capsidă virale și vectori AAV și acizi nucleici

În unele exemple de realizare, o proteină a capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici este o proteină a capsidă Ad, de exemplu, o proteină a capsidă a unui serotip Ad selectat din grupul constând din Ad1, Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad6 și Ad7. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidă AAV recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidă Ad2. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidă AAV recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidă Ad5. În unele exemple de realizare, o proteină de capsidă Ad AAV recombinantă, așa cum este descrisă aici, cuprinde un epitop heterolog într-un domeniu proteic al fibrei, de exemplu, la capătul carboxi al proteinei fibrei, nodul fibrei și/sau nucleu HI a nodului fibrei.

În unele exemple de realizare, o proteină recombinantă a capsidă AAV derivată dintr-o genă a capsidă virusului adeno-asociat (AAV) este o proteină a capsidă modificată genetic a unui serotip AAV selectat din grupul constând din AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidă AAV este derivată dintr-o genă a capsidă AAV2, o genă a capsidă AAV6, o genă a capsidă AAV8 sau o genă a capsidă AAV9.

În unele exemple de realizare, proteina a capsidă AAV recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidă AAV2, de exemplu, este o proteină a capsidă AAV2 VP1 modificată genetic, secvența de aminoacizi pentru al cărei tip sălbatic este prezentată ca SECV ID NR:1. În unele exemple de realizare, proteina a capsidă AAV recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidă AAV8, de exemplu, este o proteină a capsidă AAV8 VP1 modificată genetic, secvența de aminoacizi pentru al cărei tip sălbatic este prezentată ca SECV ID NR:21. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidă AAV este derivată dintr-o genă a capsidă AAV9, de exemplu, este o proteină a capsidă AAV9 VP1 modificată genetic, secvența de aminoacizi pentru al cărei tip sălbatic este prezentată ca SECV ID NR:5. În unele exemple de realizare, proteina capsidă AAV recombinantă este derivată dintr-o genă capsidă AAV6, de exemplu, este o proteină capsidă VP1 modificată genetic a AAV6. În unele exemple de realizare, un epitop heterolog este inserat în I-453 al unei proteine a capsidă AAV9.

În general, o proteină a capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde un epitop heterolog inserat în și/sau afișat de proteina capsidă AAV astfel încât epitopul heterolog reduce și/sau elimină tropismul natural al proteinei capsidă AAV sau al capsidă care o cuprinde. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat într-o regiune a proteinei capsidă AAV implicată cu tropismul natural al proteinei capsidă de referință de tip sălbatic, de exemplu, o regiune a proteinei capsidă implicată cu un receptor celular. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat în și/sau afișat de către un domeniu buton al unei proteine din fibră Ad. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat în și/sau afișat de bucla HI a unei proteine din fibră Ad. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat după o poziție de aminoacid selectată din grupul constând din G-453 din proteina capsidă AAV2 VP1, N-587 din proteina capsidă AAV2 VP1, Q-585 din proteina capsidă AAV6 VP1, G-453 a proteinei capsidă AAV9 VP1 și A-589 a proteinei capsidă AAV9 VP1. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este inserat și/sau afișat între aminoacizii N-587 și R-588 ai unei capsidă AAV2 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV care cuprinde o capsidă AAV recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinantă cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:2. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV cuprinzând o capsidă AAV recombinantă și/sau compoziții care

cuprind o capsidă AAV recombinată cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:4. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV cuprinzând o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprind o secvență de aminoacizi codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:25.

5 În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV cuprinzând o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprinde o secvență de aminoacizi codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:26. În unele
10 exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV care cuprinde o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprinde o secvență de aminoacizi codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:27. Locurile de inserare adecvate suplimentare identificate prin utilizarea AAV2 sunt bine cunoscute în domeniu (Wu et al. (2000) J. Virol. 74:8635-8647) și includ I-1, I-34, I-138, I-139, I-161, I-261, I-266, I-381, I-447, I-448, I-459, I-471, I-520, I-534, I-570, I-573, I-584, I-587, I-588, I-591, I-657, I-664, I-713 și I-716. O proteină a capsidului virală recombinantă așa cum este descrisă aici poate fi o proteină a capsidului AAV2 cuprinzând
15 un epitop heterolog inserat într-o poziție selectată din grupul constând din I-1, I-34, I-138, I-139, I-161, I-261, I-266, I-381, I-447, I-448, I-459, I-471, I-520, I-534, I-570, I-573, I-584, I-587, I-588, I-591, I-657, I-664, I-713, I-716 și o combinație a acestora. Locurile de inserție adecvate suplimentare identificate prin utilizarea serotipurilor AAV suplimentare sunt binecunoscute și includ I-587 (AAV1), I-589 (AAV1), I-585 (AAV3), I-585 (AAV4) și I-585 (AAV5). În unele exemple de realizare, o proteină capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici poate fi o proteină capsidă AAV2 care cuprinde un epitop heterolog inserat într-o poziție selectată din grupul constând din I-587 (AAV1), I-589 (AAV1), I-585 (AAV3), I-585 (AAV4), I-585 (AAV5) și o combinație a acestora.

Nomenclatura utilizată I-### aici se referă la locul de inserție cu ### denumind numărul de aminoacizi în raport cu proteina VP1 a unei proteine a capsidului AAV, totuși o astfel de inserție poate fi
25 localizată direct capătul-N sau capătul-C, de preferință capătul-C al unui aminoacid în secvența de 5 aminoacizi capătul-N- sau capătul-C al aminoacidului dat, de preferință 3, mai preferabil 2, în special 1 aminoacid(i) capătul-N sau capătul-C al aminoacidului dat acid. În plus, pozițiile la care se face referire aici sunt relativ la proteina VP1 codificată de o genă a capsidului AAV, iar pozițiile corespunzătoare (și mutațiile acestora) pot fi identificate cu ușurință pentru proteinele capsidului VP2 și VP3 care codifică gena capsidului prin efectuarea unei alinieri a secvenței de proteinele VP1, VP2 și VP3 care codifică gena de referință a capsidului AAV.

În consecință, o inserție în poziția corespunzătoare a acidului nucleic de codificare a unuia dintre aceste situsuri ale genei cap duce la o inserție în VP1, VP2 și/sau VP3, deoarece proteinele capsidelor sunt codificate prin suprapunerea cadrelor de citire ale aceleiași gene cu codoni de pornire eşalonați. Prin
35 urmare, pentru AAV2, de exemplu, conform acestei nomenclaturi, inserțiile dintre aminoacizii 1 și 138 sunt inserate numai în VP1, inserțiile între 138 și 203 sunt inserate în VP1 și VP2, iar inserțiile dintre 203 și C-terminal sunt inserate în VP1, VP2 și VP3, ceea ce este desigur și cazul situsului de inserție I-587. Prin urmare, prezenta invenție cuprinde gene structurale ale AAV cu inserții corespunzătoare în proteinele VP1, VP2 și/sau VP3.

40 În plus, datorită conservării înalte a cel puțin întinderi mari și a membrului mare al membrului familiei strâns înrudit, situsurile de inserție corespunzătoare pentru AAV, altele decât AAV enumerate, pot fi identificate prin efectuarea unei alinieri a aminoacizilor sau prin compararea structurilor capsidelor. Vezi, de exemplu, Rutledge et al. (1998) J. Virol. 72:309-19 și brevetul SUA nr. 9,624,274 pentru aliniamente exemplificative ale diferitelor proteine a capsidului AAV.

45 În unele compoziții dezvăluite aici constând din capsidă AAV recombinantă (de exemplu, în absența unei molecule de legare multispecifică), proteina capsidă AAV recombinantă este o proteină capsidă AAV2 VP1 cu un epitop heterolog este inserat la un situs 1587, în care epitopul heterolog. nu cuprinde un motiv Arg-Gly-Asp (RGD), un motiv NGR sau c-myc. În unele compoziții dezvăluite aici constând din capsidă AAV recombinantă (de exemplu, în absența unei molecule de legare multispecifică), proteina capsidă AAV recombinantă este o proteină capsidă VP1 cu un epitop heterolog este inserat între
50 T-448 și N-449, în care epitopul heterolog nu cuprinde c-myc. În unele compoziții dezvăluite aici constând din capsidă AAV recombinantă (de exemplu, în absența unei molecule de legare multispecifică), proteina capsidă AAV recombinantă este o proteină capsidă VP1 cu un epitop heterolog este inserat la un situs I-447, în care heterologul epitopul nu cuprinde L14 sau HA.

55 În unele compoziții care cuprind capsida AAV recombinantă (de exemplu, cuprinzând în plus o moleculă de legare multispecifică), proteina capsidă AAV recombinantă este o proteină capsidă VP1 cu un epitop heterolog este inserat la un situs I-587, în care epitopul heterolog cuprinde un Arg- Motiv Gly-Asp (RGD), un motiv NGR sau c-myc. În unele compoziții dezvăluite aici care cuprind capsida AAV recombinantă (de exemplu, cuprinzând în plus o moleculă de legare multispecifică), capsida AAV este o

capsidă VP1, epitopul heterolog cuprinde c-myc, iar epitopul heterolog este inserat între T-448 și N-449, sau între N-587 și R-588. În unele compoziții dezvăluite aici care cuprind capsidă AAV recombinantă (de exemplu, cuprinzând în plus o moleculă de legare multispecifică), proteina capsidă AAV recombinantă este o proteină capsidă VP1 cu un epitop heterolog este inserat la un situs I-447, în care epitopul heterolog cuprinde L14 sau HA. În unele compoziții dezvăluite aici care cuprind capsidă AAV recombinantă (de exemplu, în prezența unei molecule de legare multispecifică), proteina capsidă AAV recombinantă este o proteină capsidă VP1 cu un epitop heterolog este inserat între T-448 și N-449, în care epitopul heterolog cuprinde c-myc. Brevetul U.S. Nr. 9,624,274 descrie I-453 al unei proteine a capsidă AAV ca un situs de inserare adecvat pentru un epitop heterolog.

În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) epitopului heterolog elimină tropismul natural al vectorului AAV, de exemplu, transducția unei celule permissive în mod natural la infecție cu vectori AAV de referință de tip sălbatic și/sau o celulă țintă este nedetectabilă în absența unei celule adecvate. moleculă de legare multispecifică. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV, de exemplu, în comparație cu transducția unei celule permissive în mod natural la infecție cu vectori AAV de referință de tip sălbatic. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 5%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 5%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 10%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 20%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 30%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 40%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 50%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 60%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 70%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 80%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 90%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 95%. În unele exemple de realizare, inserția (afișarea) epitopului heterolog reduce tropismul natural al vectorului AAV cu cel puțin 90%. În aceste exemple de realizare, în care inserarea (afișarea) epitopului heterolog nu elimină tropismul natural al capsidelor AAV recombinante, tropismul natural al unor astfel de capsidă AAV recombinante poate fi abolit printr-o a doua mutație diferită. De exemplu, într-o variantă de realizare, o proteină a capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici poate fi derivată dintr-o genă a capsidă AAV9, poate cuprinde un epitop heterolog și poate cuprinde în plus o mutație, de exemplu, o mutație W503A.

Această redirectionare a virusului de la celula gazdă naturală este importantă în special dacă se intenționează administrarea sistemică versus locală sau loco-regională a vectorilor AAV, deoarece absorbția vectorilor AAV de către celulele gazdă naturale limitează doza eficientă a vectorilor AAV. În cazul AAV2 și AAV6, HSPG este raportat a fi receptorul principal pentru absorbția virală într-un număr mare de celule, în special celulele hepatice. Pentru AAV2, activitatea de legare a HSPG este dependentă de un grup de 5 aminoacizi bazici, R484, R487, R585, R588 și K532 (Kern și colab., (2003) J Virol. 77(20):11072-81). Recent s-a raportat că substituția de aminoacid lizină la glutamat K531E conduce la suprimarea capacității AAV6 de a lega heparina sau HSPG ((Wu și colab., 2006) J. of Virology 80(22):11393-11397). Prin urmare, mutațiile punctiforme preferate sunt cele care reduc activitatea de transducere a vectorului AAV pentru o anumită celulă țintă mediată de receptorul natural cu cel puțin 50%, de preferință cel puțin 80%, în special cel puțin 95%, în cazul HSPG ca receptorul primar, legarea vectorilor AAV la HSPG.

În consecință, alte mutații preferate pentru vectorii AAV care leagă HSPG sunt acele mutații care epuizează sau înlocuiesc un aminoacid bazic, cum ar fi R, K sau H, de preferință R sau K, care este implicat în legarea HSPG a virusului respectiv, printr-un aminoacid non-bazic. aminoacid cum ar fi A, D, G, Q, S și T, de preferință A sau un aminoacid care este prezent în poziția corespunzătoare a unui serotip AAV diferit, dar foarte conservat, lipsit de un astfel de aminoacid bazic în această poziție. În consecință, substituțiile preferate de aminoacizi sunt R-484-A, R-487-A, R-487-G, K-532-A, K-532-D, R-585-A, R-585-S, R-585-Q, R-585-A sau R-588-T, în special R-585-A și/sau R-588-A pentru AAV2 și K-531-A sau K-531-E pentru AAV6. Un exemplu de realizare preferat în mod special al invenției sunt astfel de mutanți ai proteinei a capsidă AAV2 care conțin în plus mutațiile în două puncte R-585-A și R-588-A deoarece aceste două mutații punctiforme sunt suficiente pentru a elimina activitatea de legare a HSPG

într-o mare măsură. Aceste mutații punctuale permit o detașare eficientă a celulelor care exprimă HSPG care - în scopuri de țintire - mărește specificitatea virusului mutant respectiv pentru noua sa celulă țintă.

Un exemplu de realizare a prezentei invenții este o structură multimerică care cuprinde o proteină capsidă AAV recombinantă din prezenta invenție. O structură multimerică cuprinde cel puțin 5, preferabil cel puțin 10, mai preferabil cel puțin 30, cel mai preferabil cel puțin 60 de proteine a capsidăi AAV recombinate cuprinzând un epitop heterolog așa cum este descris aici. Ele pot forma capsidă AAV obișnuite (particule AAV goale) sau vectori AAV (capsidă care încapsulează o nucleotidă de interes). Formarea vectorilor AAV capabili să împacheteze un genom viral este o caracteristică foarte preferată pentru utilizarea capsidelor AAV recombinante descrise aici ca vectori AAV.

Un exemplu de realizare a prezentei invenții este un acid nucleic care codifică o proteină capsidă așa cum este descris mai sus. Acidul nucleic este de preferință un vector care cuprinde secvența de acid nucleic revendicată. Acizii nucleici, în special vectorii, sunt necesari pentru a exprima recombinant proteinele capsidă din această invenție.

O altă variantă de realizare a prezentei invenții este utilizarea a cel puțin unei proteine a capsidăi AAV recombinate și/sau a unui acid nucleic care o codifică, de preferință cel puțin o structură multimerică (de exemplu, vector AAV) pentru fabricarea și utilizarea ca vector de transfer de gene.

Epitopi heterologi

În general, o proteină AAV recombinantă și/sau un vector AAV care cuprinde capsidul AAV recombinant cuprinde un epitop heterolog, care permite redirecționarea vectorului AAV, de exemplu, printr-o moleculă de legare multispecifică. În unele exemple de realizare, un epitop heterolog este un epitop de celule B, de exemplu, are o lungime între aproximativ 1 aminoacid și aproximativ 35 de aminoacizi și formează o pereche de legare cu un paratop de anticorp, de exemplu, un domeniu variabil de imunoglobulină. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog cuprinde o etichetă de afinitate.

Un număr mare de etichete sunt cunoscute în domeniu. (A se vedea, de exemplu: Nilsson et al. (1997) „Strategii de fuziune prin afinitate pentru detectarea, purificarea și imobilizarea proteinelor recombinate” Protein Expression and Purification 11: 1-16, Terpe și colab. (2003) „Privire de ansamblu asupra fuziunilor de proteine de etichetă: de la fundamentele moleculare și biochimice la sistemele comerciale” Applied Microbiology and Biotechnology 60:523-533 și referințele din acesta). Etichetele de afinitate includ, dar nu se limitează la, o etichetă de polihistidină (de exemplu, o etichetă His-6, His-8 sau His-10) care leagă cationi divalenți imobilizați (de exemplu, Ni^{2+}), o porțiune de biotină (de exemplu, pe un secvență de polipeptidă biotilată in vivo) care leagă avidina imobilizată, o secvență GST (glutathion S-transferaza) care leagă glutathionul imobilizat, o etichetă S care leagă proteina S imobilizată, un antigen care leagă un anticorp imobilizat sau un domeniu sau fragment al acestuia (inclusiv, de ex., T7, myc, FLAG și etichete B care leagă anticorpii corespunzători), o etichetă FLASH (o etichetă cu afinitate mare care se cuplează cu fragmente specifice pe bază de arsenic), un receptor sau un domeniu receptor care leagă un ligand imobilizat (sau invers), proteină A sau un derivat al acestuia (de exemplu, Z) care leagă IgG imobilizate, proteina de legare a maltozei (MBP) care leagă amiloza imobilizată, o proteină care leagă albumina care leagă albumina imobilizată, un domeniu de legare a chitinei care leagă chitina imobilizată, o peptidă de legare a calmodulină care leagă calmodulina imobilizată și un domeniu de legare a celulozei care leagă celuloza imobilizată. O altă etichetă exemplificativă este o etichetă SNAP, disponibilă comercial de la Covalys (www.covalys.com). În unele exemple de realizare, un epitop heterolog dezvăluit aici cuprinde o etichetă de afinitate recunoscută numai de un paratop de anticorp. În unele exemple de realizare, un epitop heterolog dezvăluit aici cuprinde o etichetă de afinitate recunoscută de un paratop de anticorp și alte perechi de legare specifice.

În unele aspecte, epitopul heterolog și/sau eticheta de afinitate nu formează o pereche de legare cu un domeniu constant de imunoglobulină. În unele aspecte, epitopul heterolog și/sau eticheta de afinitate nu formează o pereche de legare cu un ion metalic, de exemplu, Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , etc. În unele realizări, epitopul heterolog nu este o polipeptidă selectată din grupul constând din Streptavidină, Strep II, HA, L14, 4C-RGD, LH și Proteina A.

În unele exemple de realizare, eticheta de afinitate este selectată din grupul constând din FLAG (SECV ID NR:7), HA (SECV ID NR:8) și c-myc (EQKLISEEDL; SECV ID NR:6). În unele exemple de realizare, epitopul heterolog este c-myc.

În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată de și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteine a capsidăi AAV VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde secvența de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată de și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteine a capsidăi AAV2 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR:6)

inserată între N587 și R588 a unei proteine a capsidei AAV2 VP1. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:2. În unele exemple de realizare, o proteină a capsidei AAV recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:4. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV cuprinzând o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprind o secvență de aminoacizi codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:25. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV cuprinzând o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprind o secvență de aminoacizi codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:26. În unele exemple de realizare, o capsidă AAV recombinantă, un vector AAV care cuprinde o capsidă AAV recombinată și/sau compoziții care cuprind o capsidă AAV recombinată cuprinde o secvență de aminoacizi codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:27.

În unele exemple de realizare, epitopul heterolog cuprinde o etichetă de afinitate și unul sau mai mulți linkeri. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog cuprinde o etichetă de afinitate flancată de un linker, de exemplu, epitopul heterolog cuprinde de la capătul N-terminal la capătul C-terminal un prim linker, o etichetă de afinitate și un al doilea linker. În unele exemple de realizare, primul și al doilea linker au fiecare în mod independent cel puțin un aminoacid în lungime. În unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici.

În general, un epitop heterolog așa cum este descris aici, de exemplu, o etichetă de afinitate în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri, are o lungime între aproximativ 5 aminoacizi și aproximativ 35 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are lungimea de cel puțin 5 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are 6 aminoacizi în lungime. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are 7 aminoacizi în lungime. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 8 aminoacizi. În unele realizări, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 9 aminoacizi.

În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 10 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 11 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 12 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 13 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 14 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 15 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 16 aminoacizi. În unele realizări, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 17 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 18 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 19 aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 20 de aminoacizi. În unele realizări, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 21 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 22 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are 23 de aminoacizi în lungime. În unele realizări, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 24 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 25 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are 26 de aminoacizi în lungime. În unele realizări, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 27 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 28 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are 29 de aminoacizi în lungime. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 30 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are 31 de aminoacizi în lungime. În unele realizări, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are o lungime de 32 de aminoacizi. În unele exemple de

realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are 33 de aminoacizi în lungime. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are 34 de aminoacizi în lungime. În unele exemple de realizare, epitopul heterolog (în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri) are 35 de aminoacizi în lungime.

5 **Segmente de redirecționare**

Un vector AAV așa cum este descris aici are capacități de transducție reduse la desființare în absența unei molecule de legare multispecifică, în special o moleculă de legare multispecifică care cuprinde (i) un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul și (ii) un ligand de redirecționare care leagă în mod specific un receptor, care poate fi conjugat la suprafața unei perle (de exemplu, pentru purificare) sau exprimat de o celulă țintă. În consecință, o moleculă de legare multispecifică care cuprinde (i) un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul și (ii) un ligand de redirecționare care leagă în mod specific un receptor reține vectorul AAV. O astfel de „redirecționare” sau „redirecționare” poate include un scenariu în care vectorul AAV de tip sălbatic vizează mai multe celule dintr-un țesut și/sau mai multe organe dintr-un organism, care țintire largă a țesutului sau organelor este redusă la abolită prin inserarea heterologiei. epitop și care redirecționarea către celule mai specifice din țesut sau organ mai specific din organism este realizată cu molecula de legare multispecifică. O astfel de redirecționare sau redirecționare poate include, de asemenea, un scenariu în care vectorul AAV de tip sălbatic vizează un țesut, care țintire a țesutului este redusă la desființată prin inserarea epitopului heterolog și care redirecționare către un țesut complet diferit este realizată cu molecula de legare multispecifică. Un paratop de anticorp așa cum este descris aici cuprinde în general cel puțin o regiune de determinare a complementarității (CDR) care recunoaște în mod specific epitopul heterolog, de exemplu, o regiune CDR3 a unui domeniu variabil al lanțului greu și/sau ușor. În unele exemple de realizare, o moleculă de legare multispecifică cuprinde un anticorp (sau o porțiune a acestuia) care cuprinde paratopul anticorpului care leagă în mod specific epitopul heterolog. De exemplu, o moleculă de legare multispecifică poate cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cu un singur domeniu sau o regiune variabilă a lanțului ușor cu un singur domeniu, în care regiunea variabilă a lanțului greu cu un singur domeniu sau regiunea variabilă a lanțului ușor cu un singur domeniu cuprinde un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul heterolog. În unele realizări, o moleculă de legare multispecifică poate cuprinde o regiune Fv, de exemplu, o moleculă de legare multispecifică poate cuprinde un scFv, care cuprinde un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul heterolog. În unele exemple de realizare, o moleculă de legare multispecifică așa cum este descrisă aici cuprinde un paratop de anticorp care se leagă în mod specific c-myc.

În unele exemple de realizare, o moleculă de legare multispecifică așa cum este descrisă aici cuprinde un paratop de anticorp care leagă în mod specific c-myc, paratop care cuprinde scFv, domeniile variabile ale lanțului greu și ușor ale scFv și/sau setul de HCDR1-HCDR2-HCDR3 -LCDR1-LCDR2-LCDR3 secvență de aminoacizi, codificată de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:28, de exemplu, scFv cuprinzând secvența de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:37. În unele exemple de realizare, o moleculă de legare multispecifică așa cum este descrisă aici cuprinde un Fv sau scFv codificat de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:28.

În consecință, prezenta invenție include ca anticorpi, fragmente de anticorpi de legare la antigen și proteine de legare multispecifice care leagă în mod specific c-myc, în care anticorpii, fragmentele de anticorpi și proteinele de legare multispecifică cuprind un paratop care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) cuprinzând SECV ID NR:29 și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) cuprinzând SECV ID NR:30. Prezenta invenție include, de asemenea, anticorpi, fragmente de anticorpi de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice care cuprind un paratop care leagă în mod specific c-Myc, în care paratopul cuprinde o regiune 1 care determină complementaritatea lanțului greu (HCDR1) cuprinzând SEQ ID NO: 31, un HCDR2 cuprinzând SECV ID NR:32, un HCDR3 cuprinzând SECV ID NR:33, o regiune care determină complementaritatea lanțului ușor 1 (LCDR1) cuprinzând SECV ID NR:34, un LCDR2 cuprinzând SECV ID NR:35 și un LCDR3 care cuprinde SECV ID NR:36.

Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde un HCVR care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:29 sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90 %, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență față de acesta.

Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde un LCVR care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:30 sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență față de acesta.

Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde o pereche de secvențe de

aminoacizi HCVR și LCVR (HCVR/LCVR) cuprinzând secvența de aminoacizi HCVR prezentată ca SECV ID NR. :29 asociat cu secvența de aminoacizi LCVR prezentată ca SECV ID NR:30. În unele realizări, perechea de secvență de aminoacizi HCVR/LCVR este selectată din grupul constând din SECV ID NR: 29/30.

5 Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:31 sau o secvență substanțial similară a acesteia. având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

10 Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde un lanț greu CDR2 (HCDR2) care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:32 sau o secvență substanțial similară. dintre acestea având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

15 Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde un lanț greu CDR3 (HCDR3) care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:33 sau o secvență substanțial similară. dintre acestea având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

20 Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde un lanț ușor CDR1 (LCDR1) care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:34 sau o secvență substanțial similară. dintre acestea având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

25 Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde un lanț ușor CDR2 (LCDR2) care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:35 sau o secvență substanțial similară. dintre acestea având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

30 Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice care cuprind un paratop care cuprinde un lanț ușor CDR3 (LCDR3) care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:36 sau o secvență substanțial similară ale acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență.

35 Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice care cuprind un paratop care cuprinde o pereche de secvențe de aminoacizi HCDR3 și LCDR3 (HCDR3/LCDR3) cuprinzând aminoacidul HCDR3 prezentat ca SECV ID NR: 33 asociat cu secvența de aminoacizi LCDR3 prezentată ca SECV ID NR:36. În unele realizări, perechea de secvență de aminoacizi HCDR3/LCDR3 este prezentată ca SECV ID NR: 33/36.

Prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde un set de șase CDR-uri (adică, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) codificate de setul de secvențe de nucleotide. mai departe ca SECV ID NR:28. În anumite exemple de realizare, secvențele de aminoacizi HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 sunt prezentate ca SECV ID NR: 31-32-33-34-35-36.

40 Într-un exemplu de realizare înrudit, prezenta invenție poate folosi anticorpi, fragmente ale acestora de legare la antigen și/sau proteine de legare multispecifice cuprinzând un paratop care cuprinde un set de șase CDR-uri (adică, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) conținute într-o pereche de secvențe de aminoacizi HCVR/LCVR prezentată ca SECV ID NR:29/30. Metodele și tehnicile de identificare a CDR-urilor din secvențele de aminoacizi HCVR și LCVR sunt bine cunoscute în domeniu și pot fi utilizate pentru a identifica CDR-urile din secvențele de aminoacizi HCVR și/sau LCVR specificate descrise aici. Convențiile exemplificatoare care pot fi utilizate pentru a identifica limitele CDR-urilor includ, de exemplu, definiția Kabat, definiția Chothia și definiția AbM. În termeni generali, definiția Kabat se bazează pe variabilitatea secvenței, definiția Chothia se bazează pe locația regiunilor buclei structurale, iar definiția AbM este un compromis între abordările Kabat și Chothia. Vezi, de exemplu, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani și colab., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); și Martin și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Bazele de date publice sunt, de asemenea, disponibile pentru identificarea secvențelor CDR într-un anticorp.

45 Prezenta invenție poate folosi molecule de acid nucleic care codifică anticorpii anti-myc sau porțiuni ale acestora.

55 O moleculă de legare multispecifică, așa cum este descrisă aici, mai cuprinde un ligand de redirecționare, în plus față de un paratop (de exemplu, un anticorp sau o porțiune a acestuia) care leagă în mod specific epitopul heterolog inserat în/afișat de o proteină capsidă AAV recombinantă. în unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă o proteină exprimată pe suprafața unei celule, de exemplu, o proteină de suprafață celulară pe o celulă eucariotă (umană), de exemplu, o celulă țintă.

Există un număr mare de proteine de suprafață celulară, de exemplu, receptori de suprafață celulară, adecvați care pot fi țintite de un ligand de redirectionare și pentru care un ligand de redirectionare, de exemplu, anticorpi sau porțiuni ale acestora, sunt deja disponibile. Astfel de structuri includ, dar nu se limitează la: antigenii majori de histocompatibilitate clasa I și clasa II; receptori pentru o varietate de citokine (de exemplu, receptori pentru IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33 etc.), hormoni de creștere specifici tipului celular, factor neurotrofic derivat din creier (BDNF), factor neurotrofic ciliar (CTNF), factori de creștere care stimulează coloniile, factori de creștere endoteliali, factori de creștere epidermică, factori de creștere a fibroblastelor, factor neurotrofic derivat glial, factori de creștere gliali, gro-beta/mip 2, creșterea hepatocitelor factori, factor de creștere asemănător insulinei, interferoni (α -IFN, β -IFN, γ -IFN, IFN consens), interleukine (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14), factor de creștere a keratinocitelor, factori inhibitori ai leucemiei, factor de activare chimiotactic macrofag/monocite, creșterea nervilor factor, proteina de activare a neutrofilelor 2, factor de creștere derivat din trombocite, factor de celule stem, factor de creștere transformant, factori de necroză tumorală, factorul de creștere endotelial vascular, lipoproteine, incluzând receptori transmembranari suplimentari sau alți de tip 1, cum ar fi PRLR, receptori cuplați cu proteina G, cum ar fi GCGR, canale ionice precum Nav1.7, ASIC1 sau ASIC2; molecule de adeziune celulară; molecule de transport pentru metaboliți, cum ar fi aminoacizi; receptorii de antigen ai limfocitelor B și T (de exemplu, receptorii de celule B și proteinele asociate (de exemplu, CD19, CD20, etc.) și receptorii de celule T și proteinele asociate (de exemplu, CD3, CD4, CD8, etc.); a proteină tetraspanină (de exemplu, CD63). O capsidă AAV recombinantă descrisă aici permite infectarea specifică a unui tip de celulă prin utilizarea unei molecule de legare multispecifică care cuprinde un ligand de redirectionare care leagă antigenele de suprafață celulară de diferențiere ca ținte pentru complexul de vector AAV.

În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele hepatice (umane), adică un marker specific ficatului. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele creierului (umane), un marker specific pentru celulele creierului. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în primul rând (de exemplu, exclusiv) de către celulele hematopoietice (umane), adică un marker specific celulei hematopoietice. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de celule T (umane), adică, un marker specific celulei T. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de celulele B (umane), adică un marker specific pentru celulele B. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de celule dendritice (umane), adică un marker specific celulei dendritice. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de către macrofage (umane), adică un marker specific de macrofag. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în primul rând (de exemplu, exclusiv) de celule NK (umane), adică un marker specific celulei NK. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele renale (umane), adică un marker specific rinichiului. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele pancreasului (umane), adică, un marker specific pancreasului. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele intestinale (umane), adică, un marker specific intestinului. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de către o celulă canceroasă (umană), adică un antigen asociat tumorii. În unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de către celula (umană) infectată cu patogen heterolog. Proteinele care (1) sunt exprimate în mod specific de către sau pentru care expresia este îmbogățită într-o celulă/țesut/organ și (2) recunoscute de o proteină de legare a antigenului utilă ca ligand de redirectionare așa cum este descris aici sunt bine cunoscute și pot poate fi găsit și la www.proteinatlas.org; vezi și Uhlen și colab. (2010) Nat. Biotehnologie. 28:1248-50. Tabelul 1 de mai jos oferă markeri specifici de organ exemplificativi și nelimitativi pentru care sunt disponibili proteinele de legare la antigen, care pot fi utili ca liganzi de redirectionare, și celulele/țesutul/organul care exprimă astfel de markeri.

Tabelul 1: Exemple de markeri specifici țesuturilor

Țesut	Markeri specifici țesuturilor
Ficat	Caseta de legare ATP subfamilia B; membri 11 (ABCB11) Alanin-glioxilat aminotransferaza (AGXT) Alcool dehidrogenaza 1A, clasa I (ADH1A)

	Polipeptida pi alcool dehidrogenază 4 (clasa II) (ADH4) Componenta amiloid P, ser (APCS) Angiopoietină asemănătoare 3 (ANGPTL3) Apolipoproteină; C1, C2 (APOC1, APOC2) APOC4-APOC2 Receptorul pentru asialoglicoproteinei 1 (ASGR1) Receptorul pentru asialoglicoproteinei 2 (ASGR2) Acid biliar-CoA: aminoacid N-aceiltransferaza (BAAT) Complement lanțul beta C8 (C8B) Factorul de coagulare II, trombina (F2) Citocromul P450 familia 1 subfamilia A membru 2 CYP1A2 Lectina 2 care leagă manoza (MBL2) Purtător solubil, membru al familiei de transportoare de anioni organici 1B3 (SLCO1B3) Paraoxonaza 3 (PON3) Receptorul transferinei 2 (TFR2) Urocanat hidratază 1 (UROC 1)
Intestin	Proteina 6 care leagă acizii grași (FABP6)
Pancreas	CUB și zona pellucida ca domeniile 1 (CUZD1) Protează, serină 2 (PRSS2) Protează, serină 3 (PRSS3)

În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă hepatică (umană), de exemplu, un receptor de asialoglicoproteină, de exemplu, hASGR1. În unele exemple de realizare, ligand de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă a creierului (umană).

- 5 În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă T (umană), de exemplu, CD3, de exemplu, CD3ε. În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă de rinichi (umană). În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă musculară (umană), de exemplu, o integrină. În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un receptor exprimat de o celulă canceroasă (umană), de exemplu, un antigen asociat tumorii, de exemplu, E6 și E7.

- 10 În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare se leagă la receptorul uman de glucagon (hGCGR). În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă ENTPD3 uman.

- În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare leagă un antigen asociat tumorii exprimat de o celulă tumorală. Exemple nelimitative de antigene tumorale specifice includ, de exemplu,
- 15 adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, alfa-actinina-4, alfa-fetoproteina ("AFP"), ARTC1, B-RAF, BAGE-1, BCLX (L), proteina de fuziune BCR-ABL b3a2, beta-catenina, BING-4, CA-125, CALCA, antigen carcinoembrionar ("CEA"), CASP-5, CASP-8, CD274, CD45, Cdc27, CDK12, CDK4, CDKN2A, CEA, CLPP, COA-1, CPSF, CSNK1A1, CTAG1, CTAG2, ciclina D1, Ciclin-A1, proteina de fuziune dek-can, DKK1, EFTUD2, factor de alungire 2, ENAH (hMena), Ep-CAM, EpCAM, EphA3, antigen tumoral
- 20 epitelial ("ETA"), proteina de fuziune ETV6-AML1, EZH2, E6, E7, FGF5, FLT3-ITD, FN1, G250/MN/CAIX, GAGE-1,2,8, GAGE-3,4, 5,6,7, GAS7, glipican-3, GnTV, gp100/Pme117, GPNMB, HAUS3, Hepsin, HER-2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A11, HLA-A2, HLA-DOB, hsp70- 2, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, Carboxil esterază intestinală, K-ras, Kallikrein 4, KIF20A, KK-LC-1, KKLC1, KM-HN-1, KMHN1 cunoscut și ca CCDC110, LAGE-1, LDLR-fucoziltransferaza de fuziune AS,
- 25 Lengsin, M-CSF, MAGE-A1, MAGE-A 10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-C1, MAGE-C2, enzimă malică, mammaglobin-A, MART2, MATN, MC1R, MCSP, mdm-2, ME1, Melan-A/MART-1, Meloe, Midkine, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, mucină, MUM-1, MUM -2, MUM-3, Miozină, Miozină clasa I, N-raw, NA88-A, neo-PAP, NFYC, NY-BR-1, NY-ESO-1/LAGE-2, OA1, OGT, OS-9, polipeptidă P, p53, PAP, PAX5, PBF, proteina de fuziune
- 30 pml-RARalpha, mucină epitelială polimorfă ("PEM"), PPP1R3B, PRAME, PRDX5, PSA, PSMA, PTPRK, RAB38/NY-MEL-1, RAGE-1, RBAF600, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, SAGE, secernin 1, SIRT2, SNRPD1, SOX10, Sp17, SPA17, SSX-2, SSX-4, STEAP1, survivin, proteina de fuziune SYT-SSX1 sau -SSX2, TAG-1, TAG-2, Telomeraza, TGF-betaRII, TPBG, TRAG-3, Triozofosfat izomeraza, TRP-1/gp75, TRP-2, TRP2-INT2, tirozinaza, tirozinaza ("TYR"), VEGF, WT1, XAGE-1b /GAGED2a,
- 35 Kras, NY-ESO1, MAGE-A3, HPV E2, HPV E6, HPV E7, antigen WT-1 (în limfom și alte tumori solide), receptori ErbB, Melan A [MART1], gp 100, tirozinază, TRP -1/gp 75 și TRP-2 (în melanom); MAGE-1 și MAGE-3 (în vezica urinară, cap și gât și carcinomul non-microcelular); proteinele HPV EG și E7 (în cancerul de col uterin); Mucină [MUC-1] (în cancerile de sân, pancreas, colon și prostată); antigenul

specific de prostată [PSA] (în cancerul de prostată); antigen carcinoembrionar [CEA] (în cancerule de colon, sân și gastrointestinale) și astfel de antigene specifice tumorii comune precum MAGE-2, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-10, MAGE-12, BAGE-1, CAGE- 1,2,8, CAGE-3 TO 7, LAGE-1, NY-ESO-1/LAGE-2, NA-88, GnTV, TRP2-INT2. În unele exemple de realizare, antigenul asociat tumorii este ErbB2/Her2.

5 În unele exemple de realizare, antigenul asociat tumorii este E6 și/sau E7.

În unele exemple de realizare, ligandul de redirecționare se leagă la markerii CD asociați cu răspunsul imun, de exemplu, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 etc. În unele exemple de realizare, markerul CD este CD3.

În anumite exemple de realizare, molecula de legare multispecifică este un anticorp bispecific.

10 Fiecare domeniu de legare la antigen al unui anticorp bispecific cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu (HCVR) și un domeniu variabil al lanțului ușor (LCVR). În contextul unei molecule bispecifice de legare la antigen care cuprinde un prim și un al doilea domeniu de legare la antigen (de exemplu, un anticorp bispecific), CDR-urile primului domeniu de legare la antigen pot fi desemnate cu prefixul „A1” și CDR-urile de al doilea domeniu de legare la antigen poate fi desemnat cu prefixul „A2”. Astfel, CDR-

15 urile primului domeniu de legare la antigen pot fi denumite aici A1-HCDR1, A1-HCDR2 și A1-HCDR3; și CDR-urile celui de-al doilea domeniu de legare la antigen pot fi denumite aici A2-HCDR1, A2-HCDR2 și A2-HCDR3.

Primul domeniu de legare a antigenului și al doilea domeniu de legare a antigenului pot fi conectate direct sau indirect unul la altul pentru a forma o moleculă bispecifică de legare a antigenului din prezenta invenție. Alternativ, primul domeniu de legare a antigenului și al doilea domeniu de legare a antigenului pot fi fiecare conectat la un domeniu de multimerizare separat. Asocierea unui domeniu de multimerizare cu un alt domeniu de multimerizare facilitează asocierea dintre cele două domenii de legare la antigen, formând astfel o moleculă bispecifică de legare a antigenului. Așa cum este utilizat aici, un "domeniu de multimerizare" este orice macromoleculă, proteină, polipeptidă, peptidă sau aminoacid care

25 are capacitatea de a se asocia cu un al doilea domeniu de multimerizare de aceeași structură sau constituție sau similară. De exemplu, un domeniu de multimerizare poate fi o polipeptidă care cuprinde un domeniu de imunoglobulină CH3. Un exemplu nelimitator de componentă de multimerizare este o porțiune Fc a unei imunoglobuline (cuprinzând un domeniu CH2-CH3), de exemplu, un domeniu Fc al unei IgG selectate dintre izotipurile IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4, precum și orice alotip în cadrul fiecărui grup de izotip.

30

Moleculele bispecifice de legare a antigenului utilizate în prezenta invenție vor cuprinde în mod obișnuit două domenii de multimerizare, de exemplu, două domenii Fc care sunt fiecare parte individual a unui lanț greu de anticorp separat. Primul și al doilea domeniu de multimerizare pot fi de același izotip IgG, cum ar fi, de exemplu, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Alternativ, primul și al doilea domeniu de multimerizare pot fi de izotipuri IgG diferite, cum ar fi, de exemplu, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 etc.

35

În anumite exemple de realizare, domeniul de multimerizare este un fragment Fc sau o secvență de aminoacizi de 1 până la aproximativ 200 de aminoacizi în lungime conținând cel puțin un rest de cisteină. În alte exemple de realizare, domeniul de multimerizare este un rest de cisteină sau o peptidă scurtă care conține cisteină. Alte domenii de multimerizare includ peptide sau polipeptide care cuprind sau constau dintr-un fermoar de leucină, un motiv cu buclă helix sau un motiv cu bobină încolăcită.

40

Orice format sau tehnologie de anticorp bispecific poate fi utilizat pentru a produce moleculele bispecifice de legare a antigenului utilizate în prezenta invenție. De exemplu, un anticorp sau fragment al acestuia având o primă specificitate de legare la antigen poate fi legat funcțional (de exemplu, prin cuplare chimică, fuziune genetică, asociere necovalentă sau altfel) la una sau mai multe alte entități moleculare, cum ar fi un alt anticorp sau fragment de anticorp având o a doua specificitate de legare a antigenului pentru a produce o moleculă bispecifică de legare a antigenului. Formatele bispecifice exemplificative specifice care pot fi utilizate în contextul prezentei invenții includ, fără limitare, de exemplu, formate bispecifice bazate pe scFv sau diabody, fuziuni IgG-scFv, domeniu dublu variabil (DVD)-Ig, Quadroma, butoane-în- găuri, lanț ușor comun (de exemplu, lanț ușor comun cu butoane în găuri etc.), CrossMab, CrossFab, corp (SEED), fermoar cu leucină, Duobody, IgG1/IgG2, Fab cu dublă acțiune (DAF)-IgG și Formate bispecifice Mab2 (a se vedea, de exemplu, Klein și colab. 2012, mAbs 4:6, 1-11 și referințele citate aici, pentru o trecere în revistă a formatelor de mai sus; a se vedea, de asemenea, Brinkmann și Kontermann (2017) mAbs 9:182-212).

45

50

Prezenta invenție poate folosi, de asemenea, molecule bispecifice de legare a antigenului cuprinzând un prim domeniu CH3 și un al doilea domeniu Ig CH3, în care primul și al doilea domeniu Ig CH3 diferă unul de celălalt prin cel puțin un aminoacid și în care cel puțin o diferență de aminoacid reduce legarea anticorpului bispecific la proteina A în comparație cu un anticorp bispecific lipsit de diferența de aminoacizi. Într-un exemplu de realizare, primul domeniu Ig CH3 leagă proteina A, iar al

55

doilea domeniu Ig CH3 conține o mutație care reduce sau elimină legarea proteinei A, cum ar fi o modificare H95R (prin numerotarea exonului IMGT; H-435-R prin numerotarea UE). Al doilea CH3 poate cuprinde în plus o modificare Y96F (prin IMGT; Y436F de către EU). Alte modificări care pot fi găsite în al doilea CH3 includ: D-16-E, L-18-M, N-44-S, K-52-N, V-57-M și V-82-I (prin IMGT, D-356-E, L-358-M, N-384-S, K-392-N, V-397-M și V-422-I de către EU) în cazul anticorpilor IgG1; N-44-S, K-52-N și V-82-I (IMGT; N-384-S, K-392-N și V-422-I de către EU) în cazul anticorpilor IgG2; și Q-15-R, N-44-S, K-52-N, V-57-M, R-69-K, E-79-Q și V-82-I (prin IMGT; Q-355 -R, N-384-S, K-392-N, V-397-M, R-409-K, E-419-Q și V-422-I de către EU) în cazul anticorpilor IgG4; vezi, de exemplu, WO 2010/151792.

În anumite realizări, domeniul Fc poate fi himeric, combinând secvențe Fc derivate din mai mult de un izotip de imunoglobulină. De exemplu, un domeniu Fc himeric poate cuprinde o parte sau întreaga secvență CH2 derivată dintr-o regiune CH2 umană IgG1, IgG2 umană sau IgG4 umană și o parte sau toată secvența CH3 derivată dintr-o IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană. Un domeniu Fc himeric poate conține, de asemenea, o regiune balama himeric. De exemplu, o balama himerică poate cuprinde o secvență „balama superioară”, derivată dintr-o IgG1 umană, o IgG2 umană sau o regiune balama IgG4 umană, combinată cu o secvență „balama inferioară”, derivată dintr-o IgG1 umană, o IgG2 umană sau o regiune balama IgG4 umană. Un exemplu particular de domeniu Fc himeric care poate fi inclus în oricare dintre moleculele de legare la antigen prezentate aici cuprinde, de la N- la C-terminal: [IgG4 CH1] - [IgG4 balama superioară] - [IgG2 balama inferioară] - [IgG4 CH2] - [IgG4 CH3]. Un alt exemplu de domeniu Fc himeric care poate fi inclus în oricare dintre moleculele de legare la antigen prezentate aici cuprinde, de la N- la C-terminal: [IgG1 CH1] - [IgG1 balama superioară] - [IgG2 balama inferioară] - [IgG4 CH2] - [IgG1 CH3]. Acestea și alte exemple de domenii Fc himerice care pot fi incluse în oricare dintre moleculele de legare a antigenului din prezenta invenție sunt descrise în Cererea PCT nr. WO2014/022540. Domeniile Fc himerice având aceste aranjamente structurale generale și exemple ale acestora pot avea legarea modificată la receptorul Fc, care la rândul său afectează funcția efector Fc.

Metode de utilizare și realizare

Un alt exemplu de realizare a proteinelor a capsidei AAV recombinante descrise aici este utilizarea lor pentru eliberarea unei nucleotide de interes, de exemplu, o genă raportor sau o genă terapeutică, la o celulă țintă. Prin urmare, prezenta invenție furnizează o compoziție a prezentei invenții pentru utilizare într-o metodă in vivo de tratament sau diagnostic, metoda cuprinzând eliberarea nucleotidei de interes la o celulă țintă care exprimă o proteină de suprafață celulară cuprinzând contactarea celulei țintă cu compoziția, în care molecula de legare multispecifică cuprinde un ligand de redirectionare care leagă proteina de suprafață celulară. Prezenta invenție furnizează, în plus, o metodă in vitro sau ex vivo de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă care exprimă o proteină de suprafață celulară cuprinzând punerea în contact a celulei țintă cu compoziția prezentei invenții, în care molecula de legare multispecifică cuprinde un ligand de redirectionare care leagă proteina de suprafață celulară.

În general, o nucleotidă de interes poate fi o plasmidă de transfer, care poate cuprinde în general secvențe de repetare terminală inversată (ITR) 5' și 3' care flanchează gena(ele) raportor(e) sau gena(ele) terapeutică (care poate fi sub controlul unui promotor viral sau non-viral, atunci când este cuprins într-un vector AAV). Într-o variantă de realizare, o nucleotidă de interes este o plasmidă de transfer care cuprinde de la 5' la 3': un 5' ITR, un promotor, o genă (de exemplu, o genă reporter și/sau terapeutică) și un 3' ITR.

Exemple nelimitative de promotori utili includ, de exemplu, promotorul citomegalovirusului (CMV), promotorul virusului care formează focarul splinei (SFFV), promotorul factorului de alungire 1 alfa (EF1a) (promotorul EF1a de 1,2 kb sau 0,2 kb), promotorul EF1a, promotorul himeric EF 1 a/IF4 și promotorul fosfo-glicerat kinazei (PGK). Un amplificator intern poate fi de asemenea prezent în constructul viral pentru a crește expresia genei de interes. De exemplu, amplificatorul CMV (Kasuyama et al. 1989. J. Exp. Med. 169:13) poate fi folosit. În unele exemple de realizare, amplificatorul CMV poate fi utilizat în combinație cu promotorul 13-actină de pui.

O varietate de gene reporter (sau fragmente detectabile) pot fi încapsulate într-o structură multimerică care cuprinde proteinele a capsidei AAV recombinante descrise aici. Exemple de gene reporter includ, de exemplu, β -galactozidaza (gena lacZ codificată), proteina fluorescentă verde (GFP), proteina fluorescentă verde îmbunătățită (eGFP), MmGFP, proteina fluorescentă albastră (BFP), proteina fluorescentă albastră îmbunătățită (eBFP), mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, proteină galbenă fluorescentă (YFP), proteină galbenă fluorescentă îmbunătățită (eYFP), Emerald, CyPet, proteină fluorescentă cyan (CFP), Cerulean, T-Safir, luciferază, fosfatază alcalină sau o combinație a acestora. Metodele descrise aici demonstrează construcția vectorilor de țintire care folosesc utilizarea unei gene reporter care codifică proteina verde fluorescentă,

totuși, persoanele cu calificare, la citirea acestei dezvăluiri, vor înțelege că animalele non-umane descrise aici pot fi generate în absența unei genă reporter sau cu orice genă reporter cunoscută în domeniu.

O varietate de gene terapeutice pot fi, de asemenea, încapsulate în poate fi încapsulată într-o structură multimerică cuprinzând proteinele a capsidei AAV recombinante descrise aici, de exemplu, ca parte a unui vector de transfer. Exemplele nelimitative ale unei gene terapeutice includ pe cele care codifică o toxină (de exemplu, o genă sinucigașă), un anticorp terapeutic sau un fragment al acestuia, un sistem CRISPR/Cas sau o porțiune (porțiune) a acestuia, ARN antisens, siARN, shARN etc.

Un alt exemplu de realizare a prezentei invenții este un procedeu pentru prepararea unei proteine a capsidei AAV recombinante, metoda cuprinzând etapele de:

a) exprimarea unui acid nucleic care codifică proteina capsidă AAV recombinantă în condiții adecvate și

b) izolarea proteinei capsidă exprimate din etapa a).

Alte exemple de realizare ale prezentei invenții este o metodă pentru modificarea tropismului unui virus, metoda cuprinzând etapele de: (a) inserarea unui acid nucleic care codifică un epitop heterolog într-o secvență de acid nucleic care codifică o proteină capsidă AAV pentru a forma o secvență de nucleotide codificarea unei proteine a capsidei AAV modificată genetic care cuprinde epitopul heterolog și/sau (b) cultivarea unei celule de ambalare în condiții suficiente pentru producerea de vectori AAV, în care celula de ambalare cuprinde secvența de nucleotide. O altă variantă de realizare a prezentei invenții este o metodă pentru afișarea unui epitop heterolog pe suprafața unei proteine capsidă AAV, metoda cuprinzând etapele de: a) exprimarea acidului nucleic conform acestei invenții în condiții adecvate și b) izolarea proteina capsidă AAV exprimată din etapa a).

În unele exemple de realizare, celula de ambalare mai cuprinde o plasmidă auxiliară și/sau o plasmidă de transfer care cuprinde o nucleotidă de interes. În unele exemple de realizare, metodele cuprind în plus izolarea vectorilor virali adeno-asociați auto-complementari din supernatantul culturii. În unele exemple de realizare, metodele cuprind în plus lizarea celulei de ambalare și izolarea vectorilor virali adeno-asociați monocatenar din lizatul celular. În unele exemple de realizare, metodele mai includ (a) curățarea resturilor celulare, (b) tratarea supernatantului care conține vectori AAV cu ADNază I și MgCl₂, (c) concentrarea vectorilor virali, (d) purificarea vectorilor virali și (e) orice combinație de (a)-(d).

Celulele de ambalare utile pentru producerea vectorilor AAV descriși aici includ, de exemplu, celule animale permissive pentru virus sau celule modificate astfel încât să fie permissive pentru virus; sau construcția celulei de ambalare, de exemplu, cu utilizarea unui agent de transformare cum ar fi fosfatul de calciu. Exemple nelimitative de linii celulare de ambalare utile pentru producerea vectorilor AAV descriși aici includ, de exemplu, celule de rinichi embrionar uman 293 (HEK-293) (de exemplu, American Type Culture Collection [ATCC] Nr. CRL-1573), celule HEK-293 care conțin antigenul T mare SV40 (HEK-293T sau 293T), celule HEK293T/17, linie celulară de sarcom uman HT-1080 (CCL-121), linie celulară asemănătoare limfoblastului Raj i (CCL-86), glioblastom-astrocitom linia celulară asemănătoare epitelului U87-MG (HTB-14), linia celulară de limfom T HuT78 (TIB-161), celule NIH/3T3, celule ovariene de hamster chinezesc (CHO) (de exemplu, ATCC nr. CRL9618, CCL61, CRL9096), celule HeLa (de exemplu, ATCC nr. CCL-2), celule Vero, celule NIH 3T3 (de exemplu, ATCC nr. CRL-1658), celule Huh-7, celule BHK (de exemplu, ATCC nr. CCL10), celule PC12 (ATCC nr. CRL1721), celule COS, celule COS-7 (ATCC nr. CRL1651), celule RATI, celule L de șoarece (ATCC nr. CCL13), celule HLHepG2, celule CAP, CAP-T celule și altele asemenea.

Celule L929, sistemul de celule de ambalare virală FLY prezentat în Cosset și colab. (1995) J Virol 69,7430-7436, celule NS0 (mielom murin), celule amniocitare umane (de exemplu, CAP, CAP-T), celule de drojdie (inclusiv, dar fără a se limita la, *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris*), celule de plante (inclusiv, dar fără a se limita la, Tobacco NT1, BY-2), celule de insecte (inclusiv, dar fără a se limita la SF9, S2, SF21, Tni (de ex. Ridicat 5)) sau celule bacteriene (inclusiv, dar fără a se limita la, *E. coli*).

Pentru celule și sisteme de ambalare suplimentare, tehnici de ambalare și vectori pentru ambalarea genomului acidului nucleic în vectorul viral pseudotipizat, vezi, de exemplu, Polo, și colab., Proc Natl Acad Sci USA, (1999) 96:4598-4603. Metodele de ambalare includ utilizarea celulelor de ambalare care exprimă permanent componentele virale sau prin transfectarea tranzitorie a celulelor cu plasmide.

Alte exemple de realizare includ metode de redirecționare a unui virus AAV și/sau de eliberare a unui reporter sau a unei gene terapeutice la o celulă țintă, metoda cuprinzând o metodă pentru transducerea celulelor in vitro, metoda cuprinzând etapele de: contactarea celulei țintă cu combinația unui Vector AAV cuprinzând o capsidă cuprinzând o capsidă AAV recombinată care prezintă un epitop heterolog și o moleculă de legare multispecifică, în care molecula de legare multispecifică cuprinde (i) un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul și (ii) un ligand de redirecționare care leagă în mod specific un receptor exprimat de celula țintă. În unele exemple de realizare, o compoziție descrisă

aici cuprinde, sau o metodă descrisă aici combină, un vector AAV recombinant și o moleculă de legare multispecifică la un raport moleculă moleculă care restabilește eficiența de transducție a vectorului AAV similar cu cea a unui vector AAV de control de tip sălbatic. În unele exemple de realizare, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) variază de la 1:0,5 la 1:100. În unele exemple de realizare, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) variază de la 1:4 la 1:20. În unele realizări, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) variază de la 1:8 la 1:15. În unele realizări, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este 1:4. În unele realizări, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este 1:8. În unele exemple de realizare, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este 1:15. În unele realizări, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este 1:20. În unele exemple de realizare, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este mai mic de 1:100. În unele realizări, raportul dintre vectorul AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este mai mic de 1:50. În unele exemple de realizare, raportul dintre vectorul AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este mai mic de 1:20. În unele exemple de realizare, raportul dintre vectorul AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este mai mic de 1:15. În unele exemple de realizare, raportul vectorului AAV recombinant la moleculă de legare multispecifică (moleculă:moleculă) este mai mic de 1:10.

În unele exemple de realizare, celula țintă este *in vitro*. În alte exemple de realizare, invenția furnizează o compoziție pentru utilizare într-o metodă *in vivo* de tratament sau diagnostic, metoda cuprinzând eliberarea nucleotidei de interes la o celulă țintă care exprimă o proteină de suprafață celulară cuprinzând contactarea celulei țintă cu compoziția. Prin urmare, în astfel de exemple de realizare, celula țintă este *in vivo* la un subiect, de exemplu, un om.

Celulele țintă

O mare varietate de celule pot fi vizate pentru a elibera o nucleotidă de interes utilizând un vector AAV recombinant așa cum este dezvăluit aici. Celulele țintă vor fi alese în general pe baza nucleotidei de interes și a efectului dorit.

În unele exemple de realizare, o nucleotidă de interes poate fi eliberată pentru a permite unei celule țintă să producă o proteină care compensează o deficiență a unui organism, cum ar fi o deficiență enzimatică sau o deficiență imună, cum ar fi imunodeficiența combinată severă legată de X. Astfel, în unele exemple de realizare, sunt vizate celulele care ar produce în mod normal proteina la animal. În alte exemple de realizare, sunt vizate celulele din zona în care o proteină ar fi cea mai benefică.

În alte exemple de realizare, o nucleotidă de interes, cum ar fi o genă care codifică un siARN, poate inhiba expresia unei anumite gene într-o celulă țintă. Nucleotida de interes poate, de exemplu, inhiba expresia unei gene implicate într-un ciclu de viață al unui agent patogen. Astfel, celulele susceptibile la infecția cu agentul patogen sau infectate cu agentul patogen pot fi vizate. În alte exemple de realizare, o nucleotidă de interes poate inhiba expresia unei gene care este responsabilă pentru producerea unei toxine într-o celulă țintă.

În alte exemple de realizare, o nucleotidă de interes poate codifica o proteină toxică care ucide celulele în care este exprimată. În acest caz, celulele tumorale sau alte celule nedorite pot fi vizate.

În încă alte exemple de realizare, poate fi utilizată o nucleotidă de interes care codifică o proteină care trebuie colectată, cum ar fi o proteină terapeutică, iar celulele care sunt capabile să producă și să secrete proteina sunt vizate.

Odată ce o anumită populație de celule țintă este identificată în care se dorește expresia unei nucleotide de interes, este selectat un receptor țintă care este exprimat în mod specific pe acea populație de celule țintă. Receptorul țintă poate fi exprimat exclusiv pe acea populație de celule sau într-o măsură mai mare pe acea populație de celule decât pe alte populații de celule. Cu cât expresia este mai specifică, cu atât livrarea poate fi direcționată mai specific către celulele țintă. În funcție de context, cantitatea dorită de specificitate a markerului (și astfel a eliberării genei) poate varia. De exemplu, pentru introducerea unei gene toxice, o specificitate ridicată este cea mai preferată pentru a evita uciderea celulelor nețintite. Pentru exprimarea unei proteine pentru recoltare sau exprimarea unui produs secretat unde se dorește un impact global, poate fi necesară o specificitate mai mică a markerului.

Așa cum sa discutat mai sus, receptorul țintă poate fi orice receptor pentru care poate fi identificat sau creat un ligand de redirectionare. De preferință, receptorul țintă este o peptidă sau polipeptidă, cum ar fi un receptor. Cu toate acestea, în alte exemple de realizare, receptorul țintă poate fi un carbohidrat sau o altă moleculă care poate fi recunoscută de către un partener de legare. Dacă un partener de legare, de exemplu, ligand, pentru receptorul țintă este deja cunoscut, acesta poate fi utilizat

ca moleculă de afinitate. Cu toate acestea, dacă o moleculă de legare nu este cunoscută, anticorpul la receptorul țintă pot fi generați utilizând proceduri standard. Anticorpul pot fi apoi utilizați ca ligand de redirectionare ca parte a moleculei de legare multispecifică.

Astfel, celulele țintă pot fi alese pe baza unei varietăți de factori, incluzând, de exemplu, (1) aplicația particulară (de exemplu, terapia, exprimarea unei proteine care trebuie colectată și conferirea rezistenței la boli) și (2) expresia unei proteine marker cu cantitatea dorită de specificitate.

Celulele țintă nu sunt limitate în niciun fel și includ atât celule germinale și linii celulare, cât și celule somatice și linii celulare. Celulele țintă pot fi celule stem derivate din oricare origine. Când celulele țintă sunt celule germinale, celulele țintă sunt de preferință selectate din grupul constând din embrioni unicelular și celule stem embrionare (ES).

Compoziții farmaceutice, forme de dozare și administrare

O altă variantă de realizare furnizează un medicament care cuprinde cel puțin o proteină a capsidului AAV recombinată și o moleculă de legare multispecifică adecvată conform acestei invenții și/sau un acid nucleic conform acestei invenții, de preferință cel puțin o structură multimerică conform acestei invenții. De preferință, un astfel de medicament este util ca vector de transfer de gene.

De asemenea, aici sunt dezvăluite compoziții farmaceutice care cuprind vectorii AAV descriși aici și un purtător și/sau excipient acceptabil farmaceutic. În plus, aici sunt dezvăluite forme de dozare farmaceutică care cuprind vectorul AAV descris aici.

După cum s-a discutat aici, vectorii AAV descriși aici pot fi utilizați pentru diverse aplicații terapeutice (*in vivo* și *ex vivo*) și ca instrumente de cercetare.

Compozițiile farmaceutice bazate pe vectorii AAV dezvăluite aici pot fi formulate în orice mod convențional utilizând unul sau mai mulți purtători și/sau excipienți acceptabili fiziologic. Vectorul AAV poate fi formulat pentru administrare, de exemplu, prin injectare, inhalare sau izolare (fie prin gură sau pe nas) sau prin administrare orală, bucală, parenterală sau rectală, sau prin administrare directă la o tumoră.

Compozițiile farmaceutice pot fi formulate pentru o varietate de moduri de administrare, inclusiv administrare sistemică, topică sau localizată. Tehnicile și formulările pot fi găsite, de exemplu, în Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa. Pentru administrarea sistemică, este preferată injecția, inclusiv intramusculară, intravenoasă, intraperitoneală și subcutanată.

În scopul injectării, compozițiile farmaceutice pot fi formulate în soluții lichide, de preferință în tampon compatibil fiziologic, cum ar fi soluția Hank sau soluția Ringer. În plus, compozițiile farmaceutice pot fi formulate sub formă solidă și redizolvate sau suspendate imediat înainte de utilizare. Formele liofilizate ale compoziției farmaceutice sunt de asemenea adecvate.

Pentru administrare orală, compozițiile farmaceutice pot lua forma, de exemplu, tablete sau capsule preparate prin mijloace convenționale cu excipienți acceptabili farmaceutici, cum ar fi agenți de legare (de exemplu, amidon de porumb pregelatinizat, polivinilpirolidonă sau hidroxipropil metilceluloză); substanțe de umplutură (de exemplu, lactoză, celuloză microcristalină sau fosfat acid de calciu); lubrifianți (de exemplu, stearat de magneziu, talc sau silice); dezintegranti (de exemplu, amidon de cartofi sau amidon glicolat de sodiu); sau agenți de umectare (de exemplu, laurii sulfat de sodiu). Tabletele pot fi de asemenea acoperite prin metode bine cunoscute în domeniu. Preparatele lichide pentru administrare orală pot lua forma, de exemplu, de soluții, siropuri sau suspensii, sau pot fi prezentate ca un produs uscat pentru constituire cu apă sau alt vehicul adecvat înainte de utilizare. Astfel de preparate lichide pot fi preparate prin mijloace convenționale cu aditivi acceptabili farmaceutici, cum ar fi agenți de suspendare (de exemplu, sirop de sorbitol, derivați de celuloză sau grăsimi comestibile hidrogenate); agenți de emulsionare (de exemplu, lecitină sau salcâm); vehicule neapoase (de exemplu, ulei acționat, esteri uleioși, alcool etilic sau uleiuri vegetale fracționate); și conservanți (de exemplu, metil sau propil-p-hidroxibenzoati sau acid sorbic). Preparatele pot conține, de asemenea, săruri tampon, agenți de aromatizare, coloranți și îndulcitori, după caz.

Compozițiile farmaceutice pot fi formulate pentru administrare parenterală prin injecție, de exemplu, prin injectare în bolus sau perfuzie continuă. Formulările pentru injectare pot fi prezentate într-o formă de dozare unitară, de exemplu, în fiole sau în recipiente cu doze multiple, cu un conservant adăugat opțional. Compozițiile farmaceutice mai pot fi formulate ca suspensii, soluții sau emulsii în vehicule uleioase sau apoase și pot conține alți agenți incluzând agenți de suspendare, stabilizare și/sau dispersare.

În plus, compozițiile farmaceutice pot fi de asemenea formulate ca preparat depozit. Aceste formulări cu acțiune prelungită pot fi administrate prin implantare (de exemplu, subcutanat sau intramuscular) sau prin injecție intramusculară. Astfel, de exemplu, compușii pot fi formulați cu materiale polimerice sau hidrofoabe adecvate (de exemplu, ca o emulsie într-un ulei acceptabil) sau rășini schimbătoare de ioni, sau ca derivați puțin solubili, de exemplu, ca o sare puțin solubilă. Alte sisteme de livrare adecvate includ microsfere, care oferă posibilitatea eliberării locale neinvazive de medicamente pe o perioadă lungă de timp. Această tehnologie poate include microsfere având o dimensiune precapilară,

care pot fi injectate printr-un cateter coronarian în orice parte selectată a unui organ fără a provoca inflamație sau ischemie. Terapeutul administrat este apoi eliberat lent din microsfere și absorbit de celulele din jur prezente în țesutul selectat.

Administrarea sistemică poate fi, de asemenea, prin mijloace transmucoase sau transdermice.

- 5 Pentru administrare transmucoasă sau transdermică, în formulare se utilizează penetranți adecvați barierei care trebuie permeate. Astfel de penetranți sunt în general cunoscuți în domeniu și includ, de exemplu, pentru administrare transmucoasă, săruri biliare și derivați ai acidului fusidic. În plus, detergenții pot fi utilizați pentru a facilita permeabilitatea. Administrarea transmucoasă poate avea loc folosind spray-uri nazale sau supozitoare. Pentru administrare topică, vectorul AAV descris aici poate fi formulat în
- 10 unguente, unguente, geluri sau creme, așa cum este cunoscut în general în domeniu. O soluție de spălare poate fi, de asemenea, utilizată local pentru a trata o leziune sau o inflamație pentru a accelera vindecarea.

- Formele farmaceutice adecvate pentru utilizare injectabilă pot include soluții sau dispersii apoase sterile; formulări incluzând ulei de susan, ulei de arahide sau propilenglicol apos; și pulberi sterile pentru prepararea extemporanee a soluțiilor sau dispersiilor sterile injectabile. În toate cazurile, forma trebuie să
- 15 fie sterilă și trebuie să fie fluidă. Trebuie să fie stabil în condițiile de fabricație și în anumiți parametri de depozitare (de exemplu, refrigerare și congelare) și trebuie păstrat împotriva acțiunii contaminante a microorganismelor, cum ar fi bacteriile și ciupercile.

- Dacă formulările dezvăluite aici sunt utilizate ca agent terapeutic pentru a stimula un răspuns imun la un subiect, un agent terapeutic poate fi formulat într-o compoziție într-o formă neutră sau de sare.
- 20 Sărurile acceptabile farmaceutic includ sărurile de adăugare acidă (formate cu grupările amino libere ale proteinei) și care sunt formate cu acizi anorganici, cum ar fi, de exemplu, acizi clorhidric sau fosforic, sau acizi organici precum acetic, oxalic, tartric, mandelic, și altele asemenea. Sărurile formate cu grupările carboxil libere pot fi, de asemenea, derivate din baze anorganice cum ar fi, de exemplu, hidroxizi de sodiu, potasiu, amoniu, calciu sau ferici, și baze organice precum izopropilamină, trimetilamină, histidină, procaină și altele asemenea.
- 25

- Un purtător poate fi, de asemenea, un solvent sau un mediu de dispersie care conține, de exemplu, apă, etanol, poliol (de exemplu, glicerol, propilen glicol și polietilen glicol lichid și altele asemenea), amestecuri adecvate ale acestora și uleiuri vegetale. Fluiditatea adecvată poate fi menținută, de exemplu, prin utilizarea unui înveliș, cum ar fi lecitină, prin menținerea dimensiunii necesare a
- 30 vectorului viral în cazul dispersiei și prin utilizarea agenților tensioactivi. Prevenirea acțiunii microorganismelor poate fi realizată de diverși agenți antibacterieni și antifungici cunoscuți în domeniu. În multe cazuri, va fi preferabil să se includă agenți izotonici, de exemplu, zaharuri sau clorură de sodiu. Absorbția prelungită a compozițiilor injectabile poate fi realizată prin utilizarea în compoziții a agenților care întârzie absorbția, de exemplu, monostearat de aluminiu și gelatină.

- 35 Soluțiile injectabile sterile pot fi preparate prin încorporarea compușilor activi sau a construcțiilor în cantitatea necesară în solventul adecvat cu diverși dintre celelalte ingrediente enumerate mai sus, după cum este necesar, urmată de sterilizare prin filtrare.

- La formulare, soluțiile pot fi administrate într-o manieră compatibilă cu formularea de dozare și într-o cantitate care este eficientă terapeutic. Formulările se administrează cu ușurință într-o varietate de
- 40 forme de dozare, cum ar fi tipul de soluții injectabile descrise mai sus, dar pot fi de asemenea folosite capsule cu eliberare lentă sau microparticule și microsfere și altele asemenea.

- Pentru administrarea parenterală într-o soluție apoasă, de exemplu, soluția trebuie tamponată corespunzător dacă este necesar și diluantul lichid trebuie făcut mai întâi izotonic cu suficientă soluție salină sau glucoză. Aceste soluții apoase particulare sunt adecvate în special pentru administrare
- 45 intravenoasă, intratumorală, intramusculară, subcutanată și intraperitoneală. În acest context, mediile apoase sterile care pot fi folosite vor fi cunoscute de specialiștii în domeniu, în lumina prezentei dezvăluiri. De exemplu, o doză poate fi dizolvată în 1 ml de soluție izotonă de NaCl și fie adăugată la 1000 ml de lichid de hipodermocliză, fie injectată la locul propus de perfuzie.

- Persoana responsabilă de administrare va determina, în orice caz, doza adecvată pentru subiectul individual. De exemplu, unui subiect i se pot administra vectori AAV descriși aici zilnic sau săptămânal pentru o perioadă de timp sau lunar, bianuar sau anual, în funcție de nevoia sau expunerea la un organism
- 50 patogen sau la o afecțiune a subiectului (de exemplu cancer).

- În plus față de compușii formulați pentru administrare parenterală, cum ar fi injecția intravenoasă, intratumorală, intradermică sau intramusculară, alte forme acceptabile farmaceutic includ,
- 55 de exemplu, tablete sau alte solide pentru administrare orală; formulări lipozomale; capsule cu eliberare în timp; biodegradabile și orice altă formă utilizată în prezent.

Se pot folosi, de asemenea, soluții sau spray-uri intranazale sau inhalabile, aerosoli sau inhalanți. Soluțiile nazale pot fi soluții apoase concepute pentru a fi administrate în căile nazale în picături sau spray-uri. Soluțiile nazale pot fi preparate astfel încât să fie similare în multe privințe cu secrețiile nazale.

Astfel, soluțiile nazale apoase sunt de obicei izotonice și ușor tamponate pentru a menține un pH de 5,5 până la 7,5. În plus, în formulare pot fi incluși conservanți antimicrobieni, similari celor utilizați în preparatele oftalmice și stabilizatori adecvați de medicamente, dacă este necesar. Sunt cunoscute diverse preparate nazale comerciale care pot include, de exemplu, antibiotice și antihistaminice și sunt utilizate

5

pentru profilaxia astmului.

Formulările orale pot include excipienți ca, de exemplu, clase farmaceutice de manitol, lactoză, amidon, stearat de magneziu, zaharină de sodiu, celuloză, carbonat de magneziu și altele asemenea. Aceste compoziții iau forma de soluții, suspensii, tablete, pastile, capsule, formulări cu eliberare susținută sau pulberi. În anumite realizări definite, compozițiile farmaceutice orale vor include un diluant inert sau

10

un purtător comestibil asimilabil sau pot fi închise într-o capsulă de gelatină tare sau moale, sau pot fi comprimate în tablete sau pot fi încorporate direct cu hrana din dieta. Pentru administrarea terapeutică orală, compușii activi pot fi încorporați cu excipienți și utilizați sub formă de tablete ingerabile, tablete bucale, pastile, capsule, elixiruri, suspensii, siropuri, napolitane și altele asemenea.

Tabletele, pastilele, pastilele, capsulele și altele asemenea pot conține, de asemenea, următoarele:

15

un liant, ca gumă tragacanth, salcâm, amidon de porumb sau gelatină; excipienți, cum ar fi fosfat dicalcic; un agent de dezintegrare, cum ar fi amidon de porumb, amidon de cartofi, acid alginic și altele asemenea; un lubrifiant, cum ar fi stearat de magneziu; și se poate adăuga un agent de îndulcire, cum ar fi zaharoză, lactoză sau zaharină sau un agent de aromatizare, cum ar fi aroma de mentă, ulei de iarnă sau aromă de cireș.

20

Când forma unitară de dozare este o capsulă, aceasta poate conține, în plus față de materialele de tipul de mai sus, un purtător lichid. Diferite alte materiale pot fi prezente ca acoperiri sau pentru a modifica în alt mod forma fizică a unității de dozare. De exemplu, tabletele, pastilele sau capsulele pot fi acoperite cu șelac, zahăr sau ambele. Un sirop de elixir poate conține compușii activi zaharoză ca agent de îndulcire metil și propilparabeni ca conservanți, un colorant și aromă, cum ar fi aromă de cireș sau portocale.

25

Alte exemple de realizare dezvăluite aici se pot referi la truse pentru utilizare cu metode și compoziții. Trusele pot include, de asemenea, un container adecvat, de exemplu, flacoane, tuburi, tuburi mini- sau microcentrifugă, eprubetă, balon, sticla, seringă sau alt recipient. Acolo unde este furnizat un component sau un agent suplimentar, trusa poate conține unul sau mai multe recipiente suplimentare în care poate fi plasat acest agent sau component. Trusele de aici vor include, de asemenea, în mod obișnuit un mijloc pentru a conține vectori AAV și orice alte recipiente de reactiv în izolare strânsă pentru vânzare comercială. Astfel de recipiente pot include recipiente din plastic turnate prin injecție sau prin suflare în care sunt reținute flacoanele dorite. Opțional, unul sau mai mulți agenți activi suplimentari, cum ar fi, de exemplu, agenți anti-inflamatori, agenți anti-virali, agenți anti-fungici sau anti-bacterieni sau agenți anti-tumoral pot fi necesari pentru compozițiile descrise.

30

Intervalele de doză și frecvența administrării pot varia în funcție de natura vectorilor AAV și de starea medicală, precum și de parametrii unui anumit pacient și de calea de administrare utilizată. În unele exemple de realizare, compozițiile de vector AAV pot fi administrate unui subiect la o doză variind de la aproximativ 1×10^5 unități formatoare de plăci (pfu) până la aproximativ 1×10^{15} pfu, în funcție de modul de administrare, calea de administrare, natura boala și starea subiectului. În unele cazuri, compozițiile de vector AAV pot fi administrate la o doză variind de la aproximativ 1×10^8 pfu la aproximativ 1×10^{15} pfu, sau de la aproximativ 1×10^{10} pfu la aproximativ 1×10^{15} pfu, sau de la aproximativ 1×10^{15} pfu la aproximativ 1×10^{12} pfu. O doză mai precisă poate depinde și de subiectul la care este administrată. De exemplu, poate fi necesară o doză mai mică dacă subiectul este minor, și poate fi necesară o doză mai mare dacă subiectul este un subiect uman adult. În anumite exemple de realizare, o doză mai precisă poate depinde de greutatea subiectului. În anumite realizări, de exemplu, un subiect uman tânăr poate primi de la aproximativ 1×10^8 pfu la aproximativ 1×10^{10} pfu, în timp ce un subiect uman adult poate primi o doză de la aproximativ 1×10^{10} pfu la aproximativ 1×10^{12} pfu.

35

Compozițiile dezvăluite aici pot fi administrate prin orice mijloace cunoscute în domeniu. De exemplu, compozițiile pot include administrarea la un subiect intravenos, intratumoral, intradermic, intraarterial, intraperitoneal, intralezional, intracranial, intraarticular, intraprostatic, intrapleural, intratraheal, intranazal, intravitreal, intravaginal, intrarectal, topic, intratumoral, intramuscular, subcutanat, intramuscular, subcutat subconjunctival, intravezicular, mucos, intrapericardic, intraombilic, intraocular, oral, local, prin inhalare, prin injectare, prin perfuzie, prin perfuzie continuă, prin perfuzie localizată, printr-un cateter, prin lavaj, într-o cremă sau într-o compoziție lipidică.

50

Orice metodă cunoscută unui specialist în domeniu poate fi utilizată pentru producerea la scară largă a vectorilor AAV, a celulelor de ambalare și a constructelor de vectori descrise aici. De exemplu, stocurile de semințe principale și de lucru pot fi pregătite în condiții GMP în CEF primare calificate sau prin alte metode. Celulele de ambalare pot fi placate pe baloane cu suprafață mare, crescute până aproape de confluență și vectorii AAV purificați. Celulele pot fi recoltate și vectorii AAV eliberați în mediul de

55

cultură izolați și purificați, sau vectorii AAV intracelulari eliberați prin întrerupere mecanică (rețele celulare pot fi îndepărtate prin filtrare în adâncime a porilor mari și ADN-ul celulei gazdă digerat cu endonuclează). Vectorii virus AAV pot fi ulterior purificați și concentrați prin filtrare cu flux tangențial, urmată de diafiltrare. Vrac concentrat rezultat poate fi formulat prin diluare cu un tampon care conține stabilizatori, umplut în flacoane și liofilizat. Compozițiile și formulările pot fi păstrate pentru utilizare ulterioară. Pentru utilizare, vectorii AAV liofilizați pot fi reconstituiți prin adăugarea de diluant.

Anumiți agenți suplimentari utilizați în terapiile combinate pot fi formulați și administrați prin orice mijloace cunoscute în domeniu.

Compozițiile descrise aici pot include, de asemenea, adjuvanți cum ar fi săruri de aluminiu și alți adjuvanți minerali, agenți tensoactivi, derivați bacterieni, vehicule și citokine. Adjuvanții pot avea, de asemenea, proprietăți imunomodulatoare antagonizante. De exemplu, adjuvanții pot stimula imunitatea Th1 sau Th2. Compozițiile și metodele descrise aici pot include, de asemenea, terapia adjuvantă.

EXEMPLE

Următoarele exemple sunt furnizate doar în scopuri ilustrative și nu au scopul de a limita domeniul de aplicare al invenției.

Exemplul 1: Producerea de vectori virali adeno-asociați cu un epitop heterolog

Proteinele capsidei AAV sunt modificate pentru a conține unul dintre mai mulți epitopi heterologi: FLAG, c-myc, hexahistidină, etc. folosind PCR pentru a genera o plasmidă care codifică o proteină recombinată a capsidei. Pe scurt, secvența care codifică FLAG, c-myc sau hexahistidină este inserată în cadru după codonul care codifică N587 al unei proteine capsidale AAV2, Q585 al unei proteine capsidale AAV6 VP1, N590 al unei proteine capsidale AAV8 VP1, A589 al unei proteine capsidale AAV9 VP1 sau G453 al unei proteine a capsidalei AAV9 VP1.

Producerea virusului adeno-asociaat este realizată folosind o metodă de transfecție triplă cu celule HEK293 (vezi, de exemplu, Erik Arden și Joseph M. Metzger, *J Biol Methods*. 2016; 3(2)). Celulele sunt placcate cu o zi înainte de transfecția mediată de PEFpro (transfecția Polyplus, New York, NY) cu vectori adecvați:

O plasmidă auxiliară, pHelper (Agilent, Cat #240074);

O plasmidă care codifică gena AAV rep/cap de tip sălbatic sau modificată (pAAV RC2 (Cell Biolabs, Cat# VPK-422), de exemplu, pAAV RC2/6/9 (Cell Biolabs, Cat# VPK-426), pAAV RC8, pAAV RC2-N587myc, pAAV RC2/6-Q585myc, pAAVRC8-N590myc, pAAV RC9-A589myc etc.; și

O plasmidă care codifică o nucleotidă de interes și secvențe AAV ITR, de exemplu, pscAAV-CMV-eGFP, pAAV-CMVGFP (Agilent Cat# 240074), pAA V-EF1a-eGFP sau pAAV-CAGG-eGFP etc.

La șaptezeci și două de ore după transfecție, mediul este colectat și celulele sunt lizate în tampon [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl și 0,5% deoxicolat de sodiu (Sigma, Cat # D6750-100G)]. Apoi, benzonaza (Sigma, St. Louis, MO) este adăugată atât la mediu cât și la lizat celular la o concentrație finală de 0,5 U/μl înainte de incubare la 37 °C timp de 60 de minute. Lizatul celular este centrifugat la 4000 rpm timp de 30 min. Lizatul celular și mediul sunt combinate împreună și precipitate cu PEG 8000 (Teknova Cat # P4340) la o concentrație finală de 8%. Peletul este resuspendat în NaCl 400 mM și centrifugat la 10000 g timp de 10 minute. Virușii din supernatant sunt granulați prin ultracentrifugare la 149.000 g timp de 3 ore și titrați prin qPCR.

Pentru qPCR pentru titrarea genomilor AAV, probele AAV sunt tratate cu DNaseI (ThermoFisher Scientific, Cat #EN0525) la 37°C timp de o oră și lizate folosind extract de ADN All Reagents (ThermoFisher Scientific Cat# 4403319). Genomii virali încapsidați sunt cuantificați utilizând un sistem PCR în timp real QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific) folosind primeri direcționați către ITR-urile AAV2. Secvențele primerilor AAV2 ITR sunt 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' (fwd ITR; SECV ID NR:9) și 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3' (rev ITR; SECV ID NR:10) (Aurnhammer et al., 2012), a derivat secvența de repetare internă inversată stângă (ITR) din AAV și, respectiv, secvența de repetare inversă internă dreaptă (ITR) din AAV. Secvența sondei AAV2 ITRs este 5'-6-FAM-CACTCCCTCTTGCGGCTCG-TAMRA-3' (SECV ID NR:11) (Aurnhammer C., Haase M., Muether N., și colab., 2012, *Hum. Gene Ther. Metodele* 23, 18-28). După o etapă de activare la 95°C timp de 10 minute, se efectuează un ciclu PCR în două etape la 95°C timp de 15 secunde și 60°C timp de 30 de secunde pentru 40 de cicluri. TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Cat #4304437) a fost utilizat în qPCR. Plasmida ADN (Agilent, Cat #240074) este utilizată ca standard pentru a determina titrurile absolute.

Vectori virali adeno-asociați cuprinzând o capsidă în care a fost produs un epitop c-myc. În acest exemplu, un epitop c-myc (EQKLISEEDL; SECV ID NO:6) a fost inserat între aminoacizii N587 și R588 ai proteinei capsidale AAV2 VP1 sau între aminoacizii A589 și Q590 ai proteinei capsidale AAV9 VP1, adică nucleotida secvența care codifică epitopul c-myc (GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG; SECV ID NR:12) a fost inserată în plasmida pAAV RC2 (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA)

sau plasmida pAAV RC2/9, și fiecare dintre plasmidele pAAV RC2-N587Myc pAAV RC9-A589Myc modificate respective a fost utilizată pentru a codifica proteina capsidă modificată pentru vectorii virali AAV cu un tropism redus sau abolit.

Pentru a crea pAAV RC2-N587Myc, un prim produs de reacție în lanț a polimerazei (PCR) care cuprinde (de la 5' la 3') un situs de restricție BsiW1, secvența de nucleotide între pozițiile 3050 și 3773 a pAAV RC2 și un nucleu de supraînălțare a epitopului c-myc secvența și un al doilea produs PCR care cuprinde (de la 5' la 3') o secvență de nucleotide suprapuse epitopului c-myc, secvența de nucleotide dintre pozițiile 3774 până la 4370 ale pAAV RC2 și un situs de restricție PmeI au fost create folosind primerii prezentați în Tabelul 2. Plasmida pAAV RC2-N587Myc (adică o plasmidă pAAV RC2 modificată pentru a codifica epitopul c-myc între aminoacizii N587 și R588 ai proteinei capsidei VP1) a fost creată prin digerarea pAAV RC2 cu BsiW1 (New England Biolabs, R0551L) și P0551L (New England Biolabs, R0560L) și inserarea celor două produse PCR prin clonare independentă de ligatură, așa cum este descris în (2012) Methods Mol. Biol. 52:51-9.

Pentru a crea pAAV RC2/6-Q585Myc, a fost comandat de la Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa) un fragment de ADN gblock cuprinzând pozițiile 3700 și 3940 ale pAAV RC2/6 cu secvența c-myc-epitop inserată între 3757 și 3758. Plasmida pAAV RC2/6-Q585Myc a fost creată prin inserarea fragmentului gblock în pAAV RC2/6 digerat cu MscI (New England Biolabs, Cat# R0534L) și AflIII (New England Biolabs, Cat #R0520L) prin donarea independentă de ligatură, așa cum este descris în (2012) Metode Mol. Biol. 52:51-9.

Pentru a crea pAAV RC9-A589Myc, un prim produs de reacție în lanț a polimerazei (PCR) care cuprinde (de la 5' la 3') un situs de restricție BsiW1, secvența de nucleotide între pozițiile 3052 și 3779 a pAAV RC9 și un nucleu de supraînălțare a epitopului c-myc secvența și un al doilea produs PCR care cuprinde (de la 5' la 3') o secvență de nucleotide suprapuse epitopului c-myc, secvența de nucleotide dintre pozițiile 3779 până la 4404 ale pAAV RC9 și un situs de restricție PmeI au fost create folosind primerii prezentați în Tabelul 2.

Plasmida pAAV RC9-A589Myc (adică o plasmidă pAAV RC2/9 modificată pentru a codifica epitopul c-myc între aminoacizii A589 și Q590 ai proteinei capsidei VP1) a fost creată prin digerarea pAAV RC9 cu BsiW1 (New England Biolabs, R0553L) și PmeI (New England Biolabs, R0560L) și inserarea celor două produse PCR prin donarea independentă de ligatură așa cum este descris în (2012) Methods Mol. Biol. 52:51-9.

Tabelul 2

Produs PCR	Nume de amorsare	5'-Secvența-3' și (SECV ID NR:)
3050-3773 pAAVRC2-cMyc	pAAVRC2BsiWF	GGAGTACCAGCTCCCGTACG ¹ (SECV ID NR:13)
	N587mycR	CTC TTC TGA GAT TTT TTG TTC GTTGCTCTCTGGAGGTTG (SECV ID NR:14)
cMyc-3774-4370 pAAVRC2	N587mycF	AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AGACAAGCAGCTACCGCAG (SECV ID NR:15)
	pAAVRC2PmeR	TCCGCCCCGCTGTTTAAAC ² (SECV ID NR:16)
pAAVRC9-cMyc	pAAVRC9BsiWF	ACTCAGACTATCAGCTCCCGTACG ¹ (SECV ID NR:17)
	A589mycR	CTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTGCTTGGGC ACTCTGGT (SECV ID NR:18)
cMyc-pAAVRC9	A589mycF	AAACTCATCTCAGAGAGGATCTGCAGGCGCA GACCGG (SECV ID NR:19)
	pAAVRC9PmeR	CTCCGCCCCGCTGTTTAAAC ² (SECV ID NR:20)
Secvențele de subliniere reprezintă situsuri de recunoaștere a enzimelor de restricție.		
¹ BsiW1		
² PmeI		

pscAAV-CMV-eGFP a fost produs prin introducerea fragmentului GFP în vectorul pscAAV MCS (Cell Biolabs, Cat # VPK-430) utilizând site-ul de restricție BamHI și NotI. Plasmida pAAV-EF1a-eGFP și pAAV-CAGG-eGFP au fost realizate sinteza de novo de la Thermofisher Scientific (Waltham, MA).

Exemplul 2: Redirecționarea mediată de anticorpi a vectorilor virali AAV in vitro

HepG2 este o linie celulară de cancer hepatic uman, care exprimă receptorul 1 al asialoglicoproteinei marker specific hepatic (ASGR1). Pentru a testa dacă vectorii virali scAAV2-N587Myc-CMV-hrGFP pot infecta celulele HepG2, de exemplu, printr-un anticorp bispecific care recunoaște atât c-myc, cât și ASGR1 (anticorp anti-myc-ASGR1), amestecuri cuprinzând diferite rapoarte

ale numărului de genomi virali (5×10^9 genomi virali) la numărul de molecule de anticorpi (1:0,5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:15, 1:20, 1:50 sau 1:100) ale scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și anticorpii anti-myc-ASGR1 bispecifici au fost incubate la temperatura camerei timp de jumătate de oră și apoi adăugate la celulele HepG2. Celulele HepG2 au fost, de asemenea, incubate cu vectori virali scAAV2-CMV-eGFP de tip sălbatic, numai vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP sau vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP cu anticorp monospecific anti-myc (Regeneron Pharmaceuticals, Inc. Tarrytown, NY) într-un raport de 1:8 ca controale. La trei zile după infectare, expresia GFP de către celulele HepG2 infectate a fost confirmată prin sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) (**Figura 1**). Expresia GFP a fost, de asemenea, detectată într-un procent comparabil de celule HepG2 când s-a incubat cu scAAV2-CMV-eGFP de tip sălbatic și când s-a incubat cu vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 la un raport de 1:8 (44,6% și, respectiv, 44,1%, **Figurile 1A și 1G, panouri de sus și de jos**). Expresia mai scăzută a GFP a fost detectată de FACS în celulele HepG2 incubate cu un amestec de vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și anticorp anti-myc-ASGR1 bispecific mai mare sau mai mic (Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY) (**Figura 1C, panoul de jos**). În plus, GFP nu a fost detectată în celulele HepG2 infectate cu scAAV-N587Myc-CMV-eGFP în absența anticorpului anti-myc-ASGR1 sau în celulele HepG2 incubate cu scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și anticorp monospecific anti-myc.

În mod similar, celulele 293T-hASGR1, care sunt celule 29T3 modificate genetic pentru a exprima ASGR1 uman (h) pe suprafața celulei, au fost incubate cu amestecuri care cuprind diferite rapoarte dintre genomi virali și numărul de molecule de anticorpi (1:0,5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:15, 1:20 sau 1:100) de scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și anticorp bispecific anti-myc-ASGR1. Celulele 293T de tip sălbatic (care nu exprimă hASGR1) incubate cu un amestec de scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 într-un raport de 1:8 și celule 293T-hASGR1 incubate cu (a) scAAV de tip sălbatic numai vectori virali, (b) numai vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP sau (c) vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP cu un anticorp anti-myc-GCGR bispecific irelevant care recunoaște receptorul c-myc și glucagon (GCGR) (Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY) neexprimat de celulele 293T într-un raport de 1:8, a servit drept martori. La trei zile după infecție, celulele 293T-hASGR1 sau 293T au fost colorate cu anticorp uman anti-hASGR1 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY) urmat de anticorp anti-uman de capră conjugat APC (Jackson ImmunoResearch laboratories Inc, Cat # 109-136-136). 098, West Grove, PA) și expresia GFP analizată de FACS. Expresia hASGR1 a fost detectată pe suprafața celulelor 293T-hASGR1 (**Figurile 2Ai-2Ax și 2Axi**), dar nu și celulele 293T (**Figura 2Axi**). Celulele 293T-hASGR1 GFP pozitive au fost detectate după incubarea cu scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și amestecuri de anticorpi bispecifici anti-myc-ASGR1 cu rapoarte de 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:15, 1:20 și 1:50 la niveluri (56,9% până la 68,3%) comparabile cu celulele 293T-hASGR1 incubate cu scAAV de tip sălbatic (56,7%) (**Figurile 2Ai și 2Aiii-2Aix**). Un raport de 1:100 de scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 a scăzut infecțiozitatea (**Figura 2Ax**). Incubarea cu scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP singur sau scAAV-N587Myc cu un anticorp anti-myc-GCGR bispecific irelevant nu a dus la exprimarea GFP de către celulele 293T-hASGR1 (**Figurile 2Aii și 2Axi**).

Într-un experiment similar, celulele 293T-hASGR1 au fost incubate cu celule incubate doar cu vectori virali AAV9-CAGG-GFP nemodificați, numai vectori virali AAV9-A589Myc-CAGG-eGFP sau AAV9-A589Myc-CAGG-eGFP vectori virali amestecați cu vectori virali antibispecifici. - Anticorpi Myc-ASGR1 la diferite rapoarte

La trei zile după infectare, expresia GFP a fost analizată de FACS. Celulele 293T-hASGR1 GFP pozitive au fost detectate după incubarea cu AAV9-A589Myc-CAGG-eGFP și amestecuri de anticorpi bispecifici anti-myc-ASGR1 cu rapoarte de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:20, 1:50 și 1:100 la niveluri (41,1% până la 91%) comparabile cu celulele 293T-hASGR1 incubate cu AAV9-CAGG-eGFP de tip sălbatic (9,72%) (z și **Figurile 2B(iii)-(ix)**). Incubarea cu AAV9-A589Myc-CAGG-eGFP singur nu a dus la expresia GFP de către celulele 293T-hASGR1 (**Figura 2B(ii)**).

A fost testată capacitatea unui anticorp bivalent anti-hASGR1 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY) de a bloca infecția celulelor 293T-hASGR1. Celulele 293T-hASGR1 au fost incubate cu anticorpii anti-hASGR1 bivalent la diferite concentrații timp de 1 oră la temperatura camerei și, ulterior, au fost incubate cu un amestec care cuprinde un raport 1:8 de scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și anti-myc-ASGR1 bispecific anticorp. La trei zile după infectare, celulele au fost fixate și analizate prin FACS așa cum este descris mai sus. **Figura 3** oferă date care arată că intrarea scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP poate fi blocată într-o manieră dependentă de doză de către anticorpii anti-hASGR1 bivalent.

Pentru a determina dacă administrarea secvențială de anticorp bispecific și AAV modificat ar putea duce la redirectionarea mediată de anticorpi a AAV modificat, un număr diferit de molecule de anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 (cuprinzând de la 1×10^9 la 1×10^{12} molecule) s-au adăugat la 2

$\times 10^5$ 293T-hASGR1 celule timp de o oră, după care s-au adăugat 1×10^9 vectori virali scAAV-N587Myc. Controalele au inclus (1) celule 293T-hASGR1 incubate numai cu scAAV de tip sălbatic, adică în absența oricărui anticorp, (2) celule 293T-hASGR1 incubate secvențial cu 1×10^{11} molecule de anticorp bispecific anti-myc-GCGR irelevante și 1×10^9 vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP și (3) celule 293T, care nu exprimă hASGR1, incubate secvențial cu 1×10^{11} molecule de anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 și 1×10^9 vectori virali scAAV-N587Myc. La două zile după infecție, expresia GFP de către celulele 293T-hASGR1 infectate a fost vizualizată prin microscopie (**Figura 4**). Expresia GFP de către celulele 293T-hASGR1 a fost observată numai după incubarea cu scAAV de tip sălbatic și după incubarea secvențială cu molecule de anticorp anti-myc-ASGR1 la toate concentrațiile și scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP (**Figurile 4A, 4C-4I**). GFP nu a fost detectat în celulele 293T-hASGR1 numai după incubarea cu scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP (**Figura 4B**), în celulele 293T care nu exprimă ASGR1 după incubarea secvențială cu anticorp anti-myc-hASGR1 și vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP (**Figura 4J**) sau în celulele 293T-hASGR1 după incubare secvențială cu anticorpi anti-myc-GCGR bispecifici irelevanți și vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP (**Figura 4K**).

Așa cum este descris aici, tropismul AAV auto-complementar (scAAV) poate fi (1) inactivat, de exemplu, prin modificarea unei proteine a capsidei, de exemplu, prin inserarea unui epitop c-myc și, opțional, (2) redirecționat folosind bispecific anticorpi, de exemplu, cu un anticorp bispecific care recunoaște epitopul c-myc și un ligand exprimat de celula țintă. Pentru a determina dacă tropismul AAV monocatenar (ssAAV) poate fi în mod similar (1) redus sau abolit și, opțional, (2) redirecționat, celulele 293T-hASGR1 au fost incubate cu vectori virali ssAAV2-N587Myc-CMV-hrGFP produși așa cum este descris. În exemplul 1, în absența sau prezența anticorpului bispecific anti-myc-hASGR1 la diferite rapoarte vector viral:anticorp (1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:20, 1:100 sau 1:1000). Martorii au inclus celule 293T-hASGR1 incubate cu ssAAV de tip sălbatic, celule 293T-hASGR1 incubate cu vectori virali ssAAV2-N587Myc-CMV-hrGFP și anticorp anti-myc-GCGR bispecific irelevant la un raport vector viral:anticorp de 1:8 celule și 293T. (care nu exprimă hASGR1) incubate cu vectori virali ssAAV2-N587Myc-CMV-hrGFP și anticorp bispecific anti-myc-hASGR1 la un raport vector viral:anticorp de 1:8. La trei zile după infectare, celulele au fost fixate și expresia GFP a fost detectată de FACS (**Figura 5**). Expresia GFP a fost detectată în celulele 293T-hASGR1 incubate cu ssAAV de tip sălbatic și cu amestecuri de vectori virali ssAAV2-N587Myc-CMV-hrGFP și anticorpi bispecifici anti-myc-ASGR1 la toate rapoartele (**Figurile 5A, 5C-5I**). Expresia GFP nu a fost observată de celulele 293T incubate cu vectori virali ssAAV2-N587Myc-CMV-hrGFP și anticorpi bispecifici anti-myc-ASGR1 (**Figura 5J**) sau de celulele 293T-hASGR1 incubate cu vectori virali ssAAV2-N587Myc-hrGFP-CMV numai sau cu vectori virali ssAAV-N587Myc și anticorp bispecific anti-myc-GCGR bispecific irelevant (**Figurile 5B, 5K**).

Receptorul uman (h) glucagon (GCGR) nu este exprimat în mod normal de celulele 293T. Cu toate acestea, 293T-hGCGR este o linie celulară stabilă 293T modificată genetic pentru a exprima hGCGR pe suprafața celulei. Pentru a testa dacă redirecționarea vectorilor virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP poate fi mediată de anticorpi anti-myc-GCGR bispecific prin receptorul hGCGR, celulele 293T-hGCGR au fost incubate cu diferite amestecuri cuprinzând diferite rapoarte de scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP:anticorp anti-myc-GCGR bispecific. Vectorii virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP au fost amestecați cu anticorpi anti-myc-GCGR bispecific în raporturi de 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:15, 1:20, 1:50 sau 1:100 la temperatura camerei timp de o jumătate de oră înainte de adăugarea la celulele 293T-hGCGR. La trei zile după infecție, expresia GFP de către celulele 293T-hGCGR infectate a fost confirmată prin sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) (**Figura 6**). Un procent semnificativ de celule GFP pozitive a fost detectat după incubarea cu scAAV de tip sălbatic (**Figura 6A**) sau scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP/anticorp bispecific anti-myc-GCGR la un raport de 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:15, 1:20, 1:50 și 1:100 (**Figurile 6C-6K**). GFP nu a fost detectat în celulele 293T-hGCGR incubate cu vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP singuri sau vectori virali scAAV2-N587Myc-CMV-eGFP cu anticorp monospecific anti-myc (**Figurile 6B și 6L**, respectiv).

Jurkat este o linie celulară de leucemie cu celule T umane, care exprimă CD3 uman (h). Pentru a testa dacă redirecționarea vectorilor virali AAV6-Q585Myc-EF1a-eGFP poate fi mediată de anticorpi anti-myc-CD3 bispecific prin receptorul hCD3, celulele Jurkat au fost incubate cu diferite amestecuri cuprinzând diferite rapoarte de AAV6-Q585Myc-EF1a-eGFP:bispecific anticorp anti-myc-CD3. Vectorii virali AAV6-Q585Myc-EF1a-eGFP au fost amestecați cu anticorpi bispecifici anti-myc-CD3 în raporturi de 1:1, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000 la temperatura camerei timp de o jumătate de oră înainte de în plus față de celulele Jurkat. La trei zile după infectare, expresia GFP de către celulele Jurkat infectate a fost confirmată prin sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) (**Figura 7**). Un procent semnificativ de celule GFP pozitive a fost detectat după incubarea cu AAV6-EF1a-eGFP de tip sălbatic (**Figura 7B**) sau AAV6-Q585Myc-EF1a-eGFP/anticorp bispecific anti-myc-CD3 la un raport de 1:1, 1:5, 1:10 și 1:100

(Figurile 7D-7G). GFP nu a fost detectat în celulele Jurkat incubate cu vectori virali AAV6-Q585Myc-EF1a-eGFP (Figurile 7C).

În acest exemplu este descrisă inactivarea tropismului natural al mai multor serotipuri AAV autocomplementare (sc) sau monocatenar (ss) demonstrată prin incapacitatea scAAV2 sau ssAAV2 modificată genetic cu un epitop c-myc inserat între aminoacidul N587 și R588 al proteinei capsid VP1 (scAAV-N587myc sau ssAAV-N587myc), AAV6 cu un epitop c-myc inserat între Q585 și S586 și AAV9 pentru a infecta celulele infectate în mod normal cu AAV-uri de tip sălbatic (Figurile 1A-1B, 2A2-A2). -3B, 4A-4B, 5A-5B, 6A-6B și 7). În plus, este demonstrată în acest exemplu capacitatea unui anticorp bispecific care recunoaște epitopul c-myc și un al doilea ligand exprimat de celula țintă (de exemplu, hASGR1, hGCGR sau hCD3) de a redirecționa tropismul AAV modificat și de a media infecția celula țintă prin AAV pseudotipizat într-o manieră specifică ligandului (Figurile 1-7). Mai mult, acest exemplu demonstrează că administrarea simultană a sc- sau ss-AAV modificat genetic și a anticorpului bispecific nu este necesară pentru infecție, adică administrarea secvențială este suficientă pentru redirecționarea sc- sau ss-AAV modificat genetic in vitro (Figura 4).

Exemplul 3: Redirecționarea mediată de anticorpi a vectorilor virali modificați in vivo
Redirecționarea vectorilor virali către ficat cu diferite formate de molecule de legare multispecifice

Pentru a determina dacă anticorpul bispecific anti-myc-ASGR1 ar putea redirecționa vectorii virali scAAV2-N587myc-CMV-eGFP către celulele hepatice care exprimă hASGR1 in vivo, șoarecii s-au modificat genetic astfel încât celulele lor hepatice să exprime hASGR1 pe fundalul C57BL/6 și să controleze șoarecii de tip C57BL/6 au fost injectați cu 1×10^{11} (titrat prin qPCR) de tip sălbatic scAAV2-CMV-eGFP singur sau vectori virali scAAV2-N587myc-CMV-eGFP în combinație cu anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 și la 1: 8 raportul dintre genomul viral și moleculele de anticorpi intravascular. Martorii au inclus șoareci injectați cu soluție salină [250 mM NaCl] sau cu vector viral scAAV2-N587myc-CMV-eGFP singur. La zece zile după injectare, șoarecii au fost sacrificați și perfuzați transcordial cu 4% PFA. Organele ficatului, rinichilor și inimii au fost colectate și deshidratate în zaharoză 15% urmată de zaharoză 30%. Apoi organele au fost crio-secționate pe lame și colorate cu anticorp anti-EGFP de pui (Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. West Grove, PA) și anticorpul secundar anti-pui conjugat Alexa-488 (Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. West Grove, PA). (Figurile 8A-8C). Celulele pozitive GFP au fost detectate în ficat de la acele animale transgenice modificate pentru a exprima ASGR1 în ficat și injectate cu scAAV2-CMV-eGFP de tip sălbatic sau scAAV2-N587myc-CMV-eGFP în combinație cu anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 (Figurile 8A(i).) și 8A(iv)), și în ficatul de la șoareci C57BL/6 de tip sălbatic injectați cu scAAV2-CMV-eGFP de tip sălbatic (Figura 8A(v)). GFP nu a fost detectat în nicio probă de splină sau rinichi (Figurile 8B și 8C), nici în probele de ficat, splină sau rinichi de la niciun animal injectat cu ser fiziologic sau cu vectori virali scAAV2-N587myc-CMV-eGFP singuri (Figurile 8A(ii, iii, vi) , vii)), nici în probe de ficat prelevate de la animale C57BL/6 de tip sălbatic injectate cu scAAV2-N587myc-CMV-eGFP în combinație cu anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 (Figura 8A(viii)). În rezumat, combinația de vectori virali scAAV2-N587myc-CMV-eGFP și anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 a infectat numai acele celule (ficat) care exprimă hASGR1, sugerând cu tărie că vectorul viral scAAV2-CMV-eGFP a fost inactivat prin modificarea proteina capsidă, de exemplu, tropismul natural al vectorului viral scAAV ar putea fi redusă la abolită, de exemplu, cu un epitop c-myc, și astfel de vectori virali ar putea fi reactivați în mod specific, de exemplu, redirecționați în mod specific, de exemplu, către celulele hepatice in vivo, de exemplu, prin anticorpi bispecifici anti-myc-ASGR1.

În mod similar, pentru a determina dacă anticorpul bispecific anti-myc-ASGR1 ar putea redirecționa vectorii virali ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP către celulele hepatice care exprimă hASGR1 in vivo, șoarecii s-au modificat genetic astfel încât celulele lor hepatice să exprime hASGR1 pe fundal C57BL/6 și control Șoarecii C57BL/6 de tip sălbatic au fost injectați cu $2,18 \times 10^{11}$ (titrați prin qPCR) de tip sălbatic ssAAV2-CAGG-eGFP singur sau ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP vectori virali în combinație cu anticorpi bispecific anti-myc-ASGR1 Raport 1:4 dintre genomul viral și moleculele de anticorpi intravascular. Martorii au inclus șoareci injectați cu PBS sau cu vector viral ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP singur. La patru săptămâni după injectare, șoarecii au fost sacrificați și perfuzați transcordial cu 4% PFA. Organele ficatului, rinichilor și inimii au fost colectate și deshidratate în zaharoză 15% urmată de zaharoză 30%. Apoi organele au fost crio-secționate pe lame și colorate cu anticorp anti-EGFP de pui (Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. West Grove, PA) și anticorpul secundar anti-pui conjugat Alexa-488 (Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. West Grove, PA). Celulele pozitive GFP au fost detectate în ficat de la acele animale transgenice modificate pentru a exprima ASGR1 în ficat și injectate cu ssAAV2-CAGG-eGFP de tip sălbatic sau ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu anticorp bispecific anti-myc-ASGR1 (Figurile 9E-9F, 9P -9R) și în ficatul de la șoareci C57BL/6 de tip sălbatic injectați cu ssAAV2-CAGG-eGFP de tip sălbatic (Figura 9B-9C). În mod surprinzător,

eficiența infecției ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu anticorpii bispecifici anti-myc-ASGR1 este mult mai mare decât WT ssAAV2-CAGG-GFP (**Figurile 9E-9F, 9P-9R**). GFP nu a fost detectat sau abia detectat în probele de ficat de la orice animal injectat cu ser fiziologic sau vectori virali ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP singur (**Figurile 9A, 9D, 9G-9L**)), nici în probele de ficat prelevate de la tipul sălbatic C57BL/6 animalele injectate cu ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu anticorpii bispecifici anti-myc-ASGR1 (**Figura 9M-9O**). În rezumat, combinația de vectori virali ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP și anticorpii bispecifici anti-myc-ASGR1 a infectat numai acele celule (ficat) care exprimă hASGR1, sugerând cu tărie că vectorul viral ssAAV2-N587myc-CAGG-eGFP a fost inactivat de către modificarea proteinei capsidului, de exemplu, tropismul natural al vectorului viral scAAV ar putea fi redusă la abolit, de exemplu, cu un epitop c-myc, și astfel de vectori virali ar putea fi reactivați în mod specific, de exemplu, redirecționați în mod specific, de exemplu, către celulele hepatice în vivo, de exemplu, prin anticorpi bispecifici anti-myc-ASGR1.

Au fost efectuate experimente suplimentare cu un vector viral AAV9 pseudotipizat cu șoareci modificați genetic astfel încât celulele lor hepatice să exprime hASGR1 pe fundal C57BL/6. Acești șoareci au fost injectați cu 1×10^{11} (titrat prin qPCR) de particule virale AAV9-CAGG-eGFP de tip sălbatic sau AAV9-A589myc-CAGG-eGFP în combinație cu anticorpii bispecifici anti-myc-ASGR1 la un raport de 1:100 al genomului viral la moleculele de anticorpi intravasculare. Martorii au inclus șoareci injectați cu PBS sau cu particule virale AAV9-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu anticorpii anti-myc-hCD3 bispecifici irelevanți. La patru săptămâni după injectare, șoarecii au fost sacrificați. Ficații au fost fixați cu formol 10% și trimise la HistoWiz, Inc (New York, NY) pentru colorarea GFP. Celulele GFP pozitive au fost detectate în ficat de la acele animale injectate cu particule virale AAV9-CAGG-eGFP de tip sălbatic sau AAV9-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu anticorpii bispecifici anti-myc-ASGR1 (**Figurile 10A și 10D**). GFP nu a fost detectat sau abia detectat în probele de ficat de la orice animal injectat cu ser fiziologic sau cu particule virale AAV9-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu anticorpii bispecifici anti-myc-hCD3, respectiv (**Figurile 10B și 10C**). În rezumat, în mod similar cu AAV2, tropismul natural al AAV9 poate fi redus la abolit prin modificarea proteinei capsidului, de exemplu, prin inserarea unui epitop c-myc, și că un astfel de vector viral modificat, de exemplu, AAV9-A589myc, poate să fie redirecționat către tipuri de celule specifice utilizând proteina de legare a markerului specific anti-epitop-celulă bispecifică corespunzătoare, de exemplu, anticorpii bispecifici anti-myc-ASGR1 la celulele hepatice.

Anti-myc scFc-Adăugat la formatul Fc anti-hASGR1 IgG4-în orificiu

Pentru a determina dacă diferite formate de molecule de legare multispecifice ar putea media infecția AAV, scFv anti-myc a fost fuzionat la capătul C-terminal al unui lanț al unui anticorp IgG4 anti-hASGR1 cu butoane în găuri (vezi Figura 11A). În mod specific, un gblock care codifică un scFv anti-myc (SEQ ID NR:28) flancat de brațe omoloage cu 1459-1478 și 1479-1498 ale pRG7078 care codifică un lanț greu IgG4 cu buton ascuns anti-hASGR1 a fost furnizat de tehnologiile Integrated DNA (Skokie, Illinois). Secvențele de nucleotide (NA) care codifică și secvențele de aminoacizi (AA) ale HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 ale scFv (SECV ID NR:37) codificate prin SECV ID NR:28 sunt prevăzute în Tabelul 3.

Tabelul 3: SECV ID NR asociate cu scFv prezentate ca SECV ID NR:37

	scFv	HCVR	LCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
AA	37	29	30	31	32	33	34	35	36
N/A	38	39	40						

gblock-ul a fost clonat în pRG7078 care codifică un lanț greu IgG4 cu nod ascuns anti-hASGR1 pentru a face un pRG7078 care codifică o polipeptidă de fuziune scFv IgG4 anti-myc cu nod ascuns anti-hASGR1 "anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc bispecifică." Plasmida pRG7078 modificată cu c-myc, pRG7078 anti-hASGR1 IgG4 stealth hole star nemodificată și o plasmidă care conține lanț ușor de anticorp, au fost transfectate în celule 293T, cultivate cu OPTI-MEM (Cat#31985070, Thermo Fisher). La patru zile după transfecție, mediul a fost colectat și molecula de legare bispecifică anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc a fost purificată utilizând coloană cu proteină A (cat # 89948, Thermo Fisher).

Pentru a crea un vector viral AAV8 pseudotipizat, pAAV RC8 N590myc, un gblock cu un epitop c-myc (SECV ID NR:22) inserat între N590 și T591 a unei proteine capsidului VP1 a AAV8 a fost comandat de la Integrated DNA Technologies (Skokie, Illinois). Plasmida pAAV RC8 (SECV ID NR:23) a fost digerată cu enzimele MluI și SbfI și blocul gb a fost clonat în vector utilizând SLIC pentru a produce pAAV RC8 N590myc (SECV ID NR:24).

Celulele 293T-hASGR1, care sunt celule 293T modificate genetic pentru a exprima ASGR1 uman (h) pe suprafața celulei, au fost incubate cu oricare dintre amestecuri cuprinzând diferite rapoarte de AAV8-N590myc-CAGG-eGFP la anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc molecule de legare bispecifică myc (1:0,

1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:12, 1:15, 1:50 sau 1:100) sau virale AAV8-CAGG-eGFP genomurilor. La trei zile după infectare, expresia GFP a fost analizată de FACS. Celulele 293T-hASGR1 GFP pozitive au fost detectate după incubarea cu amestecuri de AAV8-N590Myc-CAGG-eGFP și molecule bispecifice anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc la rapoarte de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:12, 1:15, 1:50 sau 1:100 (2,12% până la 22,2%; **Figurile 12D-12K**) comparabil cu celulele 293T-hASGR1 incubate cu AAV8-CAGG-eGFP de tip sălbatic (46,1%) (**Figura 12A**). Nici celulele infectate simulat (**Figura 12B**), nici incubarea cu AAV8-N590Myc-CAGG-eGFP singure nu au dus la exprimarea GFP de către celulele 293T hASGR1 (**Figura 12C**).

Pentru a determina dacă proteinele de legare bispecifice anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc ar putea redirecționa particulele virale AAV8 N590myc-CAGG-eGFP către celulele hepatice care exprimă hASGR1 in vivo, șoarecii s-au modificat genetic astfel încât celulele lor hepatice să exprime hASGR1 pe fundalul C57BL/6 au fost injectate intravascular cu 1×10^{11} (titrat prin qPCR) de particule virale AAV8-CAGG-eGFP de tip sălbatic sau AAV8 N590myc-CAGG-eGFP în combinație cu molecule de legare bispecifice anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc la un raport de 1:12 dintre genomul viral și moleculele de proteine de legare. Animalele martor au fost injectate cu particule virale AAV8 N590myc-CAGG-eGFP în combinație cu o moleculă de legare bispecifică anti-hCD3xanti-myc irelevantă având un format similar cu molecula de legare bispecifică anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc. La trei săptămâni după injectare, șoarecii au fost sacrificați și perfuzați transcardial cu 4% PFA. Organele ficatului, rinichilor și inimii au fost colectate și dehidratate în zaharoză 15% urmată de zaharoză 30%. Apoi organele au fost crio-sectionate pe lame și colorate cu anticorp anti-EGFP de pui (Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. West Grove, PA) și anticorpul secundar anti-pui conjugat Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. West Grove, PA). Celulele GFP pozitive au fost detectate în ficat de la acele animale injectate cu particule virale AAV8-CAGG-eGFP de tip sălbatic (**Figurile 13A-13C**) sau AAV8 N590myc-CAGG-eGFP în combinație cu legarea bispecifică anti-hASGR1-IgG4-Fc/anti-myc molecule (**Figurile 13G-13I**). GFP nu a fost detectat sau abia detectat în probele de ficat de la orice animal injectat cu particule virale AAV8 N590myc-CAGG-eGFP în combinație cu proteina irelevantă de legare anti-hCD3/myc (**Figurile 13D-13F**). În rezumat, AAV8 marcat cu epitop, de exemplu, AAV8-N590myc, poate fi redirecționat către un tip de celulă specific folosind o moleculă de legare bispecifică care leagă în mod specific epitopul și un marker specific celulei exprimat de tipul de celulă vizat.

Redirecționarea vectorilor virali către intestin și/sau pancreas

Celulele 293T modificate genetic pentru a exprima ectonucleozidul trifosfat difosfohidrolaza 3 umană (hENTPD3) pe suprafața celulei ("293T-ENTPD3") au fost incubate cu amestecuri care cuprind diferite rapoarte de AAV2-N587Myc-CAGG-eGFP sau AAV2-CAGG-GFP și genomi virali bispecfici moleculă de legare formată prin fuzionarea anti-myc scFv la capătul C-terminal al unui lanț al unui anticorp IgG4 anti-hENTPD3 (anti-hENTPD3-IgG4-Fc/anti-myc) în diferite rapoarte (1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:20, 1:50, 1:100 sau 1:200). La trei zile după infectare, expresia GFP a fost analizată de FACS. Celulele 293T-ENTPD3 GFP pozitive au fost detectate după incubare cu amestecuri de AAV2-N587Myc-CAGG-eGFP și anti-hENTPD3-IgG4-Fc/anti-myc la niveluri (1,48% până la 16%; **Figurile 14C-14J**) comparabile cu 293T- Celulele ENTPD3 incubate cu AAV2-CAGG-eGFP de tip sălbatic (66%) (**Figura 14A**). Incubarea cu AAV2-N587Myc-CAGG-eGFP singur are ca rezultat un nivel foarte scăzut de exprimare a GFP de către celulele 293T-ENTPD3 (**Figura 14B**).

S-a determinat că ENTPD3 este exprimat în mucoasa intestinului (datele nu sunt prezentate). Pentru a determina dacă proteina de legare anti-hENTPD3-IgG4-Fc/anti-myc ar putea redirecționa particulele virale AAV2-N587myc-CAGG-eGFP către celulele intestinale care exprimă ENTPD3 in vivo, șoarecii C57BL/6 au fost injectați intravascular cu 5×10^{11} (titrați de qPCR) Particule virale AAV2-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu proteine de legare anti-hENTPD3-IgG4-Fc/anti-myc la un raport de 1:20 dintre genomul viral și moleculele de proteine de legare. Șoarecii martor au fost injectați cu PBS, AAV9 de tip sălbatic sau cu particule virale AAV2-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu o moleculă de proteină de legare irelevantă.

La trei săptămâni după injectare, șoarecii au fost sacrificați. Ficatului, intestinelor și pancreasul au fost fixate cu formol 10% și trimise la HistoWiz, Inc (New York, NY) pentru colorarea GFP. Celulele GFP pozitive au fost detectate la șoareci injectați cu AAV9 de tip sălbatic (**Figura 15B(ii)**), dar nu și în ficatul de la șoareci injectați cu PBS sau particule virale AAV2-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu molecule de legare irelevante sau anti-hENTPD3-IgG4 Proteine de legare a -Fc/anti-myc (**Figura 15A(iii)-15A(iv)**, respectiv), indicând faptul că vectorii virali AAV2-N587myc nu infectează celulele hepatice ENTPD3-negative chiar și atunci când sunt co-injectați cu hENTPD3-IgG4-Fc/ proteine de legare anti-myc. GFP a fost detectată în intestinelor numai la șoareci injectați cu particule virale AAV9 sau AAV2-N587myc-CAGG-eGFP de tip sălbatic în combinație cu proteine de legare hENTPD3-IgG4-Fc/anti-myc (**Figurile 15B(i)-15B(iv)**). GFP este detectată în insulele pancreatice ale unui șoarece injectat

cu particule virale AAV2-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu proteine de legare anti-hENTPD3-IgG4-Fc/anti-myc. (Figura 15C(iv)). WT AAV9 a infectat atât celulele insulare, cât și celulele non-insulă ale pancreasului (Figura 15C(ii)). GFP nu a fost detectat în probele de pancreas de la șoareci injectați cu ser fiziologic sau particule virale AAV2-N587myc-CAGG-eGFP în combinație cu proteine de legare irelevante. (Figurile 7C(i) și 7C(iii)). În rezumat, tropismul natural al AAV poate fi redus la abolit prin inserarea unui epitop heterolog și redirecționat către aceeași celulă sau către alte celule folosind proteina de legare multispecifică care leagă eticheta epitopului și un marker exprimat de celulele sau țesuturile redirecționate.

Acest exemplu demonstrează că mai multe serotipuri diferite de vector viral adeno-asociat pot fi modificate genetic cu un epitop heterolog (de exemplu, c-myc) așa cum este descris aici pentru a inactiva infecțiozitatea și un anticorp bispecific (indiferent de formatele bispecifice) care recunoaște atât heterologul epitop (de exemplu, c-myc) și un marker exprimat de o celulă țintă pot fi utilizate pentru a redirecționa vectorul viral pentru a elibera o nucleotidă de interes.

Exemplul 4: Utilizarea vectorilor virali AAV-N587Myc modificați genetic pentru a furniza încărcătură terapeutică la celule specifice

Acest exemplu demonstrează capacitatea vectorilor virali AAV-N587Myc de a livra în mod specific încărcătură terapeutică, cum ar fi una sau mai multe gene sinucigașe, o terapie biologică (de exemplu, anticorp), un sistem de editare a genei CRISPR/Cas, shRNA etc., la un țintit. tipul de celule. În mod specific, acest exemplu descrie livrarea unei gene sinucigașe, a unei secvențe care codifică anticorpi sau a unui sistem de editare a genei CRISPR/Cas la celulele care exprimă un ligand țintit.

Livrarea unei gene sinucigașe la celulele care exprimă un ligand țintit

Pentru a testa capacitatea vectorilor virali scAAV2-N587Myc de a furniza o genă sinucigașă la o anumită celulă, un model de șoarece nud xenogrefă de cancer de sân HER2⁺ așa cum este descris de Wang și colab. ((2010) Cancer Gene Therapy 17:559-570).

Vectori virali: vectorii virali scAAV2-N587Myc sau ssAAV2-N587Myc care poartă o genă EGFP reporter (scAAV2-N587Myc-EGFP sau ssAAV2-N587MycEGFP) sunt generați așa cum este descris în Exemplul 1. o genă sinucigașă (SG) sunt generate în mod similar. Pe scurt, celulele 293T17 sunt transfectate cu (1) pAd Helper și (2) pAAV RC2 (codifică o capsidă de tip sălbatic) sau vectori pAAV RC2-N587Myc (codifică o capsidă modificată cu un epitop c-myc) așa cum este descris mai sus și cu (3) un vector pAAV care poartă o genă sinucigașă, de exemplu, gena citozin deaminazei, gena timidin kinazei virusului herpes simplex, sub controlul unui promotor, de exemplu, CMV. Vectorii virali ssAAV-N587MycSG sau scAAV-N587SG sunt izolați și titrați așa cum este descris în Exemplul 1.

Linii celulare: Liniile celulare de cancer de sân BT474, cancerul de sân SK-BR-3 și liniile de celule de cancer pulmonar Calu-3 sunt linii de celule tumorale umane pozitive HER2 (Bunn P.A. și colab., (2001) Clin Cancer Res. 7:3239-3250 ; Pegram M, și colab. (1999) Oncogene 18:2241-2251; Spiridon CI, și colab., (2002) Clin Cancer Res. 8 :1720-1730). Răbdomiosarcomul A-673 și cancerul de col uterin HeLa sunt linii de celule tumorale umane HER2 negative, iar BEAS-2b este o linie celulară HER2 negativă epitelială bronșică imortalizată (Jia LT și colab. (Jia LT și colab. 2003) Cancer Res. 63:3257-3262 ; Kern JA, și colab., (1993) Am J Respir Cell Mol Biol 9:448-454; Martinez-Ramirez A, și colab., (2003) Cancer Genet Cytogenet. 2003; 141:138-142). Toate aceste linii celulare sunt obținute din American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) și menținute în mediu recomandat de ATCC.

Șoareci: șoarecii nuzi femele, cu vârsta cuprinsă între 6 și 8 săptămâni sunt obținuți și găzduiți în condiții specifice fără agenți patogeni. În ziua 0, șoarecii sunt simultan (1) injectați subcutanat în flancul drept cu celule tumorale 10⁷ BT474, SK-BR-3, Calu-3, A-673 sau HeLa și (2) tratați intravenos cu anti-myc-HER2 bispecific anticorpi și vectori virali ss- sau scAAV-N587Myc purtând un reporter (de exemplu, EGFP) sau genă sinucigașă. Ca martori servesc animale netratate (animale injectate numai cu celule tumorale), animale injectate cu vectori virali ss- sau scAAV de tip sălbatic purtând o genă reporter sau sinucigașă, animale injectate numai cu anticorp bispecific anti-myc-HER2 sau animale injectate cu ss- sau vectori virali scAAV-N587Myc purtând doar o genă reporter sau sinucigașă. Toate animalele sunt tratate cu un pro-medicament adecvat la 1 zi după injectare și tratament. Mărimea fiecărei tumori este măsurată folosind șublere de 2 ori pe săptămână, iar volumul tumorii este calculat ca lungime x lățime²x0,52. După morbiditate, ulceratie tumorală, un diametru al tumorii de 15 mm sau un volum al tumorii de 1000 mm³, șoarecii sunt sacrificați și data sacrificiului este înregistrată ca data morții. Ficatul, splina, rinichii și tumorile animalelor injectate cu vectori virali de tip sălbatic ss- sau scAAV sau ss- sau scAAV-N587Myc care poartă o genă reporter sunt fixate și se vizualizează expresia genei reporter.

Deși a fost descrisă livrarea țintită a genelor inductoare de sinucidere (Zarogoulidis P., și colab. (2013) J. Genet. Sindr. Gene Ther. 4:16849), acest exemplu descrie livrarea unei gene sinucigașe la o celulă care exprimă ligand HER2 țintit utilizând vectorii virali descriși aici cuprinzând un epitop heterolog, de exemplu, c-myc, și un anticorp bispecific care leagă în mod specific ligandul țintă și

- epitopul heterolog. În experimente suplimentare, o genă sinucigașă este livrată unui alt tip de celulă care exprimă unul sau mai mulți alți liganzi țintă folosind un vector viral care cuprinde un epitop heterolog așa cum este descris aici și un anticorp bispecific care leagă în mod specific epitopul heterolog (de exemplu, c-myc) și receptorul țintă. Exemple exemplificative și nelimitative de receptori adecvați pentru țintire includ acei receptori care mediază endocitoza vectorului viral, de exemplu, antigenul carcino-embriionar (CEA) (Qiu Y, și colab. 2012) *Rac Lett.* 316:31-38) și receptorul factorului de creștere endotelial vascular (VEGFR) (Leng A, și colab. (2013) *Tumor Biol.*32:1103-1111; Liu T, et al. (2011) *Exp Mol Pathol.* 91:745-752). Receptorii suplimentari care pot fi vizați includ: receptorul factorului de creștere epidermic (EGFR) (Heimberger AB, et al. (2009) *Expert Opin Biol Ther.* 9:1087-1098), grup de 44 de diferențiere (CD44) (Heider KH, și colab. (2004) *Cancer Immunol Immunother.* 53:567-579), cluster de diferențiere 133 (CD133 aka AC133) (Zhang SS, și colab. (2012) *BMC Med.* ;10:85), receptor de folat (FR) (Duarte S, et al., (2011) *J Control Release* 149(3):264-72), receptor de transferină (TfR) sau diferențiere cluster 71 (CD71) (Habashy HO și colab., *Breast Cancer Res Treat.* 119(2):283-93), mucine (Torres MP, și colab., (2012) *Curr Pharm Des.* 2012; 18(17):2472-81), specific stadiului antigenul embrionar 4 (SSEA-4) (Malecki M., și colab., (2012) *J Stem Cell Res Ther.* 2(5)), antigen de rezistență tumorală 1-60 (TRA-1-60) (Malecki M., et al., (2013) *J Stem Cell Res Ther.* 3:134).

Secvențe:

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 Kyratsous, Christos
 Murphy, Andrew J
 Wang, Cheng
 Sabin, Leah

<120> Vectori virali recombinanți modificați cu tropism și utilizările acestora pentru introducerea țintită a materialului genetic în celulele umane

<130> 009108.335WO1/10335WO01

<150> 62/525,704

<151> 2017-06-27

<160> 40

<170> Brevet în versiunea 3.5

<210> 1

<211> 735

<212> PRT

<213> virusul adeno-asociat 2

<400> 1

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140

Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270

Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285

Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300

Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
370 375 380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
385 390 395 400

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr
435 440 445

Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
450 455 460

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
465 470 475 480

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
485 490 495

Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
500 505 510

Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
515 520 525

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys

530 535 540

Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
580 585 590

Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
595 600 605

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
610 615 620

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
625 630 635 640

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
645 650 655

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
660 665 670

Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys
675 680 685

Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr
690 695 700

Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr
705 710 715 720

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

<210> 2

<211> 745

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> AAV2 VP1 N587Myc

<400> 2

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
145 150 155 160

Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile

225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270

Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285

Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300

Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370 375 380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
385 390 395 400

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
 405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
 420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr
 435 440 445

Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 450 455 460

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
465 470 475 480

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
485 490 495

Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
500 505 510

Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
515 520 525

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
530 535 540

Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Glu Gln Lys Leu Ile
580 585 590

Ser Glu Glu Asp Leu Arg Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln
595 600 605

Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln
610 615 620

Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro
625 630 635 640

Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile
645 650 655

Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Ser Thr Thr Phe Ser
660 665 670

Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val
675 680 685

Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp
690 695 700

Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val
705 710 715 720

Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile
725 730 735

Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
740 745

<210> 3
<211> 736
<212> PRT
<213> virusul adeno-asociat 6
<400> 3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Phe Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
180 185 190

Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
260 265 270

Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
275 280 285

His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
290 295 300

Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
305 310 315 320

Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
325 330 335

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
340 345 350

Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
355 360 365

Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
370 375 380

Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
385 390 395 400

Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
405 410 415

Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
420 425 430

Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
435 440 445

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
450 455 460

Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
565 570 575

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
580 585 590

Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720

Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735

<210> 4

<211> 746

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> AAV6 VP1 Q585Myc

<400> 4

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Phe Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
180 185 190

Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
260 265 270

Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
275 280 285

His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
290 295 300

Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
305 310 315 320

Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
325 330 335

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
340 345 350

Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
355 360 365

Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
370 375 380

Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
385 390 395 400

Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
405 410 415

Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
420 425 430

Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
435 440 445

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
450 455 460

Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg

565 570 575

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
580 585 590

Glu Asp Leu Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala Thr Gly Asp Val His Val
595 600 605

Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu
610 615 620

Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His
625 630 635 640

Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln
645 650 655

Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Pro Ala Glu Phe
660 665 670

Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln
675 680 685

Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg
690 695 700

Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Ala Lys Ser Ala Asn
705 710 715 720

Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu Tyr Thr Glu Pro Arg Pro
725 730 735

Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
740 745

<210> 5
<211> 736
<212> PRT
<213> virusul adeno-asociat 9

<400> 5

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

MD/EP 3645551 T2 2024.08.31

64

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

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

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> c-myc

<400> 6

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> FLAG

<400> 7

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<223> HA

<400> 8

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Secvență artificială
<220>
<223> Fwd ITR primer

<400> 9

ggaacccta gtgatggagt t 21

<210> 10
<211> 16
<212> DNA
<213> Secvență artificială
<220>
<223> Rvs ITR primer

<400> 10
cggcctcagt gagcga 16

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> AAV2 ITRs probe

<400> 11
cactccctct ctgcgcgctc g 21

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Secvență artificială
<220>
<223> c-myc

<400> 12
gaacaaaaac tcattcaga agaggatctg 30

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> pAAVRCBsiWF

<400> 13
ggagtaccag ctcccgtacg 20

<210> 14
<211> 43
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> N587mycR

<400> 14
ctcttctgag atgagttttt gttcgttgcc tctctggagg ttg 43

<210> 15
<211> 43
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> N587mycF

<400> 15
aaactcatct cagaagagga tctgagacaa gcagctaccg cag 43

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> pAAVRCPmeR

<400> 16
tcgcccgcgt gtttaaac 18

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Secvență artificială
<220>
<223> pAAVRC9BsiWF

<400> 17
actcagacta tcagctcccg tacg 24

<210> 18
<211> 41
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> A589mycR

<400> 18
ctctctgag atgagttttt gttctgcttg ggcactctgg t 41

<210> 19
<211> 37
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> A589mycF

<400> 19
aaactcatct cagagaggat ctgcaggcgc agaccgg 37

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> pAAVRC9PmeR

MD/EP 3645551 T2 2024.08.31

70

<400> 20
ctccgccgc tgtttaaac

19

<210> 21
<211> 738
<212> PRT
<213> adeno-associated virus 8

<400> 21

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
180 185 190

Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
210 215 220

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225 230 235 240

Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
245 250 255

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp
260 265 270

Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
290 295 300

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
305 310 315 320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
325 330 335

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
370 375 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr
405 410 415

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
435 440 445

Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
450 455 460

Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His
500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile
530 535 540

Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
565 570 575

Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala
580 585 590

Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
595 600 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625 630 635 640

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe
660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
675 680 685

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
705 710 715 720

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

Asn Leu

<210> 22
<211> 453
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> AAV8 N590myc gblock

<400> 22
gacctgtta ccgccaacaa cgcgtctcaa cgacaaccgg gcaaaacaac aatagcaact 60
ttgcctggac tgcctgggacc aaataccatc tgaatggaag aaattcattg gctaatactg 120
gcatcgtat ggcaacacac aaagacgacg aggagcggtt tttccagat aacgggatcc 180
tgatttttg caaacaatat gctgccagag acaatgcgga ttacagcgat gtcattctca 240
ccagcgagga agaaatcaaa accactaacc ctgtggctac agagggaatac ggtatcgtgg 300
cagataactt gcagcagcaa aacgaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgacggctc 360
ctcaaattgg aactgtcaac agccaggggg cttaccggg tatggtctgg cagaaccggg 420
acgtgtacct gcagggtccc atctgggcca aga 453

<210> 23
<211> 7336
<212> DNA
<213> Secvență artificială
<220>
<223> pAAV RC2/8

<400> 23
gcgcgcgat atcgtaaacg ccccgcgccg gccgctctag aactagtga tccccggaa 60
gatcagaagt tctattccg aagtctctat tctctagaaa gtataggaac ttctgatctg 120

cgcagccgcc atgccggggt ttacgagat tgtattaag gtccccagcg accttgacga 180
 gcattgtccc ggcattttgt acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt 240
 gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga 300
 gaagctgcag cgcgacttct tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct 360
 tttttttgt caatttgaga agggagagag ctactccac atgcacgtgc tcttggaac 420
 caccgggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttctgagt cagattcgcg aaaaactgat 480
 tcagagaatt taccgcgga tcgagccgac ttgccaac tggttcgagg tcacaaagac 540
 cagaaatggc gccggaggcg ggaacaagg gtggatgag tgctacatcc ccaattactt 600
 gctcccaaaa acccagcctg agctccagt ggctggact aatatggaac agtatttaag 660
 cgctgtttg aatctcacgg agcgtaaag gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc 720
 gcagagcgag gagcagaaca aagagaatca gaatccaat tctgatcgcg cggatgacag 780
 atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac 840
 ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctcctca atgcggcctc 900
 caactcgcg tcaccaatca aggtgcctt ggacaatgc ggaagatta tgagcctgac 960
 taaaaccgcc cccgactacc tgggtggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg 1020
 gattataaa attttgaac taaacgggta cgatcccaa tatgcggctt cgtctttct 1080
 gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggtgtttg ggcctgcaac 1140
 taccgggaag accaaccatc cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt 1200
 aaactggacc aatgagaact tcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg 1260
 ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag 1320
 caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagaccga ctcccgtgat 1380
 cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga cttcgaaca 1440
 ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga 1500
 ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cgggtgggca aggatcacgt 1560
 ggttgagggt gagcatgaat ttactgtcaa aaagggtgga gccaaagaaa gacccgcccc 1620
 cagtgcgca gatataagt agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac 1680
 gtgagacgcg gaagcttca tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca 1740
 cgtgggcatg aatctgatgc tgttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc 1800
 aaatatctgc ttaactcag gcagaaaaga ctgttagag tgccttccc tgtcagaatc 1860

tcaaccggtt tetgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat 1920
 gggaaagggtg ccagacgctt gcaactgctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg 1980
 catctttgaa caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat ctccagatt 2040
 ggctcgagga caacctctct gagggcattc gcgagtgggt ggcgctgaaa cctggagccc 2100
 cgaagcccaa agccaaccag caaaagcagg acgacggccg gggctctgggt ctccctggct 2160
 acaagtacct cggacccttc aacggactcg acaaggggga gcccgtaac gcggcggacg 2220
 cagcggccct cgagcacgac aaggcctacg accagcagct gcaggggggt gacaatccgt 2280
 acctgcggtg taaccacgcc gacgccgagt ttcaggagcg tctgcaagaa gatacgtctt 2340
 ttggggggcaa cctcggggca gcagtcttc aggccaagaa gcgggttctc gaacctctcg 2400
 gtctggttga ggaaggcgct aagacggctc ctggaaagaa gagaccggtg gagccatcac 2460
 cccagcgttc tccagactcc tctacgggca tcggcaagaa aggccaacag cccgccagaa 2520
 aaagactcaa ttttggtcag actggcgact cagagtcagt tccagacct caacctctcg 2580
 gagaacctcc agcagcggcc tctggtgtgg gacctaatc aatggctgca ggcggtggcg 2640
 caccaatggc agacaatac gaagggccg acggagtggg tagttcctcg ggaattggc 2700
 attgcgattc cacatggctg ggcgacagag tcataccac cagcaccga acctggggcc 2760
 tgcccaccta caacaaccac ctctacaagc aaatctcaa cgggacatcg ggaggagcca 2820
 ccaacgacaa cactacttc ggctacagca cccctgggg gtatttgac ttaacagat 2880
 tccactgcca ctttcacca cgtgactggc agcgactcat caacaacaac tggggattcc 2940
 ggcccaagag actcagcttc aagctctca acatccaggt caaggaggtc acgcagaatg 3000
 aaggcaccaa gaccatgcc aataacctca ccagccat ccaggtgtt acggactcgg 3060
 agtaccagct gccgtacgtt ctcggctctg cccaccaggg ctgcctgcct ccgttccgg 3120
 cggacgtgtt catgattccc cagtacggct acctaact caacaacgt agtcaggccg 3180
 tgggacgctc ctctcttac tgctggaat acttcttc gcagatgctg agaaccggca 3240
 acaactcca gtttacttac acctcgagg acgtgcctt ccacagcagc tacgccaca 3300
 gccagagctt ggaccggctg atgaatctc tgattgacca gtacctgtac tactgtctc 3360
 ggactcaaac aacaggaggc acggcaaata cgcagactct gggttcagc caaggtgggc 3420
 ctaatacaat ggccaatcag gcaagaact ggctgccagg accctgttac cgccaacaac 3480
 gcgtctaac gacaaccggg caaaacaaca atagcaact tgcctggact gctgggacca 3540
 aataccatct gaatggaaga aattcattgg ctaactctgg catcgtatg gcaacacaca 3600
 aagacgacga ggagcggtt ttcccgatg acgggatcct gattttggc aaacaaaatg 3660

ctgccagaga caatgcggat tacagcgatg tcatgetcac cagcgaggaa gaaatcaaaa 3720
 ccactaacc tgtggctaca gaggaatacg gtatcgtggc agataactg cagcagcaaa 3780
 acacggctcc tcaaattgga actgtcaaca gccagggggc cttaccgggt atggtctggc 3840
 agaaccggga cgtgtacctg cagggtccca tctgggcca gattctcac acggacggca 3900
 acttcaccc gtctccgctg atgggcgggt ttggcctgaa acatctccg cctcagatcc 3960
 tgatcaagaa cagcctgta cctgeggatc ctccgaccac cttcaaccag tcaaagctga 4020
 actcttcat cagcaatac agcaccggac aggtcagcgt ggaaattgaa tgggagctgc 4080
 agaaggaaaa cagcaagcgc tggaaccccg agatccagta cactccaac tactacaaat 4140
 ctacaagtgt ggactttgct gtaatacag aaggcgtgta ctctgaacc cgcgccattg 4200
 gcaccgta cctcaccgt aatctgtaat tgcctgtaa tcaataaacc gtttaattc 4260
 tttagtga acttgggtct ctgcgtattt cttcttacc tagtttccat ggctacgtag 4320
 ataagtagca tggcgggta atcattaact acagccggg cgtttaaaca gcggcgagg 4380
 gggtaggagtc gtacgtgaa ttacgtcata gggttaggga ggtcctgtat tagaggtcac 4440
 gtgagtgttt tgcgacattt tgcgacacca tgtggtctcg ctgggggggg gggcccgagt 4500
 gagcacgcag ggtctccatt ttgaagcggg aggtttgaac gagcgtggc gcgctcactg 4560
 gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttaccaact taatgcctt 4620
 gcagcacatc ccccttgcg cagctggcgt aatagcgaag aggccgcac cgatgcctt 4680
 tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggaaattgt aagcgttaat atttgttaa 4740
 aattcgctt aaattttgt taaatcagct catttttta accaataggc cgaaatcggc 4800
 aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc gagatagggt tgagtgtgt tccagtttg 4860
 aacaagagtc cactattaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc 4920
 agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaataag tttttgggg tcgaggtgcc 4980
 gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gccccgatt tagagcttga cggggaaaagc 5040
 cggcgaacgt ggcgagaaa gaagggaaga aagcgaaagg agcgggcgt agggcgctgg 5100
 caagtgtagc ggtcacgtg cgcgtaacca ccacaccgc cgcgttaat gcgccgtac 5160
 agggcgctc aggtggcact ttctgggaa atgtgcgcg aaccttatt tgtttttt 5220
 tctaaataca ttcaatatg tatcgcgta tgagacaata accctgataa atgettcaat 5280
 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacattccg tgcgcctt attcccttt 5340
 ttgcggcatt ttgccttct gttttgtc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 5400

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaga 5460
 tccttgagag ttttgcgcc gaagaacgtt ttccaatgat gaggactttt aaagtctgc 5520
 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc gccgcatac 5580
 actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 5640
 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataacat gagtgataac actgcggcca 5700
 acttactct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgctttttg cacaacatgg 5760
 gggatcatgt aactgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaag 5820
 acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg 5880
 gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 5940
 ttgcaggacc actctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgt gataaatctg 6000
 gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtgaagcct 6060
 cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 6120
 agatcgtga gataggtgcc tcaatgatta agcattggtg actgtcagac caagtttact 6180
 catatactat ttatagttg taaaacttc attttaatt taaaaggatc taggtgaaga 6240
 tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gtttcttc cactgagcgt 6300
 cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttctg cgcgtaatct 6360
 gctgcttga aaaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgttgccg gatcaagagc 6420
 taccaactct tttccgaag gtaactggtc tcagcagagc gcagatacca aatactgttc 6480
 ttctagtga gccgtagta ggccaccact tcaagaactc ttagcaccg cctacatacc 6540
 tcgctctgt aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtctaccg 6600
 ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagc gtcgggctga acggggggtt 6660
 cgtgcacaca gccagcttg gagegaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 6720
 agctatgaga aagcgccacg ctcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 6780
 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgagg agcttcagg gggaaacgcc tggatcttt 6840
 atagtctgt cgggttctc cacctctgac ttgagctcg attttgtga tgcctcag 6900
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacggctc ctggccttt 6960
 gctggccttt tgcacatg ttcttctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 7020
 ttaccgctt tgagtgaact gataccgtc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat 7080
 cagtgaagca ggaagcggaa gagegccaa tacgcaaacc gcctctccc gcgcgttggc 7140
 cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt ttccgactg gaaagcgggc agtgagcga 7200

acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 7260

cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 7320

accatgatta cgccaa 7336

<210> 24

<211> 7366

<212> DNA

<213> Secvență artificială

<220>

<223> paav RC2/8 myc plasmid

<400> 24

gcgcgccgat atcgtaaacg ccccgcccg gccgctctag aactagtga tccccggaa 60

gacagaagt tctattccg aagtctctat tctctagaaa gtataggaa ttctgatctg 120

cgcagccgcc atgccggggt ttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga 180

gcattctgcc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt 240

gccgccgat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccctga ccgtggccga 300

gaagctgcag cgcgacttct tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct 360

ttttttgtg caatttgaga agggagagag ctactccac atgcacgtgc tcttggaac 420

caccgggggtg aaatccatgg ttttgggacg ttctctgagt cagattcgcg aaaaactgat 480

tcagagaatt taccgcccga tcgagccgac ttgccaac tggttcgagg tcacaaagac 540

cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt 600

gctcccaaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag 660

cgcctgtttg aatctcacgg agcgtaaac gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgc 720

gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatccaat tctgatgcgc cggtgatcag 780

atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac 840

ctcgagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctcctca atcgggcctc 900

caactcggg tcccaaatca aggtgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac 960

taaaaccgcc cccgactacc tgggtggcca gcagccctg gaggacattt ccagaatcg 1020

gatttataaa attttgaac taaacgggtg cgatecccaa tatcggtt ccgttttt 1080

gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgttg ggcctgcaac 1140

taccgggaag accaaccatc cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt 1200

aaactggacc aatgagaact ttccctcaa cgactgtgc gacaagatgg tgatctgtg 1260

ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag 1320
 caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctggcccag atagaccga ctcccgat 1380
 cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga cttcgaaca 1440
 ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa attgaactc acccgccgtc tggatcatga 1500
 ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cgttgggcaa aggatcacgt 1560
 ggttgagggtg gagcatgaat ttacgtcaa aaagggtgga gccaaagaaa gacccgcccc 1620
 cagtgcgca gatataagt agcccaaagc ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac 1680
 gtcagacgcg gaagcttga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctctca 1740
 cgtgggcatg aatctgatgc tgttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc 1800
 aaatatctgc ttcactcag gacagaaaga ctgtttagag tgctttccg tgcagaatc 1860
 tcaaccgtt tctgtctca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat 1920
 gggaaagggtg ccagacgctt gcactgcctg cgtctggtc aatgtggatt tggatgactg 1980
 catctttgaa caataatga ttaaatcag gtatggctgc cgtatgttat ctccagatt 2040
 ggctcgagga caacctctct gaggcattc gcgagtgggt ggcgctgaaa cctggagccc 2100
 cgaagcccaa agccaaccag caaaagcagg acgacggccg gggtctgtg cttcctggct 2160
 acaagtacct cggacccttc aacggactcg acaaggggga gcccgtaac gcggcggacg 2220
 cagcggccct cgagcacgac aaggcctacg accagcagct gcagcgggt gacaatccgt 2280
 acctgcggtg taaccacgcc gacgccgagt ttcaggagcg tctgcaagaa gatacgtctt 2340
 ttgggggcaa cctcgggca gcagtcttc aggccaagaa gcgggttctc gaacctctcg 2400
 gtctggttga ggaaggcgct aagacggctc ctggaaagaa gagaccggtg gagccatcac 2460
 cccagcgttc tccagactcc tctacgggca tcggcaagaa aggccaacag cccgccagaa 2520
 aaagactcaa ttttggtcag actggcgact cagagtcagt tccagacct caacctctcg 2580
 gagaacctcc agcagcgcgc tctggtgtgg gacctaatc aatggctgca ggcggtggcg 2640
 caccaatggc agacaatac gaaggcgccg acggagtggg tagttcctcg ggaaattggc 2700
 attgcgattc cacatggctg ggcgacagag tcataccac cagcaccga acctgggccc 2760
 tgcccaccta caacaaccac ctctacaagc aaatctcaa cgggacatcg ggaggagcca 2820
 ccaacgacaa cacctacttc ggctacagca cccctgggg gtattttgac ttaacagat 2880
 tccactgcca ctttaccac cgtgactggc agcgactcat caacaacac tggggattcc 2940
 ggcccaagag actcagcttc aagctcttca acatccaggt caaggaggtc acgcagaatg 3000
 aaggcaccaa gaccatgcc aataacctca ccagccat ccaggtgtt acggactcg 3060

agtaccagct gccgtacgtt ctggctctg cccaccaggg ctgctgcct cegttcccg 3120
 cggacgtgt catgattccc cagtacggct acctaacct caacaacgg agtcaggccg 3180
 tgggacgtc ctctttctac tgcctggaat actttcctc gcagatgctg agaaccggca 3240
 acaactcca gtttacttac acctcgagg acgtgcctt ccacagcagc tacgcccaca 3300
 gccagagctt ggaccggctg atgaatcctc tgattgacca gtacctgtac tactgtctc 3360
 ggactcaaac aacaggaggc acggcaaata cgcagactct gggttcage caagtgggc 3420
 ctaataaat ggccaatcag gcaagaact ggtgccagg acctgttac cgccaacaac 3480
 gcgtctaac gacaaccggg caaacaaca atagcaact tgcctggact gctgggacca 3540
 aatacatct gaatggaaga aattcattg ctaatcctg catcgctatg gcaacacaca 3600
 aagacgacga ggagcggtt ttccagta acgggatcct gattttggc aaacaaatg 3660
 ctgccagaga caatgcgat tacagcatg tcatgtcac cagcgaggaa gaaatcaaaa 3720
 ccactaacc tgtggctaca gaggaatac gtatcgtgc agataactg cagcagcaaa 3780
 acgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgacggtcc tcaaattga actgtcaaca 3840
 gccagggggc ctaccgggt atgtctggc agaaccggga cgtgtacctg cagggtccca 3900
 tctgggcaa gattctcac acggacggca acttcaccc gtctccgtg atggcggt 3960
 ttggcctgaa acatctccg cctcagatcc tgatcaagaa cacgcctgta cctgcggatc 4020
 ctccgaccac ctcaaccag tcaaagctga actcttcat cacgcaatac agcaccggac 4080
 aggtcagct ggaattgaa tgggagctgc agaaggaaaa cagcaagcgc tggaaccccg 4140
 agatccagta cacctcaac tactacaaat ctacaagtgt ggactttgt gtaatacag 4200
 aaggcgtgta ctctgaacc cgccccattg gcaccgtta cctacccgt aatctgta 4260
 tgcctgttaa tcaataaacc gtttaattc ttacagtga actttgtct ctgcgtatt 4320
 cttcttctc tagtttccat ggctacgtg ataagtagca tggcgggtta atcattaact 4380
 acagccggg cgtttaaca gcggcgagg ggggtggagtc gtgacgtgaa ttacgtcata 4440
 gggtaggga ggtcctgtat tagaggtcac gtgagtgtt tgcgacatt tgcgacacca 4500
 tgtgtctcg ctgggggggg gggcccgagt gagcacgcag ggtctccatt tgaagcggg 4560
 aggtttgaac gagcgtggc gcgctcactg gccgtcgtt tacaacgtc tgactgggaa 4620
 aacctggcg ttaccaact taatgcctt gcagcacatc ccccttgc cagctggcgt 4680
 aatagcgaag agggccgcac cgatcgccct tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa 4740
 tggaaattgt aagcgtaat atttgttaa aatcgctt aaattttgt taaatcagct 4800

cttttttta accaataggc cgaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc 4860
 gagatagggt tgagtgtgtg tccagtttgg aacaagagtc cactattaag aacgtggact 4920
 ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac 4980
 cctaataag tttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga 5040
 gccccgatt tagagcttga cggggaaaag cggcgaacgt ggcgagaaa gaagggaaga 5100
 aagcgaaaag agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgtg cgcgtaacca 5160
 ccacaccgc cgcgcttaat gcgcgctac agggcgctc aggtggcact ttteggggaa 5220
 atgtgcgcg aaccctatt tgtttttt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca 5280
 tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 5340
 aacatttcg tgcgcctt attcccttt ttgcggcatt ttgccttct gttttgctc 5400
 acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 5460
 acatcgaaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttteggccc gaagaacgtt 5520
 ttccaatgat gagcactttt aaagtctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 5580
 ccgggcaaga gcaactcgtt cgcgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 5640
 caccagtcac agaaaagcat ctacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg 5700
 ccataacat gagtgataac actgcggcca acttactct gacaacgac ggaggaccga 5760
 aggagctaac cgtttttt cacaacatgg gggatcatgt aactgcctt gatcgttggg 5820
 aaccggagct gaatgaagcc atacaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 5880
 tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggaac 5940
 aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 6000
 cggctggctg gtttattgt gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca 6060
 ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 6120
 gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgata 6180
 agcattggtg actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 6240
 atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tccttttga taatctcatg accaaaatcc 6300
 cttaacgtga gtttcgttc cactgagcgt cagaccccg agaaaagatc aaagatctt 6360
 cttgagatcc tttttctg cgcgtaatct gctgcttgc aacaaaaaa ccaccgtac 6420
 cagcgggtgt ttgttgccg gatcaagagc taccaactct ttccgaag gtaactggct 6480
 tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 6540
 tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgtctgct aatcctgtta ccagtggctg 6600

ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatat ttaccggata 6660
 aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga 6720
 cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg ctccccgaag 6780
 ggagaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 6840
 agcttcagg gggaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 6900
 ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 6960
 acgggcctt ttacggtc ctggccttt gctggcctt tgctcacatg ttcttctg 7020
 cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgaact gataccgctc 7080
 gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt cagtgaacga ggaagcggaa gagcgcccaa 7140
 tacgcaaacc gctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt 7200
 ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcga acgcaattaa tgtaggttag ctactcatt 7260
 aggcacccca ggctttacac ttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg 7320
 gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaa 7366

<210> 25

<211> 748

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> pAAV8N590myc

<400> 25

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

MD/EP 3645551 T2 2024.08.31

83

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
180 185 190

Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
210 215 220

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225 230 235 240

Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
245 250 255

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp
260 265 270

Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
290 295 300

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
305 310 315 320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
325 330 335

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
370 375 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr
405 410 415

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
435 440 445

Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
450 455 460

Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His
500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile
530 535 540

Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
565 570 575

Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Glu Gln
580 585 590

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Ala Pro Gln Ile Gly Thr Val
595 600 605

Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val
610 615 620

Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
625 630 635 640

Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro
645 650 655

Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
660 665 670

Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
675 680 685

Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
690 695 700

Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
705 710 715 720

Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
725 730 735

Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
740 745

<210> 26

<211> 746

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> pAAV9A589myc

<400> 26

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Glu Gln Lys
580 585 590

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn
595 600 605

Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu
610 615 620

Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His
625 630 635 640

Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln
645 650 655

Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe
660 665 670

Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln
675 680 685

Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg
690 695 700

Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn

705 710 715 720

Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro
 725 730 735

Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 740 745

<210> 27
<211> 746
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> pAAV9G453myc

<400> 27

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
 20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
 115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

385 390 395 400
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410 415
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440 445
Lys Thr Ile Asn Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser
 450 455 460
Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn
465 470 475 480
Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln
 485 490 495
Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn Asn Asn Ser Glu Phe Ala
 500 505 510
Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met
 515 520 525
Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe
 530 535 540
Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg
545 550 555 560
Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Glu Ile
 565 570 575
Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr
 580 585 590
Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn
 595 600 605
Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu
 610 615 620

Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His
625 630 635 640

Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln
 645 650 655

Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe
 660 665 670

Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln
 675 680 685

Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg
 690 695 700

Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn
705 710 715 720

Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro
 725 730 735

Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 740 745

<210> 28

<211> 814

<212> DNA

<213> Secvență artificială

<220>

<223> cmc-scfv-gblock

<400> 28

tctccctgtc tctgggtaaa ggcggaggtg gatccggagg gggcggtatct gacatccaga 60

tgaccacgtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgcc 120

gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca acagaaacca gggaaagccc 180

ctaagctcct gatctatgct gtttccattt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagtg 240

gcagtggatc tgggacagat ttcacttca ccatcaactc tctgcaacct gaagattttg 300

caacttactc ctgtcaacag acttacagta cccctccgat caccttcggc caagggacac 360

gactggagat taaaggaggg ggcgggctcag gaggaggggg tagtggggga ggcgggtccg 420

aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tggtagagcc tggagggtcc ctgagactct 480

cctgtgtcac ctctggattt cgttttagta gttatgaaat gaactgggtc cggcaggtc 540

caggggaaggg gctggaatgg atttcataca ttaacagaag tggttatacc atatactacg 600

cagcctctct gaagggccga ttcacatct ccagagacaa cgccaagaac tcaactgtatc 660
 ttcaaatgaa cagcctgaga gacgaggaca cggtatctta ttactgtgcg agagggagta 720
 tcgccctcgc gggggagatt cgacacatct ttgactactg gggccaggga accctggtea 780
 ccgtctctc atgatgagcg gccgctaate agcc 814

<210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> myc HCVR AA

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ser Tyr Ile Asn Arg Ser Gly Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ala Ala Ser Leu
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ile Ala Pro Arg Gly Glu Ile Arg His Ile Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120

<210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> myc LCVR AA

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> myc HCDR1

<400> 31

Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr Glu
 1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> myc HCDR2 AA

<400> 32

Ile Asn Arg Ser Gly Tyr Thr Ile
 1 5

<210> 33

<211> 2
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> myc HCDR3

<400> 33

Ala Arg
1

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> myc LCDR1 AA

<400> 34

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> myc LCDR2

<400> 35

Ala Ala Ser
1

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> myc LCDR3 AA

<400> 36

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
1 5

<210> 37
<211> 247
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>

<223> anti-myc scFv

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Val Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
115 120 125

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
130 135 140

Cys Val Thr Ser Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr Glu Met Asn Trp Val
145 150 155 160

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser Tyr Ile Asn Arg
165 170 175

Ser Gly Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ala Ala Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Ile

210 215 220

Ala Pro Arg Gly Glu Ile Arg His Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 38
<211> 774
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> anti-myc scFv NA

<400> 38
ggcggagggtg gatccggagg gggcggatct gacatccaga tgacceagtc tccatcctcc 60
ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcactgcc gggcaagtca gagcattagc 120
agctatttaa attggtatca acagaaacca gggaaagccc ctaagctct gatctatgct 180
gtttccattt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagt gtcagtggatc tgggacagat 240
ttcactctca ccatcaactc tctgcaacct gaagattttg caacttactc ctgtcaacag 300
acttacagta cccctccgat caccttcggc caagggacac gactggagat taaaggaggg 360
ggcggctcag gaggaggggg tagtggggga ggcggctccg aggtgcagct ggtggagtct 420
gggggagget tggtagagcc tggagggtcc ctgagactct cctgtgtcac ctctggattt 480
cgttttagta gttatgaaat gaactgggtc cgccaggctc cagggaagg gctggaatgg 540
atttcataca ttaacagaag tggttatacc atatactacg cagcctctct gaagggccga 600
ttcaccatct ccagagacaa cgccaagaac tcaactgtatc tcaaatgaa cagcctgaga 660
gacgaggaca cggctatcta ttactgtgcg agagggagta tcgcccctcg gggggagatt 720
cgacacatct ttgactactg gggccaggga accctggtea ccgtctctc atga 774

<210> 39
<211> 372
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> myc HCVR NA

<400> 39
gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgtca cctctggatt tegttagt agttatgaaa tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggaatg gatttcatac attaacagaa gtggttatac catatactac 180
gcagcctctc tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
cttcaaatga acagcctgag agacaggagc acggctatct attactgtgc gagagggagt 300
atcgccctc ggggggagat tcgacacatc ttgactact ggggccaggg aacctgtgc 360
accgtctcct ca 372

<210> 40
<211> 324
<212> DNA
<213> Secvență artificială

<220>
<223> myc LCVR NA

<400> 40
gacatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctct gatctatgct gcacccagtt tgcaaagtgg ggtcccgta 180
aggttcagtgc gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttgc caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- EP-A2- 2 158 211
- GRIFMAN M ET AL: "Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, ACADEMIC PRESS ; NATURE PUBLISHING GROUP, US, vol. 3, no. 6, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 964-975, XP002235294, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1006/MTHE.2001.0345
- C. L. BELL ET AL: "Identification of the Galactose Binding Domain of the Adeno-Associated Virus Serotype 9 Capsid", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 86, no. 13, 18 April 2012 (2012-04-18), pages 7326-7333, XP055165759, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00448-12
- WO-A2-00/26254
- WICKHAM T J ET AL: "TARGETED ADENOVIRUS-MEDIATED GENE DELIVERY TO T CELLS VIA CD3", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 71, no. 10, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 7663-7669, XP002935954, ISSN: 0022-538X
- MARTIN U RIED: "Adeno-Associated Virus Capsids Displaying Immunoglobulin-Binding Domains Permit Antibody-Mediated Vector Retargeting to Specific Cell Surface Receptors", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 76, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 4559-4566, XP055507786,

- BARTLETT J ET AL: "Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC, vol. 17, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 181-186, XP002135910, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/6185
- ULRICH BRINKMANN ET AL: "The making of bispecific antibodies", MABS, vol. 9, no. 2, 10 January 2017 (2017-01-10), pages 182-212, XP055374463, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2016.1268307

(57) Revendicări:

1. O compoziție care cuprinde
 - (i) un vector de virus adeno-asociat recombinant (AAV) care cuprinde o capsidă AAV care încapsulează o nucleotidă de interes, în care capsida AAV cuprinde o proteină a capsidei AAV recombinantă modificată pentru a cuprinde un epitop heterolog, în care proteina capsidă AAV recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidei AAV modificată pentru a exprima epitopul heterolog;
 - (ii) o moleculă de legare multispecifică care cuprinde
 - (a) un paratop de anticorp care leagă în mod specific epitopul heterolog; și
 - (b) un ligand de redirecționare care leagă în mod specific o proteină sau un marker de suprafață celulară; și opțional
 - (iii) un purtător acceptabil farmaceutic, în care capsida AAV prezintă:
 - tropism redus până la eliminat în absența moleculei de legare multispecifică; și
 - tropism modificat, la combinarea cu molecula de legare multispecifică, comparativ cu o capsidă de referință AAV, în care capsida de referință AAV cuprinde o proteină de referință a capsidei AAV care este identică cu proteina recombinantă a capsidei AAV, dar pentru lipsa epitopului heterolog.
2. Compoziție conform revendicării 1, în care proteina capsidă AAV recombinantă mai cuprinde o mutație în plus față de epitopul heterolog.
3. Compoziție conform revendicării 1 sau 2, în care epitopul heterolog este inserat astfel încât inserția reduce parțial tropismul capsidei AAV în comparație cu o capsidă AAV de referință lipsită de epitopul heterolog și proteina capsidei AAV mai cuprinde o mutație (de exemplu, o substituție, deleție, inserție alta decât inserția epitopului heterolog), în plus față de inserția epitopului heterolog, mutația reducând în continuare și/sau eliminând tropismul capsidei AAV recombinate în comparație cu o capsidă AAV de referință lipsită de mutație.
4. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 3, în care tropismul modificat la combinarea cu molecula de legare multispecifică înseamnă că tropismul capsidei AAV este restaurat și redirecționat în comparație cu tropismul capsidei AAV de referință.
5. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care
 - (i) epitopul heterolog cuprinde o etichetă de afinitate și un linker opțional și/sau
 - (ii) proteina capsidă AAV recombinantă cuprinde o secvență de aminoacizi EQKLISEEDL (prezentată ca SECV ID NR: 6) flancată de și/sau legată operațional la cel puțin 5 aminoacizi învecinați ai unei proteine a capsidei AAV.
6. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care epitopul heterolog cuprinde o secvență de aminoacizi EQKLISEEDL (SECV ID NR:6) sau o porțiune a acesteia și în care paratopul anticorpului leagă în mod specific secvența de aminoacizi EQKLISEEDL sau o porțiune a acesteia.
7. Compoziție conform revendicării 1, în care nucleotida de interes este:
 - (i) sub controlul unui promotor selectat din grupul constând dintr-un promotor viral, un promotor bacterian, un promotor de mamifer, un promotor aviar, un promotor de pește, un promotor de insectă și orice combinație a acestora; opțional în care nucleotida de interes este sub controlul unui promotor non-uman; sau

(ii) sub controlul unui promotor non-uman și flancat de secvențe AAV ITR; sau
 (iii) o genă raportor, opțional în care gena raportor codifică proteina verde fluorescentă sau este selectată din grupul constând dintr-o genă sinucigașă, o nucleotidă care codifică un anticorp sau un fragment al acestuia, o nucleotidă care codifică un sistem CRISPR/Cas sau o porțiune(e) ale acestuia, o nucleotidă care codifică ARN antisens, o nucleotidă care codifică ARNsi și o combinație a acestora.

8. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care molecula de legare multispecifică este o moleculă de legare bispecifică.

9. Compoziție conform revendicării 1, în care paratopul anticorpului este un domeniu Fv, opțional în care domeniul Fv este fuzionat direct la un domeniu constant al lanțului greu.

10. Compoziție conform revendicării 1, în care ligandul de redirecționare este un anticorp sau o porțiune a acestuia, opțional:

în care anticorpul este un anticorp bispecific, în care paratopul anticorpului și ligandul de redirecționare cuprind fiecare un domeniu Fv distinct fuzionat la un prim și al doilea domeniu constant al lanțului greu, opțional în care primul și al doilea lanț greu se leagă la proteina A cu afinități de legare diferențiate sau

în care ligandul de redirecționare cuprinde o structură de anticorp tetrameric cuprinzând două lanțuri grele de imunoglobuline identice și două lanțuri ușoare identice și în care paratopul anticorpului care leagă epitopul heterolog este atașat la capătul C-terminal sau N-terminal al unuia sau ambelor lanțuri grele și/sau la capătul C-terminal sau N-terminal al unuia sau ambelor lanțuri grele și, opțional, în care paratopul de anticorp este un scFv, opțional în care scFv cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:37.

11. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care proteina de suprafață celulară este un receptor; și/sau în care ligandul de redirecționare se leagă la un receptor exprimat pe suprafața unei celule de mamifer sau uman.

12. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care AAV este selectat din grupul constând din AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9 și/sau în care epitopul heterolog este inserat după și/sau înlocuiește o poziție selectată din grupul constând din I-453 din AAV2, I-587 din AAV2, I-585 din AAV6, I-590 din AAV8, I-453 din AAV9, I-589 din AAV9 și orice aminoacizi corespunzători a unui serotip AAV care infectează primatul.

13. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care capsida AAV este o capsidă mozaic care cuprinde o proteină de referință a capsidei AAV de același serotip care nu cuprinde epitopul heterolog într-un anumit raport.

14. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care proteina recombinantă a capsidei AAV este derivată dintr-o genă himerică a capsidei AAV modificată pentru a exprima epitopul heterolog, în care gena himeră a capsidei AAV cuprinde o multitudine de secvențe de acid nucleic, în care fiecare dintre multitudinea de secvențe de acid nucleic codifică o porțiune a unei proteine a capsidei a unui serotip diferit de AAV și în care multitudinea de secvențe de acid nucleic codifică împreună o proteină a capsidei AAV himerică.

15. Compoziție conform oricăreia dintre revendicările precedente pentru utilizare într-o metodă in vivo de tratament sau diagnostic, metoda cuprinzând eliberarea nucleotidei de interes la o celulă țintă care exprimă o proteină de suprafață celulară cuprinzând punerea în contact a celulei țintă cu compoziția, în care multispecifică. molecula de legare cuprinde un ligand de redirecționare care leagă proteina de suprafață celulară.

16. Compoziție pentru utilizare conform revendicării 15, în care:

- (a) livrarea este către un subiect uman; sau
- (b) celula țintă este o celulă umană; sau
- (c) celula țintă este o celulă neuronală umană; sau
- (d) celula țintă este o celulă musculară umană; sau

(e) celula țintă este selectată din grupul constând dintr-o celulă hepatică, o celulă cerebrală, o celulă T, o celulă de rinichi, o celulă intestinală, o celulă de pancreas, o celulă canceroasă și o celulă infectată cu patogen heterolog.

17. Compoziție pentru utilizare conform revendicării 15 sau revendicării 16 în care:

- (a) celula țintă este o celulă hepatică umană, opțional, în care ligandul de redirecționare se leagă la receptorul 1 al asialoglicoproteinei umane (hASGR1) exprimat de celula hepatică umană; sau
- (b) ligandul de redirecționare leagă receptorul GABA exprimat de celula neuronală umană; sau
- (c) ligandul de redirecționare se leagă la receptorul de transferină exprimat de celula neuronală umană;
- (d) celula țintă este o celulă T umană, opțional în care ligandul de redirecționare leagă CD3 exprimat de celula T umană; sau
- (e) celula țintă este o celulă T umană, opțional în care ligandul de redirecționare leagă CD3ε exprimat de celula T umană; sau
- (f) celula țintă este o celulă hematopoietică umană, opțional în care ligandul de redirecționare se leagă la CD34; sau
- (g) celula țintă este o celulă canceroasă umană, opțional în care ligandul de redirecționare se leagă la un antigen asociat tumorii; sau
- (h) celula țintă este o celulă canceroasă umană, opțional în care ligandul de redirecționare se leagă la un antigen asociat tumorii care este E6, E7 sau Her2; sau
- (i) proteina de suprafață celulară este receptorul uman de glucagon (hGCGR); sau
- (j) celula țintă este o celulă intestinală sau este o celulă de pancreas; opțional în care receptorul este ENTPD3.

18. Compoziție pentru utilizare în metoda din revendicarea 15 sau 16, în care:

- (i) ligandul de redirecționare se leagă de CD20; sau
- (ii) ligand de redirecționare se leagă la receptorul uman de glucagon; sau
- (iii) ligandul de redirecționare leagă în mod specific CD63 sau ectonucleozidă trifosfat difosfohidrolaza 3 umană (hENTPD3).

19. Compoziție conform revendicării 5(i) în care eticheta de afinitate cuprinde c-myc (EQKLISEEDL; SECV ID NR:6).

20. Compoziție conform revendicării 6, în care paratopul de anticorp se leagă în mod specific de c-myc, care paratop de anticorp cuprinde o secvență HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și/sau LCDR3 a scFv codificat de secvența de acid nucleic prezentată ca SECV ID NR:28.

21. Metodă in vitro sau ex vivo de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă care exprimă o proteină de suprafață celulară cuprinzând punerea în contact a celulei țintă cu compoziția oricăreia dintre revendicările 1 până la 14, în care molecula de legare multispecifică cuprinde un ligand de redirecționare care se leagă proteina de suprafața celulară.