



MD/EP 3645553 T2 2023.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3645553 (13) T2

(51) Int. Cl: C07K 14/315 (2006.01.01)
C12N 7/00 (2006.01.01)
A61K 48/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0493 (22) Data de depozit: 2018.06.27 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18749636.9, 2018.06.27 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3645553, 2020.05.06 (31) Numărul cererii prioritare: 201762525708 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. 07/2023, 2023.07.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 11/2023, 2023.03.15 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 05/2020, 2020.05.31
(71) Solicitant: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (72) Inventatori: SABIN Leah, US; SCHOENHERR Christopher, US; ECONOMIDES Aris N., US; KYRATSOUS Christos, US; MURPHY Andrew J., US (73) Titular: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

(54) Particule virale recombinante modificate cu tropism și utilizările acestora pentru introducerea țintită a materialului genetic în celulele umane

(57) Rezumat:

1
Prezenta invenție se referă la compoziții și metode pentru redirecționarea particulelor de capsidă virale recombinante printr-o pereche specifică de legare proteină: proteină, care formează o legătură covalentă, de exemplu, izopeptidă, pentru a afișa un ligand de țintire pe proteină capsidică, totodată

2
ligandul de țintire se leagă în mod specific cu un marker de suprafață celulară exprimat pe celula de interes.

Revendicări: 28
Figuri: 14

MD/EP 3645553 T2 2023.07.31

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

(57) Abstract:

1

Provided herein are compositions and methods for redirecting recombinant viral capsid particles via a specific protein:protein binding pair that forms an covalent, e.g., isopeptide, bond to display a targeting ligand

2

on the capsid protein, wherein the targeting ligand specifically binds a cell surface marker expressed on the cell of interest.

Claims: 28

Fig.: 14

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****REFERINȚĂ LA O LISTĂ DE SECVENȚE TRIMISĂ CA FIȘIER TEXT PRIN WEB**5 **EFS**

Descrierea cuprinde Lista de secvențe scrisă în fișierul 10359WO01_ST25.txt are 183 kiloocteți, creată pe 27 iunie 2018.

DOMENIUL TEHNIC

10 Dezvăluirea de aici se referă în general la particule virale recombinante modificate cu tropism și la compoziții care le cuprind, utile pentru introducerea țintită a materialului genetic în celule. În special, prezenta invenție se referă la o capsidă virală recombinantă, o capsidă virală care o cuprinde, o particulă virală recombinantă cuprinzând o nucleotidă de interes încapsulată de proteina capsidei virale recombinante și diverse aspecte legate.

STADIUL TEHNICII

15 Livrarea genelor în anumite celule țintă a devenit una dintre cele mai importante tehnologii din medicina modernă pentru tratamentul potențial al 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 de a transduce celulele țintă evitând în același timp transducția celulelor non-țintă. În mod specific, atunci
20 când tropismul nativ al virusului nu îndeplinește ținuturile țintă terapeutică dorite sau tipurile de celule, există o nevoie de particule virale recombinante în care tropismul natural este eliminat sau diminuat și tropismul dorit este conceput cu succes. (Buchholz și colab.,)

În ultimii ani, cele mai multe progrese în dezvoltarea vectorilor s-au realizat folosind viruși neîncapsulați (de exemplu, viruși care cuprind o capsidă formată din proteine capsidice virale fără înveliș
25 (de exemplu, bistrat lipidic)), cum ar fi virușii adeno-asociați (AAV) și adenovirusurile (Ad), 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 doar ușor imunogene și sunt capabile să transducă o gamă largă de specii și țesuturi in vivo, fără dovezi de toxicitate.

30 AAV-urile sunt virusuri ADN mici, 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 și încapsidarea 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 transcripției și replicării genomului AAV. Cadrul de citire Cap codifică trei proteine virale structurale (capside) având greutăți
35 moleculare de 83-85 kD (VP1), 72-73 kD (VP2) și 61-62 kD (VP3). Mai mult de 80% din proteinele totale dintr-un virion 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 adună spontan în structuri asemănătoare viri, de exemplu, capsidice virale. Prin urmare, se pare că formarea capsidice virale 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 mai multe serotipuri de AAV au fost de asemenea determinate (vezi, de exemplu, Rutledge și colab. (1998) J. Virol., 72:309-319; Gao și colab.

45 (2005) Curr. Gen. Acolo. 5(3)285-97; Chiorini et al. (1997) J. Virol, 71:6823-6833; S. Muramatsu și colab., (1996) Virol, 221:208-217). În general, toate AAV au mai mult de 80% din secvența de nucleotide de identificare.

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 patogene. (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, deși virusul se poate integra ocazional în cromozomii gazdei, face acest lucru foarte rar într-un locus sigur în cromozomul 19 uman și numai atunci când proteinele Rep sunt furnizate în trans. Genomii AAV se circularizează și se concatemerizează rapid în celulele infectate și există într-o stare epizomală
50 stabilă în celulele infectate pentru a oferi o expresie stabilă pe termen lung a sarcinilor lor utile.

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. Această interacțiune ligand: receptor este punctul central al multor cercetări în vectorii virali și poate fi

manipulată pentru a redirecționa tropismul natural al unui virus de la o celulă permisivă în mod natural la infectarea cu virusul sălbatic către o celulă țintă non-nativă, de exemplu, prin un receptor exprimat de celula țintă.

Teoretic, redirecționarea unui vector către orice proteină sau marker de suprafață celulară ar trebui să ducă la infecție, deoarece majoritatea receptorilor de suprafață celulară sunt implicați în căile de endocitoză, fie constitutive (de exemplu, pentru reciclare) fie induse de ligand (de exemplu, mediate de receptor). 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; Verheji și Rottier (2012) Advances Virol 2012: 1-15).

Cea mai populară abordare este o modificare genetică recombinatorie a proteinelor capsidei virale și, prin urmare, a suprafeței capsidei virale. Pe de altă parte, în abordările recombinatorii indirecte, o capsidă virală este modificată cu o „schelă” heterolog, care apoi se leagă de un adaptor. Adaptorul se leagă atât de schelă cât și de celula țintă. În abordarea de țintire recombinatorie directă, un ligand de țintire este inserat direct într-o capsidă virală sau cuplat la aceasta, adică capsidele virale proteice sunt modificate pentru a exprima un ligand heterolog. Ligandul care redirecționează, de exemplu, leagă, un receptor sau un marker exprimat preferențial sau exclusiv pe o celulă țintă.

Fiecare dintre abordări are avantaje și dezavantaje. Capacitatea de a modifica genetic virusul necesită ca structura capsidei să fie menținută, iar ligandul de țintire sau schela să fie plasat într-o poziție în cadrul proteinei capsidei care va tolera și afișa în mod adecvat ligandul sau schela de țintire. De exemplu, ligandul de țintire sau scheletul introdus în proteina virală va trebui să îndeplinească limite de dimensiune pentru a nu interfera cu structura capsidei modificate, ceea ce deschide posibilitatea ca ligand sau schelă directă să nu fie prezentate corect de către capsidă și /sau limitează spectrul de molecule existente în mod natural disponibile pentru utilizare ca liganzi de țintire sau schele. În plus, utilizarea liganzilor de țintire inserați direct în capsidă virusului nu este modulară și trebuie reproiectată pentru fiecare țintă. Deși platforma de schelă este avantajoasă prin flexibilitatea și natura modulară a adaptorului utilizat, schela de pe particulele virale și adaptorul interacționează ionic și rămân două entități separate, iar instabilitatea inerentă a interacțiunilor lor poate limita utilitatea lor in vivo. Eficiența optimă a transducției poate fi dificil de realizat cu astfel de sisteme cu două componente.

În mod clar, rămâne o nevoie de sisteme de vectori virali care să mențină integritatea structurii virale modificate în timp ce rămân adaptabile pentru transferul țintit al acizilor nucleici de interes la o varietate de celule țintă.

Se mai face referire la următoarele documente:

- Santiago-Ortiz et al (2016) Journal of Controlled Release, 240: 287-301 care se referă la vectori virus adeno-asociat (AAV) în terapie genică a cancerului;
- WO 2016/112921 care se referă la o particulă asemănătoare virusului cu afișare eficientă a epitopului;
- Reid și colab. (2002) Journal of Virology, 76(9): 4559-4566 care se referă la afișarea domeniilor de legare la imunoglobuline cu capsidă virală cu adeno- asociate;
- Veggiani et al (2014) TIBS, 32(10): 506-512 care se referă la superglue din bacterii; și
- Veggiani et al (2016) PNAS USA, 113(5): 1202-1207 care se referă la poliproteamele programabile construite folosind supercleiuri peptidice gemene.

REZUMAT

Invenția

Prezenta invenție furnizează o proteină capsidei virală recombinantă care este modificată genetic pentru a prezenta a secvență heterologă de aminoacizi care cuprinde un prim membru al unei perechi de legare proteină:proteină inserată în proteina capsidei virale,

în care proteina capsidei virală este derivată dintr-o genă cap a unui virus adeno-asociat (AAV) care codifică o proteina a capsidei AAV VP1, VP2 și/sau VP3;

în care:

(a) primul membru al perechii de legare proteină:proteină este o etichetă peptidică și este capabil să formeze o izopeptidă legătură cu un al doilea membru înrudit al perechii de legare proteină:proteină; sau

(b) primul membru al perechii de legare proteină:proteină este o etichetă peptidică și proteina capsidă virală în continuare cuprinde al doilea membru înrudit al perechii de legare proteină:proteină, în care primul membru și al doilea membri înrudiți sunt legați printr-o legătură izopeptidică.

Prezenta invenție furnizează în plus o capsidă virală recombinantă cuprinzând o proteină a capsidăi virale conform prezentei invenții.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, o particulă virală recombinantă care cuprinde o nucleotidă de interes încapsulată de proteina capsidă virală din prezenta invenție.

Prezenta invenție oferă, de asemenea, o compoziție care cuprinde: (a) o proteină virală a capsidăi sau o particulă virală a prezentei invenții; și (b) un purtător acceptabil farmaceutic.

Prezenta invenție furnizează în plus o particulă sau o compoziție virală a prezentei invenții pentru utilizare într-o metodă de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă cuprinzând punerea în contact a celulei țintă cu respectiva particulă virală sau respectiva compoziție, în care proteina capsidăi virale cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific o proteină exprimată pe suprafața celulei țintă.

Prezenta invenție oferă, de asemenea, o metodă de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă *in vitro* cuprinzând punerea în contact a celulei țintă cu o particulă virală sau compoziția din prezenta invenție, în care proteina capsidăi virale cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific o proteină exprimată pe suprafața celulei țintă.

Prezenta invenție furnizează, în plus, un vector recombinant care codifică o proteină a capsidăi virale a prezentei invenții.

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, o genă cap AAV care codifică o proteină virală recombinantă a capsidăi prezentei invenții.

Realizări specifice și detalii tehnice

Dezvăluirea tehnică prezentată mai jos poate, în unele privințe, să depășească domeniul de aplicare al invenției, care este definit de revendicările anexate. Elementele dezvăluirii care nu intră în domeniul de aplicare al revendicărilor sunt furnizate cu titlu informativ, și anume pentru a plasa invenția reală revendicată într-un context tehnic mai larg.

Aici este descrisă o strategie de redirecționare virală care rezolvă problemele inerente strategiilor de redirecționare anterioare prin utilizarea unui prim membru și a unui al doilea membru înrudit al unei perechi de legare specifice, primul membru și al doilea membru înrudit interacționează în mod specific pentru a forma o legătură izopeptidică. Primul membru, când este afișat pe o proteină a capsidăi, acționează ca o schelă pentru orice ligand de țintire fuzionat cu al doilea membru înrudit, dar la legarea primului membru și a celui de-al doilea membru înrudit, se formează o legătură izopeptidică, iar particula virală recombinantă acționează ca un vector de direcționare cu o singură componentă.

Prezenta invenție furnizează o particulă virală recombinantă (de exemplu, o proteină de capsidă virală recombinantă, o capsidă virală recombinantă care cuprinde proteina capsidă virală recombinantă și/sau un vector viral recombinant care cuprinde o capsidă virală recombinantă care încapsulează o nucleotidă de interes) care este modificată genetic. pentru a afișa o secvență heterologă de aminoacizi care cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifice, o etichetă peptidică, în care secvența de aminoacizi are lungime mai mică de 50 de aminoacizi și în care proteina recombinantă capsidă/particulă virală prezintă redusă la abolită tropism natural. Primul membru al perechii de legare proteină:proteină este o etichetă peptidică și este capabilă să formeze o legătură izopeptidică cu un al doilea membru înrudit al perechii de legare proteină:proteină. Tropismul unei proteine/capsidă/vector viral recombinant poate fi restaurat și/sau redirecționat la formarea unei legături izopeptidice cu al doilea membru înrudit al perechii de legare specifice, care al doilea membru înrudit este fuzionat cu un ligand de țintire care leagă în mod specific un celulă țintă. O astfel de legare are ca rezultat proteina/capsidă/vectorul viral recombinant care prezintă ligandul de țintire. Eficiența și specificitățile de transducție sunt îmbunătățite în mod surprinzător atunci când ligandul de țintire este afișat de către o capsidă/vector viral recombinant prin intermediul unui linker și/sau în cantități limitate pe suprafața capsidăi virale. Astfel de particule virale, compoziții care le cuprind și metode de fabricare și utilizare a acestora sunt furnizate aici.

Prin urmare, aici este descrisă o proteină recombinantă a capsidăi virale care cuprinde o etichetă peptidică inserată în proteina capsidăi, în care proteina capsidăi virale este derivată dintr-o genă cap a unui virus adeno-asociat (AAV) care codifică o proteină a capsidăi AAV VP1, VP2 și/sau VP3 și în care eticheta peptidică este un prim membru al unei legături specifice pereche care formează o legătură izopeptidică cu un al doilea membru înrudit al perechii de legare specifice. În special, prezenta invenție furnizează o proteină a capsidăi virale recombinantă care este modificată genetic pentru a prezenta un aminoacid heterolog secvență care cuprinde un prim membru al unei perechi de legare proteină:proteină inserată în proteina capsidă virală, în care Proteina capsidă virală este derivată dintr-o genă cap a unui virus adeno-asociat (AAV) care codifică un AAV VP1, VP2, și/sau proteină capsidă VP3; în care: (a)

primul membru al perechii de legare proteină:proteină este o etichetă peptidică și este capabilă de formare a unei legături izopeptidice cu un al doilea membru înrudit al perechii de legare proteină:proteină; sau (b) primul membru a perechii de legare proteină:proteină este o etichetă peptidică, iar proteina capsidă virală cuprinde în plus a doua înrudită membru al perechii de legare proteină:proteină, în care primul membru și al doilea membru înrudit sunt legați de un legătură izopeptidică. în unele exemple de realizare, proteina capsidă recombinantă cuprinde în plus al doilea membru înrudit a perechii de legare proteină:proteină, în care primul membru și al doilea membru înrudit sunt legați de o izopeptidă legătură. în unele variante de realizare, proteina capsidă recombinantă cuprinde al doilea membru înrudit al specificului perechea de legare legată covalent la primul membru, în care al doilea membru înrudit al perechii de legare specifice este legat operabil la un ligand de țintire care leagă în mod specific un marker de suprafață celulară (de exemplu, o oligozaharidă de suprafață celulară, un receptor de suprafață celulară și/sau marker de suprafață celulară, etc.) pe o celulă țintă. De asemenea, aici sunt descrise capsidă virale care cuprind proteinele capsidă virale recombinante și vectori virali cuprinzând o nucleotidă de interes încapsulată de capsidă virusului descris aici. De asemenea, sunt descrise compoziții care cuprind particulele virale recombinante descrise aici (de exemplu, proteinele capsidă virale recombinante, capsidă virale recombinante și/sau vectori virali recombinanți), metode de folosindu-le pentru livrarea țintită in vitro a unei nucleotide de interes, metode de producere a acestora, precum și particule virale și compoziții pentru utilizare într-o metodă de eliberare a unei nucleotide de interes.

În unele exemple de realizare, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare specifice) este inserat în proteina capsidă printr-un prim sau al doilea linker, de exemplu, un amino. distanțier acid care are lungimea de cel puțin un aminoacid. în unele exemple de realizare, marcajul peptidic (primul membru) este flancat de un prim și/sau al doilea linker, de exemplu, un prim și/sau al doilea distanțier de aminoacid, fiecare dintre care distanțier are lungimea de cel puțin un aminoacid.

În unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker nu sunt identici. în unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker are fiecare în mod independent unul sau doi aminoacizi lungime. în unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker are fiecare în mod independent unul, doi sau trei aminoacizi lungime. în unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker are fiecare în mod independent unul, doi, trei sau patru aminoacizi lungime. în unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker are fiecare în mod independent unul, doi, trei, patru sau cinci aminoacizi în lungime. în unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker au fiecare în mod independent unul, doi, trei, patru sau cinci aminoacizi lungime. în unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker are fiecare în mod independent unul, doi, trei, patru, cinci sau șase aminoacizi în lungime. în unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker are fiecare în mod independent unul, doi, trei, patru, cinci, șase sau șapte aminoacizi lungime. în unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker are fiecare în mod independent unul, doi, trei, patru, cinci, șase, șapte sau opt aminoacizi lungime. În unele exemple de realizare, primul și/sau al doilea linker are fiecare în mod independent unul, doi, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt sau nouă aminoacizi lungime. în unele exemple de realizare, primul și sau al doilea linker este fiecare independent unul, doi, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă sau zece aminoacizi în lungime. În unele exemple de realizare, primul și sau al doilea linker are fiecare în mod independent unul, doi, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece sau mai mulți aminoacizi în lungime.

În unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici ca secvență și/sau lungime și au fiecare lungime a unui aminoacid. în unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici ca lungime și au lungimea fiecărui aminoacid. în unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici ca lungime și au fiecare doi aminoacizi în lungime. în unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici ca lungime și au fiecare trei aminoacizi în lungime. în unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici ca lungime și au fiecare patru aminoacizi în lungime, de exemplu, linkerul este GLSG (SEQ ID NO:40). în unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici ca lungime și au fiecare cinci aminoacizi în lungime. În unele exemple de realizare, primul și al doilea linker au lungime identică și fiecare are șase aminoacizi lungime, de exemplu, primul și al doilea linker cuprind fiecare o secvență de GLSGSG (SEQ ID NR:41). în unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici ca lungime și au fiecare șapte aminoacizi în lungime. în unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici ca lungime și au fiecare opt aminoacizi lungime, de exemplu, primul și al doilea linker cuprind fiecare o secvență de GLSGLSGS (SEQ ID NR:42). în unele exemple de realizare, primul și al doilea linker au lungime identică și fiecare are lungimea de nouă aminoacizi. În unele exemple de realizare, primul și al doilea linker sunt identici ca lungime și au fiecare zece aminoacizi în lungime, de exemplu, primul și al doilea linker cuprind fiecare o secvență de GLSGLSGLSG (SECV ID NR:43) sau GLSGGSLSG (SECV ID NR: 44). în unele exemple de realizare, primul și al doilea linker au lungime identică și fiecare are o lungime mai mare de zece aminoacizi.

În general, o etichetă peptidică și, opțional, unul sau mai mulți linker așa cum este descris aici, de exemplu, marca peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri, are o lungime între aproximativ 5 aminoacizi și aproximativ 50 aminoacizi. în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de cel puțin 5 aminoacizi. în unele realizări, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 6 aminoacizi. în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 7 aminoacizi. în unele realizări, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 8 aminoacizi. în unele realizări, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 9 aminoacizi. în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 10 aminoacizi. în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 11 aminoacizi. } în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 12 aminoacizi. în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 13 aminoacizi. în unele variante de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 14 aminoacizi. în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 15 aminoacizi. în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 16 aminoacizi. În unele realizări, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 17 aminoacizi. În unele realizări, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 18 aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 19 aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 20 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 21 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 22 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 23 de aminoacizi. în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 24 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 25 de aminoacizi. în unele realizări, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 26 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 27 de aminoacizi. În unele realizări, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 28 de aminoacizi. În unele realizări, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 29 de aminoacizi. În unele variante de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 30 de aminoacizi. în unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 31 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 32 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 33 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 34 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 35 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 36 de aminoacizi. În unele realizări, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 37 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 38 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 39 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime de 40 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri are o lungime mai mare de 40 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, o etichetă peptidică în sine sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri nu are o lungime mai mare de 50 de aminoacizi.

O proteină a capsidei virale recombinantă a prezentei invenții este derivată dintr-o genă cap a unui virus adeno-asociat (AAV) care codifică o proteină capsidă AAV VP1, VP2 și/sau VP3. Prin urmare, o proteină a capsidei virale recombinantă descrisă aici este derivată dintr-o genă a capsidei AAV care codifică proteinele capsidei VP1, VP2 și/sau VP3 ale AAV (sau porțiuni ale proteinelor capsidei VP1, VP2 și/sau VP3), de exemplu, este codificată de o genă cap modificată pentru a codifica un virus adeno-asociat modificat genetic (AAV) VP1, VP2 și/sau proteina capsidă VP3, de exemplu, o proteină

capside modificată genetic a unui serotip AAV care infectează oamenii selectați din grup format din AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9. În unele variante de realizare, proteina capsida virală recombinantă este derivată dintr-o genă capsidă AAV2 sau AAV9 care codifică o proteină capsidă AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 sau proteina capsidă AAV9 VP1, VP2 și/sau VP3, de exemplu, este codificată de o genă capsidă AAV2 sau AAV9 modificată pentru a codifica o proteină capsidă AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic sau o proteină capsidă AAV9 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic. În unele realizări, proteina capsidă virală recombinantă este derivată dintr-o genă capsidă AAV6, de exemplu, este codificată de o genă capsidă AAV6 modificată pentru a codifica o proteină capsidă AAV6 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic, secvența de aminoacizi de tip sălbatic din care proteina capsidă AAV6 VP1 este prezentată, respectiv, ca SECV ID NR:51. În unele realizări, proteina capsidă virală recombinantă este derivată dintr-o genă capsidă AAV2, de exemplu, este codificată de o genă capsidă AAV2 modificată pentru a codifica o proteină capsidă AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic, secvența de aminoacizi de tip sălbatic a carei proteină capsidă AAV2 VP1 este prezentată, respectiv, ca SECV ID NR:9. În unele exemple de realizare, proteina recombinantă a capsidăi virale este derivată dintr-o genă a capsidăi AAV9, de exemplu, este codificată de o genă a capsidăi AAV9 modificată pentru a codifica o proteină a capsidăi AAV9 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic, a cărei secvență de aminoacizi de tip sălbatic Proteina capsidă AAV9 VP1 este prezentată, respectiv, ca SECV ID NR:31.

În unele realizări, proteina capsidăi virale recombinantă este derivată din (codificat de) o genă a capsidăi himerică AAV, în care gena capsidă 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 capsidă a unui serotip AAV diferit și în care multitudinea de secvențe de acid nucleic secvențele de acid nucleic împreună codifică o proteină himerică a capsidăi AAV. În unele variante de realizare, proteina capsidă virală recombinantă este derivată dintr-o genă himerică a capsidăi AAV2. În unele variante de realizare, proteina capsidă virală recombinantă este derivată dintr-o genă himerică a capsidăi AAV6. În unele variante de realizare, proteina capsidă virală recombinantă este derivată dintr-o genă himerică a capsidăi AAV9.

O proteină a capsidăi virale recombinantă din prezenta invenție este o proteină de capsidă virală recombinantă care este modificată genetic pentru a prezenta o secvență heterologă de aminoacizi care cuprinde un prim membru al unei perechi de legare proteină:proteină inserată în proteina capsidă virală. În general, o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici este modificată pentru a cuprinde o etichetă peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) legată operabil (de exemplu, inserată în și/sau afișată de), opțional printr-un linker, la recombinant. proteina capsidă astfel încât eticheta peptidică (primul membru al unei proteine: pereche de legare la proteină) și linkerul opțional în sine reduc și/sau elimină tropismul natural al proteinei capsidăi recombinante sau al capsidăi care o cuprinde, în comparație cu o proteină de capsidă de referință lipsită de peptidă etichetă (primul membru al unei proteine: pereche de legare la proteine) și, respectiv, linker sau capsid opțional cuprinzând capsidul de referință al capsidăi. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) este legată operațional (de exemplu, inserată în și/sau afișată de), opțional printr-un linker, la o regiune a proteinei capsidăi implicată cu tropismul natural. a proteinei capsidăi de referință de tip sălbatic, de exemplu, o regiune a proteinei capsidăi implicată cu ținerea celulelor. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică (primul membru al unei proteine: pereche de legare la proteină) și linkerul opțional sunt legați în mod operațional (de exemplu, inserați în și/sau afișat de), opțional printr-un linker, la un domeniu buton al unei proteine fibră Ad. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) este legată operațional (de exemplu, inserată în și/sau afișată de), opțional printr-un linker, la bucla HI a unei proteine din fibră Ad. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) este legată operațional (de exemplu, inserată în și/sau afișată de), opțional printr-un linker, la o buclă variabilă expusă într-o proteină capsidă AAV. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) este legată operațional (de exemplu, inserată în și/sau afișată de), opțional printr-un linker, la o buclă variabilă expusă a unei proteine capsidă AAV2. În unele exemple de realizare, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) este legată operațional (de exemplu, inserată în și/sau afișată de), opțional printr-un linker, la o buclă variabilă expusă a unei proteine capsidă AAV9.

În unele exemple de realizare (i) proteina capsidăi virale este derivată dintr-o genă a capsidăi AAV2 care codifică o proteină capsidă AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 și eticheta peptidică este legată operațional la (de exemplu, inserată în și/sau afișată de), opțional prin intermediul unui linker, un aminoacid la poziția 1453 sau 1587 a proteinei capsidăi AAV2 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidăi VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidăi, sau aminoacizii

corespunzători ai VP1, VP2, și/sau proteine de capsidă VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9); (ii) proteina capsidă virală este derivată dintr-o genă a capsidei AAV6 și eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) este legată operațional la (de exemplu, inserată în și/sau afișată de), opțional printr-un linker, un aminoacid la poziția 1585 a 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 ai unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8 și AAV9); sau (iii) proteina capsidă virală este derivată dintr-o genă a capsidei AAV9 care codifică o proteină capsidă AAV9 VP1, VP2 și/sau VP3 și eticheta peptidică este legată operațional la (de exemplu, inserată în și/sau afișată de), opțional prin un linker, un aminoacid la poziția 1453 sau 1589 AAV9 VP1 capsidă (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 a unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 și AAV8).

În unele exemple de realizare, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) este legată operațional, opțional printr-un linker, la un aminoacid o poziție selectată din grupul constând din 453 din proteina capsidei AAV2 VP1, 587 din capsidă AAV2. proteina VP1, 585 din proteina capsidă AAV6 VP1, 453 din proteina capsidă AAV9 VP1 și 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 Proteinele capsidelor VP1, VP2 și/sau VP3 ale unui AAV diferit care infectează oamenii, de exemplu, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9), de exemplu, sunt fuzionate la capătul C-terminal al un aminoacid într-o poziție selectată din grupul constând din 453 din proteina capsidei AAV2 VP1, 587 din proteina capsidă AAV2 VP1, 585 din proteina capsidă AAV6 VP1, 453 din proteina capsidă AAV9 VP1 și 589 din proteina capsidă AAV9 VP1 (sau corespunzătoare pozițiile 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, AAV8 și AAV9). În unele exemple de realizare, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare a proteinei: proteină) și linkerul opțional sunt inserate imediat după (de exemplu, sunt fuzionate la capătul C-terminal al) unui aminoacid la poziția 453 a proteinei capsidă 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, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) și linkerul opțional sunt inserate imediat după (de exemplu, sunt fuzionate la capătul C-terminal al) unui aminoacid la poziția 587 a proteinei capsidă 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, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) și linkerul opțional sunt inserate imediat după (de exemplu, sunt fuzionate la capătul C-terminal al) unui aminoacid în poziția 585 a proteinei capsidă 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, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) și linkerul opțional sunt inserate imediat după (de exemplu, sunt fuzionate la capătul C-terminal al) unui aminoacid în poziția 453 a proteinei 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, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare a proteinei: proteină) și linkerul opțional sunt inserate imediat după (de exemplu, sunt fuzionate la capătul C-terminal al) unui aminoacid la poziția 589 a proteinei 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, eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare a proteinei: proteină) și linkerul opțional sunt inserate și/sau afișate între pozițiile 587 și 588 ale unei proteine de capsidă AAV2 VP1 (sau pozițiile corespunzătoare ale capsidă VP2 și/sau VP3). proteine 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, o proteină capsidă recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde o (a doua și diferită) mutație, care poate fi în plus față de eticheta peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină: proteină) și linker opțional. În unele exemple de realizare, (a doua mutație și diferită) cuprinde o inserare a unei peptide heterologe în proteina capsidă, substituirea unuia sau mai multor aminoacizi ai proteinei capsidă cu unul sau mai mulți aminoacizi heterologi, ștergerea unuia sau mai multor aminoacizi ai proteina capsidă sau o combinație a acestora. De exemplu, într-o variantă de realizare, o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici poate fi derivată dintr-o genă de capsidă AAV2 (de exemplu, este o proteină de capsidă AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic), cuprinde o etichetă peptidică (primul membru al o pereche de legare proteină: proteină) și linker opțional și mai poate cuprinde o mutație, de exemplu, o mutație R585A și/sau R588A în proteina capsidă VP1 AAV2 (sau mutația corespunzătoare în proteinele capsidă VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași pereche). gena capsidă AAV2). În unele exemple de realizare, o proteină de capsidă virală recombinantă este derivată dintr-o genă de capsidă AAV2, de exemplu, este o proteină de capsidă AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic, care cuprinde o etichetă peptidică (primul membru al unei proteine: pereche de legare la proteine) și linker opțional inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) unui aminoacid la poziția 453 a proteinei AAV2 VP1 (sau aminoacizi în pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidă AAV2 VP2 și/sau VP3 codificate de gena capsidă AAV2), și mai cuprinde o mutație selectată din grupul constând din R585A și/sau R588A (sau mutații corespunzătoare în proteinele capsidă VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidă AAV2). În unele exemple de realizare, o proteină de capsidă virală recombinantă este derivată dintr-o genă a capsidă AAV2, de exemplu, este o proteină de capsidă AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 modificată genetic, care cuprinde o etichetă peptidică (primul membru al unei perechi de legare proteină:proteină) și linker opțional inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) unui aminoacid la poziția 587 a proteinei capsidă AAV2 VP1 (sau aminoacizi la pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidă AAV2 VP2 și/sau VP3 codificate din același AAV2 gena capsidă) și mai cuprinde o mutație selectată din grupul constând din R585A, R588A și/sau mutații corespunzătoare în proteinele capsidă VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidă AAV2.

În unele exemple de realizare, o proteină recombinantă a capsidă virale este derivată dintr-o genă a capsidă AAV9, de exemplu, este o proteină capsidă AAV9 modificată genetic, VP1, VP2 și/sau VP3, cuprinde o etichetă peptidică (primul membru al unei proteine: pereche de legare la proteine) și linker opțional inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la C-terminalul) unui aminoacid la poziția 453 a proteinei AAV9 VP1 (sau aminoacidul în pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidă AAV9 VP2 sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidă AAV9) și mai cuprinde o mutație W503 A (sau o mutația corespunzătoare în proteinele capsidă VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidă AAV2). În unele exemple de realizare, o proteină de capsidă virală recombinantă este derivată dintr-o genă de capsidă AAV9, de exemplu, este o proteină de capsidă AAV9 modificată genetic, VP1, VP2 și/sau VP3, care cuprinde o etichetă peptidică (primul membru al unei proteine: pereche de legare la proteine) și linker opțional inserat imediat după (de exemplu, fuzionat la capătul C-terminal al) unui aminoacid la poziția 589 a proteinei AAV9 VP1 (sau aminoacizii din pozițiile corespunzătoare ale proteinelor capsidă AAV9 VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași gena capsidă AAV9) și mai cuprinde o mutație W503 A (sau o mutație corespunzătoare în proteinele capsidă VP2 și/sau VP3 codificate din aceeași genă a capsidă AAV2).

În unele exemple de realizare, perechea de legare proteină: proteină poate fi selectată din grupul constând din Spy Tag: Spy Catcher, SpyTag002:SpyCatcher002, SpyTag:KTag, Isopeptag:pilin-C și SnoopTag: SnoopCatcher. În unele exemple de realizare, în care eticheta peptidică (primul membru) este SpyTag (sau o porțiune biologic activă a acestuia) și proteina (al doilea membru înrudit) este SpyCatcher (sau o porțiune biologic activă a acesteia). În unele exemple de realizare, în care eticheta peptidică (primul membru) este SpyTag (sau o porțiune biologic activă a acestuia) și proteina (al doilea membru înrudit) este KTag (sau o porțiune biologic activă a acesteia). În unele exemple de realizare, în care eticheta peptidică (primul membru) este KTag (sau o porțiune biologic activă a acestuia) și proteina (al doilea membru înrudit) este SpyTag (sau o porțiune biologic activă a acesteia). În unele exemple de realizare, în care eticheta peptidică (primul membru) este SnoopTag (sau o porțiune biologic activă a acestuia) și proteina (al doilea membru înrudit) este SnoopCatcher (sau o porțiune biologic activă a acesteia). În unele exemple de realizare, în care eticheta peptidică (primul membru) este Isopeptag (sau o porțiune biologic activă a acestuia) și proteina (al doilea membru înrudit) este Pilin-C (sau o porțiune biologic activă a acesteia). În unele exemple de realizare, în care eticheta peptidică (primul membru) este

SpyTag002 (sau o porțiune biologic activă a acestuia) și proteina (al doilea membru înrudit) este SpyCatcher002 (sau o porțiune biologic activă a acesteia).

În unele exemple de realizare, o proteină recombinantă a capsidului viral cuprinde o etichetă Spy. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral recombinant care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă sau un vector viral cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca orice SECV ID NR listată în Tabelul 1 ca un amino. secvență acidă a unei proteine capsid virale recombinante. În unele variante de realizare, o capsidă virală recombinantă, vector viral cuprinzând o capsidă virală recombinantă și/sau compozițiile care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 13. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 15. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 17. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 19. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 21. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compozițiile cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:23. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral cuprinzând o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:25. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral cuprinzând o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:27. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral cuprinzând o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:29. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral cuprinzând o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:35. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compozițiile cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:37. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral cuprinzând o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:39.

În unele exemple de realizare, o proteină de capsid virală recombinantă descrisă aici cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică (o etichetă peptidică) legată covalent la un al doilea membru proteic înrudit al perechii de legare specifică printr-o legătură izopeptidică. În unele exemple de realizare o proteină a capsidului viral recombinantă descrisă aici cuprinde o etichetă peptidică (primul membru) legată covalent la o polipeptidă adaptare care cuprinde o proteină înrudită (al doilea membru) legată operațional la un ligand de țintire. În unele exemple de realizare, ligandul de țintire este legat operațional la proteină (al doilea membru), de exemplu, fuzionat cu proteina, opțional printr-un linker. În general, un ligand de țintire poate fi un fragment de legare, de exemplu, un ligand natural, anticorp, o moleculă de legare multispecifică etc. În unele variante de realizare, ligandul de țintire este un anticorp sau o porțiune a acestuia. În unele exemple de realizare, ligand de țintire este un anticorp care cuprinde un domeniu variabil care leagă o proteină de suprafață celulară pe o celulă țintă și un domeniu constant al lanțului greu. În unele exemple de realizare, ligandul de țintire este un anticorp care cuprinde un domeniu variabil care leagă o proteină de suprafață celulară pe o celulă țintă și un domeniu constant al lanțului greu al IgG. În unele exemple de realizare, ligandul de țintire este un anticorp care cuprinde un domeniu variabil care leagă o proteină de suprafață celulară pe o celulă țintă și un domeniu constant al lanțului greu IgG, în care domeniul constant al lanțului greu al IgG este legat operabil, de exemplu, printr-un linker, la o proteină (de exemplu, al doilea membru al unei proteine: pereche de legare a proteinei) care formează o legătură covalentă izopeptidică cu o etichetă peptidică. În unele exemple de realizare, o proteină recombinantă a capsidului descrisă aici cuprinde un SpyTag legat operabil la proteina capsidă virală și legat covalent la SpyTag, o polipeptidă adaptare care cuprinde SpyCatcher legată la un ligand de țintire care cuprinde un domeniu variabil al anticorpului și un domeniu al lanțului greu IgG, în care SpyCatcher și domeniul lanțului greu IgG sunt legate printr-un linker de aminoacizi, de exemplu, GSGESG (SECV ID NR:48). În unele exemple de realizare, polipeptida adaptor cuprinde secvența

prezentată ca SECV ID NR:46, care cuprinde o porțiune dintr-un lanț greu de IgG4 uman, porțiunea IgG4 menționată având o secvență prezentată ca SECV ID NR:49, legată prin linker (SECV. ID NR:48) la SpyCatcher (SECV ID NR:3).

În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprinde Spy Tag legat covalent la un SpyCatcher fuzionat la un ligand de țintire. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral cuprinzând o capsidă virală recombinantă și/sau compozițiile cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca orice SECV ID NR listată în Tabelul 1 ca codifică o proteină recombinantă a capsidei virale și un adaptor polipeptidic cuprinzând o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 13 și un adaptor polipeptidic cuprinzând o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral cuprinzând o capsidă virală recombinantă și/sau compozițiile cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 15 și un adaptor polipeptidic cuprinzând o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 17 și un adaptor polipeptidic care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 19 și un adaptor polipeptidic care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 21 și un adaptor polipeptidic cuprinzând o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:23 și un adaptor polipeptidic cuprinzând o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:25 și un adaptor polipeptidic care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:27 și un adaptor polipeptidic cuprinzând o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:29 și un adaptor polipeptidic care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:35 și un adaptor polipeptidic care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 37 și un adaptor polipeptidic care cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral cuprinzând o capsidă virală recombinantă și/sau compozițiile cuprinzând o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:39 și un adaptor polipeptidic cuprinzând o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46.

În general, un ligand de țintire leagă în mod specific o moleculă de suprafață celulară, de exemplu, o oligozaharidă, un receptor, un marker de suprafață celulară, etc., exprimat pe suprafața unei celule eucariote de mamifer (de exemplu, umană), de exemplu, o celulă țintă. În unele exemple de realizare, un ligand de țintire leagă o celulă hepatică (umană), o celulă cerebrală (umană), o celulă T (umană), o celulă renală (umană), o celulă intestinală (umană), o celulă pulmonară (umană), o celulă canceroasă (umană) sau o celulă (umană) infectată cu agent patogen heterolog.

În unele exemple de realizare, ligandul de țintire 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 țintire leagă o moleculă exprimată de o celulă neuronală (umană), de exemplu, GAB

A, transferină etc. În unele exemple de realizare, ligandul de țintire leagă o moleculă exprimată de o celulă T (umană), de exemplu, CD3, de exemplu, CD3. în unele exemple de realizare, ligand de țintire se leagă de CD63. în unele exemple de realizare, ligandul de țintire leagă o moleculă exprimată de o celulă stem hematopoietică (umană), de exemplu, CD34. în unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă o moleculă exprimată de o celulă de rinichi (umană). în unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă o moleculă exprimată de o celulă musculară (umană), de exemplu, o integrină. În unele exemple de realizare, ligand de țintire r leagă o moleculă exprimată 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, ciclin D1, Ciclin-A1, proteina de fuziune dek-can, DKK1, EFTUD2, alungire factor 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, glipican-3, GnTV, gp100/Pme 117, 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, Kalikrein 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-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, Mel an-A/MART-1, Meloe, Midkine, MMP- 2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, mucină, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miozină, miozină clasa I, N-rav, 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 polimohică ("PEM"), PPP1R3B, PRAME, PRDX5 , PSA, PSMA, PTPRK, RAB 38/N Y-MEL- 1, RAGE-1, RBAF600, RGS5, RhoC, R F43, RU2AS, SAGE, secernin 1, SIRT2, SNRPD1, SOX10, Spl7, 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-lb/ 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 [MARTI], 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 cancerule de sân, pancreas, colon și prostată); antigenul specific de prostată [PSA] (în cancerul de prostată); antigen carcinoembrionar [CEA] (în cancerule de colon, de sân și gastrointestinale) și astfel de antigene comune specifice tumorii 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 țintire leagă E6 și/sau E7. în unele exemple de realizare, ligand de țintire se leagă pe Her2. în unele exemple de realizare, ligand de țintire se leagă de CD63. în unele exemple de realizare, ligand de țintire se leagă la receptorul uman de glucagon (hGCGR). în unele exemple de realizare, ligandul de redirectionare leagă ectonucleozidul trifosfat difosfohidrolaza 3 umană (hENTPD3).

În general, o capsidă virală care cuprinde proteina capsidă virală recombinantă descrisă aici nu este capabilă să infecteze o celulă țintă în absența unui ligand de țintire, de exemplu, al doilea membru legat operațional la un ligand de țintire. În general, în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală cuprinzând o proteină capsidei virală 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 țină și să lege o celulă de referință permisivă în mod natural la transducție. în comparație cu cea a unei capside virale de referință, de exemplu, o capsidă cuprinzând o proteină a capsidei virală de referință, de exemplu, o proteină de capsidă virală de control de tip sălbatic sau o proteină a capsidei virală care ar fi identică cu proteina capsidei virală recombinantă, dar din lipsa de ligand de țintire și, opțional, unul sau ambii membri ai proteinei: pereche de legare la proteină. în unele exemple de realizare, eficiența de transducție a unei proteine a capsidei virală recombinantă care cuprinde SpyTag este redusă sau abolită în comparație cu o proteină a capsidei virală de tip sălbatic martor.

În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină a capsidei virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere de cel puțin 10% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control adecvat., de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere cu cel puțin 20% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o

capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere cu cel puțin 30% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere de cel puțin 40% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere de cel puțin 50% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere de cel puțin 60% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere de cel puțin 70% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere de cel puțin 75% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere cu cel puțin 80% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere de cel puțin 85% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere de cel puțin 90% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere cu cel puțin 95% a eficienței de transducție în comparație cu o capsidă virală de tip sălbatic de control, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, capsida virală cuprinzând o proteină capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, prezintă o scădere de cel puțin 99% a eficienței de transducție comparativ cu o capsidă virală de tip sălbatic martor, de ex., enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare și în absența unui ligand de țintire adecvat, transducția unei celule de control de către o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici este eliminată, de exemplu, nedetectabilă, de exemplu, prin metode de măsurare a expresiei nucleotidice de interes, de exemplu, teste reporter etc.

Dimpotrivă, o capsidă virală care cuprinde proteina capsidă virală recombinantă cuprinzând o etichetă peptidică legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată, de exemplu, o proteină înrudită legată operabil la un ligand de țintire, este capabilă să infecteze o celulă țintă, de exemplu, are o celulă țintă parțială sau completă. capacitatea restaurată de a ținti și lega o celulă de referință permisivă în mod natural la transducție în comparație cu cea a unei capsidă virale de referință, de exemplu, o capsidă care cuprinde o proteină de capsidă virală de referință, de exemplu, o proteină de capsidă virală de control de tip sălbatic. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidă virale, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 10% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, listată în tabelul 1. În unele variante de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 20% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 30% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip

sălbatic. capsidă, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 40% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, listată în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 50% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 60% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, enumerată în tabelul 1, în unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 70% față de eficiența de transducție a unei capsidă virale de tip sălbatic de control adecvat, de exemplu, enumerată în Tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidăi virale, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 75% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 80% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 85% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 90% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 95% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, listată în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este de cel puțin 99% din eficiența de transducție a unui control adecvat viral de tip sălbatic. capsidă, de exemplu, listată în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală cuprinzând o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție identică cu cea a unei capsidă virale de tip sălbatic de control adecvat, de exemplu, listată în Tabelul 1.

În mod similar, o capsidă virală care cuprinde proteina capsidă virală recombinantă cuprinzând o etichetă peptidică legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată, de exemplu, o proteină înrudită legată operabil la un ligand de țintire, este capabilă să infecteze o celulă țintă, de exemplu, are o capacitate îmbunătățită de a țintește și leagă o celulă de referință permisivă în mod natural la transducție în comparație cu cea a unei capsidă virale de referință care este identică cu proteina capsidă virală recombinantă, cu excepția faptului că îi lipsește unul sau ambii membri ai proteinei: perechea de legare la proteine, de exemplu, cuprinde o proteină de capsidă de referință. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidăi virale, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 10% mai mare decât eficiența de transducție a unui virus de referință de control adecvat. capsidă, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele variante de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidăi virale, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 20% mai mare decât eficiența de transducție a unei referințe de control adecvate, capsidă virală, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoră adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 30% > mai mare decât

eficiența de transducție a unei referințe de control adecvate, capsid viral, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsid virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 40% mai mare decât eficiența de transducție a unui virus de referință de control adecvat capsidei, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidei virale, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 50% mai mare decât eficiența de transducție a unui virus de referință de control adecvat capsid, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină a capsidei virale recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 60% mai mare decât eficiența de transducție a unei referințe de control adecvate capsida virală, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele variante de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină de capsid virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 70% mai mare decât eficiența de transducție a unei referințe de control adecvate capsid viral, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală cuprinzând o proteină a capsidei virale recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 75% mai mare decât eficiența de transducție a unui virus de referință de control adecvat capsidei, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidei virale, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 80% mai mare decât eficiența de transducție a unui virus de referință de control adecvat capsidei, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină a capsidei virale recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 85% mai mare decât eficiența de transducție a unei referințe de control adecvat capsidei virale, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidei virale, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 90% mai mare decât eficiența de transducție a unui virus de referință de control adecvat capsidei, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidei virale, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 95% mai mare decât eficiența de transducție a unui virus de referință de control adecvat capsid, de exemplu, enumerate în tabelul 1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidei virale, așa cum este descrisă aici, de exemplu, listată în Tabelul 1, legată covalent la o polipeptidă adaptoare adecvată prezintă o eficiență de transducție care este cu 99% mai mare decât eficiența de transducție a unui virus de referință de control adecvat capsidei, de exemplu, enumerate în tabelul 1.

În unele exemple de realizare, o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidei virale, așa cum este descrisă aici, este o capsidă mozaic, de exemplu, cuprinde cel puțin două seturi de proteine VP1, VP2 și/sau VP3, fiecare dintre acestea fiind codificat de o genă cap diferită, de exemplu, cuprinde o proteină de capsid virală recombinantă care cuprinde o etichetă peptidică și o proteină de referință a capsidei care nu cuprinde marcajul peptidic într-un anumit raport. În unele exemple de realizare, o proteină de capsid de referință este o proteină de capsid de referință de tip sălbatic prin aceea că aceasta cuprinde o secvență de aminoacizi a unei proteine de capsid de tip sălbatic având același serotip ca și proteina de capsid virală recombinantă. În unele exemple de realizare, o proteină de capsid de referință este o proteină de capsid de referință de control prin aceea că aceasta cuprinde o secvență de aminoacizi a proteinei capsid virale recombinante, cu excepția faptului că proteinei de capsid de referință de control îi lipsește marcajul peptidic. În unele exemple de realizare, o proteină de capsid 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 de capsid de tip sălbatic având același serotip ca și proteina de capsid virală recombinantă, dar pentru o mutație (de exemplu, o ștergere a unei secvențe de aminoacizi, o inserare a unei secvențe de aminoacizi, himerizare etc.) care reduce tropismul proteinei capsid de tip sălbatic. În unele exemple de realizare, o compoziție descrisă aici cuprinde, sau o metodă descrisă aici combină, o proteină de capsid virală recombinantă și o proteină de capsid de referință la un raport care variază de la 1:1 la 1:15, în unele exemple de realizare, raportul este 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 1:10. În unele exemple de realizare, raportul este 1:11. În unele exemple de realizare, raportul este 1:12. În unele realizări, raportul este 1:13. În unele exemple de realizare, raportul este 1:14. În unele exemple de realizare, raportul este 1:15.

În unele exemple de realizare, o compoziție descrisă aici cuprinde sau o metodă descrisă aici combină o proteină de capsidă virală recombinantă enumerată în Tabelul 1 și proteina sa de referință adecvată a capsidului (sau o combinație a proteinelor sale de referință a capsidului), enumerate de asemenea în Tabelul 1, la o raport (proteina(e) de referință a proteinei capsidului recombinant) care variază de la 1:1 la 1:15. În unele exemple de realizare, raportul este 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 1:10. În unele realizări, raportul este 1:11. În unele exemple de realizare, raportul este 1:12. În unele exemple de realizare, raportul este 1:13. În unele exemple de realizare, raportul este 1:14. În unele exemple de realizare, raportul este 1:15.

Tabelul 1 furnizează numerele de identificare a secvenței (SEQ ID NOs) care prezintă secvențele de aminoacizi ale (1) proteina capsidului viral recombinantă exemplificative și nelimitative care cuprind o etichetă peptidică descrisă aici, (2) exemple exemplificative și nelimitative. Proteinele de capsidă virale de tip sălbatic de control corespunzătoare (C) care pot fi utilizate opțional ca referință pentru determinarea reducerii sau abolirea eficienței de transducție a unei proteine de capsidă recombinante care cuprinde o etichetă de proteină covalentă în absența unui vector de țintire și (3) exemplare și non - exemple limitative de proteine de capsidă virale de referință corespunzătoare pentru producerea de capsidă mozaic și/sau utilizare ca referință pentru determinarea restabilirii eficienței de transducție a unei proteine de capsidă recombinante care cuprinde o proteină: pereche de legare la proteine și ligand de țintire.

Tabelul 1

Proteina capsidului virală recombinantă cuprinzând SpyTag (SEQ ID NO:)	Proteina capsidului virală de referință: Proteina capsidului de referință de tip sălbatic (W) (SEQ ID NO) Proteinele capsidului de referință de control (C) (SEQ ID NO) Proteine(e) de referință mutante (M) ale capsidului
AAV2 CAP N587 SpyTag HBM (SEQ ID NO:13)	(W) AAV2-CAP (SEQ ID NO:9) (C) AAV2-CAP R585A R588A HBM (SEQ ID NO: 11) (M) AAV2-CAP N587 Myc (SEQ ID NO:53)
AAV2-CAP N587 Linker 1 SpyTag HBM (SEQ ID NO:15)	(W) AAV2-CAP (SEQ ID NO:9) (C) AAV2-CAP R585A R588A HBM (SEQ ID NO: 11) (M) AAV2-CAP N587 Myc (SEQ ID NO:53)
AAV2-CAP N587 Linker 2 SpyTag HBM (SEQ ID NO:17)	(W) AAV2-CAP (SEQ ID NO:9) (C) AAV2-CAP R585A R588A HBM (SEQ ID NO:11) (M) AAV2-CAP N587 Myc (SEQ ID NO:53)
AAV2-CAP N587 Linker 4 SpyTag HBM (SEQ ID NO:19)	(W) AAV2-CAP (SEQ ID NO:9) (C) AAV2-CAP R585A R588A HBM (SEQ ID NO: 11) (M) AAV2-CAP N587 Myc (SEQ ID NO:53)
AAV2-CAP N587 Linker 6 SpyTag HBM (SEQ ID NO:21)	(W) AAV2-CAP (SEQ ID NO:9) (C) AAV2-CAP R585A R588A HBM (SEQ ID NO: 11) (M) AAV2-CAP N587 Myc (SEQ ID NO:53)
AAV2-CAP N587 Linker 8 SpyTag HBM (SEQ ID NO:23)	(W) AAV2-CAP (SEQ ID NO:9) (C) AAV2-CAP R585A R588A HBM (SEQ ID NO: 11) (M) AAV2-CAP N587 Myc (SEQ ID NO:53)

AAV2-CAP N587 Linker 10 SpyTag HBM (SEQ ID NO:25)	(W) AAV2-CAP (SEQ ID NO:9) (C) AAV2-CAP R585A R588A HBM (SEQ ID NO: 11) (M) AAV2-CAP N587 Myc (SEQ ID NO:53)
AAV2-CAP G453 SpyTag HBM (SEQ ID NO:27)	(W) AAV2-CAP (SEQ ID NO:9) (C) AAV2-CAP R585A R588A HBM (SEQ ID NO: 11) (M) AAV2-CAP N587 Myc (SEQ ID NO:53)
AAV2-CAP G453 Linker10 SpyTag HBM (SEQ ID NO:29)	(W) AAV2-CAP (SEQ ID NO:9) (C) AAV2-CAP R585A R588A HBM (SEQ ID NO: 11) (M) AAV2-CAP N587 Myc (SEQ ID NO:53)
AAV9-CAP A589 SpyTag W503A (SEQ ID NO:35)	(W) AAV9-CAP wt (SEQ ID NO:3 1) (C) AAV9-CAP W503A (SEQ ID NO:33)
AAV9-CAP A589 Linker10 SpyTag W503A (SEQ ID NO:37)	(W) AAV9-CAP wt (SEQ ID NO:3 1) (C) AAV9-CAP W503A (SEQ ID NO:33)
AAV9-CAP G453 Linker10 SpyTag W503A (SEQ ID NO:39)	(W) AAV9-CAP wt (SEQ ID NO:3 1) (C) AAV9-CAP W503A (SEQ ID NO:33)

În general, vectorii virali recombinanți așa cum sunt descriși aici cuprind o capsidă virală care cuprinde o proteină recombinantă a capsidului virală așa cum este descrisă aici, incluzând capsidă virală mozaică, în care capsidă virală încapsulează o nucleotidă de interes. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, o particulă virală recombinantă care cuprinde o nucleotidă de interes încapsulată printr-o proteină capsidă recombinantă a prezentei invenții. 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 EF1α. În unele exemple de realizare, promotorul este un promotor CAGG. În unele realizări, promotorul este un promotor al ubiquitinei C (UbC).

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, p-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 ARNs, o enzimă secretată, o genă care codifică o proteină terapeutică 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 viral care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici, de exemplu, cuprinde o capsidă care cuprinde proteina de capsidă virală recombinantă (inclusiv o capsidă mozaică), în care capsida încapsulează o nucleotidă de interes. În unele exemple de realizare, o compoziție descrisă aici cuprinde (1) un vector viral având o capsidă care cuprinde o proteină recombinantă a capsidului virală descrisă aici și (2) un purtător acceptabil farmaceutic. Prezenta invenție furnizează o compoziție care cuprinde: (a) o proteină capsidă virală r particulă virală din prezenta invenție; și (b) un purtător acceptabil farmaceutic.

De asemenea, aici sunt descrise metode de fabricare și utilizare a proteinelor capsidă virale recombinante, vectori virali care le cuprind, compoziții etc. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, o particulă sau o compoziție virală a prezentei invenții pentru utilizare într-o metodă de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă care cuprinde punerea în contact a celulei țintă cu respectiva particulă virală sau respectiva compoziție, în care proteina capsidă virală cuprinde o țintire. ligand care anume leagă o proteină exprimată la suprafața celulei țintă. Prezenta invenție furnizează, în plus, o metodă de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă in vitro cuprinzând punerea în contact a celulei țintă cu o particulă sau compoziție virală a prezentei invenții, în care proteina capsidă virală cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific o proteină exprimată la suprafață, celula țintă în

unele exemple de realizare, metode *in vitro* de redirectionare a unui virus, de exemplu, un adenovirus, un virus adeno-asociat, etc.; livrarea încărcăturii diagnostice/terapeutice la o celulă țintă, etc. cuprinde punerea în contact a unei celule țintă cu un vector viral recombinant care cuprinde o proteină de capsidă virală recombinantă din prezenta invenție, în care capsida virală sau vectorul viral cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific o proteină exprimată pe suprafața celulei țintă. Prezenta invenție furnizează de asemenea un virus al prezentei invenții pentru utilizare în metode de redirectionare a unui virus, de exemplu, un adenovirus, un virus adeno-asociat, etc.; livrarea încărcăturii diagnostice/terapeutice la o celulă țintă etc. cuprinde punerea în contact a unei celule țintă (care poate fi *in vitro* sau *in vivo*, de exemplu, la un om) cu un vector viral recombinant care cuprinde o proteină recombinantă a capsidului viral așa cum este descrisă aici, în care capsida virală sau vectorul viral cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific o proteină exprimată pe suprafața celulei țintă. Astfel de metode pot include, iar vectorii virali ai prezentei invenții pot fi utilizați în metode care includ, ca primă etapă, producerea unui vector viral recombinant, de exemplu, cultivarea unei celule de ambalare în condiții suficiente pentru producerea de vectori virali, în care ambalarea celulei cuprinde o plasmidă care codifică proteina capsidului cuprinzând eticheta peptidică (primul membru) în absența sau prezența unei plasmide care codifică o proteină capsid de referință, incubarea proteinei capsid recombinant cu un al doilea membru înrudit legat operabil la un ligand de țintire etc. În unele exemple de realizare, celula țintă este o celulă hepatică (umană) și vectorul viral recombinant (mozaic) cuprind un ligand de țintire care se leagă în mod specific la receptorul de asialoglicoproteină, de exemplu, (h)ASGR1. În unele exemple de realizare, celula țintă este o celulă neuronală (umană), iar vectorul viral recombinant (mozaic) cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific GAB A, receptorul de transferină etc. în unele exemple de realizare, celula țintă este o celulă T (umană), iar vectorul viral recombinant (mozaic) cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific CD3, de exemplu CD3ε. În unele exemple de realizare, celula țintă este o celulă stem hematopoietică (umană), iar vectorul viral recombinant (mozaic) cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific CD34. în unele variante de realizare, celula țintă este o celulă de rinichi (umană). În unele exemple de realizare, celula țintă o celulă musculară (umană) și vectorul viral recombinant (mozaic) cuprind un ligand de țintire care leagă în mod specific o integrină. În unele exemple de realizare, celula țintă este o celulă canceroasă (umană), iar vectorul viral recombinant (mozaic) cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific un antigen asociat tumorii, de exemplu, E6 și E7, Her2 etc. În unele exemple de realizare, ligand de țintire se leagă la receptorul uman de glucagon (hGCGR).

De asemenea, aici sunt descrise metode de inactivare a unei capsid virale și/sau producere de vectori virali, 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 de capsid virală pentru a forma o secvență de nucleotide care codifică o proteină genetică. proteină de capsid modificată care cuprinde marcajul peptidic (în absența sau prezența unei plasmide care codifică o proteină de capsid de referință) și/sau (b) cultivarea unei celule de ambalare în condiții suficiente pentru producerea de vectori virali, 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 variante 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 virali cu nucleaze, de exemplu, ADNază I în prezența MgCl₂, (c) concentrarea vectorilor virali, (d) purificarea virusului. vectori și (e) orice combinație de (a)-(d). De asemenea, aici sunt furnizate vectori virali realizați conform metodei descrise aici, și celula de ambalare utilă pentru producerea unui vector viral așa cum este descris aici, de exemplu, celule de ambalare cuprinzând o plasmidă care codifică o proteină de capsid recombinantă descrisă.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Dosarul brevetului sau cererii conține cel puțin un desen executat color. Copii ale acestei publicații de brevet sau cererii de brevet cu desene color vor fi furnizate Oficiului la cerere și la plata taxei necesare.

Figura 1 oferă diagrame de împrăștiere obținute din sortarea celulelor activate de fluorescență (FACS) evaluând expresia proteinei fluorescente verzi (GFP) prin celule parentale HER2-pozitive (+) 293 hErbB2 sau HER2 negative (-) 293 fie „neinfectate”, fie celule infectate cu particule „AAV2 N587-SpyTag” sau celule infectate cu „AAV2 N587-SpyTag + particule C6.5-SpyC”. Capsidele ambelor virusuri conțin următoarele mutații: R585A, delR588 și inserția peptidei SpyTag (SECV ID NR: 1) direct după restul N587 (SECV ID NR: 13). Particulele C6.5-SpyC au fost conjugate la un scFv anti-HER2 (C6.5) fuzionat cu SpyCatcher (SECV ID NR: 3) prin Spy Tag. Virușii exprimă GFP ca un marker de transducție.

Figura 2 oferă diagrame de împrăștiere obținute din sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) evaluând expresia proteinei fluorescente verzi (GFP) prin celule parentale FfER2-pozitive (+) 293 hErbB2 sau FfER2 negative (-) 293 fie „neinfectate”, fie celule infectate cu particule „AAV2 N587-SpyTag” sau celule infectate cu particule „AAV2 N587-SpyTag + SpyC-anti-FIER2”. Capsidele ambelor virusuri conțin următoarele mutații: R585A, delR588 și inserția peptidei SpyTag (SECV ID NR: 1) direct după restul N587 (SECV ID NR: 13). Particulele SpyC-anti-HER2 au fost conjugate la un anticorp anti-HER2 (HERCEPTIN®) fuzionat cu SpyCatcher (SECV ID NR: 3) prin SpyTag. Virușii exprimă GFP ca un marker de transducție.

Figura 3 oferă diagrame de împrăștiere obținute din sortarea celulelor activate de fluorescență (FACS) evaluând expresia proteinei fluorescente verzi (GFP) prin celule parentale HER2-pozitive (+) 293 hErbB2 sau HER2 negative (-) 293 infectate cu particule „AAV2 wildtype” sau celule infectate cu „AAV2 G453-SpyTag + SpyC-anti - particule HER2”. Capsidele „AAV2 de tip sălbatic” nu au mutații sau modificări (SECV ID NR: 9), în timp ce capsidul „AAV2 G453-SpyTag” este o particulă virală mozaic compusă dintr-un raport de 1:7 între proteinele capsidului „SpyTag” în care este inserat SpyTag. direct după restul G453 flancat de un linker de 10 aminoacizi (SECV ID NR:29) și capsidul „AAV2 HBM” fără SpyTag, dar care conține mutațiile R585A și R588A (SECV ID NR: 11). Particulele de mozaic AAV2 G453-SpyTag au fost conjugate la un anticorp anti-HER2 (HERCEPTIN®) fuzionat cu SpyCatcher (SEQ ID NO:3) prin SpyTag. Virușii exprimă GFP ca un marker de transducție.

Figura 4A oferă un western blot folosind anticorpul Bl, care recunoaște un epitop liniar împărțit de proteinele capsidului AAV2 VP1, VP2 și VP3, analizând reacția dintre un scFv anti-HER2 fuzionat cu SpyCatcher „SpyC-anti-Her2 scFv” și un panou de particule virale AAV2 compus din capsidul cu următoarele mutații: R585A, delR588 și inserția peptidei SpyTag direct după restul N587, flancat de linkeri de aminoacizi de lungimi diferite (Linker 1, Linker 2, Linker 4, Linker 6, Linker 8 și Linker 10) (SEQ ID NR: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25).

Figura 4B oferă procentul de celule HER2+ (gri, axa y) care exprimă GFP față de procentul de celule HER2- care exprimă GFP (negru, axa y) la 5 zile după infecție cu particule virale AAV2 compuse din capsidul cu următoarele mutații: R585A, delR588 și N587-SpyTag flancate de linkeri de aminoacizi de lungimile indicate (Linker 1, Linker 2, Linker 4, Linker 6, Linker 8 și Linker 10) (SECV ID NR: 13, 15, 17, 19, 21), 23 și, respectiv, 25) (axa x). Particulele AAV2 N587 SpyTag au fost conjugate la un scFv anti-HER2 fuzionat cu SpyCatcher (SECV ID NR:3).

Figura 5A oferă un western blot folosind anticorpul Bl, care recunoaște un epitop liniar împărțit de proteinele capsidului AAV2 VP1, VP2 și VP3, analizând reacția dintre un anticorp anti-HER2 (HERCEPTIN®) fuzionat cu SpyCatcher „anticorp SpyC-anti-Her2”, și un panou de particule virale AAV2 format din capsidul cu următoarele mutații: R585A, delR588 și inserția peptidei SpyTag direct după restul N587, flancat de linkeri de aminoacizi de lungimi diferite (Fără linker, Linker 1, Linker 2, Linker 4, Linker 6, Linker 8 și Linker 10) (SECV ID NR: 13, 15, 17, 19, 21, 23 și respectiv 25)

Figura 5B oferă procentul de celule HER2+ (gri, axa y) care exprimă GFP față de procentul de celule HER2- care exprimă GFP (negru, axa y) la 5 zile după infecție cu particule AAV2 de tip sălbatic (în greutate) sau particule virale AAV2 compuse din capsidul cu următoarele mutații: R585A, delR588 și N587- SpyTag flancat de linkeri de aminoacizi de lungimile indicate (Fără linker, Linker 1, Linker 2, Linker 4, Linker 6, Linker 8 și Linker 10) (SECV ID NR: 13, 15, 17, 19, 21, 23 și 25, respectiv) (axa x). Particulele AAV2 N587 SpyTag au fost conjugate la un anticorp anti-HER2 (HERCEPTIN®) fuzionat cu SpyCatcher (SEQ ID NR:3).

Figura 6A oferă un western blot folosind anticorpul Bl, care recunoaște un epitop liniar împărțit de proteinele capsidului AAV2 VP1, VP2 și VP3, analizând reacția dintre un anti-HER2 scFv C6.5 fuzionat cu SpyCatcher (SEQ ID NO:3)”. SpyC-anti-HER2 scFv” și un panou de particule virale mozaic AAV2 compus din amestecuri între proteinele capsidului "SpyTag" care conțin mutații R585A, delR588 și N587-linker 10-SpyTag (SEQ ID NR:25) și capsidul "HBM" proteine care conțin mutații R585A și R588A, dar fără SpyTag (SECV ID NR: 11). Proteinele capsidelor „SpyTag” și „HBM” au fost amestecate în raporturi diferite (1:0, 1:1 și 1:3).

Figura 6B oferă procentul de celule HER2+ 293 hErbB2 (bare gri) și celule parentale HER2-293 (bare negre) care exprimă GFP (axa y) la 5 zile după infecție cu particule virale mozaic AAV2 (axa x) compusă din amestecuri între proteinele capsidului „Linker 10” care conțin mutații R585A, delR588 și N587-linker 10-SpyTag (SECV ID NR: 25) și proteinele capsidului „HBM” care conțin mutații R585A și R588A, dar fără SpyTag (SECV ID NR: 11) . Proteinele capsidului „Linker 10” și „HBM” au fost amestecate în raporturi diferite (1:0, 3:1, 1:1 și 1:3) și au fost conjugate la un scFv anti-HER2 fuzionat cu SpyCatcher (SEQ ID NO. :3).

Figura 7A oferă un western blot folosind anticorpul Bl, care recunoaște un epitop liniar împărțit de proteinele capsidului AAV2 VP1, VP2 și VP3, analizând reacția dintre un anticorp anti-HER2

(HERCEPTIN®) fuzionat cu SpyCatcher (SEQ ID NR:3) „Anticorp SpyC-anti-HER2” și un panou de particule virale mozaic AAV2 compus din amestecuri între proteinele capsidului „Spy Tag” care conțin mutații R585A, delR588 și N587-linker 10-SpyTag (SEQ ID NR:25) și „HBM” „proteine capsidului care conțin mutații R585A și R588A, dar fără SpyTag (SECV ID NR: 11). Proteinele de capsid „SpyTag” și „HBM” au fost amestecate în raporturi diferite (1:0, 3:1, 1:1 și 1:3).

Figura 7B oferă procentul de celule HER2+ 293 hErbB2 (bare gri) și celule parentale HER2-293 (bare negre) care exprimă GFP (axa y) la 5 zile după infecție cu particule virale mozaic AAV2 (axa x) compusă din amestecuri între proteinele capsidului „Linker 10” care conțin mutații R585A, delR588 și N587-linker 10-SpyTag (SECV ID NR: 25) și proteinele capsidului „HBM” care conțin mutații R585A și R588A, dar fără SpyTag (SECV ID NR: 11). Proteinele capsidului „Linker 10” și „HBM” au fost amestecate în raporturi diferite (1:0, 3:1, 1:1 și 1:3) și au fost conjugate la un anticorp anti-HER2 (HERCEPTIN®) fuzionat cu SpyCatcher (SECV ID NR:3).

Figura 8A oferă un western blot folosind anticorpii B1, care recunoaște un epitop liniar împărțit de proteinele capsidului AAV2 VP1, VP2 și VP3, analizând reacția dintre un anticorp anti-HER2 (HERCEPTIN®) fuzionat cu SpyCatcher (SEQ ID NR:3) „Anticorp SpyC-anti-HER2” și un panou de particule virale mozaic AAV2 compus din amestecuri între proteinele capsidului „SpyTag” și proteinele capsidului „HBM” care conțin mutații R585A și R588A, dar fără SpyTag (SEQ ID NR: 11). Proteinele capsidului „SpyTag” includ „G453 SpyTag”, care conține mutațiile R585A, R588A și inserția peptidei SpyTag direct după restul G453 (SEQ ID NR:27) și „G453 LinkerLO SpyTag”, care conține mutațiile R585A, R588A și inserție. a peptidei SpyTag direct după restul G453 și flancat pe ambele părți de 10 aminoacizi linker (SECV ID NR:29). Capsidul „G453 SpyTag” și „G453 LinkerLO SpyTag” indicate au fost amestecate cu capsid „HBM” în raporturi diferite (1:0, 1:3 și 1:7).

Figura 8B oferă procentul de celule HER2+ 293 hErbB2 (bare gri) și celule parentale HER2-293 (bare negre) care exprimă GFP (axa y) la 5 zile după infecție cu particule virale AAV2 de tip sălbatic „wt” sau mozaic (x- axa) compusă din amestecuri între proteinele capsidului „G453 SpyTag” care conțin mutații R585A, R588A și inserarea peptidei Spy Tag direct după restul G453 (SEQ ID NO:27) sau proteinele capsidului „G453 Linker 10 SpyTag” conținând mutații R585A, R588A și inserarea peptidei SpyTag direct după restul G453 și flancat pe ambele părți de 10 aminoacizi linker (SECV ID NR:29) și proteine de capsid „HBM” care conțin mutații R585A și R588A, dar fără SpyTag (SECV ID NR: 11). Capsidul „G453 SpyTag” sau „G453 LinkerLO SpyTag” și „HBM” au fost amestecate în raporturi diferite (1:0 „pur”, 1:3 și 1:7) și au fost conjugate la un anticorp anti-HER2 (HERCEPTIN®), fuzionat cu SpyCatcher (SECV ID NR:3).

Figura 9 oferă diagrame de împrăștiere obținute din sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) evaluând expresia proteinei fluorescente verzi (GFP) de către celulele pozitive (+) pentru expresia ASGR1 după infectarea cu particule „AAV2 wt”, particule „AAV2 SpyTag fără anticorp” sau particule „AAV2 SpyTag Anti-ASGR1”. Capsidul „AAV2 wt” sunt de tip sălbatic fără mutații sau modificări (SECV ID NR:9), în timp ce capsid „AAV2 SpyTag” conține următoarele mutații: R585A, delR588 și inserția peptidei SpyTag direct după restul N587 (SECV ID NR. : 13). Particulele „AAV2 SpyTag Anti-ASGR1” au fost conjugate la un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care leagă în mod specific ASGR1. De asemenea, sunt prezentate diagrame de împrăștiere obținute din sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) care evaluează expresia proteinei fluorescente verzi (GFP) de către celulele pozitive (+) pentru expresia CD63 după infecția cu particule „AAV2 wt”, particule „AAV2 SpyTag fără anticorp” sau Particule „AAV2 SpyTag Anti-CD63”. Capsidul „AAV2 wt” sunt de tip sălbatic fără mutații sau modificări (SECV ID NR: 9), în timp ce capsid „AAV2 SpyTag” conține următoarele mutații: R585A, delR588 și inserarea peptidei SpyTag direct după restul N587 (SECV ID NR. : 13). Particulele „AAV2 SpyTag Anti-CD63” au fost conjugate la un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care leagă în mod specific CD63. Virusii exprimă GFP ca un marker de transducție. De asemenea, sunt prezentate diagramele de dispersie obținute din sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) care evaluează expresia proteinei fluorescente verzi (GFP) de către celulele pozitive (+) pentru expresia PTPRN după infecția cu particule „AAV9 wt”, particule „AAV2 SpyTag Irrelevant Antibody” sau „AAV2 SpyTag Anti-PTPRN” particule. Capsidul „AAV9 wt” sunt de tip sălbatic fără mutații sau modificări (SECV ID NR:31), în timp ce capsidul „AAV2 SpyTag” sunt particule virale mozaic compuse dintr-un raport de 1:7 între proteinele capsidului „SpyTag” în care SpyTag este inserat direct următorul rest G453 flancat de un linker de 10 aminoacizi (SECV ID NR:29) și între capsid fără SpyTag dar care conține o secvență de aminoacizi Myc tag inserată direct după restul N587 (SECV ID NR:53) care reduce legarea naturală a receptorului. Particulele „AAV2 Spy Tag Irrelevant Antibody” au fost conjugate la un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care nu leagă PTPRN. Particulele „AAV2 SpyTag Anti-PTPRN” au fost conjugate la un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care leagă în mod specific PTPRN. Virusii exprimă GFP ca un marker de transducție. De asemenea, sunt prezentate rezultatele unui test de

luciferază care evaluează expresia Luciferazei Firefly de către celulele pozitive (+) pentru hENTPD3 după infecția cu particule „AAV2 wt”, particule „AAV2 + mAb irelevante”, particule „AAV2 + Anti-ENTPD3” și „AAV2 + Particule anti-hCD20”. Capsidele „AAV2 wt” sunt de tip sălbatic fără mutații sau modificări (SECV ID NR: 9), în timp ce capsidul „AAV2 + anticorp” conține următoarele mutații: R585A, delR588 și inserția peptidei SpyTag direct după restul N587 (SECV ID NR: 13). Particulele „AAV2 + mAb irelevant” au fost conjugate la un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care nu se leagă de hENTPD3. Particulele „AAV2 + anti-hCD20” au fost conjugate la un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care leagă în mod specific hCD20, care nu este exprimat pe celulele hENTPD3+ și servește ca un control negativ suplimentar. Particulele „AAV2 + anti-ENTPD3” au fost conjugate cu un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care leagă în mod specific hENTPD3. Virusurile exprimă Luciferaza de licurici ca un marker al transducției. De asemenea, sunt prezentate rezultatele unui test de luciferază care evaluează expresia Luciferazei Firefly de către celulele pozitive (+) pentru hCD20 după infecția cu particule „AAV2 wt”, particule „AAV2 + mAb irelevante”, particule „AAV2 + Anti-ENTPD3” și „AAV2 + Particule anti-hCD20”. Capsidele „AAV2 wt” sunt de tip sălbatic fără mutații sau modificări (SECV ID NR:9), în timp ce capsidul „AAV2 + anticorp” conține următoarele mutații: R585A, delR588 și inserția peptidei SpyTag direct după restul N587 (SECV ID NR: 13). Particulele „AAV2 + mAb irelevant” au fost conjugate la un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care nu se leagă de hENTPD3. Particulele „AAV2 + anti-ENTPD3” au fost conjugate la un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care leagă în mod specific hENTPD3, care nu este exprimat pe celulele hCD20+ și servește ca un control negativ suplimentar. Particulele „AAV2 + anti-hCD20” au fost conjugate la un anticorp fuzionat cu SpyCatcher care leagă în mod specific hCD20. Virusurile exprimă Luciferaza de licurici ca un marker al transducției.

Figura 10A oferă un western blot folosind anticorpul B1, care recunoaște un epitop liniar împărțit de proteinele capsid AAV9 VP1, VP2 și VP3, analizând reacția dintre un anticorp anti-HER2 (HERCEPTIN®) fuzionat cu SpyCatcher (SEQ ID NR:3) „SpyC-Herceptin” și un panou de particule virale AAV9. Aceste particule virale AAV9 sunt compuse din capsid care conține mutația W503 A, care reduce legarea receptorului și inserția peptidei Spy Tag direct după restul A589 sau G453 fără un linker sau flancate de un linker de 10 aminoacizi sau particule virale AAV9 mozaic cuprinse în a unui raport de 1:7 între proteinele capsid „SpyTag” care conține mutații W503A și fie A589-LinkerIO-SpyTag, fie G453-LinkerIO-SpyTag, cu proteinele capsid „W503 A” conținând mutația W503 A, dar fără SpyTag. **Figura 10B** oferă procentul de celule HER2+ 293 hErbB2 (bare gri) și celule parentale HER2-293 (bare negre) (axa y) care exprimă GFP la cinci zile după infecție cu particule virale AAV9 conjugate la un anticorp anti-HER2 (HERCEPTIN). ® fuzionat cu SpyCatcher (axa x). Aceste particule virale AAV9 sunt compuse din capsid care conține mutația W503 A, care reduce legarea receptorului și inserția peptidei SpyTag direct după restul A589 (sau G453) fără un linker sau flancate de un linker de 10 aminoacizi sau particule virale AAV9 mozaic, compus dintr-un raport de 1:7 între proteinele capsid „SpyTag” care conține mutații W503A și fie A589-LinkerIO-SpyTag, fie G453-Linker 10-SpyTag, cu proteinele capsid „W503A” conținând mutația W503 A, dar fără SpyTag. Virusii exprimă GFP ca un marker de transducție.

Figura 11 furnizează imagini de microscopie cu imunofluorescență ale probelor de ficat prelevate de la șoareci C57BL/6 modificate transgenic pentru a exprima ASGR1 uman pe celulele hepatice. Probele au fost colectate la zece zile după injectarea intravenoasă cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) sau cu 2,5xl genom Ouiviral (vg)/animal de particule AAV2 Spy Tagged purtând o nucleotidă CAGG eGFP de interes și modificate de (1) anticorp SpyCatcher-anti-CD3 uman (AAV SpyT-anti-hCD3 CAGG eGFP) sau (2) Anticorp SpyCatcher-anti-uman ASGR1 (AAV SpyT- anti-hASGR1 CAGG eGFP). Șoarecii au fost sacrificați și perfuzați transcardic cu 4% PFA. Organele ficatului, rinichilor și inimii au fost colectate și deshidratate în zaharoză 15% urmată de zaharoză 30%. Apoi organele au fost cyro-sectonate 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). Fiecare imagine reprezintă un mouse. Capsidul „Spy Tagged AAV2” conține următoarele mutații R585A, delR588 și inserarea peptidei SpyTag direct după restul N587 (SECV ID NR: 13). Virusii exprimă eGFP ca un marker de transducție.

Figura 12 oferă imagini de luminescență ale șoarecilor individuali care nu exprimă ASGR1 uman pe celulele hepatice (control) și șoareci modificate genetic care exprimă ASGR1 uman pe celule hepatice (șoareci ASGR1 umanizați) la 14 zile după injectarea intravenoasă cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) sau cu 3.0xl genomu uivral (vg)/animal de tip sălbatic (wt) particule AAV2 sau particule AAV2 etichetate cu spion care poartă nucleotide luciferazei de licurici de interes și modificate de (1) anticorp SpyCatcher-anti-uman CD63 sau (2) SpyCatcher-anti-uman ASGR1 anticorp. Aceste particule virale AAV2 sunt particule virale mozaic compuse dintr-un raport 1:7 între proteinele capsidelor „SpyTag” în care eticheta Spy este inserată direct după restul G453 flancat de un linker de 10 aminoacizi

(SEQ ID NR:29) și între capsidă fără SpyTag dar conținând o secvență de aminoacizi Myc tag inserată direct după restul N587 (SEQ ID NO:53) care reduce legarea naturală a receptorului. Virușii exprimă luciferaza Firefly ca un marker de transducție. Șoarecii au fost anesteziați folosind izofluran, injectați cu un substrat Luciferin și fotografiați 10 minute mai târziu folosind sistemul IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (PerkinElmer).

Figura 13 oferă imagini de imunohistochimie ale probelor de ficat și pancreas prelevate de la șoareci C57BL/6 la 4 săptămâni după injectarea intravenoasă cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) sau cu l. Genom viral OxLO12 (vg)/animal de particule AAV9 de tip sălbatic (în greutate), sau cu l. Genomul viral OxLO13 (vg)/animalul particulelor AAV2 SpyTagged purtând o nucleotidă CMV eGFP de interes și modificată de (1) anticorp SpyCatcher-anti-uman ASGR1 (AAV2 SpyTag + mAb irelevant) sau (2) SpyCatcher-anticorp anti-uman ENTPD3 (AAV2 SpyTag + anti-ENTPD3). Șoarecii au fost sacrificați și ficatul și pancreasul au fost colectați și fixați în formol tamponat neutru 10%. Apoi organele au fost încorporate și cyro-secționate pe lame și colorate cu anticorpi anti-GFP. Fiecare imagine reprezintă un mouse. Aceste particule virale AAV2 sunt particule virale mozaic compuse dintr-un raport de 1:7 între proteinele capsidelor „SpyTag” în care SpyTag este inserat direct după restul G453 flancat de un linker de 10 aminoacizi (SEQ ID NO:29) și între capsidă fără SpyTag dar conținând o secvență de aminoacizi Myc tag inserată direct după restul N587 (SEQ ID NO:53) care reduce legarea naturală a receptorului. Virușii exprimă eGFP ca un marker de transducție. Se raportează că ENTPD3 este exprimat în celulele insulelor pancreatice și în limbă, printre alte tipuri de celule, dar nu și în ficat. Particulele de AAV2 SpyTagged au fost îndepărtate din ficat; Expresia eGFP nu a fost observată în ficatul șoarecilor injectați cu particule „AAV2 SpyTag + mAb irelevant” sau „AAV2 SpyTag + anti-ENTPD3”. Colorarea pozitivă în insulele pancreatice a fost detectată în proba de pancreas a unuia dintre șoarecii injectați cu particule „AAV2 SpyTag + anti-ENTPD3”.

Figura 14 oferă imagini imunohistochimice ale probelor de ficat și limbă prelevate de la șoareci C57BL/6 la 14 zile după injectarea intravenoasă cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) sau cu genom viral 2,0x10 (vg)/animal de particule AAV9 de tip sălbatic (gr) sau Spy Tagged Particule AAV2 care poartă un acid nucleic CMV eGFP de interes și modificate de (1) anticorp SpyCatcher-anti-uman ASGR1 (AAV2 Spy Tag + mAb irelevant) sau (2) SpyCatcher-anticorp ENTPD3 anti-uman, care se leagă de ENTPD3 de șoarece (AAV2) Spy Tag + anti- ENTPD3). Șoarecii au fost sacrificați și ficatul și limbile au fost colectate și fixate în formol tamponat neutru 10%. Apoi organele au fost încorporate și cyro-secționate pe lame și colorate cu anticorpi anti-GFP. Fiecare imagine reprezintă un mouse; trei șoareci au fost injectați și analizați din grupurile „AAV2 SpyTag + mAb irelevant” și „AAV2 SpyTag + anti-ENTPD3” și toți au prezentat modele de expresie GFP similare. Aceste particule virale AAV2 sunt particule virale mozaic compuse dintr-un raport de 1:7 între proteinele capsidelor „SpyTag” în care SpyTag este inserat direct după restul G453 flancat de un linker de 10 aminoacizi (SEQ ID NO:29) și între capsidă fără SpyTag dar care conține o secvență de aminoacizi Myc tag inserată direct după restul N587 (SEQ ID NO: 52) care reduce legarea naturală a receptorului. Virușii exprimă eGFP ca un marker de transducție. Se raportează că ENTPD3 este exprimat în limba șoarecelui, dar nu și în ficat (date extrase din bazele de date publice GenePaint.org <http://A-w/v.informaticsjax.org/test/GI:5423021> și proiectul Riken FANTOM5, set de date pentru șoareci adulți). Expresia eGFP nu a fost observată în ficatul șoarecilor injectați cu particule „AAV2 SpyTag + mAb irelevant” sau „AAV2 SpyTag + anti-ENTPD3”, dar a fost detectată în limba tuturor celor trei șoareci injectați cu „AAV2 SpyTag + anti-ENTPD3”.

DESCRIERE DETALIATA

Dezvăluirea tehnică prezentată mai jos poate, în unele privințe, să depășească domeniul de aplicare al invenției, care este definit de revendicările anexate. Elementele dezvăluirii care nu intră în domeniul de aplicare al revendicărilor sunt furnizate cu titlu informativ, și anume pentru a plasa invenția reală revendicată într-un context tehnic mai larg.

WO201611291 descrie utilizarea unei perechi de legare specifice (SpyCatcher: SpyTag) pentru a genera particule de tip virus (VLP) dintr-un bacteriofag AP205 modificat care afișează antigene imunogene la o densitate mare pe capsidă AP205 în scopul vaccinării. Teoretic, în scopul redirectionării unui vector viral, un astfel de grad ridicat de modificare a capsidă virale poate fi de dorit pentru a se asigura că tropismul natural al vectorului viral este substanțial redus sau abolit. Cu toate acestea, o astfel de afișare a liganzilor de țintire la o densitate mare pe suprafața virală poate interfera cu eficiența transducției. A se vedea, Exemplele 4 și 5. Pentru a obține eficiențe optime de transducție, s-a descoperit că eficiența optimă de transducție apar atunci când gradul de modificare a suprafeței virale cu elementul este scăzut. Ca atare, sunt furnizate aici particulele virale modificate genetic, compozițiile care le cuprind și metodele de fabricare și utilizare a acestora.

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 „ea” 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 dezvăluiri.

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 (CL). 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 tetrameric 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 F_v a anticorpului. Anticorpii cu un singur domeniu cuprind un singur domeniu de legare la antigen, de exemplu, un V_H sau un V_L. Domeniul de legare la antigen al unui anticorp, de exemplu, partea unui anticorp care recunoaște și se leagă la primul membru al unei perechi de legare specifică a unui antigen, este denumit și „paratop”. „Este o regiune mică (de 5 până la 10 aminoacizi) a regiunii F_v 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 prim membru al unei perechi de legare specifică atunci când paratopul leagă primul membru al unei perechi de legare specifică cu o afinitate mare. Termenul „anticorp de mare afinitate” se referă la un anticorp care are un K_D în raport cu primul său membru țintă al unei perechi de legare specifică de aproximativ 1×10^{-9} M sau mai mică (de exemplu, aproximativ 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, sau aproximativ 1×10^{-12} M). Într-o variantă de realizare, K_D este măsurată prin rezonanța plasmonilor de suprafață, de exemplu, BIACORE™; într-o altă variantă de realizare, K_D este măsurată 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-un 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).

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 viral și sunt componente cis esențiale pentru generarea vectorilor 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 prim membru al unei perechi de legare specifică legată selectiv de primul membru al unei proteine de legare a perechii de legare specifică în care apar. Lanțurile ușoare le includ, de asemenea, pe cele care leagă și recunosc sau asistă lanțul greu sau alt lanț ușor în legarea și recunoașterea unuia sau mai multor primii membri ai unei perechi de legare specifice legați selectiv de primul membru al unei proteine de legare a perechilor de legare specifice în care ei apar. Lanțurile ușoare comune sau universale le includ pe cele derivate dintr-o genă umană V_{K1-39J_K} sau o genă umană V_{K3-20J_K} și includ versiuni ale acestora cu mutații somatice (de exemplu, maturate în afinitate). Exemple de segmente V_L umane includ un segment de genă umană V_{K1-39} , un segment de genă umană V_{K3-20} , un segment de genă umană V_{L1-40} , un segment de genă umană V_{L1-44} , un segment de genă umană V_{L2-8} , un segment uman V_{L2-14} segmentul genei și segmentul genei umane V_{L3-21} și includ versiuni ale acestora cu mutații somatice (de exemplu, maturate prin 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 „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 „aproximativ” depinde de sistemul particular studiat și poate fi apreciată cu ușurință de către un specialist în domeniu.

Termenul "proteină capsidă" include o proteină care face parte din capsidă virusului. Pentru virusurile adeno-asociate, proteinele capsidelor sunt denumite în general VP1, VP2 și/sau VP3 și sunt codificate de gena cu un singur cap. Pentru AAV, cele trei proteine de capsidă 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, încorporat aici ca referință în întregime. VP1 al AAV2 este, în general, tradus dintr-un codon de început 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 început ACG mai slab pentru producerea 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, încorporat aici ca referință în întregime. Secvențele de aminoacizi ale proteinelor capsidă ale virusurilor adeno-asociate sunt bine cunoscute în domeniu și în general conservate, în special în 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 capsidelor 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 fi capabil să determine, respectiv, cu ușurință, poziția aceluiși aminoacid în cadrul proteinei capsidă VP2 și/sau VP3 a AAV și poziția corespunzătoare a aminoacizilor dintre diferitele serotipuri. 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 AAV-2 a proteinei de înveliș majore VP1 prezentată ca SECV. ID NR: 9, un specialist în domeniu ar fi capabil să determine, respectiv, cu ușurință, poziția aceluiși aminoacid în cadrul proteinei capsidă VP2 și/sau VP3 a AAV și aminoacidul corespunzător și poziția dintre diferitele serotipuri de AAV. În plus, un profesionist calificat ar fi capabil să schimbe domenii între proteinele capsidelor diferitelor serotipuri AAV pentru formarea unei „proteine capsidă himerice”.

Schimbarea domeniului între două construcții de proteine de capsidă AAV pentru generarea unei „proteine de capsidă AAV himerice” a fost descrisă, a se vedea, de exemplu, Shen și colab. (2007) Mol. Therapy 15(11): 1955-1962, încorporat aici în întregime ca referință. O "proteină capsidă AAV himerică" include o proteină 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 de 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 capsidă a acelui serotip și unul sau mai multe domenii dintr-o proteină capsidă a unui serotip diferit. De exemplu, o proteină capsidă himerică AAV2 include o proteină capsidă care cuprinde unul sau mai multe domenii ale unei proteine capsidă AAV2 VP1, VP2 și/sau VP3 și unul sau mai multe domenii ale unei proteine capsidă 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 recombinant proteine 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 proteine VP1, VP2 și/sau VP3 codificate de o genă cap de referință, de ex. 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 genă de referință de control care codifică proteinele VP1, VP2 și VP3 identice cu proteinele recombinante VP1, VP2 și/sau VP3, dar pentru absența epitopului heterolog, o genă cap de referință de tip sălbatic mutant care codifică substanțial proteine de tip sălbatic VP1, VP2 și/sau VP3 ale aceluiași serotip AAV ca și VP1, VP2 recombinant, și/sau proteine VP3, dar pentru o mutație (de exemplu, inserție, substituție, ștergere), mutație care reduce de preferință tropismul proteinelor VP1, VP2 și VP3 de tip sălbatic. În unele variante 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 prim membru al unei perechi de legare specifice (de exemplu, recunoașterea primului membru al unei perechi de legare specifice 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 din regiune variabilă, 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 cuprinzând un lanț asemănător imunoglobulinei cuprinzând un domeniu variabil legat în mod operabil la o regiune constantă a lanțului greu, care nu este capabilă să se asocieze cu un lanț ușor deoarece regiunea constantă a lanțului greu nu are de obicei un domeniu CHI 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 CHI funcțional sau (ii) o proteină homodimerică de legare a antigenului 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 lipsită de un domeniu C_{H1} funcțional. 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 a lanțului greu identic lipsit de un domeniu C_{H1} funcțional. În plus, fiecare lanț asemănător imunoglobulinei a unei proteine 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 VH ” sau „proteină care leagă antigen cu un singur domeniu VH ”, vezi, de ex., Brevetul U.S. Nr. 8.754.287; Publicația de brevet SUA nr. 20140289876; 20150197553; 20150197554; 20150197555; 20150196015; 20150197556 și 20150197557, fiecare dintre acestea fiind încorporat în întregime prin

referință. 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 sau „proteină de legare a antigenului cu domeniu unic VL”, vezi, de exemplu, Publicația S.U.A. 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 întreagă 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 genă V_L și J_L de lanț ușor, derivate dintr-un repertoriu de segmente de genă V și J ale lanțului ușor prezente în linia germinativă. Secvențele, locațiile și nomenclatura pentru segmentele genelor de lanț ușor V și J pentru diferite organisme pot fi găsite în baza de date EVIGT, 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 prim membru al unei perechi de legare specifică legată selectiv de primul membru al unei proteine de legare a perechii de legare specifică în care apar. Lanțurile ușoare le includ, de asemenea, pe cele care leagă și recunosc, sau asistă lanțul greu în legarea și recunoașterea, a unuia sau mai multor membri ai unei perechi de legare specifice legați selectiv de primul membru al unei proteine de legare a perechii de legare specifice în care apar. Lanțurile ușoare le includ, de asemenea, pe cele care leagă și recunosc, sau asistă lanțul greu în legarea și recunoașterea, a unuia sau mai multor membri ai unei perechi de legare specifice legați selectiv de primul membru al unei proteine de legare a perechii de legare specifice 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 prin afinitate).

Expresia "legat operabil", așa cum este utilizat 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, juxtapunerea care 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. În multe variante de realizare, "legarea operabilă" implică legarea covalentă a componentelor sau elementelor relevante unele cu altele. Specialiștii în domeniu vor aprecia cu ușurință că, în unele exemple de realizare, legătura covalentă nu este necesară 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 efectua expresia și procesarea secvențelor de codificare la care sunt legate. În unele variante 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 variante 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 variante 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 capsidă recombinantă" include o proteină capsidă care are cel puțin o mutație în comparație cu proteina capsidă corespunzătoare a virusului de tip sălbatic, care tip sălbatic poate fi un virus de referință și/sau martor pentru studiu comparativ. O proteină de capsidă recombinantă include o proteină de capsidă care cuprinde o secvență heterologă de aminoacizi, care poate fi inserată în

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

proteinei capsinei sunt substituiți cu 5 sau mai mulți aminoacizi heterologi). „Redirecționarea” sau „redirecționarea” poate include un scenariu în care vectorul de tip sălbatic vizează mai multe celule dintr-un țesut și/sau mai multe organe dintr-un organism, care țintire generală a țesutului sau organelor este redusă la abolită prin inserarea epitopului heterolog, și care redirecționarea către mai mult o celulă specifică din țesut sau un organ specific din organism este realizată cu ligand de țintire care leagă un marker exprimat de celula specifică. O astfel de redirecționare sau redirecționare poate include, de asemenea, un scenariu în care vectorul de tip sălbatic vizează un țesut, care țintire a țesutului este redusă la abolită prin inserarea epitopului heterolog și care redirecționare către un țesut complet diferit este realizată cu ligandul de țintire.

„Pereche de legare specifică”, „pereche de legare proteină: proteină” și altele asemenea includ două proteine (de exemplu, un prim membru (de exemplu, o primă polipeptidă) și un al doilea membru înrudit (de exemplu, o a doua polipeptidă)) care interacționează pentru a forma o legătură izopeptidică covalentă în condiții care permit sau facilitează formarea legăturii izopeptidice, în care termenul „înrudit” se referă la componente care funcționează împreună, adică să reacționeze împreună pentru a forma o legătură izopeptidică. Astfel, două proteine care reacționează împreună eficient pentru a forma o legătură izopeptidică în condiții care permit sau facilitează formarea legăturii izopeptidice pot fi, de asemenea, menționate ca fiind o pereche „complementară” de linkerii peptidici. Perechile de legare specifice capabile să interacționeze pentru a forma o legătură izopeptidică covalentă sunt revizuite în Veggiani și colab. (2014) Trends Biotechnol. 32:506 și includ perechi de legare peptidă:peptidă, cum ar fi Spy Tag: Spy Catcher, SpyTag002:SpyCatcher002; SpyTag:KTag; isopeptag:pilin C, SnoopTag:SnoopCatcher etc. În general, o etichetă peptidică se referă la un membru al unei perechi de legare proteină: proteină, care are în general mai puțin de 30 de aminoacizi în lungime și care formează o legătură izopeptidică covalentă cu a doua proteină înrudită, în care a doua proteină înrudită este în general mai mare, dar poate avea, de asemenea, o lungime mai mică de 30 de aminoacizi, cum ar fi în sistemul SpyTag:KTag.

Termenul „legătură izopeptidică” se referă la o legătură amidă între o grupare carboxil sau carboxamidă și o grupare amino, dintre care cel puțin una nu este derivată dintr-un lanț principal de proteină sau, în mod alternativ, văzută nu face parte din scheletul proteinei. O legătură izopeptidică se poate forma într-o singură proteină sau poate apărea între două peptide sau o peptidă și o proteină. Astfel, o legătură izopeptidică se poate forma intramolecular într-o singură proteină sau intermolecular, de exemplu între două molecule de peptidă/proteină, de ex. între doi linkerii peptidici. În mod obișnuit, o legătură izopeptidică poate apărea între un rest de lizină și un rest de asparagină, acid aspartic, glutamina sau acid glutamic sau gruparea carboxil terminală a lanțului proteic sau peptidic sau poate apărea între capătul alfa-amino al catenei proteice sau peptidice. și o asparagină, acid aspartic, glutamină sau acid glutamic. Fiecare rest al perechii implicat în legătura izopeptidică este denumit aici un rest reactiv. În exemplele de realizare preferate ale invenției, se poate forma o legătură izopeptidică între un rest de lizină și un rest de asparagină sau între un rest de lizină și un rest de acid aspartic. În particular, pot apărea legături izopeptidice între amina catenei laterale a lizinei și gruparea carboxamidă a asparaginei sau gruparea carboxil a unui aspartat.

Sistemul Spy Tag: Spy Catcher este descris în brevetul S.U.A. nr. 9.547.003 și Zakeri et al. (2012) PNAS 109:E690-E697, fiecare dintre acestea fiind încorporat aici în întregime prin referință și este derivat din domeniul CnaB2 al proteinei de legare fibronectivă a Streptococcus pyogenes FbaB. Prin împărțirea domeniului, Zakeri și colab. a obținut o peptidă „SpyTag” având secvența AHIVMVDAYKPTK (SECV ID NR: 1) care formează o legătură amidă la proteina sa înrudită „SpyCatcher”, o polipeptidă de 112 aminoacizi având secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR:3. (Zakeri (2012), supra). O pereche suplimentară de legare specifică derivată din domeniul CnaB2 este SpyTag:KTag, care formează o legătură izopeptidică în prezența SpyLigase. (Fierer (2014) PNAS 111:E1176-1181) SpyLigase a fost conceput prin excizarea catenei β din SpyCatcher care conține o lizină reactivă, rezultând KTag, etichetă peptidică cu 10 reziduuri având secvența de aminoacizi ATHIKFSKRD (SEQ). Sistemul SpyTag002:SpyCatcher002 este descris în Keeble et al (2017) Angew Chem IntEdEngl 56: 16521-25, încorporat aici în întregime ca referință. SpyTag002 are secvența de aminoacizi VPTIVMVDAYKRYK, prezentată ca SECV ID NR: 54 și leagă SpyCatcher002 (SECV ID NR:55).

Sistemul SnoopTag:SnoopCatcher este descris în Veggiani (2016) PNAS 113: 1202-07. Domeniul asemănător Ig D4 al RrgA, o aderență de la Streptococcus pneumoniae, a fost împărțit pentru a forma SnoopTag (reziduuri 734-745; SECV ID NR:5) și SnoopCatcher (reziduuri 749-860). Incubarea

SnoopTag și SnoopCatcher are ca rezultat o legătură izopeptidică spontană care este specifică între proteinele complementare. Veggiani (2016)), supra.

Perechea de legare specifică izopeptag:pilin-C a fost derivată din proteina majoră a pilinului Spy0128 din *Streptococcus pyogenes*. (Zakeir și Howarth (2010) J. Am. Chem. Soc. 132:4526-27). Isopeptag are secvența de aminoacizi TDKDMTITF TNKKD AE, prezentată ca SECV ID NR:7, și leagă pilin-C (reziduurile 18-299 din Spy0128). Incubarea SnoopTag și SnoopCatcher are ca rezultat o legătură izopeptidică spontană care este specifică între proteine complementare.

Termenul „etichetă peptidică” include polipeptide care sunt (1) heterologe cu proteina care este marcată cu eticheta peptidică, (2) un membru al unei perechi specifice de legare la proteimproteina capabilă să formeze o legătură izopeptidică și (3) nu mai mult de 50 de aminoacizi lungime.

Termenul "celule țintă" include orice celule în care se dorește exprimarea unei nucleotide de interes. De preferință, celulele țintă prezintă pe suprafața lor un receptor care permite celulei să fie țintă cu un ligand de țintire, așa cum este descris mai jos.

Termenul "transducție" sau "infecție" sau altele asemenea se referă la introducerea unui acid nucleic într-un nucleu al celulei 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 de capsidă de tip sălbatic, pot fi utilizați ca vector viral de referință în studii comparative. În general, o proteină/capsidă/vector de capsidă virală de referință sunt identice cu capsida virală de testproteină/capsidă/vector ci pentru modificarea pentru care urmează să fie testat efectul. De exemplu, pentru a determina efectul, de exemplu, asupra eficienței de transducție, al inserării unui prim membru al unei perechi de legare specifice într-un vector viral de testare, eficiența de transducție a vectorului viral de testare (în absența sau prezența unui ligand de țintire adecvat) poate fi comparat cu eficiența de transducție a unui vector viral de referință (în absența sau prezența unui ligand de țintire adecvat, dacă este necesar) care este identic cu vectorul viral testat în fiecare caz (de exemplu, mutații suplimentare, nucleotide de interes, numărul de virale). vectori și celule țintă etc.) cu excepția prezenței unui prim membru al unei perechi de legare specifice.

Strategia de redirecționare descrisă aici oferă avantajele ambelor abordări recombinatorii directe descrise mai sus, precum și rezolvă multe dintre dezavantajele inerente ambelor. Strategia utilizează o pereche de legare specifică, în care primul membru și al doilea membru înrudit se leagă în mod specific unul de celălalt și, după legare, formează o legătură covalentă care leagă permanent particula virală de orice ligand de țintire care este fuzionat cu membrul înrudit. Cu o astfel de particulă virală modificată genetic, tropismul este menținut atâta timp cât capsida virală rămâne intactă, de exemplu, un avantaj al sistemului furnizat aici în comparație cu alte abordări de schelă este permanența cu care „adaptatorul”, de exemplu, ligand de țintire, este legat de particula virală recombinantă similar unei abordări recombinatorii directe. Cu toate acestea, spre deosebire de abordarea recombinatorie directă, sistemul descris aici menține flexibilitatea abordărilor adaptorului de schelă prin aceea că particula virală recombinantă poate rămâne constantă cu variabilitatea găsită în adaptor, de exemplu, membrul înrudit poate fi fuzionat la diferite liganzi de țintire și diferite proteine de fuziune apoi cuplate la particula virală în conformitate cu celula țintă.

Proteine recombinante ale capsidului viral și vectori virali și acizi nucleici

Aici este furnizată o particulă virală recombinantă (de exemplu, o proteină de capsidă virală și o capsidă virală recombinantă și/sau un vector viral recombinant care cuprinde proteina capsidă virală recombinantă) care este modificată genetic pentru a prezenta o secvență heterologă de aminoacizi care cuprinde un prim membru. a unei perechi de legare specifică, în care secvența de aminoacizi este mai mică de 50 de aminoacizi în lungime și în care proteina virală recombinantă capsidă/particulă prezintă un tropism natural redus la abolit. În unele exemple de realizare, particula virală mai cuprinde un al doilea membru înrudit al perechii de legare specifică, în care primul și al doilea membru sunt legați covalent printr-o legătură izopeptidică și în care al doilea membru este fuzionat la un ligand de țintire.

În unele exemple de realizare, secvența heterologă de aminoacizi cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică și unul sau mai mulți linker. În unele exemple de realizare, secvența de aminoacizi heterologă cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică flancat de un linker, de exemplu, secvența de aminoacizi heterologă cuprinde de la capătul N-terminal la capătul C-terminal

un prim linker, un prim membru al unei legături specifice pereche 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, o secvență heterologă de aminoacizi așa cum este descrisă aici, de exemplu, care cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică prin ea însăși sau în combinație cu unul sau mai mulți linkeri, are o lungime între aproximativ 5 aminoacizi și aproximativ 50 aminoacizi. în unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de cel puțin 5 aminoacizi. în unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 6 aminoacizi. în unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 7 aminoacizi. în unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 8 aminoacizi. în unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 9 aminoacizi. în unele exemple de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are o lungime de 10 aminoacizi. în unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 11 aminoacizi. în unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 12 aminoacizi. în unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 13 aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 14 aminoacizi. în unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 15 aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 16 aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 17 aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 18 aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 19 aminoacizi. În unele exemple de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 20 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 21 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 22 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 23 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 24 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 25 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 26 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 27 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 28 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 29 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are o lungime de 30 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 31 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 32 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 33 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 34 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are o lungime de 35 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 36 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 37 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 38 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are 39 de aminoacizi în lungime. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are o lungime de 40 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are 41 de aminoacizi în lungime. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are o lungime de 42 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 43 de aminoacizi. În unele exemple de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 44 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are 45 de aminoacizi în lungime. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are o lungime de 46 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 47 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are lungimea de 48 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvența heterologă de aminoacizi are o lungime de 49 de aminoacizi. În unele realizări, secvența heterologă de aminoacizi are o lungime de 50 de aminoacizi.

În unele exemple de realizare, perechea de legare specifică este o pereche de legare Spy Tag: Spy Catcher, în care primul membru este Spy Tag și în care al doilea membru înrudit este SpyCatcher. În unele exemple de realizare, perechea de legare specifică este SpyTag:KTag, în care primul membru este Spy Tag și în care al doilea membru înrudit este KTag. În unele exemple de realizare, perechea de legare specifică este SpyTag:KTag, în care primul membru este KTag și în care al doilea membru înrudit este Spy Tag. În unele exemple de realizare, perechea de legare specifică este izopeptag:pilin-C, în care primul membru este izopeptag, și în care al doilea membru înrudit este pilin-C, sau o parte a acestuia. În unele exemple de realizare, perechea de legare specifică este SnoopTag:SnoopCatcher, iar primul membru este SnoopTag, iar al doilea membru înrudit este SnoopCatcher.

În unele variante de realizare, o proteină capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici este o proteină capsidă Ad, de exemplu, o proteină 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 recombinantă a capsidă virale este derivată dintr-o genă a capsidă Ad2. În unele exemple de realizare, o proteină recombinantă a capsidă virale este derivată dintr-o genă a capsidă Ad5. În unele exemple de realizare, o proteină recombinantă a capsidă virale Ad așa cum este descrisă aici, cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică într-un domeniu proteic al fibrei, de exemplu, la capătul carboxi al proteinei fibrei, butonul fibrei și/sau bucla HI a fibrei butonul.

Proteina capsidă virală din prezenta invenție este derivată dintr-o genă cap a unui virus adeno-asociat (AAV) care codifică o proteină capsidă AAV VP1, VP2 și/sau VP3. În unele exemple de realizare, o proteină virală recombinantă a capsidă descrisă aici este derivată dintr-o genă a proteinei capsidă virusului adeno-asociat (AAV), de exemplu, o genă a capsidă a unui serotip AAV selectat din grupul constând din AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9. În unele variante de realizare, proteina recombinantă a capsidă virale este derivată dintr-o genă a capsidă AAV2 sau o genă a capsidă AAV9. În unele exemple de realizare, proteina capsidă virală recombinantă este o proteină capsidă AAV2 VP1 modificată genetic, a cărei secvență de aminoacizi de tip sălbatic este prezentată ca SECV ID NR:9. În unele realizări, proteina capsidă virală recombinantă este o proteină capsidă AAV9 VP1 modificată genetic, a cărei secvență de aminoacizi de tip sălbatic este prezentată ca SECV ID NR:31.

În general, o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică inserată în proteina capsidă astfel încât primul membru al unei perechi de legare specifică reduce și/sau elimină tropismul natural al capsidă. proteină sau capsidă care o cuprinde. În unele exemple de realizare, primul membru al unei perechi de legare specifică este inserat într-o regiune a proteinei capsidă implicată cu tropismul natural al proteinei capsidă de referință de tip sălbatic, de exemplu, o regiune a proteinei capsidă implicată cu receptorul celular. În unele exemple de realizare, primul membru al unei perechi de legare specifică este inserat în (de exemplu afișat) de un domeniu buton al unei proteine din fibră Ad. În unele exemple de realizare, primul membru al unei perechi de legare specifice este inserat în (de exemplu afișat) de bucla HI a unei proteine din fibră Ad. În unele exemple de realizare, primul membru al unei perechi de legare specifică este inserat după o poziție de aminoacid selectată din grupul constând din G453 din proteina capsidă AAV2 VP1, N587 din proteina capsidă AAV2 VP1, G453 din proteina capsidă AAV9 VP1 și A589 din AAV9 proteina capsidă VP1. În unele exemple de realizare, primul membru al unei perechi de legare specifică este inserat (de exemplu afișat) între aminoacizii N587 și R588 ai unei capsidă AAV2 VP1. În unele exemple de realizare, o capsidă virală recombinantă, un vector viral care cuprinde o capsidă virală recombinantă și/sau compoziții care cuprind o capsidă virală recombinantă cuprind o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 35, 37 sau 39. Locurile de inserție adecvate suplimentare identificate prin utilizarea AAV2 sunt bine cunoscute în domeniu (Wu și colab. 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 de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici poate fi o proteină de capsidă AAV2 care cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică inserată 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 de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici poate fi o proteină de capsidă AAV2 care cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică inserată 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 de capsidă AAV, totuși o astfel de inserție poate fi localizată direct N- sau C-terminal, de preferință C-terminal al unui aminoacid în secvența de 5 aminoacizi N- sau C-terminal al aminoacidului dat, de preferință 3, mai preferabil 2, în special 1 aminoacid(i) N- sau C-terminal al aminoacidului dat acid. În plus, pozițiile la care se face referire aici sunt relativ la proteina VP1 codificată de o genă a capsidă AAV, iar pozițiile corespunzătoare (și mutațiile acestora) pot fi identificate cu ușurință pentru proteinele capsidă VP2 și VP3 care codifică gena capsidă prin efectuarea unei alinieri a secvenței de proteinele VP1, VP2 și VP3 care codifică gena de referință a capsidă AAV.

În consecință, o inserție în poziția corespunzătoare a acidului nucleic de codificare a unuia dintre aceste situsuri ale genei cap duce la o inserare în VP1, VP2 și/sau VP3, deoarece proteinele capsidelor sunt codificate prin suprapunerea cadrelor de citire ale aceleiași gene cu codoni de pornire eșalonați. Prin 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.

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 U.S. Nr. 9.624.274 pentru alinieri exemplificative ale diferitelor proteine de capsidă AAV.

În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce sau elimină tropismul natural al vectorului viral, de exemplu, transducția unei celule permissive în mod natural la infecție cu vectori virali de referință de tip sălbatic și/sau o celulă țintă este nedetectabil în absența unei legături covalente cu al doilea membru înrudit al perechii de legare, care este fuzionat la un ligand de țintire adecvat. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral, de exemplu, în comparație cu transducția unei celule permissive în mod natural la infecție cu vectori virali de referință de tip sălbatic. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 5%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 5%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifică reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 10%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 20%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 30%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 40%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifică reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 50%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifică reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 60%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 70%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 80%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 90%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifică reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 95%. În unele exemple de realizare, inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice reduce tropismul natural al vectorului viral cu cel puțin 90%. În exemplele de realizare în care inserarea (afișarea) primului membru al unei perechi de legare specifice nu elimină complet tropismul natural al capsidelor virale recombinante, tropismul natural al unor astfel de capsidă virale recombinante poate fi redus în continuare printr-o a doua mutație diferită. De exemplu, într-o variantă de realizare, o proteină de capsidă virală recombinantă așa cum este descrisă aici poate fi derivată dintr-un serotip AAV9 și poate cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică 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 virali, deoarece absorbția vectorilor virali de către celulele gazdă naturale limitează doza eficientă a vectorilor virali. 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). În consecință, mutațiile punctiforme preferate sunt cele care reduc activitatea de transducere a vectorului viral pentru o anumită celulă țintă mediată de receptorul natural cu cel puțin 50%, de referință cel puțin 80%, în special cel puțin 95%, în cazul HSPG ca un receptorul primar pentru legarea vectorilor virali la celulele țintă.

În consecință, alte mutații preferate pentru vectorii virali care leagă HSPG sunt acele mutații care șterg 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 nebazic. 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 de aminoacizi preferate sunt R484A, R487A, R487G, K532A, K532D, R585A, R585S, R585Q, R585A sau R588T, în special R585A și/sau R588A pentru AAV2 și K531E A pentru AAV2 sau K531E A. O variantă de realizare preferată în mod special a invenției sunt astfel de mutații ai proteinei de capsidă ai AAV2 care conțin în plus cele două mutații punctiforme R585A și R588A deoarece aceste două mutații punctiforme sunt suficiente pentru a elimina activitatea de legare a HSPG într-o mare măsură. Aceste mutații punctuale permit o detargerea eficientă a celulelor care exprimă HSPG, care - în scopuri de țintire - crește specificitatea virusului mutant respectiv pentru noua sa celulă țintă.

Liganzi de țintire

O particulă virală descrisă aici poate cuprinde în plus un al doilea membru al perechii de legare specifică care formează în mod specific o legătură covalentă izopeptidică cu primul membru al perechii de legare specifică care este inserată într-o proteină recombinantă a capsidului viral, în care al doilea membru este fuzionat la un ligand de țintire. În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat pe suprafața unei celule, de exemplu, o proteină de suprafață celulară pe o celulă eucariotă (umană), de exemplu, o celulă țintă. În unele variante de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele hepatice (umane). În unele variante de realizare, ligandul de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele creierului (umane). În unele variante de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de limfocite (umane). În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de celulele T (umane). În unele variante de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de celulele B (umane). În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele dendritice (umane). În unele exemple de realizare, ligandul de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către macrofage (umane). În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de celulele NK (umane). În unele exemple de realizare, ligandul de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de celulele renale (umane). În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către o celulă canceroasă (umană). În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către celula (umană) infectată cu patogen heterolog.

Există un număr mare de proteine de suprafață celulară, de exemplu, receptori de suprafață celulară, adecvate care pot fi țintite de un ligand de țintire și pentru care un ligand de țintire, de exemplu, anticorpi sau porțiuni ale acestuia, 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 al macrofagelor/monocitelor, factor de creștere a nervilor, proteină 2 de activare a neutrofilelor, factor de creștere derivat de trombocite, factor de celule stem, factor de creștere transformantă, factori de necroză tumorală, factor de creștere a endotială vasculară, lipoproteine, inclusiv receptori transmembranari suplimentari sau alți receptori 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 virală recombinantă descrisă aici permite infectarea specifică a unui tip de celulă prin folosirea unui ligand de țintire care leagă antigenele de suprafață celulară de diferențiere ca ținte pentru complexul de vector viral.

În unele variante de realizare, ligand de țintire leagă o proteină exprimată în primul rând (de exemplu, numai) de către celulele hepatice (umane), adică un marker specific hepatic. În unele variante de realizare, ligandul de țintire leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele creierului (umane), un marker specific celulei creierului. În unele variante de realizare, ligandul

de țintire leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele hematopoietice (umane), adică, un marker specific celulei hematopoietice. În unele exemple de realizare, ligandul de țintire leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de celule T (umane), adică, un marker specific celulei T. În unele variante de realizare, ligandul de țintire leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de celulele B (umane), adică, un marker specific pentru celulele B. În unele variante de realizare, ligand de țintire leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de celule dendritice (umane), adică un marker specific celulei dendritice. În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de macrofage (umane), adică un marker specific macrofagului. În unele variante de realizare, ligand de țintire leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de celule NK (umane), adică, un marker specific celulei NK. În unele exemple de realizare, ligandul de țintire leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de celulele renale (umane), adică, un marker specific rinichiului. În unele exemple de realizare, ligandul de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele pancreasului (umane), adică, un marker specific pancreasului. În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat în principal (de exemplu, exclusiv) de către celulele intestinale (umane), adică un marker specific intestinului. În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă o proteină exprimată în principal (de exemplu, exclusiv) de către o celulă canceroasă (umană), adică un antigen asociat tumorii. În unele variante de realizare, ligand de țintire 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 la antigen utilă ca ligand de țintire așa cum este descris aici sunt binecunoscute și pot găsiți și la www.proteinatlas.org; vezi, de asemenea, Uhlen et al. (2010) *Nat. Biotechnologie*, 28: 1248-50. Tabelul 2 de mai jos furnizează markeri specifici de organ exemplificativi și nelimitativi pentru care sunt disponibili proteinele de legare la antigen, care pot fi utile ca liganzi de țintire, și celulele/țesutul/organul care exprimă astfel de markeri.

Tabelul 2: Exemple de markeri specifici țesuturilor

Țesut	Markeri specifici țesutului
Ficat	Caseta de legare ATP subfamilia B; 11 membri (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 (UROCI)
Intestin	Proteine care leagă acizii grași 6 (FAB 6)
Pancreas	CUB și zona pellucida ca domeniile 1 (CUZD1) Protează, serină 2 (PRSS2) Protează, serină 3 (PRSS3)

În unele exemple de realizare, ligand de țintire 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 țintire leagă un receptor exprimat de o celulă a creierului (umană). În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat de o celulă T (umană), de exemplu, CD3, de exemplu, CD3ε. În unele exemple de realizare, ligandul de țintire leagă un receptor exprimat de o celulă renală (umană), de exemplu. În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat de

o celulă musculară (umană), de exemplu, o integrină. În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un receptor exprimat de o celulă canceroasă (umană), de exemplu, un antigen asociat tumorii, de exemplu, E6 și E7. În unele exemple de realizare, ligand de țintire se leagă la receptorul uman de glucagon (hGCGR).

5 În unele exemple de realizare, ligand de țintire leagă un antigen asociat tumorii exprimat de o celulă tumorală. Exemple nelimitative de antigene specifice asociate tumorii includ, de exemplu, AFP, ALK, proteine BAGE, β -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidraza carbonică IX, caspaza-8, CCR5, CD19, CD20, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, ciclin-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteine GAGE (de exemplu, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, glipican-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HL A/MAGE-A3, hTERT, LMP2, proteine MAGE (de exemplu, MAGE- 1, -2, - 3, -4, -6 și -12), MART-1, mezotelină, ML-IAP, Mucl, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Mucl6 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), proteine RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Step-1, Step-2, supraviețuire, TAG-72, TGF-p, TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, tirozinază și uroplakin-3.

10 În unele exemple de realizare, ligand de țintire se leagă la markerii CD asociați cu răspunsul imun, de exemplu, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 etc.

O variantă de realizare a prezentei invenții este o structură multimerică care cuprinde o proteină recombinantă a capsidului viral 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 proteine de capsid virale recombinante cuprinzând un prim membru al unei perechi de legare specifică așa cum este descris aici. Ele pot forma capsid virale obișnuite (particule virale goale) sau vectori virali (capsid care încapsulează o nucleotidă de interes). Formarea vectorilor virali capabili să împacheteze un genom viral este o caracteristică foarte preferată pentru utilizarea capsidelor virale recombinante descrise aici ca vectori virali.

O variantă de realizare a prezentei invenții este un acid nucleic care codifică o proteină capsid așa cum este descris mai sus. Acidul nucleic este de preferință un vector care cuprinde nucleul revendicat. Acizii nucleici, în special vectorii, sunt necesari pentru a exprima recombinant proteinele capsid din această invenție

30 Este menționată de asemenea utilizarea a cel puțin unei proteine capsid virale recombinante și/sau a unui acid nucleic care o codifică, de preferință cel puțin o structură multimerică (de exemplu, vector viral) pentru fabricarea și utilizarea ca vector de transfer genic.

Metode de utilizare și realizare

O altă variantă de realizare a proteinelor capsid virale 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. Astfel, prezenta invenție furnizează o particulă sau o compoziție virală a prezentei invenții pentru utilizare într-o metodă de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă care cuprinde punerea în contact a celei țintă cu respectiva particulă virală sau respectiva compoziție, în care proteina capsid virală cuprinde o ligand de țintire care leagă în mod specific o proteină exprimată pe suprafața celei țintă. Prezenta invenție furnizează, în plus, o metodă de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă in vitro care cuprinde punerea în contact a celei țintă cu particula virală conform revendicării 18 sau compoziția conform revendicării 19, în care proteina capsid virală cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific o proteină exprimată la suprafața celulei țintă. 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, un raportor și/sau o genă terapeutică) și un 3' ITR.

Exemple nelimitative de promotori utili includ, de exemplu, citomegalovirus (CMV), promotorul virusului care formează focarul splinei (SFFV), promotorul factorului de alungire 1 alfa (EFla) (promotorul EFla de 1,2 kb sau promotorul EFla de 0,2 kb), himeric EF 1 a/IF4 -promotorul 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 (Karasuyama et al. 1989. J. Exp. Med. 169: 13, care este încorporat aici ca referință în întregime) poate fi utilizat. În unele exemple de realizare, amplificatorul CMV poate fi utilizat în combinație cu promotorul β -actină de pui.

O varietate de gene reporter (sau fragmente detectabile) pot fi încapsulate într-o structură multimerică care cuprinde proteinele capsid virale 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

5 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 capsid virale recombinante descrise aici, de exemplu, ca

10 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.

O altă variantă de realizare a prezentei invenții este un procedeu pentru prepararea unei proteine recombinante de capsid, metoda cuprinzând etapele de:

15 a) exprimarea unui acid nucleic care codifică proteina capsid recombinantă în condiții adecvate și

b) izolarea proteinei capsid exprimate din etapa a).

În unele exemple de realizare, o particulă virală așa cum este descrisă aici cuprinde o capsidă mozaic, de exemplu, o capsidă cuprinzând proteine capsid modificate genetic așa cum este descris aici

20 (în absența sau prezența unei legături covalente cu un ligand de țintire) într-un anumit raport cu proteinele capsid de referință. O metodă pentru realizarea unei astfel de particule virale mozaic cuprinde

a) exprimă un acid nucleic care codifică proteina capsid recombinantă și o nucleotidă care codifică o proteină capsid de referință la un raport (greutate:greutate) de 1:1 și 10:1 în condiții adecvate și

25 b) izolarea proteinei capsid exprimate din etapa a).

În general, o capsidă de mozaic formată conform metodei va fi considerată a avea un raport modificat al proteinei de referință a capsid, similar cu raportul (greutate:greutate) al acizilor nucleici care îi codifică utilizat pentru producerea capsid mozaic. În consecință, în unele exemple de realizare, o

30 compoziție descrisă aici cuprinde, sau o metodă descrisă aici combină, o proteină de capsid virală recombinantă și o proteină de capsid de referință (sau o combinație de proteine de capsid de referință) la un raport care variază de la 1:1 la 1:15. În unele exemple de realizare, raportul este 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

35 exemple de realizare, raportul este de 1:9. În unele exemple de realizare, raportul este 1:10. În unele exemple de realizare, raportul este 1:11. În unele exemple de realizare, raportul este 1:12. În unele exemple de realizare, raportul este 1:13. În unele exemple de realizare, raportul este 1:14. În unele exemple de realizare, raportul este 1:15.

Alte exemple de realizare ale prezentei invenții sunt o metodă pentru modificarea tropismului

40 unui virus, metoda cuprinzând etapele de: (a) inserarea unui acid nucleic care codifică o secvență heterologă de aminoacizi într-o secvență de acid nucleic care codifică o proteină capsid virală pentru a forma o secvență de nucleotide care codifică o proteină capsid modificată genetic care cuprinde secvența heterologă de aminoacizi și/sau (b) cultivarea unei celule de ambalare în condiții suficiente pentru producerea de vectori virali, în care celula de ambalare cuprinde acidul nucleic. O altă variantă de

45 realizare a prezentei invenții este o metodă pentru afișarea unui ligand de țintire pe suprafața unei proteine de capsid, metoda cuprinzând etapele de: (a) exprimarea unui acid nucleic care codifică o proteină de capsid virală recombinată așa cum este descris aici (și opțional cu o nucleotidă care codifică o proteină de capsid de referință) în condiții adecvate, în care acidul nucleic codifică o proteină de capsid care cuprinde un prim membru al unei perechi de legare specifică, (b) izolarea proteinei de capsid exprimată cuprinzând un prim membru al unei perechi de legare specifice de etapă (a) sau capsida care o cuprinde

50 și (c) incubarea proteinei capsid sau a capsid cu un al doilea membru înrudit al perechii de legare specifică în condiții adecvate pentru a permite formarea unei legături izopeptidice între primul și al doilea membru, în care al doilea membru înrudit al perechii de legare specifică este fuzionată cu un ligand de țintire.

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 virali cu nucleaze, de exemplu, ADNază I și MgC12, (c) concentrarea vectorilor virali, (d) purificarea vectorilor virali și (e) orice combinație de (a)-(d).

Celulele de ambalare utile pentru producerea vectorilor virali 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 virali 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-293 T sau 293 T), celule HEK293T/17, linia celulară de sarcom uman HT-1080 (CCL-121), linia celulară asemănătoare limfoblastului Raji (CCL-86), glioblastom- linia celulară de tip epitelial de astrocitom 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. CCL1.3), celule HLHepG2, celule CAP, CAP-T celule și altele asemenea.

Celule L929, sistemul de celule de ambalare virală FLY descris 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 NTL, 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 redirectionare a unui virus 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 sau in vivo, metoda cuprinzând etapele de: contactarea celulei țintă cu un virus. vector care cuprinde o capsidă descrisă aici, în care capsida cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific un receptor exprimat de celula țintă. În unele exemple de realizare, celula țintă este in vitro. În alte variante 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 viral 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 variante de realizare, sunt vizate celulele care ar produce în mod normal proteina la animal. În alte variante de realizare, sunt vizate celulele din zona în care o proteină ar fi cea mai benefică.

În alte variante 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 variante de realizare, o nucleotidă de interes poate inhiba expresia unei gene care este responsabilă pentru producerea unei toxine într-o celulă țintă.

În alte variante 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 variante de realizare o nucleotidă de interes care codifică o proteină terapeutică.

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 s-a discutat mai sus, receptorul țintă poate fi orice receptor pentru care poate fi identificat sau creat un ligand de țintire. De preferință, receptorul țintă este o peptidă sau polipeptidă, cum ar fi un receptor. Totuși, în alte variante de realizare, receptorul țintă poate fi un carbohidrat sau o altă moleculă care poate fi recunoscută de 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, anticorpii la receptorul țintă pot fi generați utilizând proceduri standard. Anticorpii pot fi apoi utilizați ca ligand de țintire.

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.

Compoziții farmaceutice, forme de dozare și administrare

O altă variantă de realizare oferă un medicament care cuprinde cel puțin o proteină capsidă virală recombinantă și ligand de țintire adecvat conform acestei invenții și/sau un acid nucleic conform acestei invenții. De preferință, unui astfel de medicament este utilă o particulă de transfer de genă.

De asemenea, sunt oferite de prezenta invenție compoziții farmaceutice care cuprind particulele virale prezente în invenții și un purtător și/sau excipient acceptabil farmaceutic. În plus, aici sunt oferite forme de dozare farmaceutică care cuprind particula virală descrisă aici.

După cum s-a discutat aici, particulele virale descrise aici pot fi utilizate pentru diverse aplicații terapeutice (in vivo și ex vivo) și ca instrumente de cercetare.

Compozițiile farmaceutice bazate pe particulele virale ale prezentei invenții pot fi formulate în orice mod convențional utilizând unul sau mai mulți purtători și/sau excipienți acceptabili fiziologic. Particulele virale pot fi formulate 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 direct la o tumoare.

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, incluzând intramusculară, intravenoasă, intraperitoneală și subcutanată. În scopul injectării, compozițiile farmaceutice pot fi formulate în soluții lichide, de preferință înampoane compatibile 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 farmaceutic, 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); lubrifianti (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 farmaceutic, 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-hidroxibenzoați 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 ex. prin injectare în bolus sau perfuzie continuă. Formulările pentru injectare pot fi prezentate într-o formă de dozare unitară, de ex. în fiole sau în recipiente cu mai multe doze, 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 ex. subcutanat sau intramuscular) sau prin injectare intramusculară. Astfel, de exemplu, compușii pot fi formulați cu materiale polimerice sau hidrofobe 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. Terapia administrată este bărbații eliberați lent din microsfere și absorbiți de celulele din jur prezente în țesutul selectat.

Administrarea sistemică poate fi, de asemenea, prin mijloace transmucoase sau transdermice. 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, particulele virale descrise aici pot fi formulate în 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 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. Sărurile acceptabile farmaceutic includ sărurile de adăiere 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 fieri, și baze organice precum izopropilamină, trimetilamină, histidină, procaină și altele asemenea.

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 unei acoperiri, cum ar fi lecitină, prin menținerea dimensiunii cerute a particulelor în cazul dispersiei și prin utilizarea surfactanților. 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.

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 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 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 particule virale descrise aici zilnic sau săptămânal pentru o perioadă de timp sau lunar, bianuar sau anual, în funcție de nevoia sau expunerea la un organism 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, 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 intranasale 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 exemple de realizare definite, compozițiile farmaceutice orale vor include un

10

diluant inert sau 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 alimentul cura de slabire. 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.

15

Tabletele, pastilele, pastilele, capsulele și altele asemenea pot conține, de asemenea, următoarele: un liant, ca gumă tragacanth, salcâm, amidon de porumb sau gelatină; excipienți, cum ar fi dicalciul fosfat; 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

20

aromă de cireșe. 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

25

aromă de cireșe sau portocale.

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

30

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 particulele virale și orice alt recipient de reactiv într-un izolat strâns pentru

vânzare comercială. Astfel de recipiente pot include recipiente din plastic turnate prin injecție sau prin

sufflare în care sunt reținute flacoanele dorite. Opțional, unul sau mai mulți agenți activi suplimentari, cum

35

ar fi, de exemplu, agenți anti-inflamatori, agenți anti-virali, agenți anti-fungici sau anti-bacterieni sau

agenți anti-tumoralii pot fi necesari pentru compozițiile descrise.

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,

40

intratraheal, intranasal, intravitreal, intravaginal, intrarectal, topic, intratumoral, intramuscular,

intratumoral, intramuscular, subcutanat, 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.

Orice metodă cunoscută unui specialist în domeniu poate fi utilizată pentru producerea la scară

45

largă de particule virale, celule de ambalare și construcții de particule 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 particulele virale purificate. Celulele pot fi recoltate și particulele virale eliberate în mediul

de cultură izolate și purificate, sau particulele virale intracelulare eliberate prin perturbare mecanică

50

(rețele celulare pot fi îndepărtate prin filtrare în adâncime a porilor mari și ADN-ul celulei gazdă digerat

cu endonuclează). Particulele de virus pot fi ulterior purificate și concentrate 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, particulele virale liofilizate pot fi reconstituite prin adăugarea de

diluant.

55

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.

EXAMPLE

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

Materiale și metode

Linii celulare și anticorpi

Toate cele 293 de linii celulare au fost menținute în DMEM suplimentat cu 10% FBS, 1% Pen/Strep și 1% L-glutamină. Liniile celulare 293 hErbB2 și 293hASGR1/2 au fost generate prin transducția lentivirală a liniei celulare parentale 293 cu un vector care exprimă cADN-ul corespunzător. Toate liniile celulare au fost obținute din centrul Regeneron TC. Anticorpus B1 recunoaște un epitop liniar împărțit de AAV VP1, VP2 și VP3.

Constructii proteice ale capsidei AA V

GeneBlocks care codifică inserțiile SpyTag dorite, aminoacizii linker de flancare și mutațiile suplimentare au fost achiziționate de la IDT și donate în pAAV2-CAP wt sau pAAV9-CAP wt digerat cu BsiWI și XcmI folosind Gibson Assembly conform protocolului producătorului (NEB).

Fuziunea SpyCatcher cu anticorpi

GeneBlocks care codifică SpyCatcher au fost achiziționate de la IDT și Gibson Assembly a fost folosit pentru a dona secvența de codificare în cadru în plasmide de expresie pentru scFv sau lanțuri grele de anticorpi la capătul C-terminal al fiecărui construct, separate printr-un linker flexibil de aminoacizi GSGESG (SECV ID NR. :48).

Prepararea vectorilor virali AA V

Virusul a fost generat prin transfectarea celulelor de ambalare 293 T folosind PEI Pro cu următoarele plasmide: pAd Helper, o plasmidă a genomului care conține AAV2 ITR care codifică o proteină reporter și o plasmidă pAAV-CAP care codifică genele AAV Rep și Cap, fie cu sau fără suplimentare. plasmide care codifică fie un scFv, fie lanțurile grele și ușoare ale unui anticorpi. Construcțiile de lanț greu de scFv și anticorpi sunt toate fuzionate cu SpyCatcher la capătul lor C-terminal așa cum este descris mai sus. Transfecția a fost efectuată în OptiMEM și mediul a fost schimbat în DMEM suplimentat cu 10% FBS, 1% Pen/Strep și 1% L-Glut după 8 ore.

Celulele de ambalare transfectate au fost incubate timp de 3 zile la 37°C, apoi virusul a fost colectat din lizatele celulare folosind un protocol standard de înghețare-dezghețare. Pe scurt, celulele de ambalare au fost ridicate prin răzuire și granulate. Supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost resuspendate într-o soluție de 50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; și 2 mM MgCl₂ [pH 8,0]. Particulele de virus intracelular au fost eliberate prin inducerea lizei celulare prin trei cicluri consecutive de îngheț-dezgheț, constând în transferul suspensiei celulare între baia de gheață carbonică/etanol și baia de apă la 37°C cu agitare puternică. Vâscozitatea a fost redusă prin tratarea lizatului cu EMD Millipore Benzonase (50 U/ml de lizat celular) timp de 60 min la 37°C, cu amestecare ocazională. Resturile au fost apoi granulate prin centrifugare, iar supernatantul rezultat a fost filtrat printr-un filtru PVDF Millex-GV de 0,22 μm, direct în camera superioară a unei unități de filtrare centrifugă Amicon Ultra-15 cu cartuș de filtru cu membrană Ultracel-100 (100 KDa MWCO). Unitatea de filtrare a fost centrifugată la intervale de 5-10 minute până când volumul dorit a fost atins în camera superioară, apoi virusul brut concentrat a fost pipetat într-un tub cu legare scăzută de proteine și depozitat la 4°C. Titrul (genomi virali per mililitru vg/mL) a fost determinat prin qPCR folosind o curbă standard a unui virus de concentrație cunoscută.

Infecție/transducție celulară și analiză citometrică în flux

Pentru a infecta celulele, particulele virale au fost adăugate direct în mediul de celule din cultură, iar amestecul a fost incubat peste noapte la 37°C. Mediul din fiecare godeu a fost înlocuit 24 de ore mai târziu, iar celulele au fost incubate timp de 5 zile. În ziua 5 după infecție, celulele au fost tripsinizate, resuspendate în PBS cu 2% FBS, iar procentul de celule GFP+ a fost colectat pe un citometru de flux BD FACSCanto și analizat folosind software-ul FlowJo.

Analiza Western blot

Reacția dintre proteinele AAV marcate cu Spy VP1, VP2 și VP3 și anticorpii marcați cu SpyCatcher sau scFv a fost monitorizată prin analiză Western blot. Tampon de probă Novex® Tris-Glycine SDS cu agent reducător a fost adăugat la volume egale de preparate de virus brut, iar probele au fost încălzite la 85°C timp de 5 minute, apoi au fost răcite la temperatura camerei și încărcate pe un Tris pre-turnat 4-12% -gel de glicina (Invitrogen). Proteinele au fost separate prin reducerea SDS-PAGE și blotate pe PVDF printr-un transfer umed. Membranele au fost blocate cu Li-Cor Odyssey TBS Blocking Buffer și testate cu anticorpus B1 monoclonal de șoarece (ARP American Research Products, Inc.) diluat 1:100 în TBST peste noapte la 4°C. Petele au fost spălate în TBST, testate cu un anticorpus secundar anti-șoarece conjugat în infraroșu și fotografiate pe Li-Cor Odyssey.

EXEMPLE**Exemplul 1 Conjugarea unui scFv cu o peptidă inserată în capsidul AAV2 la restul N587 direcționează țintirea specifică antigenului**

Fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-hrGFP	4ug
pAAV2-CAP N587 SpyTag HBM	4ug
CU sau FĂRĂ	

pCMV-C6.5-SpyCatcher	4ug
----------------------	-----

Celulele incubate cu particule virale așa cum s-a descris mai sus au fost evaluate prin analiză citometrică în flux pentru infecție.

AAV2 care poartă mutațiile de legare la heparină (HBM) R585A și R588A, precum și peptida SpyTag în poziția capsinei N587, a fost produs în prezența sau absența lui C6.5-SpyCatcher, un scFv care leagă HER2 și este fuzionat la SpyCatcher la nivelul său C-terminal. AAV2 conjugat cu scFv care vizează HER2 infectează în mod specific celulele HER2+ și prezintă foarte puțină infecție de fond a celulelor HER2-. **Figura 1.**

Exemplul 2 Conjugarea unui anticorp la o peptidă inserată în capsidul AAV2 la restul N587 direcționează țintirea specifică antigenului

Fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-hrGFP	4ug
pAAV2-CAP greutate	4ug

SAU	
pAAV2-CAP N587 SpyTag HBM	4ug
CU SAU FĂRĂ	

pAnti-HER2 hIgG4 SpyCatcher Vh	1,5ug
pAnti-HER2 Vk	3ug

AAV2 și AAV2 de tip sălbatic purtând mutații de legare la heparină (HBM) R585A și R588A, precum și peptida SpyTag în poziția capsinei N587, au fost produse în prezența sau absența lanțurilor grele și ușoare de anticorpi care codifică SpyCatcher-Herceptin, un anticorp care leagă HER2 și este fuzionat cu SpyCatcher la capătul C-terminal al acestuia. lanțul greu. Celulele infectate cu particule virale așa cum este descris mai sus au fost evaluate prin analiză citometrică în flux pentru a monitoriza transducția. AAV2 conjugat la anticorpul care vizează HER2 infectează în mod specific celulele HER2+ și prezintă foarte puțină infecție de fond a celulelor HER2. **Figura 2.**

Exemplul 3 Conjugarea unui anticorp la o peptidă inserată în capsidul AAV2 la restul G453 direcționează țintirea specifică antigenului

Reziduurile N587 și G453 se află fiecare pe regiuni expuse ale capsinei AAV2 care formează vârfuri de proteine care se extind departe de suprafața virionului. Reziduurile se află pe două vârfuri diferite, așa că s-a investigat dacă un SpyTag inserat după reziduul G453 ar funcționa în același mod ca SpyTag inserat după reziduul N587. Fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-hrGFP	4ug
pAAV2-CAP G453 SpyTag HBM	0,5 ug
pAAV2-CAP R585A R588A HBM	3,5 ug

SAU	
pAAV2-CAP greutate	4ug

CU sau FĂRĂ	
pAnti-HER2 hIgG4 SpyCatcher Vh	1,5ug
pAnti-HER2 Vk	3ug

AAV2 și AAV2 de tip sălbatic purtând mutații de legare la heparină (HBM) R585A și R588A, precum și peptida SpyTag la poziția capsinei G453, au fost produse în prezența sau absența lanțurilor grele și ușoare de anticorpi care codifică SpyCatcher-Herceptin, un anticorp care leagă HER2 și este fuzionat cu SpyCatcher la capătul C-terminal al lanțului greu. Virusul a fost produs ca un mozaic prin amestecarea capsidelor care exprimă Spy Tag cu capside HBM. Celulele infectate cu particule virale așa cum este descris mai sus au fost evaluate prin analiză citometrică în flux pentru a monitoriza transducția.

AAV2 conjugat cu anticorpii care vizează HER2- infectează în mod specific celulele HER2+ și prezintă foarte puțină infecție de fond a celulelor HER2-. **Figura 3**

Exemplul 4 Creșterea modificării virionilor AAV de către scFvs scade infecțiozitatea acestora

Într-un efort de a optimiza eficiența reacției SpyTag-SpyCatcher, accesibilitatea SpyTag pe suprafața virusului a fost îmbunătățită prin flancarea etichetei peptidice cu aminoacizi linker flexibili pe fiecare parte. A fost generat un panou de mutații de inserție SpyTag N587 flancați de lungimi crescând ale linkerului și s-a preparat virus folosind aceste construcții AAV2 Rep-Cap în prezența sau absența C6.5 -Spy Catcher, scFv care leagă HER2 și este fuzionat cu SpyCatcher la nivelul său C-terminal. Reacția dintre proteinele AAV2 marcate cu Spy VP1, VP2 și VP3 și C6.5 marcate cu SpyCatcher a fost monitorizată prin Western blot; Proteinele capsidei etichetate cu Spy care au reacționat cu scFv marcat cu SpyCatcher prezintă o creștere a dimensiunii prin SDS-PAGE. Celulele infectate cu particule virale așa cum este descris mai sus au fost evaluate prin analiză citometrică în flux pentru a măsura transducția.

Fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-hrGFP	4ug
Anti-HER2 hIgG4 SpyCatcher Vh	1,5ug
pAnti-HER2 Vk	3ug
pAAV2-CAP N587 LinkerX SpyTag	4ug
Construcțiile pAAV2-CAP N587 Linker Spy Tag includ:	
pAAV2-CAP N587 Linker 1 Spy Tag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker2 Spy Tag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker4 Spy Tag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker6 Spy Tag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker8 Spy Tag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker 10 Spy Tag HBM	

Când Spy Tag nu a fost flancat de aminoacizi linker, complexe VP-SpyTag-SpyCatcher-scFv au fost nedetectabile prin Western blot, iar virusurile au atins niveluri scăzute de transducție specifică a celulelor HER2+. **Figura 4.** Pe măsură ce lungimea linkerului a crescut (1-6 aminoacizi), complexe VP-SpyTag-SpyCatcher-scFv au început să fie detectabile prin Western blot, iar eficiența de transducție a virusurilor a crescut. **Figura 4.** Cu toate acestea, când SpyTag a fost flancat de cei mai lungi doi linkeri (8-10 aminoacizi), aproape toate proteinele VP au reacționat cu SpyCatcher-Vh prin Western blot, dar acești viruși complet decorati nu au mai transdus celulele în mod eficient. **Figura 4.** Prin urmare, s-a părut că supramodificarea particulelor de AAV de către scFv este dăunătoare capacității lor de a transduce celulele țintă și este necesar doar un număr mic de scFv conjugați pentru a redirecționa virusul către celulele țintă.

Exemplul 5 Creșterea modificării virionilor AAV de către anticorpi scade infecția lor

Folosind panoul de mutații de inserție SpyTag N587 flancați de lungimi în creștere ale linkerului, virusul a fost preparat folosind aceste construcții AAV2 Rep-Cap în prezența sau absența lanțurilor grele și ușoare de anticorpi care codifică SpyCatcher-Herceptin, un anticorp care leagă HER2 și este fuzionat la SpyCatcher la capătul C-terminal al lanțului greu. Reacția dintre proteinele AAV marcate cu Spy VP1, VP2 și VP3 și lanțul greu Herceptin marcat cu SpyCatcher (Vh) a fost monitorizată prin Western blot; Proteinele capsidei SpyTagged care au reacționat cu anticorpii etichetați cu SpyCatcher vor prezenta o schimbare de dimensiune prin SDS-PAGE.

Fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-hrGFP	4ug
pAnti-HER2 hIgG4 SpyCatcher Vh	1,5ug
pAnti-HER2 Vk	3ug
pAAV2-CAP N587 LinkerX SpyTag	4ug
Construcțiile pAAV2-CAP N587 Linker Spy Tag includ:	
pAAV2-CAP N587 SpyTag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker 1 SpyTag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker2 SpyTag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker4 SpyTag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker6 SpyTag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker8 SpyTag HBM	
pAAV2-CAP N587 Linker 10 SpyTag HBM	

Când SpyTag nu a fost flancat de aminoacizi linker sau a fost flancat de aminoacizi foarte scurți, complexe VP-SpyTag-Spy Catcher-Vh nu au fost detectate prin Western blot, dar virusurile au infectat în mod specific celulele HER2+ la o eficiență apropiată de nivelurile de tip sălbatic. **Figura 5.** În schimb, atunci când SpyTag a fost flancat de linkeri mai lungi (6 aminoacizi sau mai mult), aproape toate

5 proteinele VP au reacționat cu SpyCatcher-Vh prin Western blot, dar acești viruși complet decorati nu mai erau infecțioși. **Figura 5.** Creșterea modificării particulelor AAV de către anticorpi este dăunătoare capacității lor de a transduce celulele țintă și este necesar doar un număr mic de anticorpi conjugați pentru a redirecționa virusul către celulele țintă.

Exemplul 6 Mozaicismul modulează eficiența de transducție a particulelor de virus

10 Deoarece linkerii lungi și flexibili permit reacția eficientă a capsidelor AAV SpyTagged cu scFv-uri fuzionate cu SpyCatcher, dar supramodificarea particulelor AAV de către scFv este dăunătoare capacității lor de a transduce celulele țintă, numărul de SpyTag-uri pe fiecare virion a fost redus în timp ce accesibilitatea SpyTag și reactivitatea eficientă a fost reținută prin generarea de particule AAV mozaic care sunt un amestec de rapoarte diferite de constructe SpyTagged foarte reactive cu constructe de capsid

15 non-Spy Tagged, toate purtând mutația de legare a heparinei R585A R588A (HBM). Fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-hrGFP	4ug
pCMV-C6.5-SpyCatcher	4ug
CU RATE VARIATE DE:	
pAAV2-CAP N587 LinkerLO Spy Tag HBM	
pAAV2-CAP R585A R588A Xug	
sau	
pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-hrGFP	4ug
p Anti-HER2 hIgG4 SpyCatcher Vh	1,5ug
pAnti-HER2 Vk	3ug
CU RATE VARIATE DE:	
pAAV2-CAP N587 LinkerLO Spy Tag HBM Xug	
pAAV2-CAP R585A R588A Xug	
sau	
pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-hrGFP	4ug
p Anti-HER2 hIgG4 SpyCatcher Vh	1,5ug
pAnti-HER2 Vk	3ug
CU RATE VARIATE DE:	
pAAV2-CAP G453 LinkerX Spy Tag HBM Xug	
pAAV2-CAP R585A R588A Xug	

25 Raportul dintre pAAV2-CAP N587 LinkerLO SpyTag HBM și pAAV2-CAP plasmidele R585A R588A au fost fie 1:0 (4ug:0ug), care reprezintă virioni puri pAAV2-CAP N587 LinkerLO SpyTag HBM, 3:1 (3ug: 1ug), 1:1 (2ug:2ug) sau 1:3 (1ug: 3ug) în amestecul de transfecție. Raportul dintre plasmidele pAAV2-CAP G453 Linker 10 SpyTag HBM și pAAV2-CAP R585A R588A a fost fie 1:0 (4ug:0ug) care

30 reprezintă virioni puri pAAV2-CAP G453 LinkerLO SpyTag HBM, 1:3 (1ug:3ug), fie 1:7 (0,5ug:3,5ug) în amestecul de transfecție. Reacția dintre proteinele AAV SpyTagged VP1, VP2 și VP3 și anti-HER scFv marcate cu SpyCatcher sau lanțul greu Herceptin (Vh) marcat cu SpyCatcher a fost monitorizată prin Western blot; Proteinele capsidului marcate cu SpyTagged care au reacționat cu scFvs sau anticorpi marcați cu SpyCatcher vor prezenta o schimbare de dimensiune prin SDS-PAGE. Reacția panoului de legătură

35 N587 SpyTag cu SpyCatcher-anti-FcER2 scFv este prezentată în **Figura 6.** Reacția panoului linker N587 SpyTag cu anticorpii SpyCatcher-anti-FcER2 este prezentată în **Figura 7.** Celulele infectate cu particulele virale mozaic descrise mai sus au fost evaluate prin analiza citometrică în flux pentru a măsura transducția **Figura 6-7.** Pe măsură ce cantitatea de capsid SpyTag flancat Linker 10 foarte reactive a scăzut și numărul de capsid non-SpyTagged a crescut, s-a observat o scădere a cantității de complexe

40 VP-SpyTag-SpyCatcher-scFv prin Western blot, cuplată cu o creștere a eficiența de transducție a virusului **Figurile 6-7.** A fost demonstrată o relație inversă între numărul de anticorpi care decorează virionul și eficiența transducției cu virusul reținut.

Reacția lui G453 SpyTag HBM și G453 LinkerLO SpyTag HBM cu Anticorpii SpyCatcher-anti-HER2 este prezentat în **Figura 8.** Ambele inserții SpyTag la G453, fie SpyTag singur, fie SpyTag flancat

de LinkerIO, au reacționat foarte eficient cu Herceptin etichetat cu SpyCatcher, măsurat prin Western blot, sugerând că locul de inserție G453 este în mod natural mai accesibil decât N587, care nu reacționează ușor decât dacă este flankat de aminoacizi linker. După cum s-a observat cu panoul de legătură N587, când virușii au fost puternic modificați de anticorpii SpyCatcher-Herceptin, virușii nu mai erau infecțioși. Prin urmare, se pare că nivelurile ridicate de modificare a particulelor AAV de către anticorpi sunt dăunătoare capacității lor de a transduce celulele țintă și concluzionăm că un SpyTag inserat după G453 este în mod natural mai accesibil decât un SpyTag inserat la N587.

Exemplul 7 Sistemul SpyTag-SpyCatcher poate fi utilizat cu perechi suplimentare anticorp-țintă pentru a realiza o redirecționare specifică in vitro

A fost examinată capacitatea abordării SpyTag-SpyCatcher de a redirecționa AAV către alte ținte decât HER2. Au fost donați anticorpi marcați cu SpyCatcher care vizează proteine suplimentare de la suprafața celulară și a fost examinată capacitatea acestor anticorpi de a redirecționa AAV etichetat Spy către tipurile de celule care exprimă aceste ținte suplimentare. Pentru experimentele care vizează ASGR1 și CD63, fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-hrGFP	4ug
pAAV2-CAP N587 LinkerIO Spy Tag HBM	0,5 ug
pAAV2-CAP R585A R588A	3,5 ug

CU SAU FĂRĂ

Plasmida cu lanț greu Vh fuzionată cu SpyCatcher	1,5 ug
Plasmida de lanț ușor Vk	3ug

Pentru experimentele care vizează PTPRN, fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-eGFP	4ug
pAAV2-CAP G453 Linker 10 SpyTag HBMx5	0,5 ug
pAAV2-CAP N587 Myc	3,5 ug

CU SAU FĂRĂ

Plasmida cu lanț greu Vh fuzionată cu SpyCatcher	1,5 ug
Plasmida de lanț ușor Vk	3ug

Pentru experimentele care vizează ENTPD3 și CD20, fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-Firefly Luciferase	4ug
pAAV2-CAP N587 SpyTag HBM	4ug
CU SAU FĂRĂ	

Plasmida cu lanț greu Vh fuzionată cu SpyCatcher	1,5 ug
Plasmida de lanț ușor Vk	3ug

Au fost testate plasmidele SpyCatcher-Vh și Vk care codifică lanțuri grele și ușoare de anticorpi care recunosc proteinele umane ASGR1, CD63, PTPRN, ENTPD3 și CD20. Pentru a genera particule de mozaic AAV cu un număr redus de SpyTag expuse, plasmidele SpyTag și non-Spy Tagged au fost prezente într-un raport de 1:7 în amestecul de transfecție, care a fost anterior determinat a fi raportul ideal dintre SpyTag și non-Spy. Etichetați capsidul pentru redirecționarea AAV folosind anticorpi. Celulele care exprimă ASGR1, CD63 sau PTPRN au fost infectate cu particulele mozaic AAV2 descrise mai sus și transducția a fost măsurată prin citometrie în flux. AAV2 conjugat cu anticorpii specifici ASGR1, CD63 și PTPRN, a fost capabil să infecteze în mod specific celulele țintă înrudite care exprimă ASGR1, CD63 și, respectiv, PTPRN și a afișat o infecție de fond foarte scăzută în absența anticorpului. Celulele care exprimă ENTPD3 sau CD20 au fost infectate cu particulele AAV2 descrise mai sus și transducția a fost măsurată printr-un test al luciferazei folosind protocoale standard. AAV2 conjugat cu anticorpii specifici ENTPD3 și CD20, a fost capabil să infecteze în mod specific celulele țintă înrudite care exprimă ENTPD3 și, respectiv, CD20 și a prezentat o infecție de fond foarte scăzută în absența anticorpului.

Figura 9

Exemplul 8 Sistemul SpyTag-SpyCatcher poate fi adaptat pentru retargeting AAV9

A fost examinată adaptabilitatea sistemului SpyTag-SpyCatcher la alte serotipuri AAV. AAV9 este un serotip utilizat pe scară largă care generează virus cu titru ridicat și este foarte eficient în transducerea țesuturilor de șoarece. Reziduurile importante pentru legarea receptorilor diferă între AAV2

și AAV9, deoarece AAV2 leagă Heparin Sulfate Proteoglycans și AAV9 leagă Galactoza. Reziduurile cunoscute a fi importante în legarea receptorilor au fost determinate din literatura disponibilă (Bell, C. L., Gurda, B. L., Van Vliet, K., Agbandje-McKenna, M. și Wilson, J. M. (2012). Identificarea domeniului de legare a galactozei a capsidului virusului adeno-asociat serotip 9. *Journal of Virology*, 86(13), 7326-7333. <http://doi.org/10.1128/JVI.00448-12>) și a inclus N470, D271, N272, Y446 și W503. Mutația W503A a fost selectată ca mutație de legare la receptor pentru a fi utilizată în generarea de construcții mutante, deoarece această mutație unică de aminoacid a redus puternic legarea la receptor. Au fost identificate, de asemenea, regiuni ale capsidului AAV9 care sunt ortologe cu cele două proiecții (bucle variabile) în care se află AAV2 N587 și G453; resturile corespunzătoare din AAV9 sunt A589 și G453. Spy Tag a fost inserat în aceste două situsuri în capsidul AAV9, cu și fără aminoacizi de legătură și în combinație cu mutația de legare la receptor W503 A.

Fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea unei plăci de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

pAd Helper	8ug
pAAV-CMV-eGFP	4ug
p Anti-HER2 hlgG4 SpyCatcher Vh	1,5ug
pAnti-HER2 Vk	3ug
pAAV9 RC plasmida	4ug ADN total

Pentru AAV9 wt, AAV9-CAP A589SpyT_W503A, AAV9-CAP A589Linkerl0SpyT_W503A și AAV9-CAP G453Linkerl0SpyT_W503A, s-au folosit 4 ug din fiecare plasmidă pentru fiecare transfecție.

Pentru virușii mozaic, 3,5 ug de pAAV9-CAP W503A și 0,5 ug de pAAV9-CAP A589Linkerl0SpyT_W503A sau pAAV9-CAP G453Linkerl0SpyT_W503A a fost utilizat pentru fiecare transfecție pentru a obține un raport de 1:7 de SpyTag față de plasmide Rep-Cap non-SpyTagged.

Transducția celulară, analiza citometrică în flux și analiza Western blot au fost efectuate așa cum este descris mai sus.

Inserțiile AAV9 RC A589 și G453 SpyTag au susținut o reacție cu SpyCatcher-Herceptin și transducția specifică mediată a celulelor FIER2+. **Figura 10.** Similar cu AAV2, un SpyTag inserat la AAV9 RC A589 fără linker de flancare nu a fost foarte accesibil și a reacționat prost cu SpyCatcher. **Figura 10.** În schimb, adăugarea de linker de aminoacizi de ambele părți ale SpyTag a permis o reactivitate mai robustă la SpyCatcher, iar particulele de mozaic cu câteva SpyTag foarte reactive au fost foarte eficiente la transducerea celulelor țintă. **Figura 10.**

Exemplul 9: Redirecționarea particulelor AAV SpyTagged - SpyCatcher - complexe Vh in vivo

Pentru a determina dacă VP-SpyTag-Spy Catcher-Vh ar putea fi redirecționat 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, iar șoarecii de control de tip sălbatic au fost injectați intravascular cu sălbatic. -tip AAV singur sau particule virale VP-SpyTag-SpyCatcher-Vh (sub formă de particule pure sau mozaic, și cu sau fără un linker de aminoacizi) purtând o genă reporter, de exemplu, proteină fluorescentă verde sau luciferază de licurici. Martorii includ șoareci care au fost injectați cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS). Pentru a determina dacă VP- Spy Tag- Spy Catcher- Vh ar putea fi detașat din ficat și redirecționat către alte organe, șoarecii de tip sălbatic au fost injectați intravascular numai cu AAV de tip sălbatic sau VP- Spy Tag- Spy Catcher- Vh particule virale (ca particule de mozaic) purtând o genă reporter, de exemplu, proteină verde fluorescentă. Pentru a demonstra detargerea de la ficat și redirecționarea către un alt organ, a fost aleasă proteina ENTPD3, deoarece nu se știe că este exprimată în ficat, dar este exprimată în alte organe, cum ar fi celulele insulelor pancreatice (Syed et al. 2013, *Am J Physiol*). *Endocrinol Metab* 305: E1319-E1326, 2013) și limbă, conform bazelor de date disponibile public (date extrase de pe GenePaint.org

<http://7www.informatics.jax.org/assay/MGI:5423021> și proiectul Riken FANTOM5, set de date pentru șoareci adulți).

Anticorpi marcați cu SpyCatcher care vizează CD3 uman, CD63 uman, ASGR1 uman (nici unul dintre acestea nu este exprimat la șoareci de tip sălbatic) sau ENTPD3 uman (care recunoaște și proteina de șoarece) au fost clonați și capacitatea acestor anticorpi pentru reținerea AAV2 SpyTagged purtând fie eGFP, fie luciferaza de licurici in vivo au fost examinați. Fiecare virus a fost generat așa cum este descris mai sus prin transfectarea plăcilor de 15 cm de celule de ambalare 293T cu următoarele plasmide și cantități:

Anti-Human CD3/ anti-Human ASGR1 GFP

pAd Helper	8ug
pAAV-CAGG eGFP	4ug
pAAV2-CAP N587 SpyTag HBM	4ug
CU SAU FĂRĂ	

	pAnti-CD3 sau Anti-ASGR1 SpyCatcher Vh 1	.5ug
	pAnti-CD3 sau Anti-ASGR1 Vk	3ug
	<u>Anti-uman CD63/ anti-Human ASGR1 Luciferaza</u>	
	pAd Helper	8ug
5	pAAV-UbC- Firefly Luciferase	4ug
	pAAV2-CAP G453 Linker 10 SpyTag HBMx5	0,5 ug
	pAAV2-CAP N587 Myc	3,5 ug
	CU sau FĂRĂ	
	pAnti-CD63 sau Anti-ASGR1 SpyCatcher Vh	1.5ug
10	pAnti-CD63 sau Anti-ASGR1 Vk	3ug
	<u>Anti-Human ENTPD3/ anti-Human ASGR1 GFP</u>	
	pAd Helper	8ug
	pAAV-CMV-eGFP	4ug
	pAAV2-CAP G453 Linker 10 SpyTag HBMx5	0,5 ug
15	pAAV2-CAP N587 Myc	3,5 ug
	CU sau FĂRĂ	
	pAnti-ENTPD3 sau Anti-ASGR1 SpyCatcher Vh	1.5ug
	pAnti-ENTPD3 sau Anti-ASGR1 Vk	3ug
20	Plasmidele SpyCatcher-Vh și Vk care codifică lanțuri grele și ușoare de anticorpi care recunosc proteinele umane ASGR1, CD3 sau CD63, au fost testate pe șoareci modificați genetic, astfel încât celulele lor hepatice să exprime hASGR1 pe fundal C57BL/6. Pe șoareci de tip sălbatic au fost testate plasmidele SpyCatcher-Vh și Vk care codifică anticorpii care recunoaște proteina umană ASGR1 (ca un control care nu vizează) sau proteina ENTPD3 de șoarece și umană. La zece zile după infectare, șoarecii au fost sacrificați și expresia genei reporter a fost examinată; ficatul, splina și rinichii au fost fixate și	
25	colorate cu anticorp anti-eGFP de pui (Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. West Grove, PA) și anticorpii secundari anti-pui conjugat Alexa-488 (Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. West Grove, PA). Pentru a testa luminescența animalelor, la 14 zile după infecție, animalele vii au fost anesteziate folosind izofluran, au fost injectate cu un substrat Luciferin și au fost fotografiate 10 minute mai târziu folosind sistemul IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (PerkinElmer). Figurile 11 și 12 arată că infecția cu	
30	complexele AAV2 -SpyTag-SpyCatcher-Vh a fost detectată numai în ficatul șoarecilor care exprimă hASGR1 injectați cu AAV reținut hASGR1 și nu a fost detectată în ficatul șoarecilor de tip sălbatic, care nu exprimă hASGR1. Nu a fost detectat EGF pozitiv în alte organe (datele nu sunt prezentate).	
	Figura 13 prezintă colorarea imunohistochimică pentru expresia eGFP în ficat și pancreas la șoareci de tip sălbatic după injectarea de AAV-uri conjugați la anticorpi care vizează ENTPD3 sau	
35	hASGR1 ca un control ne-țintire, deoarece hASGR1 nu este exprimat la șoarecii de tip sălbatic. La patru săptămâni după infecție, organele au fost recoltate de la animale infectate și fixate în formol tamponat cu neutroal 10% timp de 48 de ore, apoi colorate pentru eGFP prin imunohistochimie. Figura 13 arată că	
	complexele AAV2-SpyTag-SpyCatcher-Vh au fost îndepărtate de ficatul de șoarece de tip sălbatic; toți șoarecii injectați cu AAV conjugați cu anticorpi care vizează ENTPD3 și hASGR1 au arătat o lipsă	
40	similară a expresiei eGFP în ficat. Un șoarece injectat cu AAV conjugați cu anticorpi care vizează ENTPD3 avea celule care exprimă eGFP în insulele pancreatice, unde se crede că ENTPD3 este exprimat.	
	Figura 14 prezintă colorarea imunohistochimică pentru expresia eGFP în ficat și limbă la șoareci de tip sălbatic după injectarea de AAV conjugați cu anticorpi care vizează ENTPD3 sau hASGR1 ca un	
45	control non-țintire, deoarece hASGR1 nu este exprimat la șoarecii de tip sălbatic. La 14 zile după infecție, organele au fost recoltate de la animale infectate și fixate în formol tamponat cu neutroal 10% timp de 48 de ore, apoi colorate pentru eGFP prin imunohistochimie. Figura 14 arată că complexele AAV2-SpyTag-	
	SpyCatcher-Vh au fost îndepărtate de ficatul de șoarece de tip sălbatic; toți șoarecii injectați cu AAV conjugați cu anticorpi care vizează ENTPD3 și hASGR1 au arătat o lipsă similară a expresiei eGFP în	
50	ficat. Toți cei trei șoareci injectați cu AAV conjugați cu un anticorp irelevant (anti-ASGR1) nu au prezentat nicio colorare în limbă, în timp ce toți cei trei șoareci injectați cu AAV conjugați cu anti-ENTPD3 au arătat celule care exprimă eGFP în limbă, unde se crede ENTPD3 a fi exprimat.	
	<u>Exemplul 10: Livrarea unei gene sinucigase la celulele care exprimă un ligand țintit</u>	
	De asemenea, este descrisă capacitatea complexelor VP-SpyTag-SpyCatcher-Vh de a furniza în mod specific încărcătură terapeutică, cum ar fi una sau mai multe gene sinucigase, o terapie biologică (de	
55	exemplu, anticorp), un sistem de editare a genelor CRISPR/Cas, shRNA etc., la un tip de celulă vizat.	
	Pentru a testa capacitatea complexelor VP-Spy Tag-Spy Catcher-Vh de a furniza o genă sinucigasă unei celule specifice, un model de șoarece nud xenogrefă de HER2+cancer de sân așa cum este descris de Wang și colab. ((2010) Cancer Gene Therapy 17:559-570).	

Complexele VP- Spy Tag- Spy Catcher- Vh care poartă o genă sinucigașă (SG) sunt generate în mod similar cu cele descrise în Materiale și Metode.

Liniile 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). Rhabdomyosarcomul A-673 și cancerul de col uterin HeLa sunt linii de celule tumorale umane HER2 negative și 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 femele nude, cu vârsta cuprinsă între 6 și 8 săptămâni sunt obținuți și găzduiți în condiții specifice fără agenți patogeni. În ziua 0, șoarecii sunt injectați simultan (1) subcutanat în flancul drept cu celule tumorale 107BT474, SK-BR-3, Calu-3, A-673 sau HeLa și (2) tratate intravenos complexe VP-SpyTag-SpyCatcher-Vh purtând un reporter (de exemplu, EGFP) sau genă sinucigașă. Ca martori servesc animale netratate (animale injectate numai cu celule tumorale), animale injectate cu particule AAV de tip sălbatic purtând o genă reporter sau sinucigașă, animalele injectate numai cu particule de virus SpyTag etc. 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 lățime² x 0,52. După morbiditate, ulcerare tumorală, un diametru al tumorii de 15 mm sau un volum al tumorii de 1000 mm³, șoarecii sunt sacrificați și data sacrificării este înregistrată ca data morții. Ficatul, splina, rinichii și tumorile animalelor injectate cu particule de virus purtând o genă reporter sunt fixate și se vizualizează expresia genei reporter.

Deși a fost descrisă livrarea țintită a genelor inductoare de sinucidere (Zarogoulidis P., et al. (2013) J. Genet. Sindr. Gene Ther. 4: 16849), acest exemplu descrie livrarea unei gene sinucigașe la o celulă care exprimă ligandul HER2 țintit folosind particulele virale descrise aici. În experimente suplimentare, o genă sinucigașă este livrată la un alt tip de celulă care exprimă unul sau mai mulți alți liganzi țintă folosind o particulă virală descrisă aici Exemple exemplificative și nelimitative de receptori adecvați pentru țintire includ acei receptori care mediază endocitoza particulei virale, de exemplu, antigen carcino-embrionar (CEA) (Qiu Y, et al. (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, și colab. (2009) Expert Opin Biol Ther. 9: 1087-1098), cluster de diferențiere 44s (CD44s) (Heider KH, și colab. (2004) Cancer Immunol Immunother. 53:567-579), grupul de diferențiere 133 (CD133 aka AC133) (Zhang SS, și colab. (2012) BMC Med. ; 10:85), receptorul de folat (FR) (Duarte S, et al., (2011) J Control Release 149(3):264-72), receptorul de transferină (TfR) sau diferențierea cluster 71 (CD71) (Habashy HO, et al., Breast Cancer Res Treat.119(2):283-93), mucine (Torres MP, et al., (2012) Curr Pharm Des. 2012; 18(17):2472-81), antigenul embrionar specific stadiului 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., și colab., (20U) J Stem Cell Res Ther. 3: 134).

Exemplele de mai sus ilustrează aspecte ale invenției, dar nu limitează domeniul de aplicare al acesteia, care este definit de revendicări.

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 înțelege în mod obișnuit o persoană cu calificare obișnuită în domeniul căruia îi aparține această invenție.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- CHEN Z.C., KASARANENI N. & CHAMOUN-EMANUELLI A.M.: "Stable in vitro reprogramming of lentiviral vectors for target delivery of genetic cargo", MOL. THERAPY, vol. 24, no. S1, 602, May 2016 (2016-05), page S239, XP002785100,
- EP-A1- 3 758 725
- CHAMOUN-EMANUELLI A.M. ET AL.: "In vitro incorporation of a cell-binding protein to lentiviral vector using an engineered split intein enables targeted delivery of genetic cargo.", BIOTECH. BIOENGINEERING, vol. 112, no. 12, 12 August 2015 (2015-08-12), pages 2611-2617+sup, XP002785101,
- WO-A1-2016/011291
- WO-A1-2016/112921
- MÜNCH R.C. ET AL.: "Displaying high-affinity ligands on adeno-associated viral vectors enables tumor cell-specific and safe gene transfer.", MOL. THERAPY, vol. 21, no. 1, January 2013 (2013-01), pages 109-118+sup, XP002785102,
- RIED M.U. ET AL.: "Adeno-Associated Virus Capsids Displaying Immunoglobulin-Binding Domains Permit Antibody-Mediated Vector Retargeting to Specific Cell Surface Receptors", J. VIROLOGY, vol. 76, no. 9, May 2002 (2002-05), pages 4559-4566, XP002785103,
- WO-A1-2019/169144
- V. W. VAN BEUSECHEM ET AL: "Efficient and Selective Gene Transfer into Primary Human Brain Tumors by Using Single-Chain Antibody-Targeted Adenoviral Vectors with Native Tropism Abolished", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 76, no. 6, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 2753-2762, XP055004358, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.76.6.2753-2762.2002
- WO-A2-2014/108484
- VEGGIANI G , ZAKERI B. & HOWARTH M.: "Superglue from bacteria: unbreakable bridges for protein nanotechnology", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 32, no. 10, 26 August 2014 (2014-08-26), pages 506-512, XP029064532, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2014.08.001
- GIANLUCA VEGGIANI ET AL: "Programmable polyproteins built using twin peptide superglues", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 113, no. 5, 19 January 2016 (2016-01-19), pages 1202-1207, XP055295991, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1519214113
- KEEBLE A.H. ET AL.: "Evolving accelerated amidation by SpyTag/SpyCatcher to analyze membrane dynamics", ANGEW. CHEM. INT. ED., vol. 56, December 2017 (2017-12), pages 16521-16525, XP002785104,
- SANTIAGO-ORTIZ JORGE L ET AL: "Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 240, 12 January 2016 (2016-01-12), pages 287-301, XP029759411, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2016.01.001
- LIMIN CAO ET AL: "Characterization of a single-chain variable fragment (scFv) antibody directed against the human asialoglycoprotein receptor", BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 44, no. 2, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 65-72, XP002643344, ISSN: 0885-4513, DOI: 10.1042/BA20050081 [retrieved on 2010-12-23]
- SYED S.K. ET AL.: "Ectonucleotidase NDPase3 is abundant in pancreatic beta-cells and regulates glucose induced insulin secretion.", AM. J. ENDOCRINOL. METAB., vol. 305, 2013, pages E1319-E1326, XP002787496,
- BUCHEIT A.D. ET AL.: "An Oncolytic Measles Virus Engineered to Enter Cells Through the CD20 Antigen", MOL. THER., vol. 7, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 62-72, XP002787497,
- MIHARU KOBAYASHI ET AL: "Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, vol. 12, no. 1, 4, 6 January 2014 (2014-01-06), XP021174598, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-12-4
- KASHENTSEVA E A ET AL: "Adenovirus targeting to c-erbB-2 oncoprotein by single-chain antibody fused to trimeric form of adenovirus receptor ectodomain", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 62, no. 2, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 609-616, XP002227912, ISSN: 0008-5472

- 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
- XIE H., NOTKINS A.L. & LAN M.S.: "IA-2, a Transmembrane Protein Tyrosine Phosphatase, Is Expressed in Human Lung Cancer Cell Lines with Neuroendocrine Phenotype", CANCER RES., vol. 56, 15 June 1996 (1996-06-15), pages 2742-2744, XP002787498,
- KASARANENI N. ET AL.: "Retargeting lentiviruses via spycather-spytag chemistry for gene delivery into specific cell types.", MBIO, vol. 8, no. 6, 12 December 2017 (2017-12-12), pages E01860-17, XP002785105,

(57) Revendicări:

1. O proteină recombinantă a capsidei virale care este modificată genetic pentru a prezenta o secvență heterologă de aminoacizi cuprinzând un prim membru al unei perechi de legare proteină:proteină inserată în proteina capsidă virală,

în care proteina capsidă virală este derivată dintr-o genă cap a unui virus adeno-asociat (AAV) care codifică o proteină de capsidă AAV VP1, VP2 și/sau VP3;

în care:

(a) primul membru al perechii de legare proteină:proteină este o etichetă peptidică și este capabil să formeze o legătură izopeptidică cu un al doilea membru înrudit al perechii de legare proteină:proteină; sau

(b) primul membru al perechii de legare proteină:proteină este o etichetă peptidică și proteina capsidă virale cuprinde în continuare al doilea membru înrudit al perechii de legare proteină:proteină, în care primul membru și al doilea membru înrudit sunt legați printr-o legătură izopeptidică.

2. Proteina capsidă virale recombinantă conform revendicării 1, în care proteina capsidă virale cuprinde în plus un al doilea membru înrudit al perechii de legare proteină: proteină, în care primul și al doilea m

embru înrudit sunt legați printr-o legătură izopeptidică.

3. Proteina capsidă virale recombinantă conform revendicării 1 sau revendicării 2, în care proteina capsidă virale este derivată dintr-o genă cap AAV himerică.

4. Proteina capsidă virale recombinantă conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care proteina capsidă virale cuprinde în continuare o mutație în plus față de primul membru al perechii de legare proteină:proteină.

5. Proteina capsidă virale recombinantă conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care:

(a) primul membru reduce sau elimină tropismul natural al proteinei capsidă; și/sau

(b) proteina capsidă virale mai cuprinde o mutație în plus față de primul membru al perechii de legare proteină:proteină, care reduce sau elimină tropismul natural al proteinei capsidă.

6. Proteina capsidă virale recombinantă conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care:

(a) primul membru este flancat de un prim și/sau al doilea linker care leagă primul membru al proteinei capsidă virale, și în care primul și/sau al doilea linker are fiecare în mod independent cel puțin un aminoacid în lungime;

(b) proteina capsidă virale mai cuprinde o mutație la o poziție de aminoacid implicată în legarea proteinei capsidă virale la receptorul său natural, în care mutația cuprinde o inserție a unei peptide heterologe în proteina capsidă, înlocuirea unuia sau mai multor aminoacizi ai proteinei capsidă cu o peptidă heterologă, eliminarea unuia sau mai multor aminoacizi ai proteinei capsidă sau o combinație a acestora;

(c) AAV este selectat din grupul format din AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 și AAV9;

(d) perechea de legare proteină:proteină este:

- (i) SpyTag: SpyCatcher,
- (ii) SpyTag:KTag,
- (iii) Isopeptag:pilin-C,
- (iv) SnoopTag: SnoopCatcher,
- (v) SpyTag002:SpyCatcher002; sau
- (e) orice combinație de (a)-(d).

7. Proteina capsidei virale recombinante conform revendicării 5 sau 6, în care tropismul proteinei capside virale este:

- (a) restaurat;
 - (b) redirectionat; sau
 - (c) restaurat și redirectionat,
- la formarea legăturii izopeptidice cu al doilea membru înrudit, care al doilea membru înrudit este fuzionat cu un ligand de țintire care leagă în mod specific o celulă țintă.

8. Proteina capsidei virale recombinante conform oricăreia dintre revendicările 2-7, în care:

- (a) primul membru este SpyTag, iar al doilea membru înrudit este SpyCatcher sau KTag;
- (b) primul membru este KTag și al doilea membru înrudit este SpyTag;
- (c) primul membru este SnoopTag, iar al doilea membru înrudit este SnoopCatcher;
- (d) primul membru este izopeptag și al doilea membru înrudit este Pilin-C; sau
- (e) primul membru este SpyTag002, iar al doilea membru înrudit este SpyCatcher002.

9. Proteina capside virale recombinante conform oricăreia dintre revendicările 2-7, în care al doilea membru înrudit este legat de un ligand de țintire.

10. Proteina capsidei virale recombinante conform revendicării 9, în care:

- (a) ligandul de țintire este un fragment de legare;
- (b) ligandul de țintire este un anticorp sau o parte a acestuia;
- (c) ligandul de țintire cuprinde o secvență de aminoacizi prezentată ca SECV ID NR:46;
- (d) ligandul de țintire leagă în mod specific o moleculă de suprafață celulară; sau
- (e) orice combinație de (a)-(d).

11. Proteina capsidei virale recombinante conform revendicării 10, în care fragmentul de legare este un anticorp sau o porțiune a acestuia, în care:

- (a) anticorpul sau o parte a acestuia este fuzionat cu SpyCatcher;
- (b) anticorpul sau porțiunea acestuia este fuzionată cu SpyCatcher, în care anticorpul sau porțiunea acestuia este fuzionată cu un linker la capătul C-terminal, iar linkerul este fuzionat cu SpyCatcher la capătul C-terminal al linkerului; sau
- (c) anticorpul sau porțiunea acestuia este fuzionată cu SpyCatcher, în care anticorpul sau porțiunea acestuia este fuzionată cu un linker la capătul C-terminal, iar linkerul este fuzionat cu SpyCatcher la capătul C-terminal al linkerului, în care linkerul cuprinde o secvență prezentată ca SECV ID NR:48 (GSGESG).

12. Proteina capsidei virale recombinante conform revendicării 10, în care ligandul de țintire leagă în mod specific o moleculă a suprafeței celulare care este:

- (i) asialoglicoproteina 1 (ASGR1),
- (ii) ectonucleozidă trifosfat difosfohidrolază 3 umană (ENTPD3),
- (iii) PTPRN,
- (iv) CD20,
- (v) CD63,
- (vi) Her2; sau
- (vii) receptorul transferinei 2.

13. Proteina capsidei virale recombinante conform revendicării 10, în care:

- (a) ligand de țintire leagă în mod specific o moleculă exprimată de o celulă neuronală; sau
- (b) ligandul de țintire se leagă în mod specific la receptorul de transferină exprimat de o celulă neuronală.

14. Proteina capsidei virale recombinante conform revendicării 10, în care ligandul de țintire leagă în mod specific o moleculă exprimată de către o celulă musculară.

15. O capsidă virală recombinantă cuprinzând proteina capsidei virale conform oricăreia dintre revendicările 1-14.

16. Capsida virală recombinantă conform revendicării 15, în care proteina capsidei virale mai cuprinde o proteină a capsidei virale de referință lipsită de orice membru al perechii de legare specifică.

17. Capsida virală recombinantă conform revendicării 16, care cuprinde proteina capsidei virale și proteina capsidei virale de referință într-un raport între 1: 1 și 1: 15.

18. O particulă virală recombinantă cuprinzând o nucleotidă de interes încapsulată de proteina capsidei virale a oricăreia din revendicările 15-17.

19. Compoziție care cuprinde: (a) proteina capsidei virale conform oricăreia dintre revendicările 15-17 sau particula virală conform revendicării 18; și (b) un purtător acceptabil farmaceutic.

20. Particula virală conform revendicării 18 sau compoziție conform revendicării 19 pentru utilizare într-o metodă de eliberare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă cuprinzând punerea în contact a celulei țintă cu respectiva particulă virală sau respectiva compoziție, în care proteina capsidei virale cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific o proteină exprimată pe suprafața celulei țintă.

21. Particulă sau compoziție virală pentru utilizare în metoda din revendicarea 20, în care:

- (a) celula țintă este in vivo la un subiect;
- (b) celula țintă este in vivo la un subiect uman; și/sau
- (c) celula țintă este o celulă țintă umană.

22. Particulă sau compoziție virală pentru utilizare în metoda din revendicarea 21, în care:

- (i) celula țintă este o celulă hepatică umană și în care ligandul de țintire se leagă la receptorul de asialoglicoproteină uman (ASGR1);
- (ii) celula țintă este o celulă neuronală umană, și în care ligandul de țintire leagă GABA;
- (iii) celula țintă este o celulă T umană, și în care ligandul de țintire se leagă de CD3;
- (iv) celula țintă este o celulă T umană, și în care ligandul de țintire se leagă de CD3ε;
- (v) celula țintă este o celulă hematopoietică umană, și în care ligandul țintă se leagă la CD34;
- (vi) celula țintă este o celulă renală umană;
- (vii) celula țintă este o celulă canceroasă umană, și în care ligandul de țintire se leagă la un antigen asociat tumorii; sau
- (viii) celula țintă este o celulă canceroasă umană și în care ligandul de țintire se leagă la un antigen asociat tumorii, în care antigenul tumoral este E6, E7 sau Her2.

23. Particulă sau compoziție virală pentru utilizare în metoda din revendicarea 21, în care:

- (i) ligandul de țintire se leagă de PTPRN (Receptor de Protein Tirozin Fosfataza Tip N);
- (ii) ligandul de țintire leagă CD20;
- (iii) ligandul de țintire se leagă la receptorul uman de glucagon; sau
- (iv) ligandul de țintire leagă în mod specific CD63 sau ectonucleozidă umană trifosfat difosfohidrolaza 3 (hENTPD3).

24. O metodă de furnizare a unei nucleotide de interes la o celulă țintă in vitro care cuprinde punerea în contact a celulei țintă cu particula virală conform revendicării 18 sau compoziția conform revendicării 19, în care proteina capsidei virale cuprinde un ligand de țintire care leagă în mod specific o proteină exprimată pe suprafața celulei țintă.

25. Metodă conform revendicării 24, în care:

- (i) celula țintă este o celulă hepatică umană, și în care ligandul de țintire se leagă la receptorul de asialoglicoproteină uman (ASGR1);
- (ii) celula țintă este o celulă neuronală umană, și în care ligandul de țintire leagă GABA;
- (iii) celula țintă este o celulă T umană, și în care ligandul de țintire se leagă de CD3;

- (iv) celula țintă este o celulă T umană, și în care ligandul de țintire se leagă de CD3ε;
- (v) celula țintă este o celulă hematopoietică umană, și în care ligandul țintă se leagă la CD34;
- (vi) celula țintă este o celulă renală umană;
- (vii) celula țintă este o celulă canceroasă umană, și în care ligandul de țintire se leagă la un antigen asociat tumorii; sau
- (viii) celula țintă este o celulă canceroasă umană și în care ligandul de țintire se leagă la un antigen asociat tumorii, în care antigenul tumoral este E6, E7 sau Her2.

26. Metodă conform revendicării 24, în care:

- (i) ligand de țintire se leagă la PTPRN;
- (ii) ligandul de țintire leagă CD20;
- (iii) ligandul de țintire se leagă la receptorul uman de glucagon; sau
- (iv) ligand de țintire se leagă în mod specific CD63hENTPD3; sau
- (v) ligand de țintire se leagă în mod specific la receptorul 2 al transferinei.

27. Un vector recombinant care codifică proteina capsidă virală conform oricăreia dintre revendicările 1-14.

28. O genă cap AAV care codifică proteina capsidă virală recombinată conform oricăreia dintre revendicările 1-14.

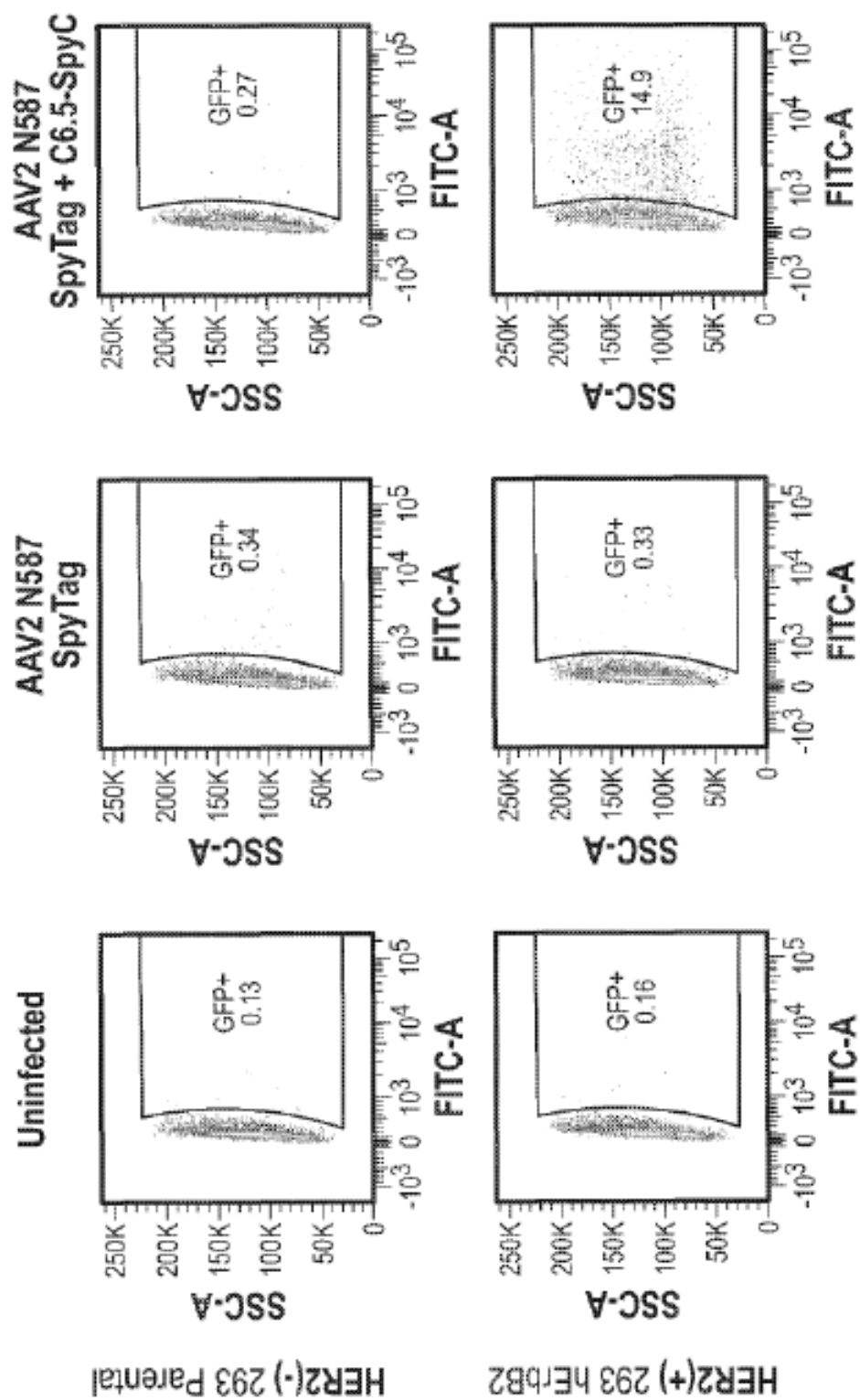


FIG. 1

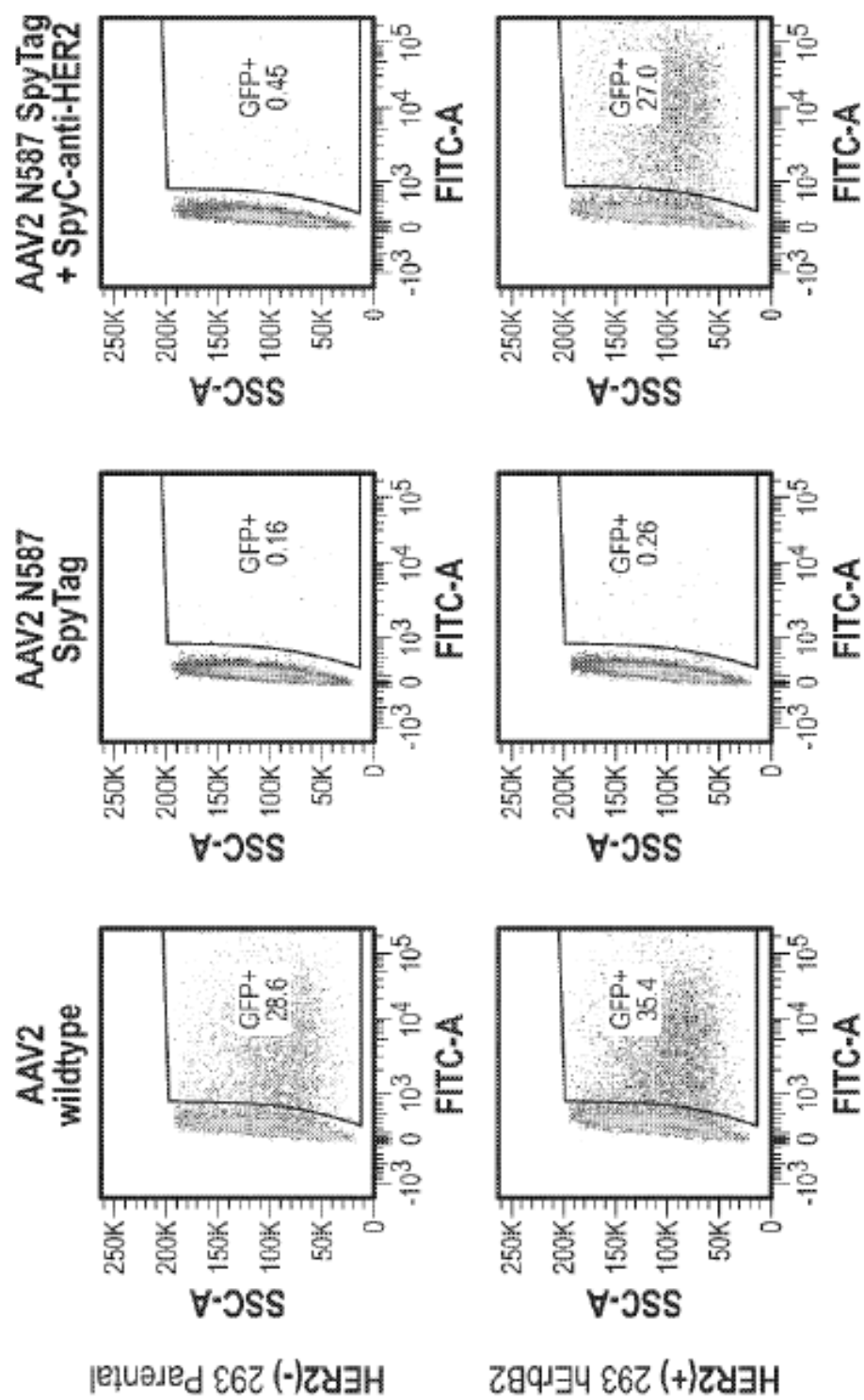


FIG. 2

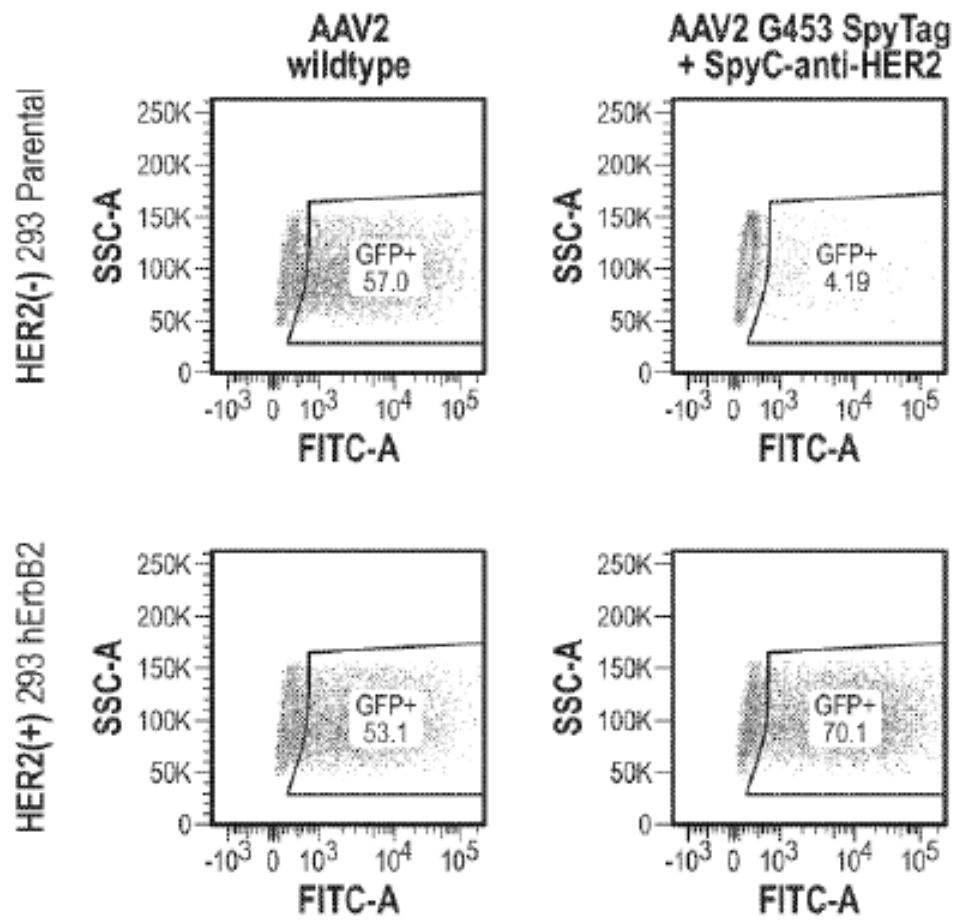


FIG. 3

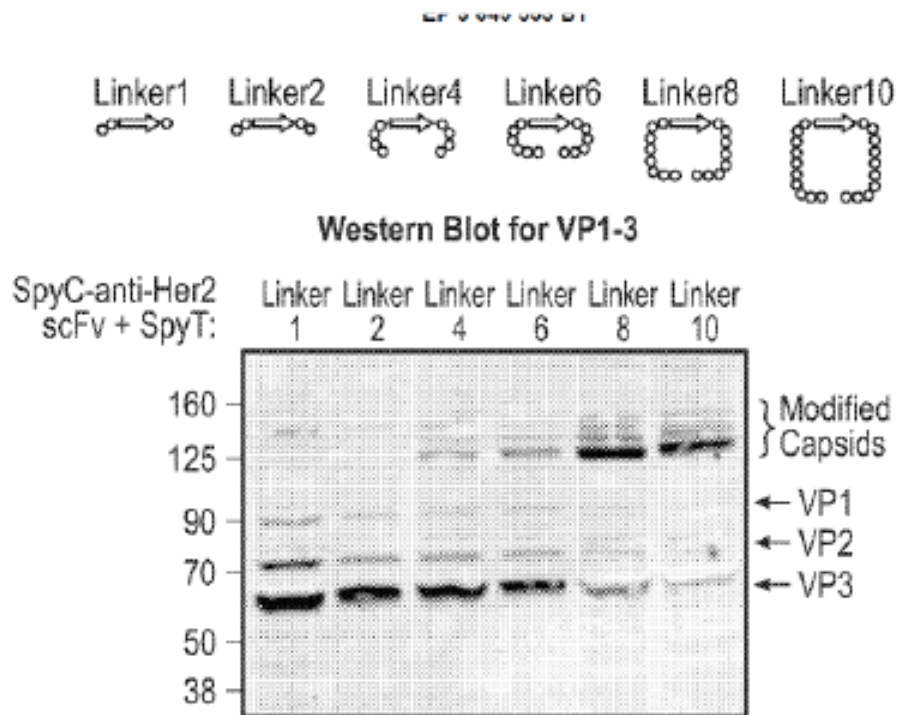


FIG. 4A

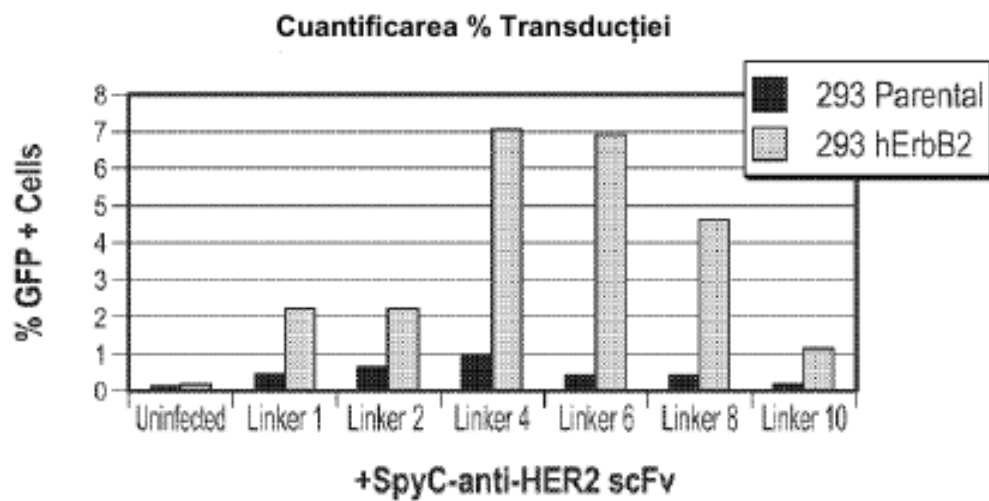


FIG. 4B

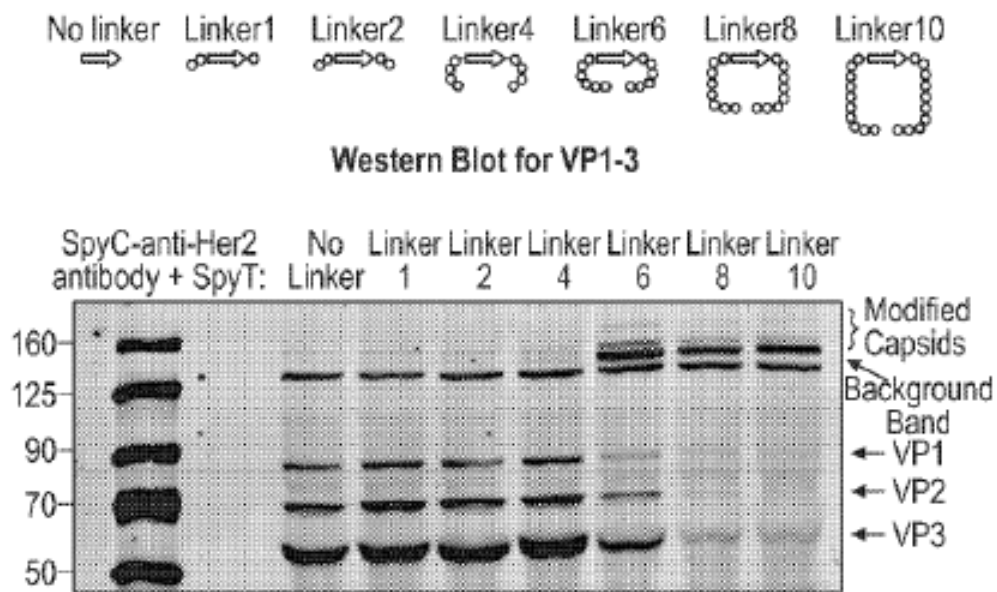


FIG. 5A

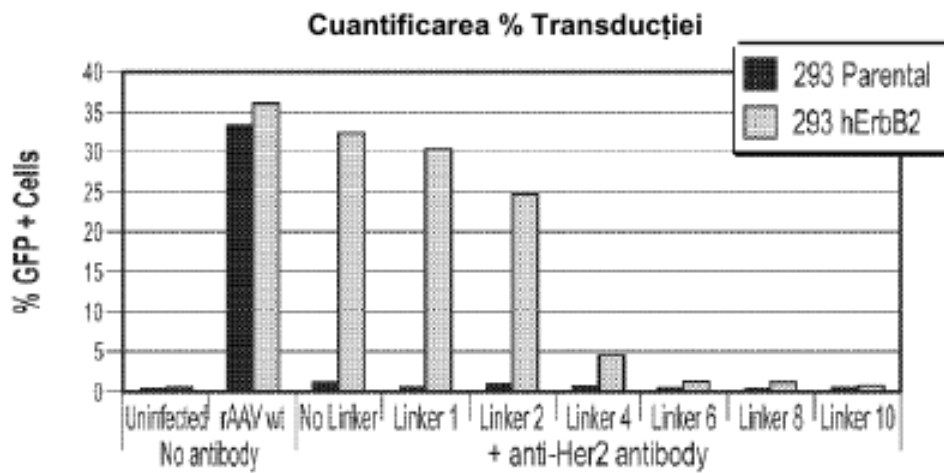


FIG. 5B

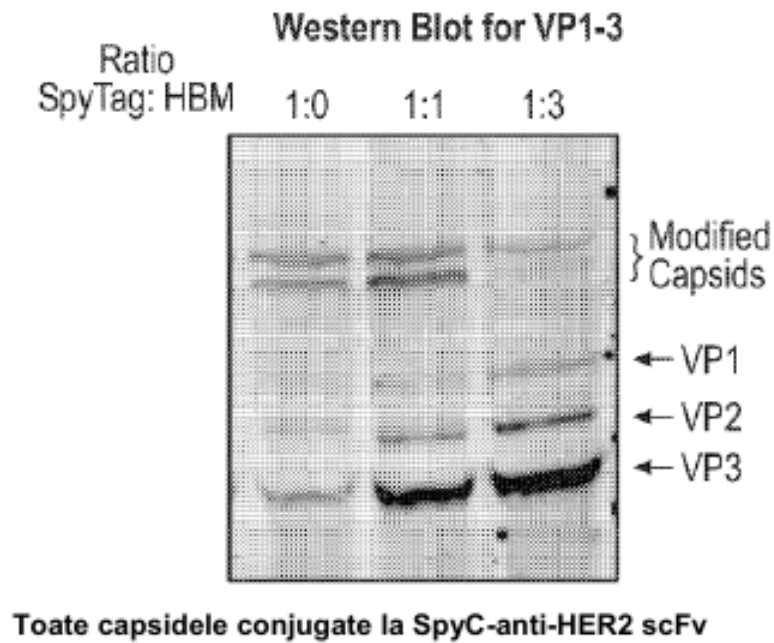


FIG. 6A

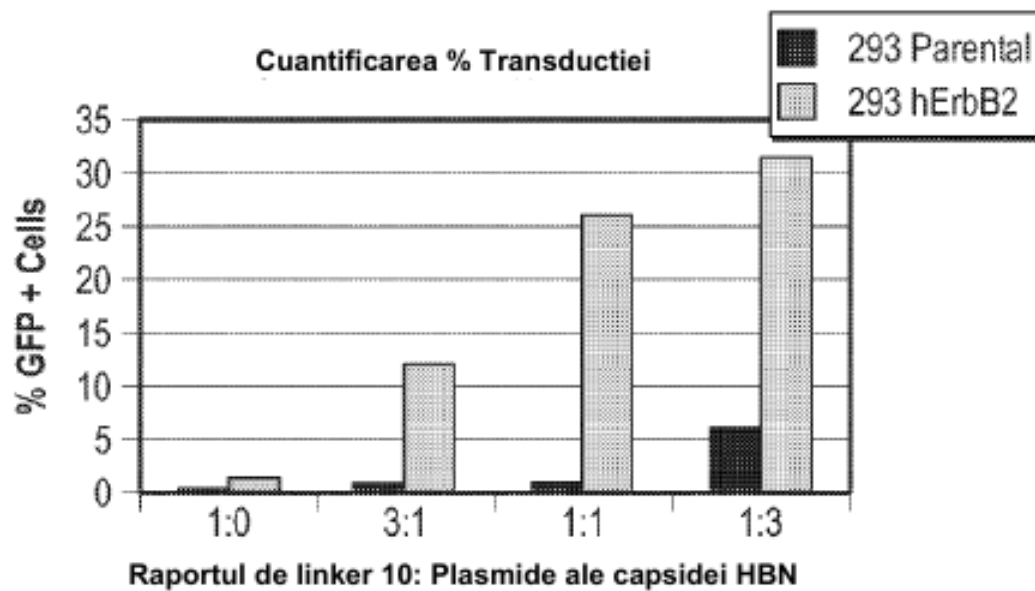


FIG. 6B

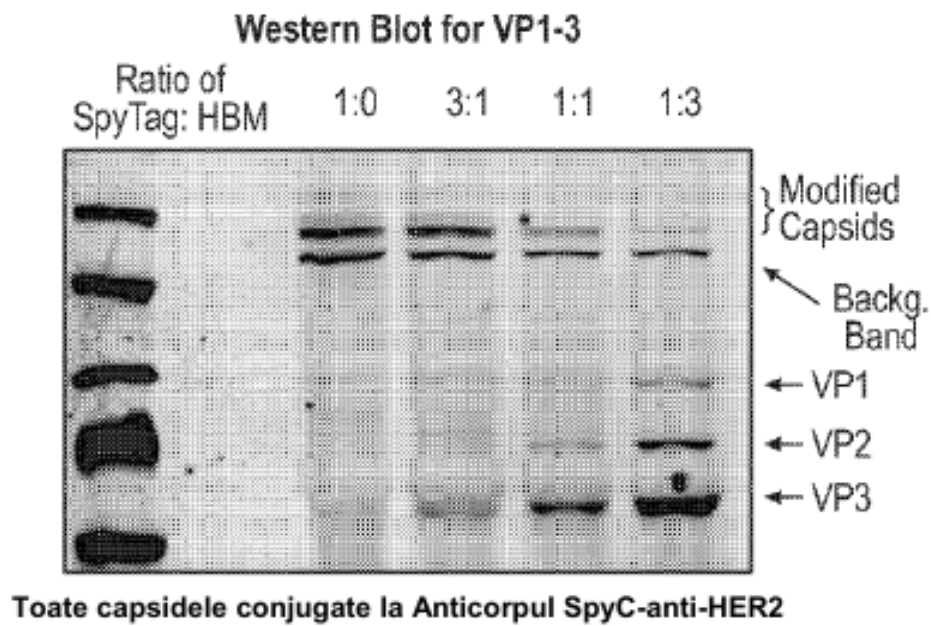


FIG. 7A

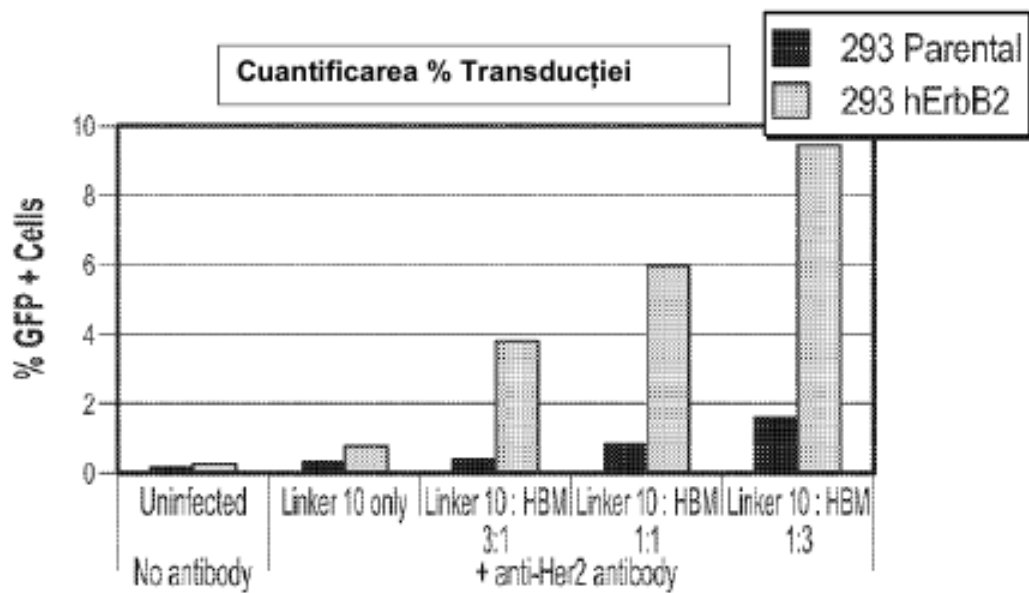


FIG. 7B

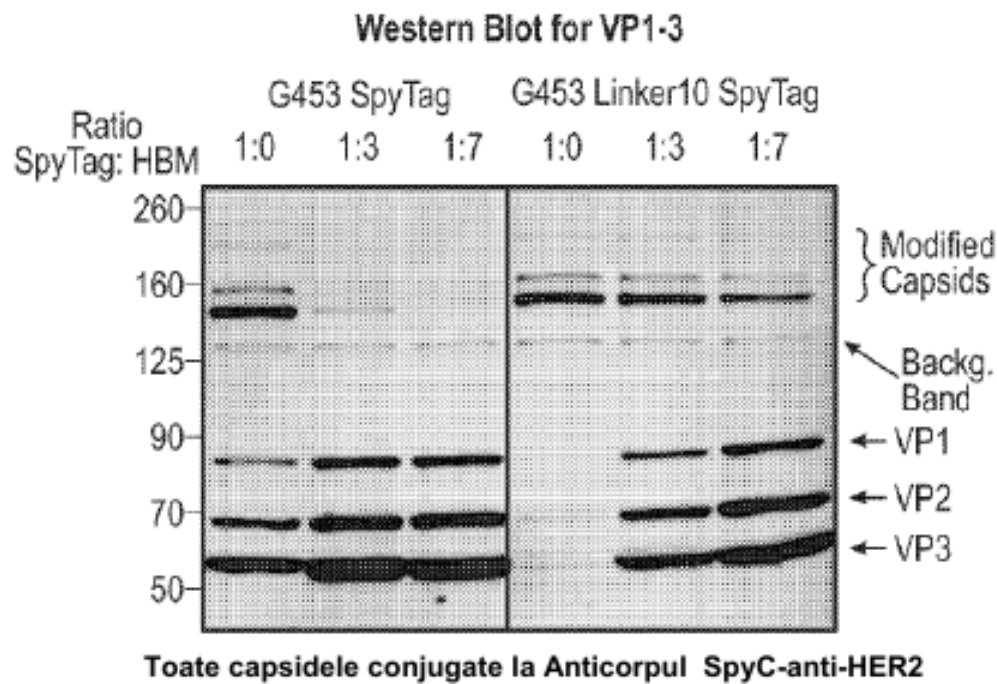


FIG. 8A

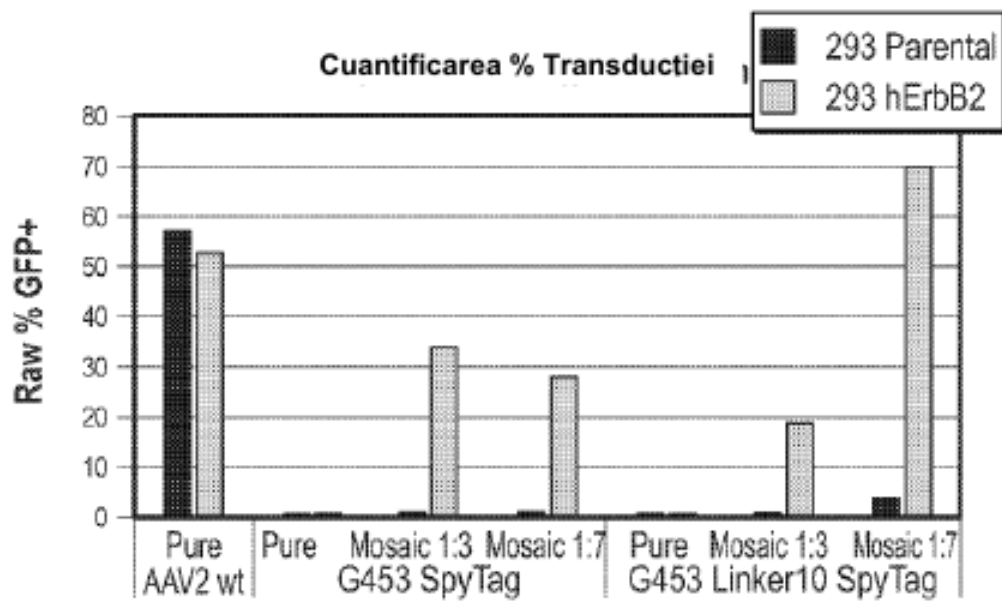


FIG. 8B

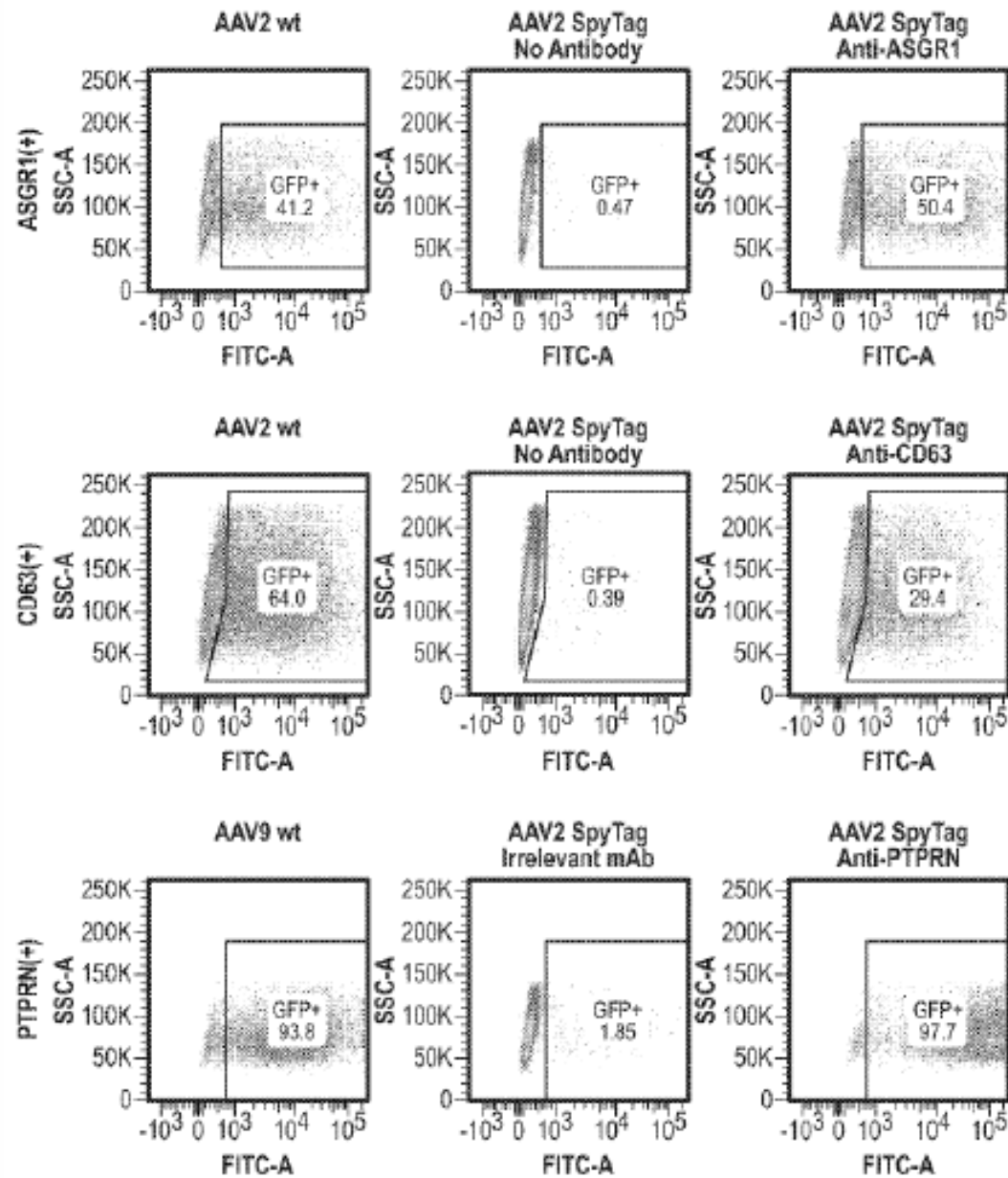


FIG. 9

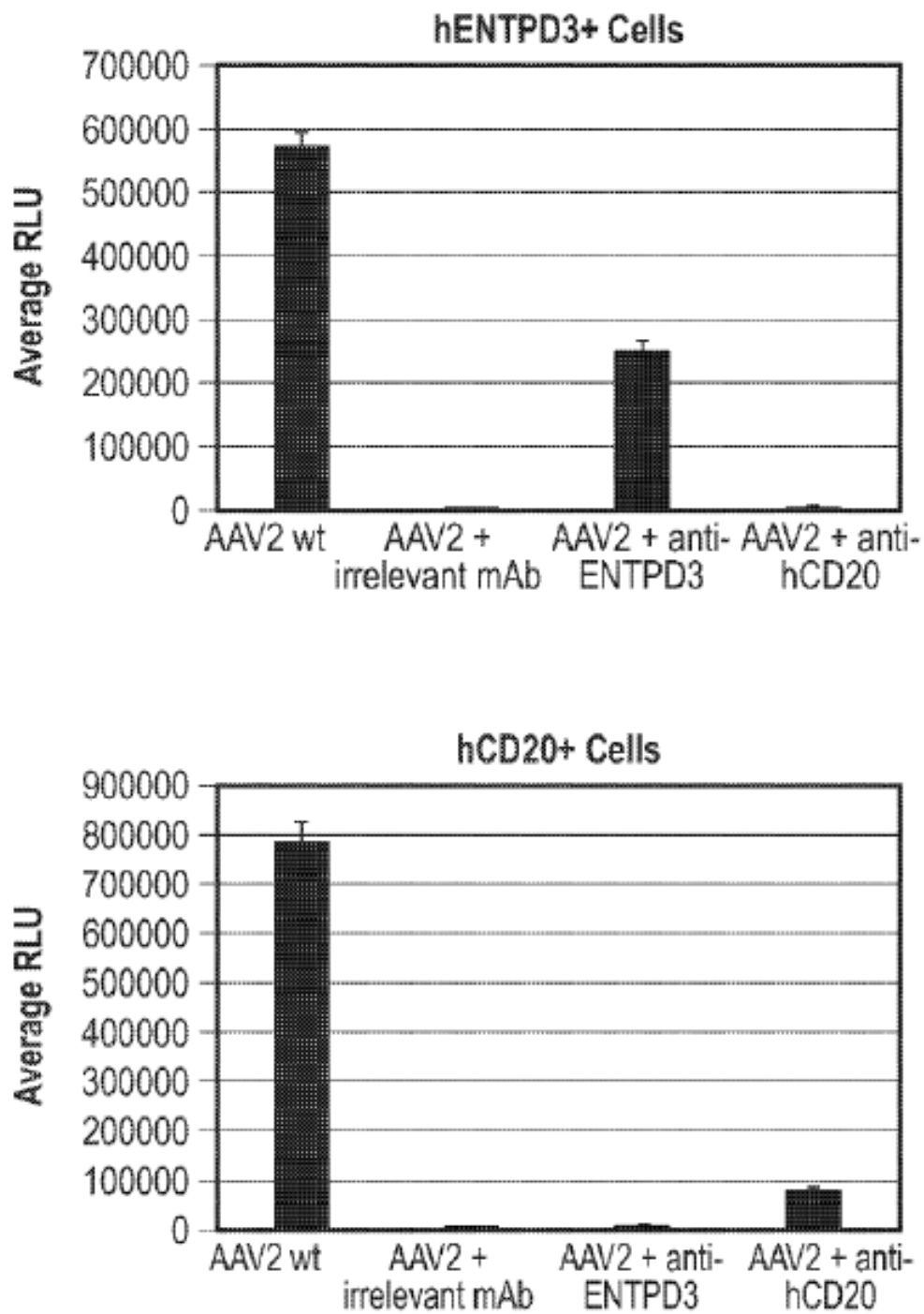
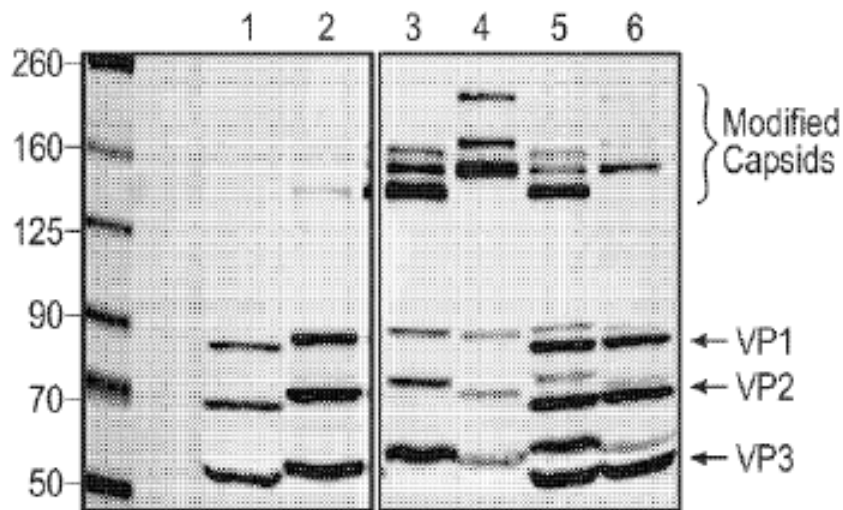


FIG. 9 (Continuare)



Lane 1	AAV9 wt
Lane 2	AAV9-RC A589SpyT_W503A + SpyC-Herceptin
Lane 3	AAV9-RC A589Linker10SpyT_W503A + SpyC-Herceptin
Lane 4	AAV9-RC G453Linker10SpyT_W503A + SpyC-Herceptin
Lane 5	AAV9-RC W503A + AAV9-RC A589Linker10SpyT_W503A Mosaic + SpyC-Herceptin
Lane 6	AAV9-RC W503A + AAV9-RC G453Linker10SpyT_W503A Mosaic + SpyC-Herceptin

FIG. 10A

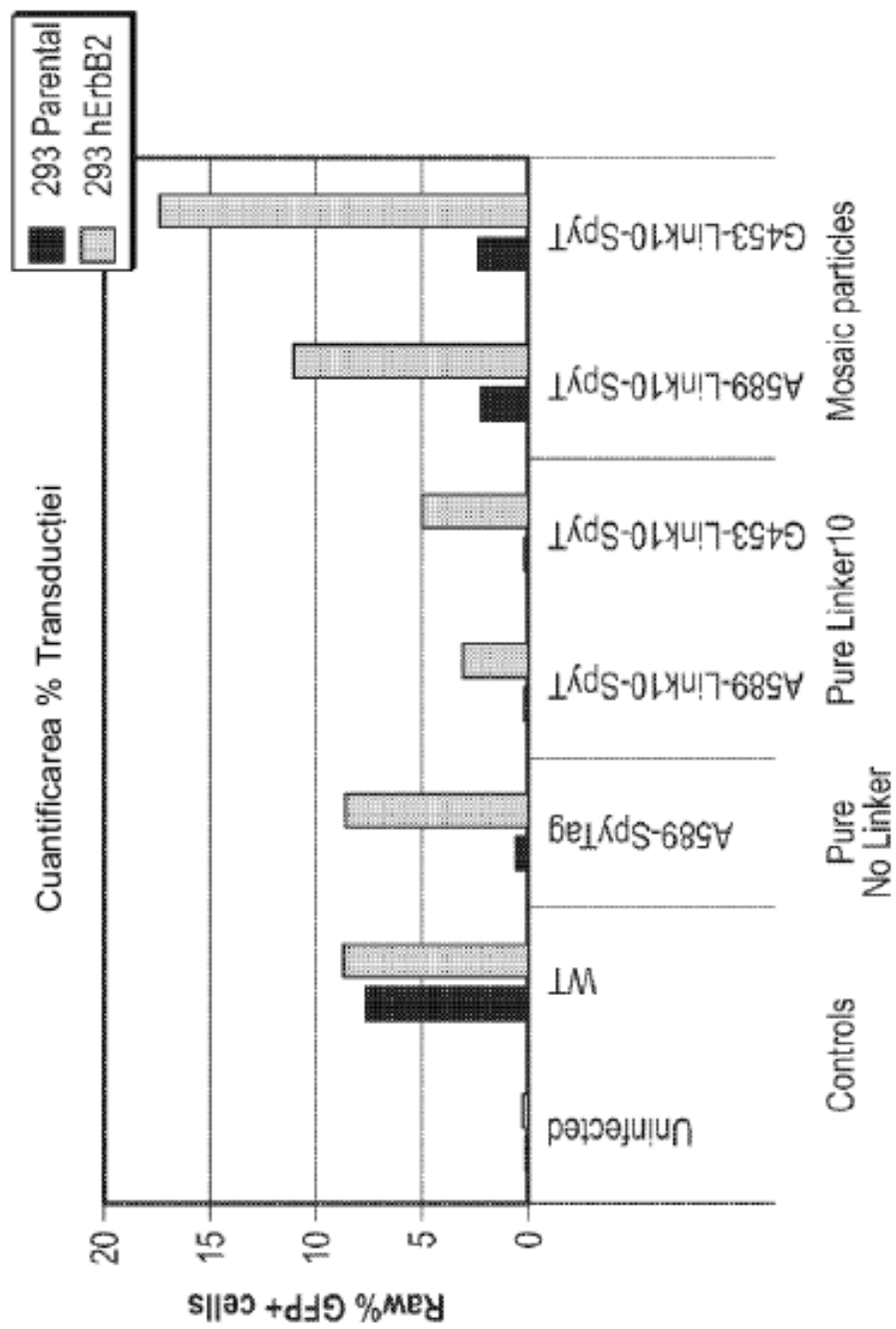
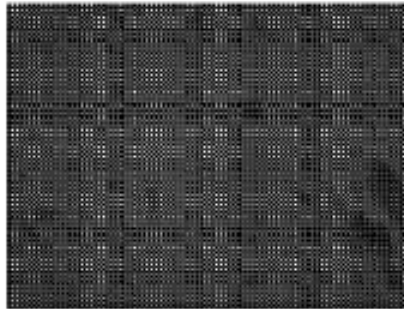
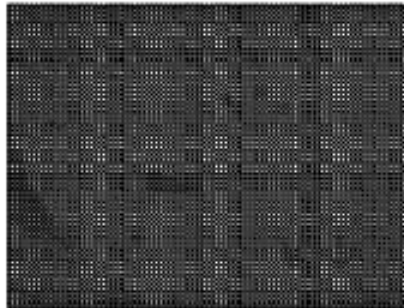


FIG. 10B

PBS



AAV2 SpyT-anti-hCD3
CAGG eGFP



AAV2 SpyT-anti-hASGR1
CAGG eGFP

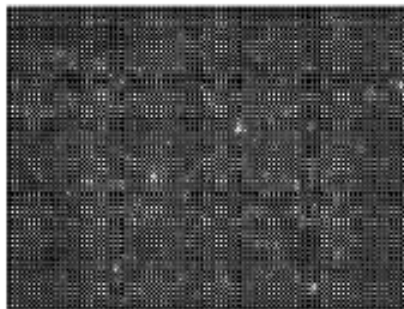


FIG. 11

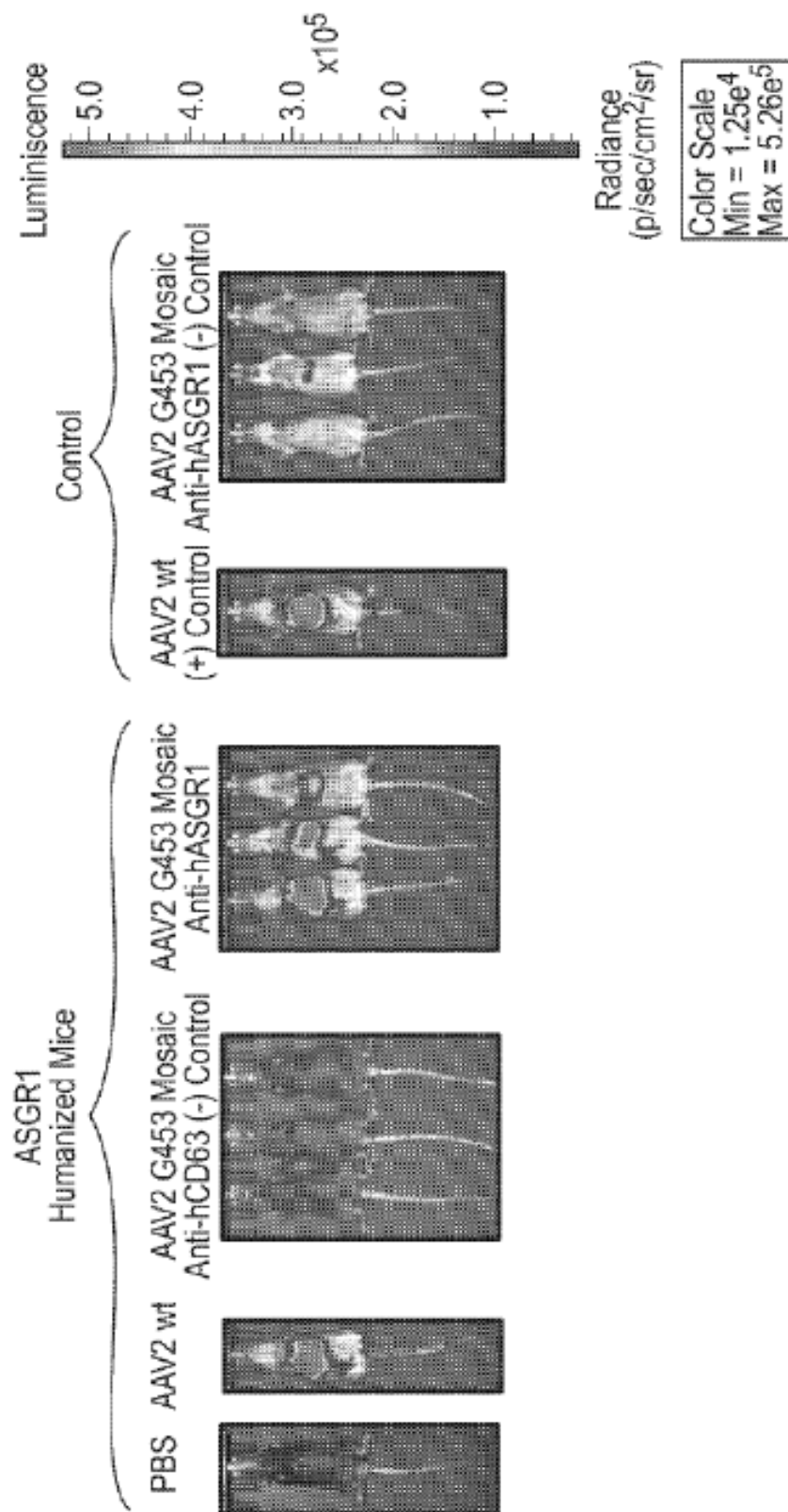


FIG. 12

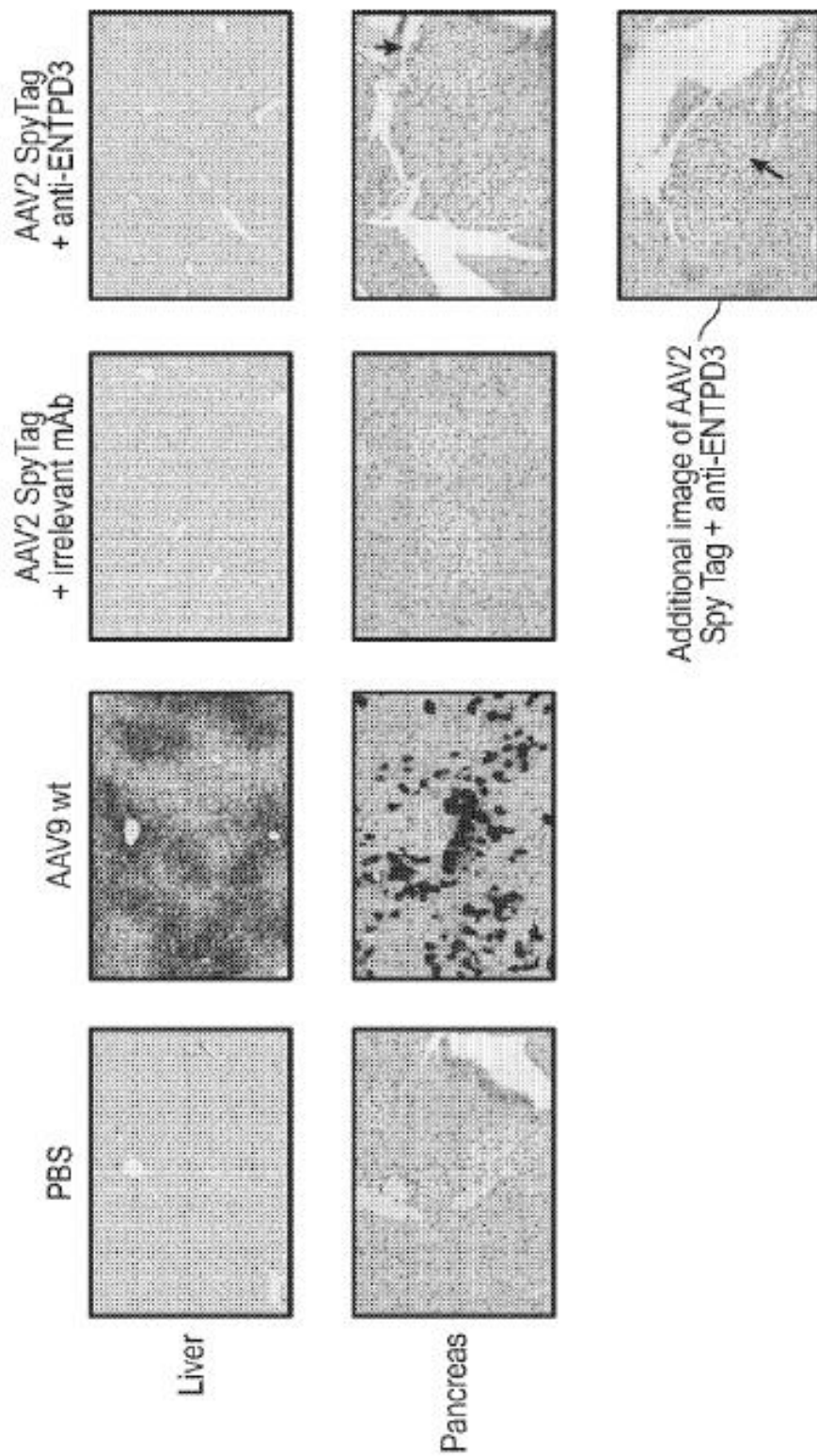


FIG. 13

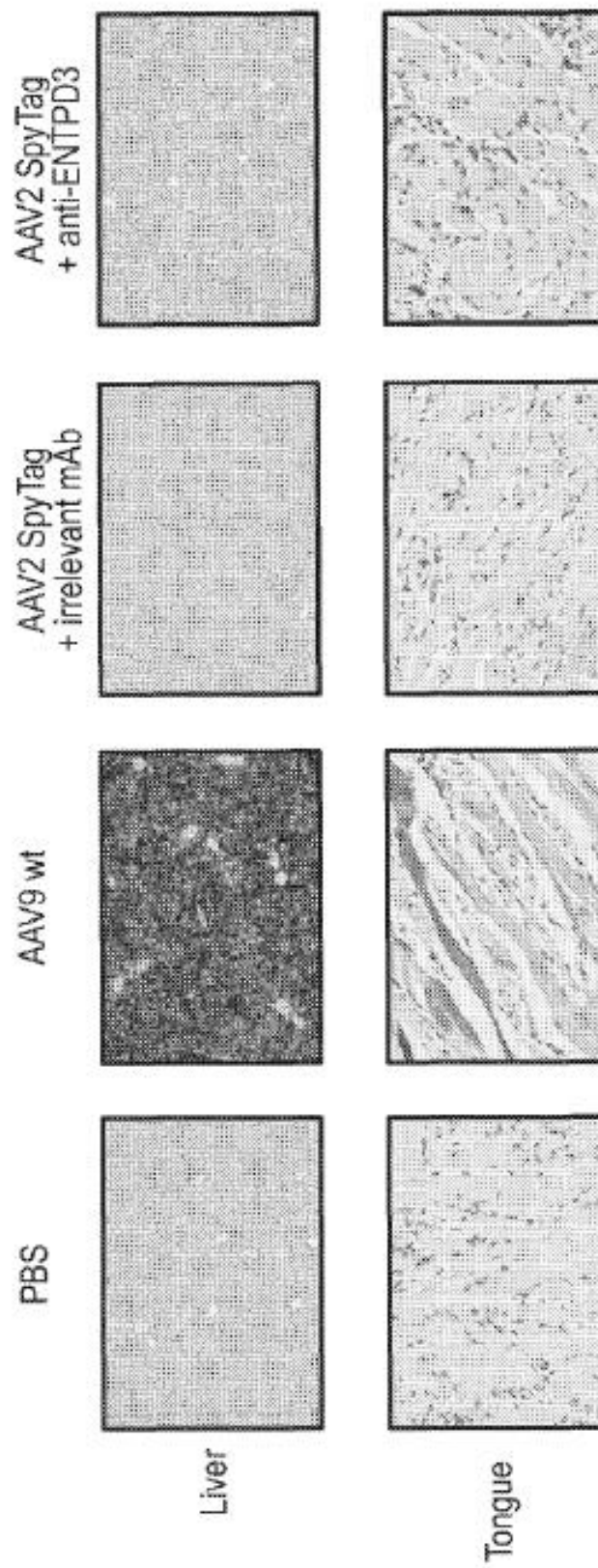


FIG. 14