

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036051**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.18

(21) Номер заявки
201791936

(22) Дата подачи заявки
2016.03.10

(51) Int. Cl. **A61K 38/16** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) **РЕКОМБИНАНТНЫЙ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЙ ВЕКТОР (rAAV), СПОСОБНЫЙ ПРОНИКАТЬ СКВОЗЬ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР (ГЭБ), И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ Glut1**

(31) **62/130,899**

(32) **2015.03.10**

(33) **US**

(43) **2018.01.31**

(86) **PCT/US2016/021810**

(87) **WO 2016/145217 2016.09.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЗЕ ТРАСТИС ОФ КОЛАМБИЯ
ЮНИВЕРСИТИ ИН ЗЕ СИТИ ОФ
НЬЮ-ЙОРК; ЮНИВЕРСИТИ ОФ
МАССАЧУСЕТС (US)**

(72) Изобретатель:

**Де Виво Дэрил, Монани Умрао, Гао
Гуанпин, Энгельстад Кристин (US)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.
(RU)**

(56) **US-A1-20120232130**

US-A1-20120177605

US-A1-20100199362

"GI 166795299: solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 [Homo sapiens]" 02 February 2008 (02.02.2008), Pg. 1 of 1. Retrieved from the Internet: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/166795299>> on 15 June 2016 (15.06.2016), entire document

US-B2-8945583

SHAH et al. "The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer's Disease," International Journal of Molecular Sciences, 03 October 2012 (03.10.2012), Vol. 13, Pgs. 12629-12655, entire document

(57) Изобретение относится к рекомбинантному аденоассоциированному вектору (rAAV), способному проникать сквозь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит трансген, кодирующий Glut1, и промотор бета-актина курицы, выбранный из SEQ ID NO: 31, 38, 45, 54, 62 и 70. В некоторых вариантах реализации изобретение относится к композиции для восстановления экспрессии Glut1 у субъектов с дефицитом Glut1, содержащей рекомбинантный AAV по изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретение относится к способу восстановления транспорта Glut1 сквозь ГЭБ субъекта, способу лечения синдрома дефицита Glut1 у субъекта и способу облегчения у субъекта по меньшей мере одного из симптомов, связанных с синдромом дефицита Glut1, выбранных из гипогликорахии, приобретенной микроцефалии, атаксической и дистонической моторной дисфункции, включающие введение субъекту эффективного количества рекомбинантного AAV, по изобретению.

B1**036051****036051****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет Предварительной заявки на выдачу патента США серийный номер 62/130899, поданной 10 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Заявление о правительственной поддержке

Настоящее изобретение было сделано при государственной поддержке в соответствии с грантом номер R01NS057482 Национальных Институтов Здоровья. Правительство может обладать определенными правами на это изобретение.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан электронным способом в формате ASCII и включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 4 марта 2016 года, носит название 01001-003887-WO0_SL.txt, и ее размер составляет 189953 байта.

Область техники

Изобретение относится к рекомбинантному Glut1 аденоассоциированному вирусному вектору (AAV) и связанным с ними способам восстановления экспрессии Glut1 у млекопитающих с дефицитом Glut1.

Уровень техники

Глюкоза является основным источником энергии для мозга млекопитающих. Переносчик глюкозы 1 (Glut1), также известный как семейство растворимых носителей 2, является доминирующим переносчиком глюкозы, экспрессирующимся в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ), который ответствен за проникновение глюкозы в мозг и является первым идентифицированным членом семейства облегченного переносчика глюкозы (SLC2A). Ген человека SLC2A1, кодирующий белок Glut1, локализуется в коротком плече хромосомы 1 (p34.2), имеет размер 35 тыс. пар оснований и содержит 10 экзонов, кодирующих белок размером 492 аминокислоты (SEQ ID NO 79). Белок в высокой степени консервативен у разных видов, включая человека, крысу, мышь и свинью. Ген Slc2a1 мыши, кодирующий белок mGlut1, локализуется в хромосоме 4 и имеет сходную структуру гена со структурой SLC2A1 человека (Mouse Genome Informatics) (последовательность mGlut1 размером 492 аминокислот представлена в SEQ ID NO 78). кДНК Slc2a1 мыши (NM 011400) на > 97% идентична кДНК SLC2A1 человека. (См.: Mueckler M. et al., 1985; Veggiotti P et al., 2013; Seidner et al., 1998).

Синдром дефицита Glut1 (Glut1 DS, OMIM 606777) - редкое, но инвалидизирующее детское неврологическое расстройство, вызванное гаплонедостаточностью гена SLC2A1. Синдром дефицита Glut1 является аутосомно-доминантным расстройством. Наиболее известный фенотип пациента включает инфантильные судороги, приобретенную микроцефалию, задержку развития и гипогликорахию (De Vivo D.C. et al., 1991).

Современные методы лечения заболевания включают применение кетогенных диет, поскольку кетоновые тела образуют альтернативный источник энергии для нейронов головного мозга. Однако диета включает в себя потребление большого количества масел и, как сообщается, оказывает лишь незначительное влияние на нейроповеденческие симптомы. Существует постоянная потребность в улучшенных методах лечения, особенно в генной терапии для восстановления экспрессии Glut1 у пациентов.

Краткое описание сущности изобретения

В некоторых вариантах реализации изобретение относится к рекомбинантному аденоассоциированному вектору (гAAV), содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит трансген, кодирующий Glut1 и бета-актиновый промотор курицы, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO 31, 38, 45, 54, 62 и 70. В некоторых вариантах реализации изобретения Glut1 содержит SEQ ID NO 78 или 79. гAAV способен проникать сквозь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). В некоторых вариантах реализации изобретения трансген способен экспрессироваться в эндотелиальных клетках, выстилающих микрососуды мозга. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV представляет собой AAV8 или AAV9. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV дополнительно содержит элементы микроРНК, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO 48, 56, 59, 64 и 73. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV дополнительно содержит инвертированные концевые повторы (ИКП), фланкирующие элементы микроРНК.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к композиции, содержащей любой из рекомбинантных AAV, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтический носитель.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к набору, включающему емкость, которая содержит композицию, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения емкость представляет собой шприц.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к способу восстановления транспорта Glut1 в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ) субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества любого из рекомбинантных векторов AAV, описанных в настоящем документе, который способен проникать сквозь ГЭБ, а также способен к экспрессии в эндотелиальных клетках,

выстилающих микрососуды мозга.

В некоторых вариантах реализации изобретение относится к способу лечения синдрома дефицита Glut1 у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение субъекту эффективного количества любого из рекомбинантных векторов AAV, описанных в настоящем документе, который способен проникать сквозь ГЭБ, а также способен к экспрессии в эндотелиальных клетках, выстилающих микрососуды мозга.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к способу облегчения у субъекта по меньшей мере одного из симптомов, связанных с синдромом дефицита Glut1, выбранного из группы, состоящей из гипогликорахии, приобретенной микроцефалии, атаксической и дистонической двигательной дисфункции, причем способ включает введение субъекту эффективного количества любого из рекомбинантных векторов AAV, описанных в настоящем документе, который способен пересекать ГЭБ, а также способен к экспрессии в эндотелиальных клетках, выстилающих микрососуды мозга.

В некоторых аспектах варианты реализации изобретения относятся к способу лечения у субъекта Glut1 DS, характеризующегося дефектом или гаплонедостаточностью гена SLC2A1. Способ может включать введение субъекту эффективного количества рекомбинантного аденоассоциированного вируса, несущего последовательность нуклеиновой кислоты (т.е. трансген), кодирующую белок Glut1 нормального/дикого типа, под контролем промоторной последовательности, которая экспрессирует продукт Glut1 в желаемых клетках. В некоторых вариантах реализации изобретения промоторная последовательность обеспечивает экспрессию продукта Glut1 в клетках ГЭБ. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия осуществляется в эндотелиальных клетках, выстилающих микрососуды мозга. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия трансгенного гена обеспечивает клетки продуктом, необходимым для восстановления или поддержания желаемых уровней Glut1 у субъекта. В еще одном варианте реализации изобретение относится к композиции для лечения Glut1 DS. Такие композиции могут быть составлены с носителем и дополнительными компонентами, подходящими для инъекций.

Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения дополнительно описаны в следующем подробном описании предпочтительных вариантов его реализации.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-D представлены карты плазмид (десяти) конструкций, кодирующих Glut1. На фиг. 1A проиллюстрированы две конструкции EGFP-2A-Glut1, несущие репортерные гены Glut1 и EGFP вместе с кодирующей последовательностью 2A. На фиг. 1B проиллюстрированы две конструкции Glut1-2A-EGFP. На фиг. 1C проиллюстрированы две нативные конструкции Glut1. На фиг. 1D проиллюстрированы четыре конструкции, несущие сайт связывания с микроРНК-122 (Mir-122CC), который служит для выборочного отключения экспрессии Glut1 в ткани печени;

на фиг. 2A-C - блоты и графики, иллюстрирующие экспрессию конструкции AAV9-hGlut1-eGFP (SEQ ID NO 80) и функцию Glut1 в анализе на клетках CHO in vitro. На фиг. 2A проиллюстрирован Вестерн-блоттинг, демонстрирующий экспрессию конструкции AAV9-hGlut1-eGFP. Фиг. 2B представляет собой график, демонстрирующий усиленное поглощение глюкозы клетками CHO, трансфицированными конструкцией AAV9-hGlut1-eGFP; что демонстрирует их способность функционировать в функциональном анализе. На фиг. 2C проиллюстрирована флуоресценция конструкции зеленого флуоресцентного белка (GFP) после трансфекции в клетки CHO;

на фиг. 3A-B - графики, демонстрирующие улучшение моторной функции после повторного введения гена *slc2a1* мышам с Glut1 DS. Фиг. 3A представляет собой график, иллюстрирующий улучшение показателей теста с вращающимся барабаном у леченных AAV9-mGlut1 (SEQ ID NO 35) мутантных мышей. Фиг. 3B представляет собой график, иллюстрирующий улучшение показателей лазания по вертикальному шесту после восстановления mGlut1 у леченных мутантных мышей;

на фиг. 4A-B - графики, демонстрирующие усиленную тканеспецифичную экспрессию Glut1 у леченных AAV9-mGlut1 мышей (SEQ ID NO 35). Фиг. 4A представляет собой график, иллюстрирующий относительную экспрессию гена *slc2a1* у леченных мутантов и соответствующих контрольных животных. Фиг. 4B представляет собой график, иллюстрирующий экспрессию Glut1 в виде процента экспрессии у мышей Glut1^{+/+} дикого типа;

на фиг. 5A-D - блоты и графики, демонстрирующие повышенный уровень Glut1 и уровень глюкозы в СМЖ леченных AAV9-mGlut1 мышей; продемонстрировано, что восстановление Glut1 смягчает гипогликорахию у мышей на модели Glut1 DS. Фиг. 5A представляет собой Вестерн-блот белка Glut1 в ткани мозга леченных мутантных мышей Glut1 DS и соответствующих контрольных животных. Фиг. 5B представляет собой график, иллюстрирующий количественное определение уровней белка у леченных мутантных мышей Glut1 DS и контрольных животных. Фиг. 5C представляет собой график, иллюстрирующий концентрации глюкозы в крови и СМЖ леченных AAV9-mGlut1 (SEQ ID NO 35) мышей и контрольных животных. Фиг. 5D представляет собой диаграмму размаха, иллюстрирующую соотношение концентрации глюкозы в крови:СМЖ у разных мышей. Примечание: n/z - незначимый; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001, односторонний дисперсионный анализ, N ≥ 8.

Подробное описание сущности изобретения

Мутации в гене SLC2A1 (также носит название Glut1) приводят к синдрому дефицита Glut1 (Glut1 DS), редкому, но инвалидизирующему нарушению нервно-психического развития (De Vivo D.C. et al. 1991). Белок Glut1 дикого типа широко экспрессируется. Однако его основным местом действия в клетках, по-видимому, являются эндотелиальные клетки микрососудов головного мозга, где его функция состоит в содействии переносу глюкозы через гематоэнцефалический барьер. Снижение уровня или утрата белка приводит к сложному фенотипу, характерные признаки которого включают гипогликорахию, задержку развития и приобретенную микроцефалию. Пациенты также проявляют моторный фенотип, который является как атаксическим, так и дистоническим. Мыши с гаплонедостаточностью гена *slc2a1* проявляют многие признаки заболевания человека. Гомозиготный нокаут мышинного гена *slc2a1* является летальным для эмбриона. Модели животных с гаплонедостаточностью демонстрируют многие аспекты заболевания человека. Настоящее изобретение относится к применению конструкций AAV9-Glut1 для восстановления экспрессии белка Glut1 в головном мозге. Ожидается, что такие способы и конструкции AAV9-Glut1 могут быть эффективными средствами лечения заболеваний человека. Для удобства ссылок описанные в настоящем документе векторные конструкции упоминаются как различные конструкции AAV9-Glut1, которые указывают на конструкции AAV9, содержащие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют белок Glut1 мыши или человека, среди других элементов. В настоящем документе SLC2A1 относится к гену человека, а *slc2a1* относится к гену мыши, кодирующим соответствующий белок Glut1.

Определения.

Для лучшего понимания изобретения некоторые технические и научные термины конкретно определены ниже. Если специально не определено в другом месте настоящего документа, все другие технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно придаваемое им специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

В настоящем документе, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа слов включают их соответствующие формы множественного числа, если контекст явно не диктует иного.

"Активация", "стимуляция" и "лечение" применительно к клеткам или рецепторам могут иметь одинаковое значение, например, активации, стимуляции или лечения клетки или рецептора лигандом, если иное не указано явно или не диктуется контекстом. "Лиганд" включает природные и синтетические лиганды, например цитокины, варианты цитокинов, аналоги, мутеины и связывающие соединения, полученные из антител. "Лиганд" дополнительно включает молекулы небольшого размера, например пептидные миметики цитокинов и пептидные миметики антител. "Активация" может относиться к активации клеток, которая регулируется внутренними механизмами, а также внешними или экологическими факторами. "Реакция", например, клетки, ткани, органа или организма включает изменение биохимического или физиологического поведения, например концентрации, плотности, адгезии или миграции в биологическом купе, скорость экспрессии генов или состояние дифференцировки, где изменение коррелирует с активацией, стимуляцией или лечением или с внутренними механизмами, такими как генетическое программирование.

"Активность" молекулы может описывать или ссылаться на связывание молекулы с лигандом или с рецептором, с каталитической активностью; на способность стимулировать экспрессию генов или клеточную сигнализацию, дифференцировку или созревание; на антигенную активность, на модуляцию активности других молекул и т.п. Кроме того, "активность" молекулы также может относиться к активности при модулировании или поддержании взаимодействия между клетками, например, адгезии или активности в поддержании структуры клетки, например клеточных мембран или цитоскелета. Дополнительно, "активность" может означать специфическую активность, например [каталитическую активность] / [мг белка] или [иммунологическую активность] / [мг белка], концентрацию в биологическом купе и т.п. "Активность" может относиться к модуляции компонентов врожденной или адаптивной иммунной системы.

"Введение" и "лечение" применительно к животному, человеку, экспериментальному субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости относится к приведению экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или композиции в контакт с организмом животного, человека, субъекта, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. "Введение" и "лечение" могут относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Лечение клетки включает приведение реагента в контакт с клеткой, а также приведение реагента в контакт с жидкостью, когда жидкость находится в контакте с клеткой. Кроме того, "введение" и "лечение" означают обработку *in vitro* и *ex vivo*, например клетки, реагентом, диагностическим, связывающим соединением или другой клеткой. Термин "субъект" включает любой организм, предпочтительно животное, более предпочтительно млекопитающее (например, крысу, мышь, собаку, кошку, кролика) и наиболее предпочтительно человека, включая пациента-человека.

"Лечить" или "обрабатывать" означает введение терапевтического агента, такого как композиция, содержащая любую из конструкций гAAV по настоящему изобретению, внутрь или наружное применение у субъекта или пациента с одним или более симптомами заболевания или подозреваемым заболева-

нием или подверженного повышенному риску развития заболевания, при котором агент проявляет терапевтическую активность. Как правило, агент вводят в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов заболевания у подлежащего лечению субъекта или популяции, путем индукции регресса или подавления прогрессирования такого(их) симптома(ов) в любой клинически измеримой степени. Количество терапевтического агента, эффективного для облегчения какого-либо конкретного симптома заболевания (также называемое "терапевтически эффективным количеством"), может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст и масса тела пациента, а также способность лекарственного средства вызывать желаемый ответ у субъекта. Облегчение симптомов заболевания можно оценить с помощью любого клинического теста, обычно применяемого врачами или другими медицинскими работниками для оценки степени тяжести или прогрессирования указанного симптома. Хотя вариант реализации настоящего изобретения (например, способ лечения или продукт) может быть неэффективным для облегчения целевого(ых) симптома(ов) у каждого субъекта, он должен облегчать целевой(ые) симптом(ы) у статистически значимого количества субъектов по данным любого статистического теста, известного в данной области техники, такого как t-тест Стьюдента, тест хи квадрат, U-тест Манна-Уитни, тест Крускала-Уоллиса (H-тест), тест Джонкхиера-Трепстра и тест Уилкоксона.

"Лечение" со ссылкой на человека, ветеринарный или исследуемый субъект относится к терапевтическому лечению, профилактическим или превентивным мерам, к исследованиям и диагностическому применению. "Лечение" со ссылкой на человека, ветеринарный или исследуемый субъект или клетку, ткань или орган включает трансфекцию любой из конструкций gAAV или применением соответствующих способов по настоящему изобретению к организму человека или животного, клетке, ткани, физиологическому купе или физиологической жидкости.

"Выделенная молекула нуклеиновой кислоты" означает ДНК или РНК геномного, мРНК, кДНК или синтетического происхождения или их комбинацию, которые не связаны с полноразмерным или частью полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид обнаружен в природе, или связаны с полинуклеотидом, с которым они не связаны в природе. Для целей настоящего описания следует понимать, что "молекула нуклеиновой кислоты, содержащая" конкретную нуклеотидную последовательность, не включает интактные хромосомы. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, "содержащие" указанные последовательности нуклеиновых кислот, могут содержать, в дополнение к указанным последовательностям, кодирующие последовательности до десяти или даже до двадцати или более других белков или их частей или фрагментов или могут содержать функционально связанные регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию кодирующего участка повторяющихся последовательностей нуклеиновой кислоты и/или могут содержать векторные последовательности.

Фраза "контрольные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Контрольные последовательности, которые подходят для прокариот, например, включают промотор, необязательную операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется как белок-прекурсор, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы облегчить трансляцию. Как правило, "функционально связанный" означает, что связанные с ним последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторного лидера - непрерывными и находятся в фазе считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными. Образование связи осуществляют путем лигирования на подходящих рестрикционных сайтах. Если такие сайты отсутствуют, применяются синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры, в соответствии с обычной практикой.

В настоящем документе выражения "клетка", "клеточная линия" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают потомство. Таким образом, слова "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают в себя первичную клетку-субъект и культуры, полученные из нее, без учета количества пассажей. Кроме того, необходимо понимать, что вследствие преднамеренных или непреднамеренных мутаций не все потомство будет нести в точности идентичную ДНК. В число включенных потомков входят мутантные потомки, которые обладают той же функцией или биологической активностью, что и первоначально трансформированная клетка. Если предусмотрены разные обозначения, это будет ясно из контекста.

Рекомбинантные AAV.

В некоторых аспектах изобретения предлагаются изолированные AAV. В отношении AAV в настоящем документе термин "выделенный" относится к AAV, который был выделен из природной среды (например, из клетки-хозяина, ткани или субъекта) или получен искусственно. Выделенные AAV могут быть получены с применением рекомбинантных методов. Такие AAV в настоящем документе называют-

ся "рекомбинантными AAV". Рекомбинантные AAV (rAAV) предпочтительно обладают возможностями тканеспецифичного направленного действия, поэтому трансгенный rAAV будет направленно доставлен в одну или несколько предварительно определенных тканей. Капсид AAV является важным элементом в определении таких возможностей тканеспецифичного нацеливания. Таким образом, может быть выбран rAAV с капсидом, подходящим для целевой ткани. В некоторых вариантах реализации изобретения rAAV содержит последовательности (такие как SEQ ID NO 96), кодирующие капсид AAV9, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO 97, или белок, в значительной степени гомологичный ему.

Для направленного действия на желаемую ткань в контексте лечения Glut1 DS предпочтительный rAAV представляет собой комбинацию капсида AAV9 и скелета AAV2, дающую различные описанные в настоящем документе rAAV (см. табл. 1 и список последовательностей).

Способы получения рекомбинантных AAV, содержащих желаемый капсидный белок, описаны (см., например, US 2003/0138772, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме). Описано несколько различных капсидных белков AAV, например, описанные в G. Gao et al., *J. Virol.*, 78(12):6381-6388 (June 2004); G. Gao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(10):6081-6086 (May 13, 2003); US 2003-0138772, US 2007/0036760, US 2009/0197338, содержание которых относится к капсидным белкам AAV и связанным с ними нуклеотидным и аминокислотным последовательностям и которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Для желаемой упаковки описанных в настоящем документе конструкций и способов предпочтительным является вектор AAV9 и капсид. Однако следует отметить, что другие подходящие AAV, такие как rAAVrh.8 и rAAVrh.10, или другие аналогичные векторы могут быть адаптированы для применения в настоящем изобретении. Обычно способы включают культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок AAV или его фрагмент; функциональный ген гер; рекомбинантный вектор AAV, состоящий из инвертированных концевых повторов AAV (ИКП) и трансгена; и достаточные вспомогательные функции, позволяющие упаковывать рекомбинантный вектор AAV в капсидные белки AAV.

Компоненты для культивирования в клетке-хозяине для упаковки вектора rAAV в капсид AAV могут быть предоставлены клетке-хозяину в транс форме. В качестве альтернативы, стабильная клетка-хозяин может быть снабжена любым одним или более требуемыми компонентами (например, рекомбинантный вектор AAV, повторяющиеся внегенные палиндромные последовательности (гер), последовательности кэпа и/или вспомогательные функции), причем клетка модифицирована таким образом, чтобы содержать один или несколько требуемых компонентов, с применением способов, известных специалистам из уровня техники. В большинстве случаев такая стабильная клетка-хозяин будет содержать требуемый(е) компонент(ы) под контролем индуцибельного промотора. Однако требуемый(е) компонент(ы) может(гут) находиться и под контролем конститутивного промотора. В еще одном альтернативном варианте реализации изобретения выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный(е) компонент(ы) под контролем конститутивного промотора и другого(их) выбранного(ых) компонента(ов) под контролем одного или более индуцибельных промоторов. Например, может быть создана стабильная клетка-хозяин, которая получена из клеток 293 (в которых присутствуют функции E1 хелпера под контролем конститутивного промотора), но которые содержат белки гер и/или кэпа под контролем индуцибельных промоторов.

Рекомбинантный вектор AAV, последовательности гер, последовательности кэпа и вспомогательные функции для получения rAAV могут быть введены в клетку-хозяина, которая осуществляет упаковку, с применением любого подходящего генетического элемента (вектора). Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, в том числе описанным в настоящем документе. См., например, K. Fisher et al., *J. Virol.*, 70:520-532 (1993) и патент США № 5478745.

В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантные AAV могут быть получены с применением метода тройной трансфекции (например, как подробно описано в патенте США № 6001650, содержание которого, относящееся к способу тройной трансфекции, включено в настоящий документ посредством ссылки). Как правило, рекомбинантные AAV получают путем трансфекции клетки-хозяина рекомбинантным вектором AAV (содержащим трансген), который должен быть упакован в частицы AAV, вектором вспомогательной функции AAV и вектором добавочной функции. Вектор вспомогательной функции AAV кодирует последовательности "вспомогательной функции AAV" (т.е. гер и кэп), которые функционируют в режиме транс для продуктивной репликации и капсидирования AAV. Предпочтительно, вектор вспомогательной функции AAV поддерживает эффективную выработку AAV-вектора без генерирования каких-либо обнаружимых вирионов AAV дикого типа (т.е. вирионов AAV, содержащих функциональные гены гер и кэпа). Неограничивающие примеры векторов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают rHLP19, описанный в патенте США № 6001650, и вектор rRep6сарб, описанный в патенте США № 6156303, причем все они включены в настоящее описание посредством ссылки. Вектор вспомогательной функции кодирует нуклеотидные последовательности для не связанных с AAV вирусных и/или клеточных функций, от которых зависит репликация AAV (т.е. "вспомогательные функции"). Вспомогательные функции включают те функции, которые необходимы

для репликации AAV, включая, но не ограничиваясь этим, те фрагменты, которые участвуют в активации гена транскрипции AAV, стадийспецифического сплайсинга AAV мРНК, репликации ДНК AAV, синтеза продуктов экспрессии кэпа и сборки капсида AAV. Вспомогательные функции вирусного происхождения могут быть получены из любого из известных вспомогательных вирусов, таких как аденовирус, герпесвирус (кроме вируса простого герпеса типа 1) и вирус осповакцины.

Что касается трансфицированных клеток-хозяев, термин "трансфекция" используется для обозначения поглощения клеткой чужеродной ДНК, причем клетка была "трансфицирована", если экзогенная ДНК была введена внутрь клеточной мембраны. Ряд способов трансфекции широко известен из уровня техники. См., например, Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, and Chu et al. (1981) *Gene* 13: 197. Такие методы могут быть применены для введения одной или более экзогенных нуклеиновых кислот, таких как вектор интеграции нуклеотидов и другие молекулы нуклеиновой кислоты, в подходящие клетки-хозяева.

"Клетка-хозяин" относится к любой клетке, которая несет или может нести целевое вещество. Часто клетка-хозяин является клеткой млекопитающего. Клетку-хозяина можно использовать в качестве реципиента вспомогательной конструкции AAV, минигеномной плазмиды AAV, вектора добавочной функции или другой передающей ДНК, связанной с образованием рекомбинантных AAV. Термин включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, "клетка-хозяин" в настоящем документе может относиться к клетке, которая была трансфицирована экзогенной последовательностью ДНК. Понятно, что потомство одной родительской клетки не обязательно должно быть полностью идентичным по морфологии или геномному или полному комплексу ДНК в качестве исходного родителя из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации.

Что касается клеток, термин "выделенная" относится к клетке, которая была выделена из ее естественной среды (например, из ткани или организма субъекта). Термин "клеточная линия" относится к популяции клеток, способных к непрерывному или продолжительному росту и делению *in vitro*. Часто клеточные линии представляют собой клональные популяции, полученные из одной клетки-предшественника. Кроме того, известно, что спонтанные или индуцированные изменения могут возникать в кариотипе при хранении или переносе таких клональных популяций. Следовательно, клетки, полученные из указанной клеточной линии, могут быть не точно идентичны клеткам или культурам предков, и упомянутая клеточная линия включает такие варианты. В настоящем документе термин "рекомбинантная клетка" относится к клетке, в которую был введен сегмент экзогенной ДНК, такой как сегмент ДНК, который приводит к транскрипции биологически активного полипептида или выработке биологически активной нуклеиновой кислоты, такой как РНК.

Термин "вектор" включает в себя любой генетический элемент, такой как плаزمид, фаг, транспозон, космид, хромосома, искусственная хромосома, вирус, вирион и т.д., который способен к репликации, если он связан с надлежащими элементами управления, и который может переносить генные последовательности между клетками. Таким образом, этот термин включает в себя основы для клонирования и экспрессии, а также вирусные векторы. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящими векторами считаются те векторы, в которых сегмент нуклеиновой кислоты, подлежащий транскрибированию, размещен под транскрипционным контролем промотора. "Промотор" относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки, или вводит синтетический аппарат, необходимый для иницирования специфической транскрипции гена. Фразы "функционально размещенный", "функционально связанный", "под контролем" или "под транскрипционным контролем" означают, что промотор находится в надлежащем месте и ориентации по отношению к нуклеиновой кислоте для контроля инициации РНК-полимеразы и экспрессии гена. Термин "экспрессионный вектор или конструкция" означает любой тип генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, в которой часть или вся кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты способна транскрибироваться. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия включает транскрипцию нуклеиновой кислоты, например, для получения биологически активного полипептидного продукта или ингибиторной РНК (например, кшРНК, микроРНК) из транскрибируемого гена.

Рекомбинантные векторы AAV.

"Рекомбинантные векторы AAV (rAAV)", описанные в настоящем документе, обычно состоят по меньшей мере из трансгена (например, кодирующего *Glut1*) и его регуляторных последовательностей, а также 5' и 3' инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV. Именно этот рекомбинантный вектор AAV упаковывается в капсидный белок и доставляется в выбранную клетку-мишень. В некоторых вариантах реализации изобретения трансген представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную к векторным последовательностям, которые кодируют полипептид, белок, молекулу функциональной РНК (например, микроРНК, ингибитор микроРНК) или другой целевой генный продукт (например, *Glut1*). Кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторными компонентами таким способом, который позволяет транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию трансгена в клетке ткани-мишени.

Последовательности вектора AAV могут содержать цис-действующие последовательности 5' и 3'

инвертированных концевых повторов (см., например, B.J. Carter в "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990)). Длина последовательностей ИКП обычно составляет 145 п.о. Предпочтительно, по существу, все последовательности, кодирующие ИКП, применяются в молекуле, хотя допустима некоторая степень незначительной модификации этих последовательностей. (См., например, такие тексты, как Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1996)). Примером такой молекулы является "цис-действующая" плаزمид, содержащая трансген, в которой выбранная трансгенная последовательность и связанные с ней регуляторные элементы фланкированы последовательностями 5' и 3' ИКП AAV. Последовательности ИКП AAV могут быть получены из любого известного AAV, включая известные в настоящее время типы AAV млекопитающих.

В дополнение к элементам, указанным выше для рекомбинантных векторов AAV, вектор может дополнительно содержать обычные контрольные элементы, функционально связанные с трансгеном таким способом, который позволяет транскрибировать, трансформировать и/или экспрессировать в клетке, трансфицированной вектором плазмиды или инфицированной вирусом, полученной согласно изобретению. В настоящем документе "функционально связанные" последовательности включают в себя последовательности для контроля экспрессии, смежные с целевым геном, и последовательности для контроля экспрессии, которые действуют в режиме транс или на расстоянии, контролируя целевой ген. Последовательности для контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (polyA); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые увеличивают секрецию кодируемого продукта. Из уровня техники известно большое количество последовательностей для контроля экспрессии, включая промоторы, которые являются нативными, конститутивными, индуцибельными и/или тканеспецифичными и могут применяться.

В настоящем документе последовательность нуклеиновой кислоты (например, кодирующая последовательность) и регуляторные последовательности называются функционально связанными, если они ковалентно связаны таким образом, что экспрессия или транскрипция последовательности нуклеиновой кислоты находится под влиянием или контролем регуляторных последовательностей. Если желательно, чтобы последовательности нуклеиновых кислот были переведены в функциональный белок, две последовательности ДНК называют функционально связанными, если индукция промотора в 5'-регуляторных последовательностях приводит к транскрипции кодирующей последовательности, и если природа связи между двумя последовательностями ДНК (1) не приводит к введению мутации со сдвигом рамки генетического кода, (2) не препятствует способности участка промотора направлять транскрипцию кодирующих последовательностей или (3) не мешает способности соответствующего транскрипта РНК транслироваться в белок. Таким образом, участок промотора был бы функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, если бы участок промотора мог бы осуществлять транскрипцию указанной последовательности ДНК таким образом, что полученный транскрипт мог бы быть транслирован в желаемый белок или полипептид. Аналогично, два или более кодирующих участков функционально связаны, если они связаны таким образом, что их транскрипция из общего промотора приводит к экспрессии двух или более белков, которые были транслированы в рамке. В некоторых вариантах реализации изобретения функционально связанные кодирующие последовательности дают химерный белок. В некоторых вариантах реализации изобретения функционально связанные кодирующие последовательности дают функциональную РНК (например, кшРНК, микроРНК).

В случае нуклеиновых кислот, кодирующих белки, последовательность полиаденилирования обычно вводится после трансгенных последовательностей и перед последовательностью 3'-ИКП AAV. Конструкция gAAV, пригодная в соответствии с настоящим изобретением, может дополнительно содержать интрон, желательно расположенный между последовательностью промотора/энхансера и трансгеном. Одна из возможных интронных последовательностей получена из SV-40 и упоминается как интронная последовательность SV-40 Т. Другим векторным элементом, который может применяться, является участок внутренней посадки рибосомы (УВПР). Последовательность УВПР применяется для получения более чем одного полипептида из одного генного транскрипта. Последовательность УВПР могла бы применяться для получения белка, который содержит более одной полипептидной цепи. Выбор этих и других общих векторных элементов является общепринятым, и доступно множество таких последовательностей (см., например, Sambrook et al. и процитированные в ней ссылки, например, на стр. 3.18-3.26 и 16.17-16.27, и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989). В некоторых случаях в полибелок может быть введена последовательность 2А вируса ящура; это пептид небольшого размера (длиной приблизительно 18 аминокислот), который, как было показано, опосредует расщепление полибелков (Ryan M.D. et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin C. et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459). Способность расщеплять 2А-последовательности ранее была продемонстрирована

в искусственных системах, включая плазмиды и векторы генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan M.D. et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion N.M. et al., J. Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler S. et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin C. et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe P. et al., Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe P. et al., Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931; и Klump H et al., Gene Therapy, 2001; 8: 811-817).

Точный характер регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии генов в клетках-хозяевах, может варьироваться между видами, тканями или типами клеток, но в общем случае должен включать, по мере необходимости, 5' нетранскрибируемые и 5' нетранслируемые последовательности, связанные с инициацией транскрипции и трансляции, соответственно, такие как блок ТАТА, кэппирующая последовательность, последовательность СААТ, энхансерные элементы и т.п. В частности, такие 5' нетранскрибируемые регуляторные последовательности будут включать участок промотора, который содержит промоторную последовательность для транскрипционного контроля функционально связанного гена. Регуляторные последовательности дополнительно могут включать энхансерные последовательности или вышележащие активаторные последовательности, при необходимости. Векторы могут необязательно содержать 5' лидерные или сигнальные последовательности.

Примеры конститутивных промоторов включают, но не ограничиваясь этим, ретровирусный промотор LTR вируса саркомы Рауса (BCP) (необязательно с энхансером BCP), промотор цитомегаловируса (ЦМВ) (необязательно с энхансером ЦМВ) [см., например, Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)], промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор 13-актина, промотор фосфолипид-киназы (ФЛК) и промотор EFla [Invitrogen].

Индукцибельные промоторы позволяют регулировать экспрессию генов и могут регулироваться экзогенно введенными соединениями, такими факторами окружающей среды, как температура, или наличием определенного физиологического состояния, например, острая фаза, конкретное состояние дифференцировки клетки или только в реплицирующих клетках. Индукцибельные промоторы и индукцибельные системы доступны из различных коммерческих источников, в том числе, но не ограничиваясь этим, Invitrogen, Clontech и Ariad. Примеры индукцибельных промоторов, регулируемых экзогенно введенными промоторами, включают индукцибельный цинком промотор овечьего металлотиона (MT), индукцибельный дексаметазоном (Декс) промотор вируса опухоли молочной железы мыши (BOMM), промоторную систему T7 полимеразы (WO 98/10088); промотор экдизонов насекомых (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), подавляемую тетрациклином систему (Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), индукцибельную тетрациклином систему (Gossen et al., Science, 268:1766-1769 (1995), см. также Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), индукцибельную RU486 систему (Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) и Wang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997)) и индукцибельную рапамицином систему (Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Другими типами индукцибельных промоторов, которые могут быть полезны в этом контексте, являются те, которые регулируются определенным физиологическим состоянием, например температурой, острой фазой, конкретным состоянием дифференцировки клетки или только в реплицирующих клетках.

В другом варианте реализации изобретения для трансгена будет применяться нативный промотор или его фрагмент. Нативный промотор может быть предпочтительным, если желательно, чтобы экспрессия трансгена имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно применять в случае необходимости регулировать экспрессию трансгена во времени или в ходе развития или тканеспецифичным образом или в ответ на специфические транскрипционные стимулы. Кроме того, в другом варианте реализации изобретения другие нативные элементы управления экспрессией, такие как энхансерные элементы, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Козака, могут применяться для имитации нативной экспрессии.

В некоторых вариантах реализации изобретения регуляторные последовательности обеспечивают возможность тканеспецифичной экспрессии генов. В некоторых случаях тканеспецифичные регуляторные последовательности связываются с тканеспецифичными транскрипционными факторами, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифичным образом. Такие тканеспецифичные регуляторные последовательности (например, промоторы, энхансеры и т.д.) хорошо известны из уровня техники. Типичные тканеспецифичные регуляторные последовательности включают, но не ограничиваясь этим, следующие тканеспецифичные промоторы: нейронный, такой как нейронспецифичный промотор енолазы (HCE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13: 503-15 (1993)), нейрофиламентный промотор гена легкой цепи (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. IDSA, 88:5611-5 (1991)) и нейроспецифичный промотор гена vgf (Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995)). В некоторых вариантах реализации изобретения тканеспецифичный промотор представляет собой промотор гена, выбранного из: нейронных ядер (NeuN), глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ), аденоматозного полипоза толстой кишки (АПТ) и молекулы ионизирующего кальцийсвязывающего адаптера 1 (Iba-1).

В некоторых вариантах реализации изобретения один или несколько сайтов связывания для одной или более микроРНК вводятся в трансген вектора gAAV, чтобы ингибировать экспрессию трансгена в одной или более тканях субъекта, несущего трансгена, например, в ткани за пределами ЦНС. Специалисту в данной области техники будет понятно, что сайты связывания могут быть выбраны для контроля экс-

прессии трансгена тканеспецифичным образом. Например, экспрессию трансгена в печени можно ингибировать путем введения сайта связывания для miR-122, таким образом, что мРНК, экспрессируемая из трансгена, связывается с и ингибируется miR-122 в печени. Экспрессия трансгена в сердце может быть ингибирована путем введения сайта связывания для miR-133a или miR-1, таким образом, что мРНК, экспрессируемая из трансгена, связывается и ингибируется miR-133a или miR-1 в сердце. Целевые сайты микроРНК в мРНК могут находиться в 5' НТУ, 3' НТУ или в кодирующем участке. Как правило, целевой сайт находится в 3' НТУ мРНК. Кроме того, трансген может быть модифицирован таким образом, что множественные микроРНК регулируют мРНК путем распознавания одного или более сайтов. Наличие множественных сайтов связывания с микроРНК может привести к совместному действию множества индуцированных РНК комплексов сайленсинга (ИРКС) и обеспечить высокоэффективное ингибирование экспрессии. Последовательность сайта-мишени может содержать в общей сложности 5-100, 10-60 или более нуклеотидов. Последовательность сайта-мишени может содержать по меньшей мере 5 нуклеотидов последовательности сайта связывания с геном-мишенью.

Трансгенные кодирующие последовательности.

Состав трансгенной последовательности вектора gAAV будет зависеть от целевого применения полученного вектора. Например, один тип трансгенной последовательности включает репортерную последовательность, которая после экспрессии создает обнаруживаемый сигнал. В другом примере трансген кодирует терапевтический белок Glut1 или терапевтическую функциональную РНК. В другом примере трансген кодирует белок или функциональную РНК, которые предназначены для применения в исследовательских целях, например, для создания соматической трансгенной модели на животных, несущих трансген, например, для изучения функции трансгенного продукта. В другом примере трансген кодирует белок или функциональную РНК, целевое применение которой состоит в создании животной модели заболевания. Соответствующие трансгенные кодирующие последовательности будут очевидны для специалистов в данной области техники.

В некоторых аспектах изобретения предлагаются векторы gAAV для применения в способах предотвращения или лечения дефекта гена SLC2A1 (например, наследственных дефектов гена, изменений соматических генов) у млекопитающего, например такого как дефект гена, который приводит к дефициту полипептида Glut1 у субъекта и, в частности, для лечения или снижения степени тяжести или степени выраженности дефицита у субъекта, у которого проявляется дефицит Glut1. В некоторых вариантах реализации изобретения способы включают введение вектора gAAV, который кодирует один или более терапевтических пептидов, полипептидов, кшРНК, микроРНК, антисмысловых нуклеотидов и т.д. в фармацевтически приемлемом для субъекта носителе, в количестве и в течение периода времени, достаточного для лечения нарушения Glut1 у субъекта, у которого присутствует или подозревается такое расстройство.

Введение рекомбинантного AAV.

gAAV вводят в достаточных количествах для трансфекции клеток желаемой ткани и обеспечения достаточных уровней передачи и экспрессии гена без чрезмерных побочных эффектов. Обычные и фармацевтически приемлемые способы введения включают, но не ограничиваясь этим, непосредственную доставку в выбранную ткань (например, внутримозговое введение, интратекальное введение), внутривенное, пероральное, ингаляционное (включая интраназальное и интратрахеальное введение), внутриглазное, внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутрикожное, внутриутробное и другие парентеральные пути введения. Способы введения можно комбинировать, если это необходимо.

Введение определенных gAAV субъекту может осуществляться, например, путем введения в кровоток субъекта. Введение в кровоток может осуществляться путем инъекции в вену, артерию или любое другое сосудистое русло. Более того, в некоторых случаях может быть желательно доставить gAAV в ткань головного мозга, мозговые оболочки, нейронные клетки, глиальные клетки, астроциты, олигодендроциты, спинномозговую жидкость (СМЖ), внеклеточное пространство и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения рекомбинантные AAV могут быть доставлены непосредственно в спинной мозг или головной мозг путем инъекции в область желудочка, а также в полосатое тело (например, хвостатое ядро или путамен полосатого тела) и нервно-мышечное соединение или мозжечковую долю, с помощью иглы, катетера или сопутствующего устройства, с применением нейрохирургических методов, известных в данной области техники, таких как стереотаксическая инъекция (см., например, Stein et al., J. Virol., 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993; и Alisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000). В определенных обстоятельствах будет желательным вводить терапевтические конструкции на основе gAAV в подходящих фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, подкожно, в поджелудочную железу, интраназально, парентерально, внутривенно, внутримышечно, интрацеребрально, интратекально, интрацеребрально, перорально, внутрибрюшинно или путем ингаляции. В некоторых вариантах реализации изобретения для доставки gAAV можно применять способы введения, описанные в патентах США № 5543158; 5641515 и 5399363 (каждый из которых конкретно включен в описание посредством ссылки в полном объеме).

Композиции рекомбинантных AAV.

gAAV могут быть доставлены субъекту в композициях в соответствии с любыми подходящими спо-

собами, известными в данной области техники. гAAV, предпочтительно суспендированный в физиологически совместимом носителе (например, в композиции), может вводиться субъекту, например человеку, мыши, крысе, кошке, собаке, овце, кролику, лошади, корове, козе, свинье, морской свинке, хомяку, курице, индейке или примату, отличному от человека (например, макаку). В некоторых вариантах реализации изобретения композиции могут содержать гAAV отдельно или в сочетании с одним или несколькими другими вирусами (например, второй гAAV, кодирующий один или более отличных трансгенов).

Подходящие носители могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники, с учетом показания, для которого предназначен гAAV. Например, один из подходящих носителей включает физиологический раствор, который может быть приготовлен с применением целого ряда буферных растворов (например, буферизованного фосфатом физиологического раствора). Другие примеры носителей включают стерильный физиологический раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло и воду. Выбор носителя не является ограничивающим для настоящего изобретения.

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

Доза вирионов гAAV, необходимых для достижения желаемого эффекта или "терапевтического эффекта", например единицы дозы в векторных геномах на килограмм массы тела (вг/кг), будут варьироваться в зависимости от нескольких факторов, в том числе, но не ограничиваясь этим, способа введения гAAV, уровня экспрессии гена или РНК, необходимого для достижения терапевтического эффекта, конкретного заболевания или расстройства, подлежащего лечению, и стабильности гена или продукта РНК. Специалист в данной области техники может легко определить диапазон дозы вирионов гAAV для лечения субъекта с конкретным заболеванием или расстройством, на основе вышеупомянутых факторов, а также других факторов, которые хорошо известны из уровня техники. Эффективное количество гAAV обычно находится в диапазоне от примерно 10 мкл до примерно 100 мл раствора, содержащего от 10^9 до 10^{16} копий генома на одного субъекта. Могут применяться другие объемы раствора. Применяемый объем обычно зависит, помимо прочего, от размеров субъекта, дозы гAAV и способа введения. Например, для интратекального или внутримозгового введения можно применять объем в диапазоне от 1 до 10 мкл или от 10 до 100 мкл. Для внутривенного введения можно применять объем в диапазоне от 10 до 100 мкл, от 100 мкл до 1 мл, от 1 до 10 мл и более. В некоторых случаях целесообразно вводить дозу от 10^{10} до 10^{12} копий генома гAAV на одного субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения 10^{12} копий генома гAAV на одного субъекта будут эффективными для направленного действия на ткани ЦНС. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV вводят в дозе 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} копий генома на одного пациента. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV вводят в дозе 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} или 10^{14} копий генома на килограмм.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции гAAV составлены для уменьшения агрегации частиц AAV в композиции, особенно в случаях, когда присутствуют высокие концентрации гAAV (например, около 10^{13} копий генома (КГ)/мл или более). Способы уменьшения агрегации гAAV хорошо известны из уровня техники и включают, например, добавление поверхностно-активных веществ, коррекцию pH, коррекцию концентрации соли и т.д. (См., например, Wright F.R. et al., *Molecular Therapy* (2005) 12, 171-178, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки).

Составление рецептуры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ и растворов носителей хорошо известно специалистам из уровня техники, как и разработка подходящих схем введения и лечения с применением конкретных композиций, описанных в настоящем документе, в различных схемах лечения. Как правило, такие препараты могут содержать по меньшей мере около 0,1% активного ингредиента или более, хотя процентное содержание активного ингредиента (ингредиентов) может, разумеется, варьироваться и может составлять от около 1 до 2% и около 70 или 80% или более от общей массы или объема композиции. Естественно, количество активного ингредиента в каждой пригодной с терапевтической точки зрения композиции может быть определено таким образом, что подходящая доза будет получена в любой конкретной единичной дозе соединения. Специалисты в данной области техники могут рассматривать такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полураспада, способ введения, срок годности продукта, а также может быть желательной оценка других фармакологических факторов, таких как различные дозы и схемы лечения.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий. Кроме того, дисперсии могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Во многих случаях форма является стерильной и жидкой в такой степени, чтобы ее можно было свободно вводить с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена против загряз-

няющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), подходящие их смеси и/или растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с применением поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительно введение в рецептуру осмотических агентов, например сахаров или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута за счет применения в композициях агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Например, для введения инъекционного водного раствора такой раствор может быть соответствующим образом буферизован, и, если необходимо, жидкий разбавитель сначала делают изотоническим с помощью достаточного количества соли или глюкозы. Указанные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривентриального введения. В связи с этим стерильная водная среда, которую можно применять, будет известна специалистам из уровня техники. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и добавлена к 1000 мл жидкости для гиподермоклиза или введена в предложенное место инфузии (см., например, 15-е издание "Remington's Pharmaceutical Sciences", стр. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторая вариация доз обязательно будет возникать в зависимости от состояния хозяина. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определяет подходящую дозу для конкретного хозяина.

Стерильные растворы для инъекций получают путем введения в рецептуру активного гAAV в необходимом количестве в подходящем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными в настоящем документе, при необходимости, с последующей стерилизующей фильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем введения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную основу, которая содержит базовую дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются способы вакуумной сушки и сушки вымораживанием, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из ранее обработанного стерилизующей фильтрацией раствора.

Раскрытые в настоящем документе гAAV-композиции также могут быть составлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (образованные свободными аминокислотными группами белка) и образованные с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, манделовая и т.п. Соли, образованные с помощью свободных карбоксильных групп, также могут быть получены с неорганическими основаниями, такими как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа, и такими органическими основаниями, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п. После приготовления растворы вводят способом, совместимым с лекарственным средством, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Композиции легко вводятся в различных лекарственных формах, таких как инъекционные растворы, капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

В настоящем документе термин "носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и абсорбирующие агенты, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и т.п. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно из уровня техники. В композиции также могут быть введены дополнительные активные ингредиенты. Фраза "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным объектам и композициям, которые не вызывают аллергической или подобной неблагоприятной реакции при введении хозяину.

Для введения композиций по настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяева можно изменять основы для доставки, такие как липосомы, нанокapsулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и т.п. В частности, доставляющие вектор гAAV трансгены могут быть введены в препараты для доставки либо инкапсулированы в липидную частицу, липосому, везикулу, наносферу или наночастицу и т.п.

Такие препараты могут быть предпочтительными для введения фармацевтически приемлемых композиций нуклеиновых кислот или конструкций гAAV, описанных в настоящем документе. Получение и применение липосом обычно известно специалистам из уровня техники. В последнее время были разработаны липосомы с повышенной стабильностью в сыворотке и периодом полувыведения из кровотока (патент США № 5741516). Кроме того, описаны различные способы получения липосомальных и липосомоподобных препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственного средства (патенты США № 5567434, 5552157, 5565213, 5738868 и 5795587).

Липосомы успешно применялись с целым рядом типов клеток, которые обычно устойчивы к трансфекции другими методами. Кроме того, липосомы свободны от ограничений длины ДНК, которые ти-

пичны для систем доставки на основе вирусов. Липосомы эффективно применялись для введения генов, лекарств, радиотерапевтических агентов, вирусов, транскрипционных факторов и аллостерических эффекторов в различные культивируемые клеточные линии и организм животных. Кроме того, было завершено несколько успешных клинических испытаний, посвященных оценке эффективности опосредованной липосомами доставки лекарственных средств.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергируются в водной среде и спонтанно образуют многослойные концентрические двухслойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (МСВ). Диаметр МСВ обычно составляет от 25 нм до 4 мкм. Обработка МСВ ультразвуком приводит к образованию маленьких однослойных везикул (МОВ) с диаметром в диапазоне от 200 до 500 Å, содержащие в ядре водный раствор.

В качестве альтернативы, можно применять нанокапсульные композиции гAAV. Нанокапсулы могут обычно захватывать вещества стабильным и воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных эффектов из-за чрезмерного количества полимеров внутри клетки, такие сверхмелкозернистые частицы (размером около 0,1 мкм) следует модифицировать с применением полимеров, способных разлагаться *in vivo*. Для применения рассматриваются биоразлагаемые наночастицы полиалкилцианоакрилата, которые отвечают этим требованиям.

В дополнение к способам доставки, описанным выше, следующие способы рассматриваются в качестве альтернативных способов доставки композиций гAAV в организм хозяина. Сонофорез (т.е. ультразвук) был применен и описан в патенте США № 5656016 в качестве устройства для повышения скорости и эффективности проникновения лекарственного средства в систему кровообращения и с ее помощью. Другие альтернативы доставки лекарственных средств представляют собой внутрикостную инъекцию (патент США № 5779708), устройства для микрочипов (патент США № 5797898), офтальмологические препараты (Bourlais et al., 1998), трансдермальные матрицы (патенты США № 5770219 и 5783208) и управляемую обратной связью доставку (патент США № 5697899).

Общие методы, касающиеся доставки гAAV-композиций.

Настоящее изобретение относится к стабильным фармацевтическим композициям, содержащим вирионы гAAV. Композиции остаются стабильными и активными, даже если они подвергаются воздействию циклов замораживания/оттаивания и хранятся в емкостях из различных материалов, включая стекло.

Рекомбинантные вирионы AAV, содержащие целевую гетерологичную последовательность нуклеотидов, можно применять для доставки генов, например, при генной терапии, для получения трансгенных животных, вакцинации нуклеиновой кислотой, рибозимной и антисмысловой терапии, а также для доставки генов *in vitro* в различные типы клеток.

Как правило, вирионы гAAV вводят в клетки субъекта с применением методов трансдукции *in vivo* или *in vitro*. При трансфекции *in vitro*, желаемая клетка-реципиент будет извлечена из организма субъекта, трансфицирована вирионами гAAV и повторно введена субъекту. В качестве альтернативы, можно применять сингенные или ксеногенные клетки, если эти клетки не будут вызывать неуместный иммунный ответ у субъекта.

Были описаны подходящие способы доставки и введения трансфицированных клеток в организм субъекта. Например, клетки могут быть трансфицированы *in vitro* путем комбинирования рекомбинантных вирионов AAV с клетками, например, в соответствующих средах, и скрининга на клетки, несущие целевую ДНК, с применением обычных методов, таких как Саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с применением селективных маркеров. Далее трансфицированные клетки могут быть введены в фармацевтические композиции, более подробно описанные ниже, а композиция введена в организм субъекта различными способами, такими как внутримышечная, внутривенная, внутриаартериальная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция или способ инъекции в гладкие мышцы, с применением, например, катетера, или непосредственно в орган.

Для доставки *in vivo* вирионы гAAV будут введены в фармацевтическую композицию и обычно будут вводиться парентерально, например, путем внутримышечной инъекции непосредственно в скелетную мышцу, внутрисуставно, внутривенно или непосредственно в орган.

Соответствующие дозы будут зависеть от подлежащего лечению субъекта (например, человека или примата, не относящегося к человеку, или другого млекопитающего), возраста и общего состояния подлежащего лечению субъекта, тяжести состояния, подлежащего лечению, способа введения вирионов гAAV, среди прочих факторов. Специалист в данной области техники может легко определить подходящее эффективное количество.

Таким образом, "терапевтически эффективное количество" будет варьировать в относительно широком диапазоне, который может быть определен посредством клинических испытаний. Например, для инъекции *in vivo*, т.е. инъекции непосредственно субъекту, терапевтически эффективная доза будет составлять примерно от 10^5 до 10^{16} вирионов гAAV, более предпочтительно от 10^8 до 10^{14} вирионов гAAV. Для трансфекции в пробирке эффективное количество вирионов гAAV, которое должно быть доставлено в клетки, будет составлять порядка от 10^5 до 10^{13} , предпочтительно от 10^8 до 10^{13} вирионов гAAV. Если композиция содержит трансфицированные клетки для доставки обратно в организм субъекта, то количество трансфицированных клеток в фармацевтических композициях будет составлять от примерно 10^4 до

10^{10} клеток, более предпочтительно от 10^5 до 10^8 клеток. Доза, конечно, зависит от эффективности трансфекции, силы промотора, стабильности единицы генетического кода и кодируемого ею белка и т.д. Эффективные дозы могут быть легко установлены специалистом в данной области техники посредством шаблонных испытаний для определения кривых зависимости "доза-ответ".

Схема введения может представлять собой расписание с однократным введением или расписание с многократным введением доз, чтобы в конечном итоге доставить указанное выше количество. Кроме того, субъекту можно вводить как можно больше доз. Таким образом, субъекту может быть введено, например, от 10^5 до 10^{16} вирионов гAAV в виде однократной дозы или двух, четырех, пяти, шести или более доз, которые в совокупности обеспечивают доставку, например, от 10^5 до 10^{16} вирионов гAAV. Специалист в данной области техники может с легкостью определить подходящее количество доз для введения.

Таким образом, фармацевтические композиции будут содержать достаточно генетического материала для получения терапевтически эффективного количества целевого белка, т.е. количества, достаточного для уменьшения или улучшения симптомов подлежащего лечению патологического состояния или количества, достаточного для получения желаемого эффекта. Таким образом, вирионы гAAV будут присутствовать в композициях по изобретению в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического эффекта при назначении в одной или более дозах. Вирионы гAAV могут быть представлены в виде лиофилизированных препаратов и разведены в стабилизирующих вирион композициях для немедленно или будущего применения. В качестве альтернативы, вирион гAAV может быть поставляться сразу после производства и храниться для будущего применения.

Фармацевтические композиции также будут содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Такие вспомогательные вещества включают любой фармацевтический агент, который сам по себе не вызывает образования антител, вредных для индивидуума, получающего композицию, и который можно вводить без чрезмерной токсичности. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают, но не ограничиваясь этим, такие жидкости, как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. В их число могут быть включены фармацевтически приемлемые соли, например соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т.п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Кроме того, в таких основах могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие агенты, буферные вещества для коррекции pH и т.п. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ доступно в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

В настоящем документе термин "полимеразная цепная реакция" или "ПЦР" относится к процедуре или методике, в ходе которой амплифицируются конкретные последовательности нуклеиновых кислот, РНК и/или ДНК, как описано, например, в патенте США № 4683195. Как правило, информация о последовательности с концов интересующей области или за ее пределами используется для конструирования олигонуклеотидных праймеров. Последовательность этих праймеров будет идентичной или подобной противоположным цепям шаблона, который подлежит амплификации. 5'-концевые нуклеотиды двух праймеров могут совпадать с концами амплифицированного материала. ПЦР можно применять для амплификации специфичных последовательностей РНК, специфичных последовательностей ДНК из общей геномной ДНК, а также кДНК транскрибируемой из последовательностей общей клеточной РНК, бактериофагов или плазмид и т.д. В общем, см. Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR Technology (Stockton Press, N.Y.). В настоящем документе ПЦР считается одним из, но не единственным примером способа амплификации тестового образца нуклеиновой кислоты с помощью реакции полимеразы нуклеиновой кислоты, включающего применение известной нуклеиновой кислоты в качестве праймера и полимеразы нуклеиновой кислоты для амплификации или генерации определенного фрагмента нуклеиновой кислоты.

Нуклеиновые кислоты.

Изобретение дополнительно включает определенные конструкции и нуклеиновые кислоты, кодирующие описанный в настоящем документе Glut1 белок. Некоторые конструкции и последовательности, включая выбранные последовательности, перечисленные в табл. 1, в том числе SEQ ID NO 28-75 и 80-97, и в некоторых аспектах одна или несколько из SEQ ID NO 2-5, 7-9, 11-14, 16-18, 20-23, 25-27 и 80-95, могут быть подходящими для вариантов реализации настоящего изобретения. Как описано в настоящем документе, неожиданно было обнаружено, что включение последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих 2А-пептид, не дает желаемых уровней экспрессии Glut1. Таким образом, предпочтительные конструкции гAAV не будут содержать нуклеиновых кислот SEQ ID NO 6, 15 и/или 24, все из которых соответствуют кодирующим последовательностям 2А.

Предпочтительно, нуклеиновые кислоты гибридизуются в условиях низкой, умеренной или высокой строгости и кодируют белок Glut1, который поддерживает биологическую функцию. Первая молекула нуклеиновой кислоты "способна гибридизоваться" со второй молекулой нуклеиновой кислоты, если однопочечная форма первой молекулы нуклеиновой кислоты может отжигать вторую молекулу нуклеиновой кислоты при соответствующих условиях температуры и ионной силы раствора (см. Sambrook et

al., выше). Условия температуры и ионной силы определяют "строгость" гибридизации. Типичные условия гибридизации с низкой строгостью включают 55°C, 5X натрия хлорида и натрия цитрата (НХЦ), 0,1% НДС и отсутствие формамида; или 30% формамида, 5X НХЦ, 0,5% НДС при 42°C. Типичными условиями гибридизации умеренной строгости являются 40% формамида, 5X или 6X НХЦ и 0,1% НДС при 42°C. Условия высокой строгости гибридизации: 50% формамид, 5X или 6X НХЦ при 42°C или, необязательно, при более высокой температуре (например, 57, 59, 60, 62, 63, 65 или 68°C). В общем, НХЦ составляет 0,15M NaCl и 0,015M Na цитрата. Гибридизация требует присутствия комплементарных последовательностей двух нуклеиновых кислот, хотя возможны несоответствия между основаниями, в зависимости от строгости гибридизации. Соответствующая степень строгости гибридизации нуклеиновых кислот зависит от длины нуклеиновых кислот и степени комплементарности, т.е. параметров, хорошо известных в данной области техники. Чем больше степень сходства или гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями, тем выше степень строгости, при которой могут гибридизоваться нуклеиновые кислоты. Для гибридов длиной более 100 нуклеотидов были получены уравнения для расчета температуры плавления (см. Sambrook et al., выше, 9.50-9.51). Для гибридизации с более короткими нуклеиновыми кислотами, например олигонуклеотидами, положение несоответствий становится более значимым, а длина олигонуклеотида определяет его специфичность (см. Sambrook et al., выше, 11.7-11.8).

Полипептиды Glut1, содержащие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 70% идентичны, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90% идентичны и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95% идентичны (например, на 95, 96, 97, 98, 99, 100%) аминокислотным последовательностям mGlut1 или hGlut1, предложенным в настоящем документе (например, SEQ ID NO 78 и SEQ ID NO 79), рассматриваются для восстановления функции Glut1 при сравнении с помощью алгоритма BLAST, в котором параметры алгоритма выбираются таким образом, чтобы давать наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих референтных последовательностей. Полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере приблизительно на 70% подобны, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% подобны, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90% подобны и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95% подобны (например, на 95, 96, 97, 98, 99, 100%) любой из референтных аминокислотных последовательностей Glut1 при сравнении с помощью алгоритма BLAST, в котором параметры алгоритма выбраны таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих референтных последовательностей, также включены в конструкции и способы по изобретению.

Идентичность последовательностей относится к степени, в которой аминокислоты двух полипептидов одинаковы в эквивалентных положениях при оптимальном выравнивании двух последовательностей. Сходство последовательностей включает идентичные остатки и неидентичные биохимически родственные аминокислоты. Биохимически родственные аминокислоты, которые обладают сходными свойствами и могут быть взаимозаменяемыми, обсуждаются выше.

"Гомология" относится к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидными последовательностями при оптимальном выравнивании. Если положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занято одним и тем же основанием или мономерной аминокислотной субъединицей, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то молекулы являются гомологичными в этом положении. Процент гомологии представляет собой количество гомологичных позиций, разделяемых двумя последовательностями, деленное на общее количество позиций по сравнению с $\times 100$. Например, если 6 из 10 позиций в двух последовательностях совпадают или гомологичны при оптимальном выравнивании последовательностей, то две последовательности гомологичны на 60%. Как правило, сравнение производится при выравнивании последовательностей, чтобы обеспечить максимальный процент гомологии.

Следующие ссылки относятся к алгоритмам BLAST, которые часто применяются для анализа последовательностей: Altschul S.F. et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Gish W. et al., (1993) *Nature Genet.* 3:266-272; Madden T.L. et al., (1996) *Meth. Enzymol.* 266:131-141; Altschul S.F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Zhang J. et al., (1997) *Genome Res.* 7:649-656; Wootton J.C. et al., (1993) *Comput. Chem.* 17:149-163; Hancock J.M. et al., (1994) *Comput. Appl. Biosci.* 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff M.O. et al., "A model of evolutionary change in proteins" в *Atlas of Protein Sequence and Structure*, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, *Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, DC; Schwartz R.M. et al., "Matrices for detecting distant relationships" в *Atlas of Protein Sequence and Structure*, (1978) vol. 5, suppl. 3." M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, *Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington DC; Altschul S.F., (1991) *J. Mol. Biol.* 219:555-565; States D.J. et al., (1991) *Methods* 3:66-70; Henikoff S. et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919; Altschul S.F. et al., (1993) *J. Mol. Evol.* 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin S. et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268; Karlin S. et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877; Dembo A. et al., (1994) *Ann. Prob.* 22:2022-2039; и Altschul S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." в *Theoretical and Computational Methods in Genome Research* (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

В настоящем изобретении также предлагаются векторы экспрессии, содержащие различные нуклеиновые кислоты, в которых нуклеиновая кислота функционально связана с контрольными последовательностями, распознаваемыми клеткой-хозяином при трансфекции клетки-хозяина вектором. Кроме того, предлагаются вирионы, содержащие рекомбинантные AAV9 и некоторые последовательности AAV2, а также последовательности нуклеиновых кислот для экспрессии Glut-1 под управлением промотора куриного Р-актина и энхансера ЦМВ. В пределах этих конструкций последовательности гAAV2 соответствуют последовательностям 5'- и 3'-ИКП, например, SEQ ID NO 2, 9, 29, 34, 36, 41 и др., как описано в табл. 1). Эти последовательности были упакованы с капсидом AAV9 с образованием вирионов, которые являются терапевтическими при дефиците Glut-1 по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции и введение.

Для приготовления фармацевтических или стерильных композиций для композиций по настоящему изобретению векторы AAV9 или родственные композиции могут быть смешаны с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Препараты терапевтических и диагностических агентов могут быть получены путем смешивания с приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, суспензий, водных растворов или суспензий (см., например, Hardman et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

Токсичность и терапевтическая эффективность терапевтических композиций, вводимых по отдельности или в сочетании с другим агентом, могут быть определены стандартными фармацевтическими методиками в культурах клеток или организме экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции). Соотношение доз, оказывающих токсическое и терапевтическое воздействие, представляет собой терапевтический индекс (LD₅₀/ED₅₀). В частности, желаемыми являются терапевтические композиции с высоким терапевтическим индексом. Данные, полученные в результате этих анализов клеточной культуры и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона доз для применения у человека. Дозы таких соединений предпочтительно находятся в пределах диапазона концентраций в кровотоке, которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или без нее. Доза может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и способа введения.

В одном из вариантов реализации изобретения композицию по изобретению вводят субъекту в соответствии с Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (November 1, 2002)).

Способ введения может варьироваться. Подходящие способы введения включают пероральный, ректальный, трансмукозальный, кишечный, парентеральный; внутримышечный, подкожный, внутрикожный, интрамедуллярный, интратекальный, прямой внутривентрикулярный, внутривенный, внутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазной, ингаляционный, инсuffляционный, местное применение, кожный, трансдермальный или внутриартериальный.

В конкретных вариантах реализации изобретения композицию или терапевтический препарат можно вводить инвазивным путем, таким как инъекция (см. выше). В других вариантах реализации изобретения терапевтическую композицию или фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно, внутримышечно, внутриартериально, внутрисуставно (например, в пораженные артритом суставы), в опухоль или путем ингаляции, аэрозольного введения. Введение с помощью неинвазивных способов (например, перорально, например, в виде пилюли, капсулы или таблетки) также включено в настоящее изобретение.

Композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных из уровня техники. Например, фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить инъекцией с помощью иглы для подкожных инъекций, включая, например, предварительно заполненный шприц или аутоинжектор.

Кроме того, фармацевтические композиции по изобретению можно вводить с помощью безыгольных устройств для подкожных инъекций; таких как устройства, описанные в патентах США № 6620135; 6096002; 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556.

В качестве альтернативы, можно применять вектор AAV9 или родственное соединение скорее местно, чем системно, например, путем инъекции непосредственно в желаемый целевой сайт, часто в виде препарата депо или с пролонгированным высвобождением. Кроме того, можно вводить композицию в систему доставки лекарственного средства с направленным действием, например в липосоме, покрытой тканеспецифичным антителом, направленно действующим, например, на мозг. Липосомы будут направленно действовать выбранный отдел желаемой ткани.

Схема введения зависит от нескольких факторов, включая скорость метаболизма терапевтической композиции в сыворотке или ткани, степень тяжести симптомов и доступность клеток-мишеней в биоло-

гической матрице. Предпочтительно, схема введения обеспечивает достаточное количество терапевтической композиции для улучшения целевого патологического состояния, одновременно минимизируя нежелательные побочные эффекты. Соответственно, количество для биологической доставки частично зависит от конкретной терапевтической композиции и тяжести состояния, подлежащего лечению.

Определение соответствующей дозы проводится клиницистом, например, с применением параметров или факторов, влияние которых на лечение известно или подозревается в данной области техники. Обычно введение начинают с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, и затем увеличиваются с небольшими приращениями до тех пор, пока не будет достигнут желаемый или оптимальный эффект по сравнению с любыми отрицательными побочными эффектами. Важными диагностическими показателями являются симптомы, например, воспаления или уровня вырабатываемых воспалительных цитокинов. В общем, желательно, чтобы биологическое средство, которое будет применяться, было получено из тех же видов, что и животное, подлежащее лечению, что будет минимизировать любой иммунный ответ на реагент.

В настоящем документе термин "подавлять" или "лечить" или "лечение" включает отодвигание во времени развития симптомов, связанных с расстройством, и/или уменьшение тяжести симптомов такого расстройства. Термины дополнительно включают улучшение существующих неконтролируемых или нежелательных симптомов, предотвращение развития дополнительных симптомов и улучшение или предотвращение появления основных причин таких симптомов. Таким образом, эти термины означают, что положительный результат был достигнут у позвоночного пациента с расстройством, заболеванием или симптомом или с потенциалом развития такого расстройства, заболевания или симптома.

В настоящем документе термины "терапевтически эффективное количество", "терапевтически эффективная доза" и "эффективное количество" относятся к количеству соединения на основе gAAV9-Glut1 по изобретению, которое при монотерапии или в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом для клетки, ткани или субъекта является эффективным для достижения измеримого улучшения одного или более симптомов заболевания или состояния или прогрессирования такого заболевания или состояния. Терапевтически эффективная доза дополнительно относится к такому количеству соединения, которое является достаточным, по меньшей мере, для частичного улучшения симптомов, например лечения, заживления, профилактики или улучшения соответствующего состояния здоровья или сокращения периода лечения, заживления, профилактики или улучшения таких состояний. При применении к отдельному активному ингредиенту, вводимому в качестве монотерапии, терапевтически эффективная доза относится только к одному ингредиенту. При применении к комбинации терапевтически эффективная доза относится к комбинированным количествам активных ингредиентов, которые приводят к терапевтическому эффекту, независимо от того, вводились ли они в комбинации, последовательно или одновременно. Эффективное количество терапевтического средства приведет к улучшению диагностического показателя или параметра по меньшей мере на 10%; обычно по меньшей мере на 20%; предпочтительно по меньшей мере около 30%; более предпочтительно по меньшей мере 40% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 50%. Кроме того, эффективное количество также может привести к улучшению субъективного показателя в тех случаях, когда для оценки степени тяжести заболевания применяются субъективные показатели.

Наборы.

В настоящем изобретении также предлагаются наборы, содержащие компоненты комбинаций по изобретению в форме набора. Набор по настоящему изобретению включает один или несколько компонентов, в том числе, но не ограничиваясь этим, соединение на основе gAAV9-Glut1, как обсуждается в настоящем документе, в сочетании с одним или несколькими дополнительными компонентами, в том числе, но не ограничиваясь этим, фармацевтически приемлемым носителем и/или химиотерапевтическим агентом, как обсуждалось в настоящем документе. Соединение или композиция на основе gAAV9-Glut1 и/или терапевтический агент могут быть введены в композицию без дополнительных компонентов или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, в фармацевтической композиции.

В одном варианте реализации изобретения набор включает соединение/композицию на основе gAAV9-Glut1 по изобретению или его фармацевтическую композицию в одной емкости (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе) и его фармацевтическую композицию и/или химиотерапевтическое средство в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

В другом варианте реализации настоящего изобретения набор включает комбинацию по изобретению, включая соединение на основе gAAV9-Glut1, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, необязательно в сочетании с одним или несколькими компонентами химиотерапевтического агента, которые совместно введены, необязательно в фармацевтическую композицию в одной общей емкости.

Если набор включает фармацевтическую композицию для парентерального введения субъекту, то набор может включать в себя устройство для такого введения. Например, набор может включать одну или несколько игл для подкожных инъекций или других инъекционных устройств, как описано выше.

Набор может включать в себя листок-вкладыш в упаковку, содержащий информацию, касающуюся фармацевтических композиций и лекарственных форм в наборе. Как правило, такая информация помогает пациентам и врачам эффективно и безопасно применять прилагаемые фармацевтические композиции.

и лекарственные формы. Например, следующая информация, касающаяся комбинации по изобретению, может предоставляться на листке-вкладыше: фармакокинетика, фармакодинамика, клинические исследования, параметры эффективности, показания и применение, противопоказания, предупреждения, меры предосторожности, побочные реакции, передозировка, надлежащие дозы и способ введения, упаковка, надлежащие условия хранения, ссылки, информация о производителе/дистрибьюторе и патентная информация.

Общие методы.

Стандартные методы в молекулярной биологии описаны Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Стандартные методы также приведены в Ausbel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, где описано клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белка (том 3) и биоинформатика (том 4).

Описаны способы очистки белков, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию (Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение химерных белков, гликозилирование белков (см., например, Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описаны получение, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, выше). Доступны стандартные методы для характеристики взаимодействия лиганд/рецептор (см., например, Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Сокращения.

AAV: аденоассоциированный вирус;

гAAV: рекомбинантный аденоассоциированный вирус или вирусный вектор;

ГЭБ: гематоэнцефалический барьер;

ВЯ: вирус ящура;

GFP: зеленый флуоресцентный белок;

Glut1: переносчик глюкозы 1, также известный как семейство 2 растворимых носителей, облегченный переносчик глюкозы 1 (SLC2A1), является унипортерным белком, который у человека кодируется геном SLC2A1. Glut1 облегчает перенос глюкозы через плазматические мембраны клеток млекопитающих. Glut1 был первым переносчиком глюкозы, который был охарактеризован. Glut1 1 обладает высокой степенью консервативности для белка Glut1 человека (hGlut1) (учетный номер: NP_006507.2; SEQ ID NO 79) и белка Glut1 мыши (mGlut1) (учетный номер: NP_035530.2; SEQ ID NO 78), которые облают 98% гомологией. Glut1 демонстрирует 40% гомологию с другими Glut;

SLC2A1: ген, кодирующий переносчик глюкозы человека 1 (hGlut1). SLC2A1 человека (учетный номер: NG_008232.1; идентификатор гена - 6513);

Slc2a1: ген, кодирующий Glut1 мыши (mGlut1) (учетный номер: идентификатор гена NC_000070.6; ген ID - 20525);

GLUT1 DS: синдром дефицита Glut1;

ПРД: послеродовой день;

ПРДЗ: послеродовой день 3.

Примеры

Таблица 1. Реконбинантные Glut1-плазмиды

EGFP-2A-Glut1		
Конструкции		
Человек	рAAV CB6 PI EGFP-2A-hGlut1 (SEQ ID NO 1) Ключевые признаки конструкции 5'НКП (SEQ ID NO 2) энхансер ЦМВ IE (SEQ ID NO 3) промотор CB (SEQ ID NO 4) eGFP (SEQ ID NO 5) 2A-линкер (SEQ ID NO 6) кДНК hGlut1 и 3'НТУ (SEQ ID NO 7) сигнал Poly A (SEQ ID NO 8) 3' НКП (SEQ ID NO 9)	Не экспрессирует hGlut1
Мышь	рAAV CB6 PI EGFP-2A-mGlut1 (SEQ ID NO 10) Ключевые признаки конструкции 5'НКП (SEQ ID NO 11) энхансер ЦМВ IE (SEQ ID NO 12) промотор CB (SEQ ID NO 13) eGFP (SEQ ID NO 14) 2A-линкер (SEQ ID NO 15) кДНК и 3'НТУ mGlut1 (SEQ ID NO 16)	Не экспрессирует mGlut1

	сигнал Poly A (SEQ ID NO 17) 3' НКП (SEQ ID NO 18)	
Glut1-2A-EGFP Конструкции		
Человек	рAAV CB6 PI hGlut1-2A-EGFP (SEQ ID NO 19) Ключевые признаки конструкции 5'НКП (SEQ ID NO 20) энхансер ЦМБ IE (SEQ ID NO 21) промотор CB (SEQ ID NO 22) кДНК hGlut1 (SEQ ID NO 23) 2A-линкер (SEQ ID NO 24) eGFP (SEQ ID NO 25) сигнал Poly A (SEQ ID NO 26) 3' НКП (SEQ ID NO 27)	Не экспрессирует hGlut1
Мышь	рAAV CB6 PI mGlut1-2A-EGFP SEQ ID NO:88 Ключевые признаки конструкции 5'НКП (SEQ ID NO 89) энхансер ЦМБ IE (SEQ ID NO:90) промотор CB (SEQ ID NO:91) eGFP (SEQ ID NO:92) кДНК и 3'НТУ mGlut1 (SEQ ID NO 93) сигнал Poly A (SEQ ID NO 94) 3' НКП (SEQ ID NO 95)	Не экспрессирует mGlut1
Конструкции нативного Glut1		
Человек	рAAV9-CB6 PI hGlut1 рAAV CB6 PI hGlut1 (SEQ ID NO 28) Ключевые признаки конструкции 5'НКП (SEQ ID NO 29) энхансер ЦМБ IE (SEQ ID NO 30)	Экспрессирует hGlut1

	промотор CB (SEQ ID NO 31) κДНК hGlut1 (SEQ ID NO 32) сигнал Poly A (SEQ ID NO 33) 3' НКП (SEQ ID NO 34)	
Мышь	pAAV9-CB6 PI mGlut1 pAAV CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO 35) Ключевые признаки конструкции 5' НКП (SEQ ID NO 36) энхансер ЦМВ IE (SEQ ID NO 37) промотор CB (SEQ ID NO 38) mGlut1 κДНК (SEQ ID NO 39) сигнал Poly A (SEQ ID NO 40) 3' НКП (SEQ ID NO 41)	Экспрессирует mGlut1
Конструкции Glut1-mir122		
Человек	pAAV CB6 PI hGlut1-out3xmiR-122 CC (SEQ ID NO 42) Ключевые признаки конструкции 5' НКП (SEQ ID NO 43) энхансер ЦМВ IE (SEQ ID NO 44) промотор CB (SEQ ID NO 45) κДНК hGlut1 (SEQ ID NO 46) 3' НТУ (SEQ ID NO 47) 3xmiR-122 CC (SEQ ID NO 48) сигнал Poly A (SEQ ID NO 49) 3' НКП (SEQ ID NO 50)	hGlut1 экспрессия ПДР
Человек	pAAV CB6 PI hGlut1-in3xmiR-122 CC (SEQ ID NO 51) Ключевые признаки конструкции	hGlut1 экспрессия ПДР

	5' НКП (SEQ ID NO 52) энхансер ЦМВ IE (SEQ ID NO 53) промотор CB (SEQ ID NO 54) кДНК hGlut1 (SEQ ID NO 55) 3' НТУ и 3xmiR-122 (SEQ ID NO 56) сигнал Poly A (SEQ ID NO 57) 3' НКП (SEQ ID NO 58)	
Мышь	pAAV CB6 PI mGlut1-in3xmiR-122 CC (SEQ ID NO 59) Ключевые признаки конструкции 5' НКП (SEQ ID NO 60) энхансер ЦМВ IE (SEQ ID NO 61) промотор CB (SEQ ID NO 62) mGlut1 кДНК (SEQ ID NO 63) 3' НТУ и 3x-miR122CC (SEQ ID NO 64) сигнал Poly A (SEQ ID NO 65) 3' НКП (SEQ ID NO 66)	mGlut1 экспрессия ПДР
Мышь	pAAV CB6 PI mGlut1-out3xmiR-122 CC (SEQ ID NO 67) Ключевые признаки конструкции 5' НКП (SEQ ID NO 68) энхансер ЦМВ IE (SEQ ID NO 69) промотор CB (SEQ ID NO 70) mGlut1 кДНК (SEQ ID NO 71) 3' НТУ (SEQ ID NO 72) 3xmiR-122CC (SEQ ID NO 73) сигнал Poly A (SEQ ID NO 74) 3' НКП (SEQ ID NO 75)	mGlut1 экспрессия ПДР
Конструкция EGFP человека		
	pAAV CB6 PI hGlut1-EGFP SEQ ID NO:80	Экспрессирует hGlut1
	Ключевые признаки конструкции 5' НКП (SEQ ID NO 81) энхансер ЦМВ IE (SEQ ID NO 82) промотор CB (SEQ ID NO 83) eGFP (SEQ ID NO 84) mGlut1 кДНК (SEQ ID NO 85) сигнал Poly A (SEQ ID NO 86) 3' НКП (SEQ ID NO 87)	

Разработка рекомбинантной конструкции AAV.

Были созданы четыре конструкции ДНК, несущие ген SLC2A1 мыши или человека, связанный с нуклеотидной кассетой, кодирующей репортер в форме зеленого флуоресцентного белка (GFP), как проиллюстрировано на фиг. 1А-В. Указанные четыре конструкции дополнительно содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую 16 аминокислотный длинный 2А-пептид вируса ящура (ВЯ), который введен между открытыми рамками считывания Glut1 и GFP. Пептид 2А введен в конструкцию,

чтобы избежать возможности того, что химерные белки Glut1-GFP могут изменять структуру или активность белка Glut1. Пептид 2A опосредует первичное дис-"расщепление" полипротеина ВЯ в каскаде процессов обработки, которые в конечном счете генерируют зрелые белки ВЯ (Donnelly M.L. et al. (2001)). Предполагалось, что эта стратегия позволит получить конструкции, в которых белок Glut1 образуется в своем нативном состоянии. Однако, как описано ниже, ни одна из этих конструкций не экспрессирует Glut1 на удовлетворительных уровнях.

Дополнительно были разработаны еще шесть ДНК-конструкций без нуклеиновой кислоты, кодирующей 2A-пептид (фиг. 1C-D), причем некоторые из них содержат элементы, которые обеспечивают избирательное отключение экспрессии гена SLC2A1 в печени (фиг. 1D). Указанные конструкции были разработаны с целью изучения возможности того, что системное повышение экспрессии гена SLC2A1 в будущих экспериментах по генной терапии может привести к высокому уровню экспрессии белка в печени, который может усилить процесс гликогенеза и, таким образом, вызвать гипогликемическое состояние. Наконец, конструкции, содержащие исключительно нативный мышиный или человеческий ген SLC2A1, также были сгенерированы для целей контроля (фиг. 1C). pAAV9 CB6 PI hGlut1, pAAV9 CB6 PI hGlut1 out3xmiR122CC и pAAV9 CB6 PI hGlut1 in3xmiR122CC будут применяться в валидационных экспериментах. Последовательности и ключевые признаки этих конструкций перечислены в табл. 1 и в соответствующем перечне последовательностей SEQ ID NO 1-97.

Начальный анализ экспрессии плазмид gAAV, трансфицированных в клетки CHO.

Две клеточные линии применяли для оценки различных рекомбинантных плазмид в культуре клеток. Одна клеточная линия представляет собой линию клеток яичника китайского хомячка (CHO), другая - линию фибробластов, полученную от пациента Glut1 (Yang et al., 2011). Эксперименты с клеточной культурой и последующий Вестерн-блоттинг показали, что плазмидные конструкции, содержащие 2A-пептид, не экспрессируют ни Glut1, ни GFP на удовлетворительных уровнях. Хотя это было неожиданно, возможно, что в контексте гена SLC2A1/slc2a1 пептид 2A отрицательно влияет на экспрессию белка. Напротив, было обнаружено, что контрольные конструкции, содержащие только мышиные или человеческие гены SLC2A1, экспрессируют устойчивые уровни белка. Ни одна из 2A-содержащих конструкций Glut1 (фиг. 1A-B) не изучалась в дальнейшем для восстановления экспрессии Glut1 в мутантных модельных системах.

Чтобы обойти трудности экспрессии, возникающие в присутствии 2A-пептида в первых четырех конструкциях (фиг. 1A-B), тестировали химерный белок hGlut1-eGFP (называемый phGlut1::eGFP). Эксперименты в клеточной культуре показали, что химерный белок не только экспрессируется, но и функционирует в анализе захвата глюкозы. Указанная конструкция (phGlut1::eGFP), а также конструкции, содержащие только мышиный slc2a1 или человеческий SLC2A1 гены, предназначены для применения в экспериментах *in vivo* с применением генной терапии на мышинной модели Glut1.

Клонирование плазмиды AAV9 и последующая упаковка вирусных векторов.

Конструкцию химерного белка hGlut1-eGFP (phGlut1::eGFP) повторно клонировали в AAV9 для последующей упаковки в вирусный вектор. Чтобы гарантировать продолжение экспрессии белка повторно клонированной конструкцией, его временно трансфицировали клетки яичника китайского хомячка (CHO), и уровни белка исследовали методом Вестерн-блоттинга (фиг. 2A). Анализ экспрессии белка в клетках CHO показал, что по сравнению с конструкциями, экспрессирующими только кодирующую кДНК hGlut1 или слияние hGlut-eGFP под управлением другого промоторного элемента, плазида AAV9-hGlut1-eGFP экспрессирует более низкие уровни Glut1 (фиг. 2A). Однако модифицированная (AAV9-hGlut1-eGFP) гибридная конструкция продолжала экспрессировать белок Glut1 в эффективном и удовлетворительном количестве. Более того, химерный белок имел значительно больший размер, чем нативный белок hGlut1, как и ожидалось из-за метки GFP на 3'-конце кДНК Glut1 (фиг. 2A). Указанные результаты согласуются с анализом захвата глюкозы, в котором было обнаружено, что белок hGlut-eGFP увеличивает захват глюкозы клетками CHO (фиг. 2B). На фиг. 2C показана GFP-флуоресценция этой конструкции после трансфекции в клетки CHO. Параллельно гены человека SLC2A1 и мыши slc2a1 дополнительно клонировали в плазмиду AAV9 и после трансфекции в фибробласты пациентов обнаружили, что они приводят к экспрессии Glut1 и увеличивают захват глюкозы. Соответственно, каждый был упакован в капсид AAV9 и $\sim 10^{13}$ копий генома, подготовленных для введения мышам модели Glut1 DS. (Согласно способам, описанным в патенте США № 8734809, а также в Grieger and Samulski 2005 и Grieger and Samulski 2012).

Условия упаковки/Распределение.

С целью оптимизации условий для введения конструкций, экспрессирующих Glut1, упакованные в векторы AAV9, было проанализировано распределение вектора AAV9-GFP (Foust K.D. et al., 2009) у мышей дикого типа. (Согласно способам, описанным в Gao G.P. и Sena-Esteves M. (2012), в Molecular Cloning, Vol 2: A Laboratory Manual (M.R. Green and J. Sambrook eds.)).

Распределение конструкции AAV9-GFP оценивали в разных тканях мышей дикого типа или новорожденных мышей. Ярко-зеленая флуоресценция была обнаружена в исследуемых тканях мышей, которым был инъекционно введен AAV9-GFP, но не у мышей, получавших ФСБ/контроль. По существу, $\sim 4 \times 10^{12}$ геномных копий вектора вводили мышам системно в объеме ~ 40 мкл через ретро-орбитальный

синус и височную вену. Результаты этих экспериментов показывают, что вирус AAV9 распространяется в различных нервных и других тканях. В частности, было обнаружено, что высокие уровни направленно действуют на скелетную мышцу, сердце и печень. Тем не менее, значительная флуоресценция GFP наблюдалась в ткани головного мозга, в том числе в Glut1-положительных эндотелиальных клетках, выстилающих микрососуды мозга. Важно отметить, что эти клетки являются предполагаемыми сайтами терапии направленного действия при Glut1 DS.

Контрольные конструкции AAV9-mGlut1.

Таблица 2, mGlut1 = pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO 35-41).

Таблица 2. Краткое описание мышей, которым инъекционно вводили Glut1 или основу

Кол-во животных	Пол	Дата инъекции	Инъекционно вводили
4	Самки	5/19	mGlut1
1	Самцы	5/15	mGlut1
2	Самцы	5/25	mGlut1
2	Самки	5/25	mGlut1
1	Самки	5/25	ФСБ
1	Самцы	5/31	ФСБ
3	Самцы	6/1	ФСБ
2	Самцы	6/6	ФСБ

Одну из конструкций, которые экспрессировали желаемые количества белка mGlut1, упаковывали в вирусный вектор AAV9. Несмотря на то что эта конструкция не содержит метки (например, GFP), экспрессия Glut1 из этой конструкции у модельных мышей может сопровождаться оценкой общего белка mGlut1 с помощью анализа методами Вестерн-блоттинга и иммуногистохимии.

Конструкция pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO 35) была введена в послеродовой день (ПРД) 2 детенышам мыши с мутантным Glut1 через ретро-орбитальную пазуху. Мыши, которым эта конструкция была введена инъекционно, служили контролем для мутантов, инъекционно получавших AAV9-hGlut1-eGFP (SEQ ID NO 80; см. SEQ ID NO 81-87). Девять мутантных мышей инъекционно получали конструкцию AAV9-mGlut1 pAAV9 CB6 PI mGlut1 (табл. 2). В качестве дополнительного контроля семи мутантам вводили только основу (ФСБ). Эти мыши будут изучены на предмет функционального улучшения фенотипа заболевания. Это будет осуществляться путем определения уровней захвата глюкозы в ткани головного мозга с помощью ПЭТ-сканирования и путем измерения моторных функций в тестах способности удерживаться на вращающемся барабане и лазать по вертикальному стержню в соответствии со стандартными методиками (см. Kariya et al., 2012).

Одной из конструкций, примененных в экспериментах с заменой генов на модели мышей Glut1 DS, является конструкция AAV9-hGlut1-eGFP (SEQ ID NO 80). Меченый белок Glut1, полученный из этой конструкции, позволит отслеживать распределение белка в различных системах органов, включая Glut1-экспрессирующие эндотелиальные клетки мозга экспериментальных мышей. Это позволит оптимизировать условия обнаружения mGlut1 в мозге мыши. Надежная экспрессия белка mGlut1 в мозге обнаруживается с применением специфичного антитела.

Восстановление Glut1 у Glut1 DS мутантных мышей избавляет от фенотипа заболевания, как показано на примере избавления от нарушений походки.

Способность рекомбинантного аденоассоциированного вируса 9 (rAAV9) инфицировать несколько типов клеток применялась в качестве признака для повторного введения мышинного гена Slc2a1 на мышинной модели заболевания у человека. В отсутствие одной аллели Slc2a1 дикого типа мыши Glut1 DS демонстрируют сниженную способность удерживаться на вращающемся барабане, показатель, который, как считается, моделирует моторные поведенческие дефекты, т.е. моторные фенотипы, наблюдаемые у пациентов-людей. Мутантным мышам вводили инъекционно $\sim 4 \times 10^{11}$ геномных копий AAV9-Glut1, поставляемых конструкцией pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO 35), или основу (ФСБ) на ПРД3. Значения Р вычисляли с применением одностороннего дисперсионного анализа. Восстановление гена Slc2a1 у мутантных мышей на ПРД3 приводило к значительному улучшению способности удерживаться на вращающемся барабане (тест, проводимый в стандартных условиях - см. Wang et al., 2006) уже в возрасте 6 недель (фиг. 3А). Улучшенная способность сохранялась до 20-недельного возраста, после чего эксперимент был прекращен.

В дополнение к улучшенным характеристикам на анализе с вращающимся барабаном (фиг. 3А) получавшие лечение мыши более проворно обращаются с вертикальным шестом, чем их двойники, получавшие основу (фиг. 3В). Показатели получавших лечение мутантом были неотличимыми от контрольных однопометных животных дикого типа при тестировании когорт в возрасте от 6 до 12 недель. Полу-

ченные результаты дают убедительные доказательства того, что восстановление Glut1 у мышей Glut1 DS ослабляет характеристики моторного фенотипа заболевания у человека, указывая на то, что восстановление гена Slc2a1 у мутантных модельных мышей свидетельствует о терапевтической ценности.

Восстановление Glut1 у мутантных мышей Glut1 DS приводит к повышенной экспрессии гена в нескольких тканях.

Для изучения молекулярной основы улучшения показателей у животных, получавших лечение AAV9-Glut1, оценивали экспрессию мышинового гена Slc2a1 в ткани мозга и печени животных. Мутантные животные, получавшие лечение pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO 35), демонстрировали более высокий уровень гена Slc2a1 в ткани мозга и печени (фиг. 4A-B). Экстрагировали ткань мозга и печени получавших лечение и контрольных мышей, получали РНК, а затем обрабатывали обратной транскриптазой перед амплификацией транскрипта Slc2a1 в анализе К-ПЦР. β -актин применяли для нормализации экспрессии гена Slc2a1. На фиг. 4A проиллюстрирована относительная экспрессия гена Slc2a1 у получавших лечение мутантов и соответствующих контрольных животных. На фиг. 4B проиллюстрирована экспрессия Slc2a1 как процент от экспрессии у мышей Glut1^{+/+} дикого типа. Праймеры, перекрывающие интрон 1, применяли для амплификации кодирующего Glut1 транскрипта с помощью количественной ПЦР у получавших лечение мутантов (Glut1^{+/+}) и соответствующих контрольных животных (мутанты Glut1^{+/+} и ФСБ Glut1^{+/+}). Мышей подвергали эвтаназии и ткани экстрагировали после транскрипционной перфузии с применением ФСБ. РНК получали с применением набора Qiagen RNeasy в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen, Валенсия, Калифорния). РНК обрабатывали обратной транскриптазой в соответствии со стандартными методиками и следующими праймерами, применяемыми для амплификации транскрипта, кодирующего Glut1: Glut1QPCR F1: 5' CTT GCT TGT AGA GTG ACG ATC 3' (SEQ ID NO 76) и Glut1 QPCR R1: 5' CAG TGA TCC GAG CAC TGC TC 3' (SEQ ID NO 77). Ожидаемую полосу 212 п.о. определяли количественно в Eppendorf Realplex Cyclex (Eppendorf, Германия).

Неожиданно, экспрессия гена в обработанной мутантной печени превышала уровни в такой же ткани контрольных животных Glut1^{+/+}, что соответствовало более ранним сообщениям (Foust et al., 2010) о том, что вирус AAV9-Glut1 обладает определенной степенью тропности в отношении печени. В небольшой когорте мышей ДТ, которым вводили вирус, это также приводило к гипогликемии, что, вероятно, было следствием активизации Slc2a1 в этой ткани и, следовательно, удаления глюкозы из крови. Соответственно, рассматривается подавление экспрессии Slc2a1 с применением конструкций, содержащих сайты связывания микроРНК-122 (как показано на фиг. 1D и охватывается SEQ ID NO 42-75). МикроРНК-122 специфически экспрессируется в печени и подавляет экспрессию генов, с транскриптами которых она связывается (Xie et al., 2011). Физиологические последствия этого открытия будут предметом дополнительных исследований.

Повышение уровня белка Glut1 в мозге и глюкозы СМЖ у мутантных мышей, получавших AAV9-Glut1: восстановление Glut1 смягчает гипогликемию у модельных мышей Glut1 DS.

Определяющим признаком Glut1 DS является гипогликемия (низкий уровень глюкозы в спинномозговой жидкости). Этот фенотип демонстрируют мыши модели Glut1 DS. Чтобы определить, будет ли восстановление Glut1 у модельных мышей устранять или смягчать гипогликемию, извлекали кровь и спинномозговую жидкость (СМЖ) животных и измеряли уровни глюкозы. Перед проведением измерений все мыши голодали на протяжении ночи. СМЖ извлекали из мозжечково-мозговой цистерны, в основном следуя описанной ранее методике (Wang et al., 2006; Fleming et al., 1983). Вкратце, был сделан разрез от верхушки черепа до дорсального отдела грудной клетки, мышцы от основания черепа до первых позвонков удаляли, чтобы обнажить мозговые оболочки над мозжечково-мозговой цистерной. Ткань над мозжечково-мозговой цистерной иссекали, чтобы не проколоть полупрозрачные мозговые оболочки. После того как окружающая область была очищена от остаточной крови/интерстициальной жидкости, использовали микропипетку, соединенную с иглой 30G, для прокола арахноидальной мембраны, покрывающей мозжечково-мозговую цистерну, и извлекали 5-15 мкл СМЖ. Вся методика занимала 5 мин, а уровень глюкозы СМЖ, измеренный с помощью глюкометра Ascensia Elite XL (Bayer Corp.), аналогичным образом определяли до извлечения СМЖ, отбирая ~10 мкл крови из надреза на хвосте. Оценивали два показателя для каждой из концентраций глюкозы в крови и СМЖ для каждой мыши. Приводится среднее значение.

Что касается значений глюкозы СМЖ и стадий заболевания, то типичными являются следующие диапазоны: у более чем 90% пациентов с Glut1 значения глюкозы СМЖ составляют < 40 мг/дл (2,2 мМ), у остальных пациентов значения находятся в диапазоне 41-52 мг/дл. Таким образом, нормальный диапазон для уровней глюкозы СМЖ составляет $\geq$ около 53 мг/дл. Для модельных мышей Glut1 DS типичный уровень глюкозы СМЖ составляет около $23,3 \pm 7,17$ мг/дл (в пределах диапазона $< 25,0 \pm 8,00$ мг/дл); тогда как для мышей дикого типа указанный уровень составляет около $74,6 \pm 14,1$ мг/дл (в пределах $\geq$ около $70,0 \pm 15,0$ мг/дл).

Кроме того, количественная оценка функции захвата глюкозы эритроцитами часто применяется в качестве суррогатной для гаплонедостаточности Glut1. В этом анализе образцы пациентов с проявлениями Glut1 DS демонстрируют захват около 50% поглощения, с диапазоном 36-73%. По оценкам, актив-

ность $\geq 75\%$ соответствует нормальному диапазону. Отмечается, что $< 25\%$ свидетельствует от тяжелом нарушении, а при 0% состояния приближается к эмбриолетальности.

Восстановление гена *slc2a1* у мутантных мышей *Glut1* DS путем трансфекции конструкцией pAAV9 CB6 PI m*Glut1* (SEQ ID NO 35) приводит к повышению экспрессии *Glut1* (фиг. 5A). Кроме того, получавшие лечение мутантные мыши *Glut1* DS экспрессируют повышенные уровни белка *Glut1* в ткани головного мозга (фиг. 5B). На фиг. 5C концентрации глюкозы в СМЖ получавших лечение мутантов были значительно выше, чем концентрации у нелеченных мутантов, но не достигали уровней, наблюдаемых у контрольных животных дикого типа. Мыши-мутанты с восстановленным *slc2a1* демонстрировали повышенный уровень глюкозы в СМЖ/крови (фиг. 5D). Размеры выборки составляют $n=8$ для нелеченных мутантных мышей и $n=9$ для получавших лечение мутантных мышей. Кроме того, в когорте дикого типа $n=18$. Эти данные показывают, что восстановление *Glut1* у мутантов *Glut1* DS повышает уровни глюкозы в СМЖ и уменьшает гипогликемию у пораженных животных. В совокупности эти результаты являются очевидным свидетельством терапевтических преимуществ восстановления *Glut1* у субъекта с дефицитом *Glut1*. Предварительные результаты проведенных экспериментов показывают, что восстановление *Glut1* у указанных взрослых мышей с симптомами не позволяет устранить фенотип заболевания, указывая на ограниченное терапевтическое окно возможностей у мышей и, вероятно, у человека.

Восстановление *Glut1* у мышей с симптомами - описание введения *Glut1*.

Восстановление экспрессии *Glut1* у модельных мышей в раннем возрасте в ходе заболевания (примером чего является инъекция ПРДЗ конструкции AAV9-m*Glut1*) у мышей *Glut1* DS имеет явную терапевтическую ценность. Чтобы определить временные рамки восстановления *Glut1* у мышей с симптомами, были начаты эксперименты, предусматривающие инъекцию конструкций pAAV CB6 PI m*Glut1* (SEQ ID NO 35) мутантным мышам в возрасте 8 недель. Мыши *Glut1* DS в этом возрасте демонстрируют явные симптомы, с более низкими показателями на вращающемся барабане, чем у контрольных однопометных животных дикого типа. Соответственно, когорте мышей *Glut1* DS системно вводили основу или 1×10^{12} геномных копий AAV9-m*Glut1*. Все мыши хорошо переносили процедуру, что указывает на безопасность инъекция вируса взрослым грызунам. Молекулярные, клеточные и поведенческие анализы, подобные описанным выше, проводили для определения временных рамок, которые позволяют лечить/облегчать симптомы дефицита *Glut1*, а также любые временные рамки для обращения протекания фенотипа заболевания.

Уточнение терапевтического окна возможностей на модели *Glut1* DS.

Представленные данные демонстрируют, что опосредованное AAV9 восполнение белка *Glut1* (мышь) у новорожденных (ПРДЗ) мышей *Glut1* DS повышает экспрессию *Glut1*, смягчает гипогликемию, типично наблюдаемую при заболевании, восстанавливает размеры мозга и приводит к заметному улучшению моторных показателей. Напротив, восполнение *Glut1* в возрасте 8 недель не устраняет фенотип заболевания. Полученные результаты свидетельствуют о том, что существует ограниченное терапевтическое окно возможностей у модельных мышей *Glut1* DS, что, вероятно, будет отражать состояние человека. Кроме того, предварительные данные указывают на значительно пониженные уровни глюкозы СМЖ у мутантных мышей уже в возрасте 2 недель (мутанты: $23,25 \pm 3,77$ мг/дл, контроль: $53,33 \pm 5,20$ мг/дл, $P < 0,01$, *t* тест). Тем не менее, неясно, будет ли восстановление *Glut1* на этом этапе, до очевидного проявления фенотипа, давать терапевтический эффект.

Чтобы определить исход восполнения *Glut1* на этой ранней стадии заболевания - сродни лечению пациентов, которым был поставлен диагноз в детском возрасте, но у которых тем не менее безвредные эффекты дефицита *Glut1* не проявлялись во время младенчества, мутантным мышам будет систематически вводиться вектор pAAV9 CB6 PI m*Glut1* (SEQ ID NO 35). Вкратце, $\sim 10^{12}$ геномных копий терапевтического вектора основы в объеме ~ 50 мкл будут вводиться в височную вену 2-недельных мышей. Затем состояние животных будут оценивать с применением комплексной батареи молекулярных (анализ методом Вестерн-блоттинга, анализы методом К-ПЦР, уровни глюкозы в СМЖ и крови), томографических (ПЭТ-сканирование) и поведенческих анализов (тест на вращающихся барабанах, вертикальном шесте) для определения результата восстановления функционального белка на этой "ювенильной" стадии у мышей. Эти эксперименты будут дополнять результаты, полученные при лечении новорожденных (ПРДЗ), с одной стороны, и на модели взрослых животных (8 недель), с другой, и уточнять терапевтическое окно возможностей при *Glut1* DS.

Оценка сочетанных эффектов раннего лечения кетогенной диетой и позднего восполнения белка *Glut1* у модельных мышей *Glut1* DS.

Хотя ясно, что восстановление *Glut1* у взрослых мышей (8 недель) не уменьшало выраженности фенотипа *Glut1* DS, но, возможно, предварительное лечение этих мышей диетой с высоким содержанием жиров могло бы привести к более благоприятному исходу. Мыши на таких диетах более точно отображают когорту пациентов с *Glut1* DS старшего возраста, которые, возможно, пропустили идеальное для лечения терапевтическое окно, но, тем не менее, могут выиграть от позднего восполнения белка *Glut1* благодаря ранним защитным эффектам кетогенной диеты. Такие диеты снабжают мозг кетонами, альтернативным, хотя и несовершенным источником энергии, который проходит сквозь гематоэнцефаличе-

ский барьер с помощью монокарбоксильных переносчиков. Соответственно, в дополнение к нашим экспериментам на двухнедельных мышах мы будем изучать эффекты восстановления Glut1 у взрослых (6-8 недель) мутантов, которые получали (начиная с ПРД7) триглицерид тригептаноин 7С. Тригептаноин, который в настоящее время проходит клинические испытания при Glut1 DS, не только метаболизируется до ацетил-КоА для цикла ТКК, но также считается способным обеспечить основные анаплеротические субстраты для цикла, поскольку питательные вещества в конечном итоге разрушаются, чтобы обеспечить энергетические потребности клетки. Вкратце, этот эксперимент будет включать лечение мутантов (82 мг/г) или без тригептаноина до тех пор, пока им не будет введена конструкция AAV9-Glut1 (pAAV9 CB6 PI mGlut1). Затем состояние различных когорт мышей будет оцениваться, как описано выше, в качестве средства прогнозирования терапевтического результата восстановления экспрессии Glut1 у пациентов старшего возраста, получающих доступные в настоящее время терапевтические средства (кетогенная диета).

Оптимизация конструкций Glut1 для клинических испытаний.

Хотя до сих пор не наблюдалось никаких неблагоприятных эффектов экспрессии slc2a1 у мышей Glut1 DS, предварительные исследования небольшой выборки мышей дикого типа, которым вводили вектор pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO 35), показали снижение уровня глюкозы в СМЖ и крови. Это неожиданное событие может быть вызвано повышением экспрессии slc2a1 в печени, предпочтительном органе-мишени AAV9 и, как следствие, усилением переноса глюкозы в эту ткань. Конечным результатом является снижение уровня глюкозы в кровотоке, что отображается в состоянии гипогликемии. С учетом такого события конструкция hGlut1 (pAAV CB6 PI hGlut1) будет модифицирована таким образом, чтобы исключить высокие уровни ее экспрессии в печени - органе, в отношении которого AAV9 обладает особенно высокой тропностью (Zincarelli et al., 2008; Pacak et al., 2006). Для этого в конструкции будут введены сайты связывания (CC) для микроРНК - miR-122 (специфично экспрессирующиеся в гепатоцитах). Такая стратегия была успешно реализована ранее (см. Xie et al., 2011) и использует преимущество микроРНК-опосредованного эндонуклеолитического расщепления мРНК-мишеней, тем самым ограничивая экспрессию транскрипта в целевых тканях. Такие конструкции, проиллюстрированные на фиг. 1D и в табл. 1 (pAAV CB6 PI hGlut1-in3xmiR-122 CC, pAAV CB6 PI hGlut1-out3xmiR-122 CC, pAAV CB6 PI mGlut1-in3xmiR-122, pAAV CB6 PI mGlut1-out3xmiR-122) будут изучаться на подмножестве мышей вместе с оригинальными (немодифицированными) векторами экспрессии Glut1, с целью изучения каждого на предмет уровней экспрессии Glut1 и терапевтической эффективности. Повышенная склонность исходной конструкции вызывать гипогликемию будет указывать на преимущества применения новых конструкций Glut1-микроРНК-СС в последующих экспериментах и испытаниях.

Для оптимизации экспрессии тестовых конструкций, описанных в настоящем документе, не только в качестве средства снижения титров вируса во время производственного процесса, но также для решения проблем безопасности, связанных с большими концентрациями вируса, гены SLC2A1 и slc2a1 будут оцениваться с применением процесса оптимизации кодонов и свободно доступного программного обеспечения (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>). Кроме того, по мере необходимости в конструкции будут вводиться консенсусные последовательности Козака. Таким образом, любая из конструкций или элементов, описанных в табл. 1, может быть кодон-оптимизирована таким способом. Каждая из модифицированных конструкций будет тестироваться параллельно с родительскими конструкциями у мышей. Вкратце, конструкции будут вводиться системно через височную вену детенышам мыши ПРД3. Затем животных будут подвергать эвтаназии через две или три недели, и уровни белка для из каждой из конструкций определять методами к-ПЦР и Вестерн-блоттингом. Конструкции, обеспечивающие самые быстрые и высокие уровни экспрессии, будут рассматриваться для возможного применения в исследованиях на приматах, отличных от человека, и в конечном итоге для клинических испытаний.

Исследования на приматах, отличных от человека.

С целью определения биораспределения, экспрессии и токсичности выбранной(ых) нами конструкции(ий) на модели крупного млекопитающего, вирусный(ые) вектор(ы) будет вводиться когорте яванских макаков. Вкратце, 6 животным в ПРД1, ПРД90 и в возрасте 2 года будут системно вводить вектор AAV9 в дозе 5×10^{13} копий генома/кг. Для определения острой токсичности конструкции(ий) у животных будут брать образцы крови через 1, 3 и 7 дней после введения вектора. Кроме того, у животных будут брать образцы крови через 2, 3 и 4 недели после инъекции вектора. В каждом случае будут оцениваться важные параметры клинической химии и гематологии. Титры нейтрализующих антител к AAV9 будут контролироваться в образцах сыворотки с помощью количественного анализа нейтрализующих антител на основе трансдукции (Rapti et al., 2012), а присутствие трансген- или капсидспецифичных Т-клеток в МКИК будет оцениваться с применением методов окрашивания на основе метода иммуноферментных пятен, окрашивания внутриклеточных цитокинов и проточной цитометрии (Walker et al., 2001). В дополнение к упомянутым выше иммунологическим исследованиям три животных из каждой когорты будут подвергнуты эвтаназии на 4-й неделе для изучения гистопатологических показателей, биораспределения вектора и анализа экспрессии трансгена во всех основных системах органов. Дополнительно, эти эксперименты позволят изучить и сравнить иммунные ответы В- и Т-клеток на капсид или трансген в сыворотке, лимфоцитах и МКИК в начале против позднего периода после введения вируса. Для проведения долгосрочного исследования безопасности за состоянием оставшихся 3 животных в каждой группе будут

наблюдать в течение 3-месячного периода, в течение которого каждый месяц будут отбираться образцы крови для изучения показателей клинической химии и гематологии, как описано выше. Эти животные в конечном итоге будут подвергнуты эвтаназии через 3 месяца после инъекций с проведением анализов, описанных в исследованиях острой токсичности. Возможно, белок Glut1 человека, несмотря на гомологию ~99% с Glut1 яванского макака, будет вызывать агрессивный иммунный ответ. Чтобы исключить это, в тестовые конструкции будут введены два сайта связывания микроРНК для miR-142-3p и miR-155. Предварительные результаты независимого исследования показывают, что указанные микроРНК экспрессируются в антигенпрезентирующих клетках и, следовательно, подавляют экспрессию белков, транскрипты которых содержат сайты связывания с микроРНК. В совокупности, эти исследования будут способствовать возможному применению тестовых конструкций Glut1, описанных в настоящем документе, в клинических испытаниях.

Ссылки

- De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI. (1991). Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N. Engl. J. Med.*, 325, 703-709.
- Donnelly, M.L. et al. (2001). The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J. Gen. Virol.* 82, 1027–1041.

- Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M. and Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotech.* 27, 59-65.
- Pearson TS, Akman C, Hinton VJ, Engelstad K, De Vivo DC. (2013) Phenotypic spectrum of glucose transporter type 1 deficiency syndrome (Glut1 DS). *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 13, 342.
- De Giorgis V and Veggiotti, P. (2013) Glut1 deficiency syndrome 2013: Current state of the art. *Seizure* 22, 803-811.
- Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Mao X, Cheng J, Yoo J, Noebels JL, De Vivo DC (2006) A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1169-1179.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945.
- Seidner G, Alvarez MG, Yeh JI, O'Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, Wang D, Spinner NB, Birnbaum MJ, De Vivo DC (1998) GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat Genet.* 18, 188-191.
- Yang H, Wang D, Engelstad K, Bagay L, Wei Y, Rotstein M, Aggarwal V, Levy B, Ma L, Chung WK, De Vivo DC (2011) Glut1 deficiency syndrome and erythrocyte glucose uptake assay. *Ann Neurol* 70, 996-1005.
- Grieger JC, Samulski RJ (2005) Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 99, 119-145.
- Grieger JC, Samulski RJ (2012) Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol.* 507, 229-254.
- Kariya S, Re DB, Jacquier A, Nelson K, Przedborski S, Monani UR (2012) Mutant superoxide dismutase 1 (SOD1), a cause of amyotrophic lateral sclerosis, disrupts the recruitment of SMN, the spinal muscular atrophy protein to nuclear Cajal bodies. *Hum Mol Genet.* 21,3421-3434.
- Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM, Le TT, Morales PR, Rich MM, Burghes AH, Kaspar BK (2010) Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat. Biotech.* 28, 271-274.
- Fleming JO, Ting JY, Stohlman SA, Weiner LP (1983) Improvements in obtaining and characterizing mouse cerebrospinal fluid. Application to mouse hepatitis virus-induced encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 4,129-140.
- Gao, G.P., and Sena-Esteves, M. (2012). Introducing Genes into Mammalian Cells: Viral Vectors. In *Molecular Cloning, Vol 2: A Laboratory Manual* (M.R. Green and J. Sambrook eds.) pp. 1209-1313. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Rapti K, Louis-Jeune V, Kohlbrenner E, Ishikawa K, Ladage D, Zolotukhin S, Hajjar RJ, Weber (2012) Neutralizing antibodies against AAV serotypes 1, 2, 6, and 9 in sera of commonly used animal models. *Mol. Ther.* 20, 73-83.
- Goulder PJ, Addo MM, Altfeld MA, Rosenberg ES, Tang Y, Govender U, Mngqundaniso N, Annamalai K, Vogel TU, Hammond M, Bunce M, Coovadia HM, Walker BD (2001) Rapid definition of five novel HLA-A*3002-restricted human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes by elispot and intracellular cytokine staining assays. *J. Virol.* 75, 1339-1347.

Многие модификации и варианты реализации настоящего изобретения могут быть осуществлены без выхода за его пределы, как будет очевидно для специалистов в данной области техники. Объем изобретения определяется объемом прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, к которым применима указанная формула. Конкретные варианты реализации изобретения, описанные в настоящем документе, в том числе следующие примеры, предлагаются только с целью иллюстрации и не ограничивают объем изобретения.

Все ссылки, приведенные в настоящем документе, включены посредством ссылки в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация, запись в базе данных (например, последовательности Genbank или записи GenelD), патентная заявка или патент была специально и отдельно указана как включенная посредством ссылки. Настоящее заявление о включении посредством ссылки делается Заявителями в соответствии с 37 CFR §1.57(b)(1) как относящееся к каждой отдельной публикации, запись в базе данных (например, последовательности Genbank или записи GenelD), патентной заявке или патенту, каждый из которых четко идентифицирован в соответствии с 37 C.F.R. §1.57(b)(2), даже если рядом с такой ссылкой не приведено непосредственно специальное заявление о включении посредством ссылки. Включение специальных заявлений о включении посредством ссылки, если таковые имеются, в описание никоим образом не ослабляет действия настоящего общего заявления о включении посредством ссылки. Цитирование ссылок в настоящем документе не предназначено для признания того, что ссылка имеет отношение к предшествующим уровням техники, и не представляет собой никакого допущения относительно содержания или даты этих публикаций или документов.

Объем изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами реализации изобретения, описанными в настоящем документе. В действительности, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе будут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопроводительных графических материалов. Такие модификации охватываются прилагаемой формулой изобретения.

Предшествующее письменное описание считается достаточным для того, чтобы позволить специалисту в данной области техники внедрить изобретение. Различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны и проиллюстрированы в настоящем документе, будут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и находятся в объеме прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вектор (гAAV), способный проникать сквозь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит трансген, кодирующий Glut1, и промотор бета-актина курицы, выбранный из SEQ ID NO 31, 38, 45, 54, 62 и 70.

2. Рекомбинантный AAV по п.1, отличающийся тем, что трансген способен экспрессироваться в эндотелиальных клетках, выстилающих микрососуды мозга.

3. Рекомбинантный AAV по п.1, представляющий собой AAV8 или AAV9.

4. Рекомбинантный AAV по п.1, отличающийся тем, что Glut1 содержит SEQ ID NO 78 или 79.

5. Рекомбинантный AAV по п.1, дополнительно содержащий сайты связывания микроРНК, выбранные из SEQ ID NO 48, 56, 59, 64 и 73, где микроРНК ингибируют экспрессию трансгена, кодирующего Glut1, в тканях, отличных от тканей ЦНС.

6. Рекомбинантный AAV по п.5, дополнительно содержащий инвертированные концевые повторы (ИКП), фланкирующие сайты связывания микроРНК.

7. Композиция для восстановления экспрессии Glut1 у субъектов с дефицитом Glut1, содержащая рекомбинантный AAV по п.1.

8. Композиция по п.7, дополнительно содержащая фармацевтический носитель.

9. Способ восстановления транспорта Glut1 сквозь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантного AAV по п.1.

10. Способ лечения синдрома дефицита Glut1 у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантного AAV по п.1.

11. Способ облегчения у субъекта по меньшей мере одного из симптомов, связанных с синдромом дефицита Glut1, выбранных из гипогликорахии, приобретенной микроцефалии, атаксической и дистонической моторной дисфункции, причем способ включает введение субъекту эффективного количества рекомбинантного AAV по п.1.

12. Способ по пп.9, 10 или 11, отличающийся тем, что трансген способен экспрессироваться в эндотелиальных клетках, выстилающих микрососуды мозга.

13. Способ по пп.9, 10 или 11, отличающийся тем, что рекомбинантный AAV представляет собой AAV8 или AAV9.

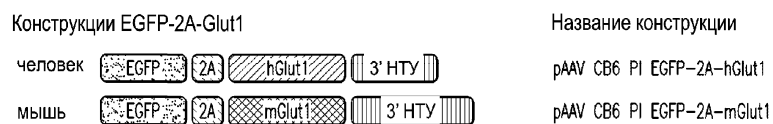
14. Способ по пп.9, 10 или 11, отличающийся тем, что Glut1 содержит SEQ ID NO 78 или 79.

15. Способ по пп.9, 10 или 11, отличающийся тем, что рекомбинантный AAV дополнительно со-

держит сайты связывания микроРНК, выбранные из SEQ ID NO 48, 56, 59, 64 и 73, где микроРНК ингибируют экспрессию трансгена, кодирующего Glut1, в тканях, отличных от тканей ЦНС.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что рекомбинантный AAV дополнительно содержит инвертированные концевые повторы (ИКП), фланкирующие сайты связывания микроРНК.

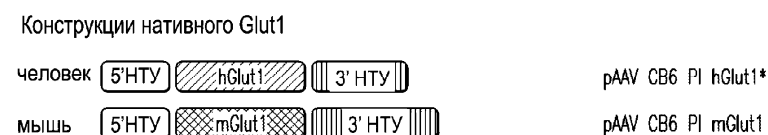
17. Способ по пп.9, 10 или 11, отличающийся тем, что рекомбинантный AAV находится в составе композиции, дополнительно содержащей фармацевтический носитель.



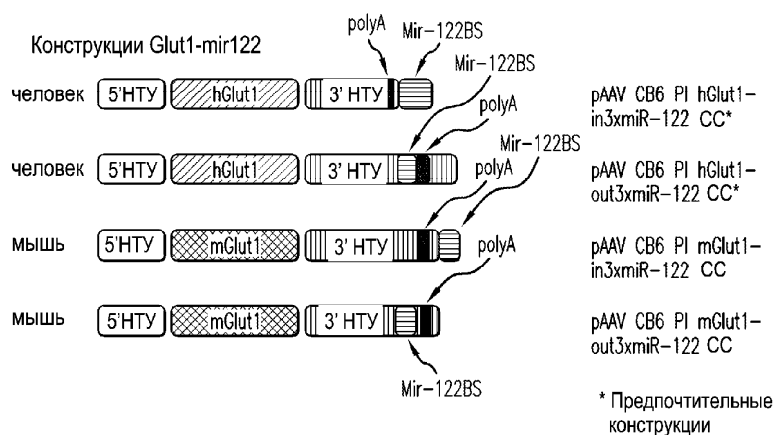
Фиг. 1А



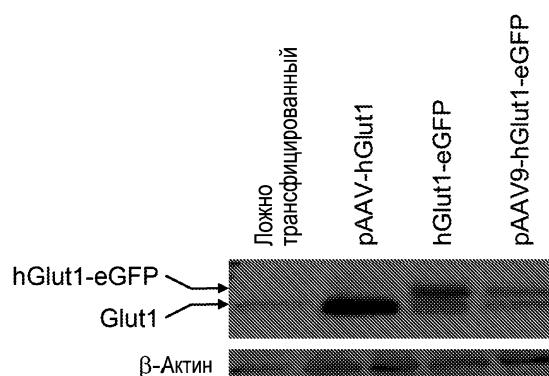
Фиг. 1В



Фиг. 1С

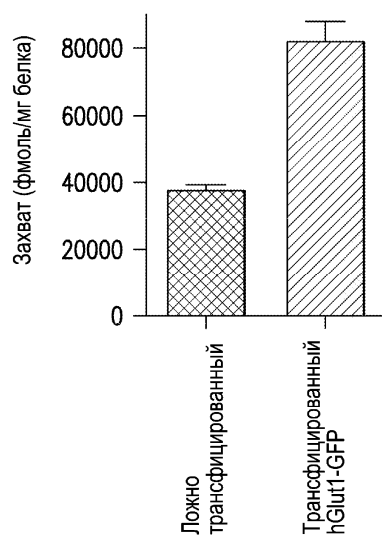


Фиг. 1D

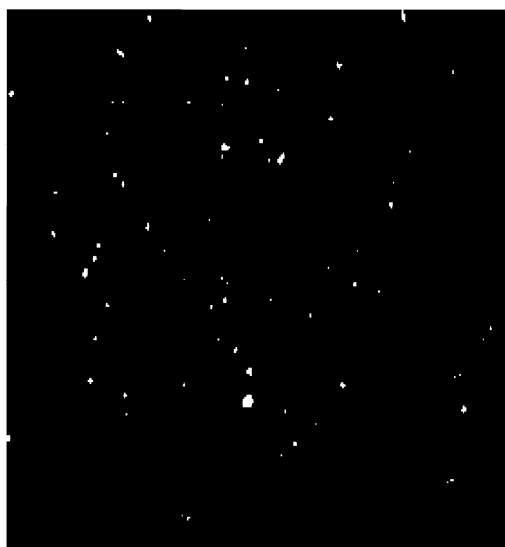


Фиг. 2А

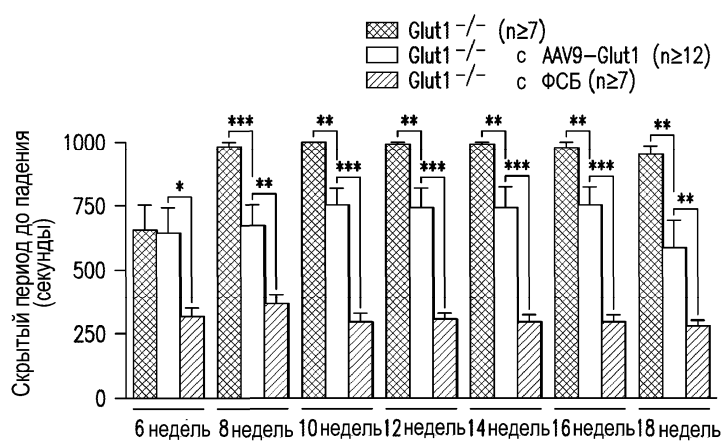
036051



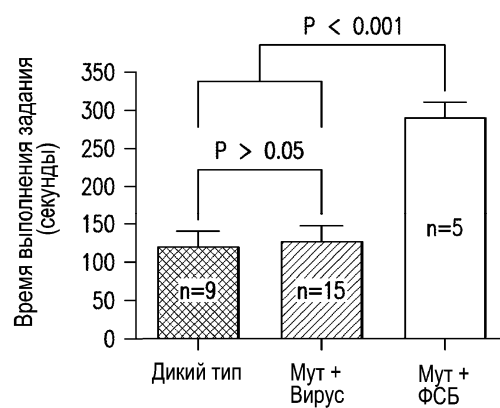
Фиг. 2В



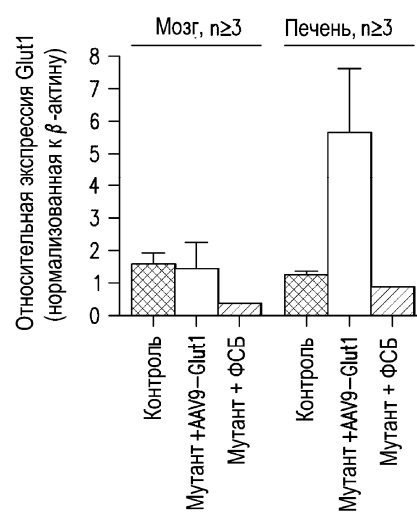
Фиг. 2С



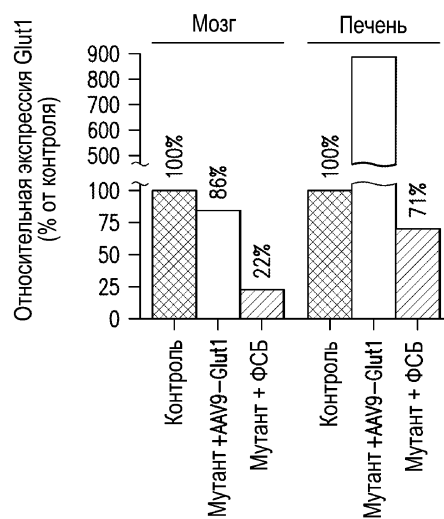
Фиг. 3А



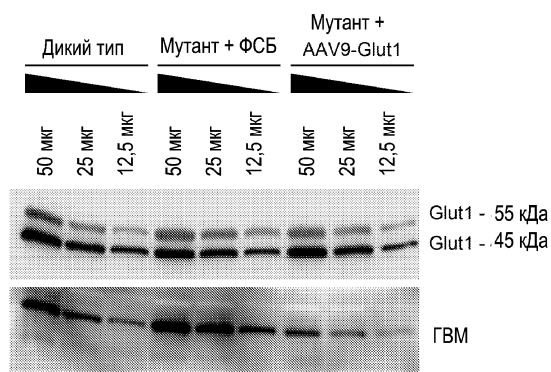
Фиг. 3В



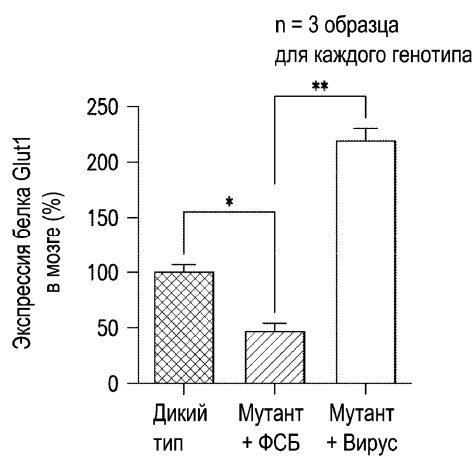
Фиг. 4А



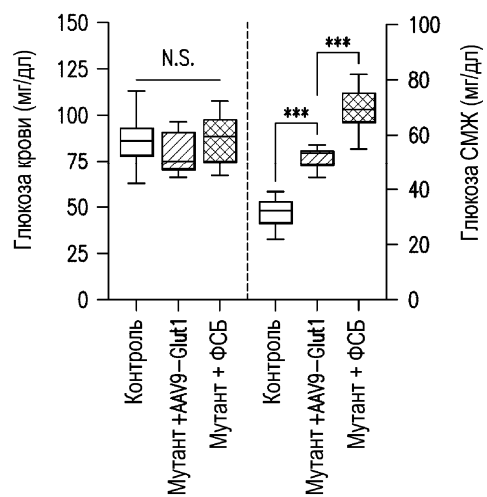
Фиг. 4В



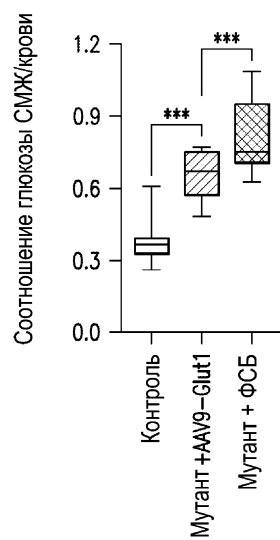
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 5С



Фиг. 5D

