

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992032** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.03.06

(51) Int. Cl. *C12N 15/864* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.02.27

(54) **КОМПОЗИЦИИ, ПРИГОДНЫЕ ПРИ ЛЕЧЕНИИ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ**

(31) 62/464,756; 62/515,902; 62/618,437

(32) 2017.02.28; 2017.06.06; 2018.01.17

(33) US

(86) PCT/US2018/019996

(87) WO 2018/160585 2018.09.07

(88) 2018.10.25

(71) Заявитель:

**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)**

(72) Изобретатель:

**Уилсон Джеймс М., Хиндерер
Кристиан, Катц Натан, Ван Цян (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе описан вектор гAAV, который имеет капсид AAVhu68 и по меньшей мере одну экспрессионную кассету в капсиде. По меньшей мере одна экспрессионная кассета содержит последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие функциональный белок SMN, и последовательности контроля экспрессии, которые направляют экспрессию последовательностей SMN в клетке-хозяине. Также представлены композиции, содержащие этот вектор гAAVhu68.SMN, и способы его применения для лечения у пациента спинальной мышечной атрофии.

A1

201992032

201992032

A1

КОМПОЗИЦИИ, ПРИГОДНЫЕ ПРИ ЛЕЧЕНИИ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Спинальная мышечная атрофия (SMA – Spinal muscular atrophy) – это нервно-мышечное заболевание, вызываемое мутациями в теломерном SMN1, гене, кодирующем повсеместно экспрессируемый белок (выживание моторного нейрона – SMN – survival of motor neuron), участвующий в сплайсном биогенезе. SMA является аутосомно-рецессивным нарушением, вызванным мутациями или делецией гена SMN1. Было показано, что наличие функционирующего гена SMN1 спасает фенотип. См., например, Tanguy et al., Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8(36) (July 2015).

Классификация Международного консорциума SMA определяет несколько степеней тяжести фенотипа SMA в зависимости от возраста проявления и основных этапов развития моторики. Предложено обозначение SMA 0 для отображения пренатального проявления и тяжелых контрактур суставов, лицевой диплегии и дыхательной недостаточности. SMA типа 1 (или I), болезнь Верднига-Гоффмана I, является наиболее тяжелой постнатальной формой с проявлением в течение 6 месяцев после рождения. Пациенты не могут сидеть и имеют серьезные нарушения дыхания. SMA типа 2 (или II) является промежуточной формой с проявлением в течение первых 2 лет; дети могут сидеть, но не могут ходить. Клиническое течение является различным. Тип 3 (или III) (также называемый болезнью Кугельберга-Веландера) начинается после 2 лет и обычно имеет хроническое развитие. Дети могут стоять и ходить без посторонней помощи по меньшей мере в младенческом возрасте. Форма для взрослых (тип 4 или IV) – самая легкая, проявляется в возрасте после 30 лет; было зарегистрировано несколько случаев заболевания и его распространенность точно не известна.

Многие наследственные и приобретенные нервно-мышечные заболевания включают дегенерацию нижних моторных нейронов. Одним из наиболее распространенных и разрушительных примеров является спинальная мышечная атрофия (SMA), наследственный дефицит выживания белка моторных нейронов (SMN), характеризующийся избирательной смертью нижних моторных нейронов, прогрессирующей

слабостью и часто смертью в раннем детстве. По неясным причинам дефицит SMN приводит к избирательной токсичности для нижних моторных нейронов, что приводит к прогрессирующей потере нейронов и мышечной слабости. Тяжесть заболевания изменяется числом копий центромерного дублирования гомологичного гена (SMN2), который несет мутацию сайта сплайсинга, что приводит к образованию только небольших количеств полноразмерного транскрипта SMN. Пациенты, которые имеют 1–2 копии SMN2, страдают тяжелой формой SMA, характеризующейся появлением в первые несколько месяцев жизни и быстрым прогрессированием дыхательной недостаточности. Пациенты с 3 копиями SMN2 обычно демонстрируют ослабленную форму заболевания, обычно проявляющуюся после шестимесячного возраста. Хотя многие никогда не приобретают способность ходить, у них редко происходит дыхательная недостаточность и они часто доживают до зрелого возраста. Пациенты с четырьмя копиями SMN2 могут не проявлять заболевания до зрелого возраста с постепенным появлением мышечной слабости. В настоящее время нет лечения SMA, кроме паллиативной помощи.

Четкая корреляция между экспрессией SMN и тяжестью заболевания, а также относительно небольшим количеством пораженных клеток делает SMA превосходной мишенью для генной терапии. Предыдущие исследования показали, что фенотип SMA можно воспроизвести на моделях трансгенных мышей, используя системную инъекцию векторных серотипов AAV со способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер. См., например, Tanguy et al., *Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice*, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8(36) (July 2015). Passini et al., *HGT*, 2014, сообщили о дозозависимом увеличении выживаемости до 200 дней у мышей SMN Δ 7 с использованием вектора scAAV9.GusB.SMN1. Meyer et al., *Molecular Therapy*, 2014, сообщили о дозозависимом увеличении выживаемости до 450 дней с использованием вектора scAAV9.CBA.SMN1 в дозировках от $2,7 \times 10^9$ GC/детеныша до $3,3 \times 10^{10}$ GC/детеныша. Однако более низкие дозы показали очень небольшое улучшение. См. также, Passini et al, *JCI*, 2010 и Passini et al, *Sci Trans Med*, 2011. Каждый из этих документов включен в данный документ посредством ссылки.

Эффективное лечение SMA все еще необходимо.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, содержащий капсид AAVhu68 и по меньшей мере одну экспрессионную кассету, причем по меньшей мере одна экспрессионная кассета содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие функциональный белок SMN, и последовательности, контролирующие экспрессию, которые направляют экспрессию последовательностей SMN в клетке-хозяине, при этом капсид AAVhu68 содержит популяцию капсидных белков AAVhu68vp1, имеющих аминокислотную последовательность, независимо выбранную из продуцируемых белков, кодируемых SEQ ID NO: 7, или имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 имеет гетерогенную популяцию белков vp1. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 имеет гетерогенную популяцию белков vp2. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 имеет гетерогенную популяцию белков vp3. В одном варианте осуществления изобретения последовательность, кодирующая капсидный белок AAVhu68, имеет последовательность SEQ ID NO: 7. В одном варианте осуществления изобретения последовательность, кодирующая SMA, имеет последовательность SEQ ID NO: 1.

Кроме того, предложен вектор rAAV, содержащий капсид AAVhu68, в который упакована молекула нуклеиновой кислоты, содержащая 5'-ITR AAV, промотор CB7, интрон, последовательности нуклеиновых кислот SEQ ID NO:1, полиА и AAV 3' последовательность инвертированного концевого повтора, где капсид AAVhu68 содержит популяцию белков vp1, популяцию vp2 и популяцию белков vp3, причем капсидные белки AAVhu68 имеют аминокислотные последовательности, независимо выбранные из белков, продуцируемых SEQ ID NO: 7 капсидных белков, имеющих аминокислотную последовательность vp1, vp2 и/или vp3 SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 имеет гетерогенную популяцию белков vp1. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 имеет гетерогенную популяцию белков vp2. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 имеет гетерогенную популяцию белков vp3.

Предложена фармацевтическая композиция, которая содержит вектор AAVhu68, такой как описанный выше. Помимо по меньшей мере

одного векторного исходного набора, композиция дополнительно содержит по меньшей мере один из фармацевтически приемлемого носителя, эксципиента и/или консерванта.

Кроме того, предоставлен способ лечения спинальной мышечной атрофии у субъекта, нуждающегося в этом, с использованием вектора rAAVhu68.SMA или другого средства доставки для сконструированного hSMN, представленного в данном документе. В определенных вариантах осуществления изобретения композиции, представленные в данном документе, можно вводить интратекально.

В некоторых вариантах осуществления изобретения rAAVhu68.SMN1 предоставляется, как описано в данном документе, или как композиция для применения при лечении спинальной мышечной атрофии у пациента, необязательно в совместной терапии. В определенных вариантах осуществления изобретения пациент имеет SMA типа 3. В определенных вариантах осуществления изобретения композиция составлена для интратекальной доставки.

Применение rAAVhu68.SMA, как описано в данном документе, или композиции, содержащей его, для лечения пациента с SMA обеспечивается, необязательно, в режиме совместного лечения. Такая композиция может быть составлена для интратекальной доставки.

Другие аспекты и преимущества изобретения будут легко очевидны из следующего подробного описания изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А схематично представлен геном вектора AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG. ITR представляет собой инвертированный концевой повтор AAV2. CB7 представляет собой куриный бета-актиновый промотор с энхансером цитомегаловируса. RBG полиА представляет собой сигнал полиаденилирования бета-глобина кролика.

На Фиг. 1В-1С приведено выравнивание нативного hSMN1, вариант D (номер доступа NM_000344.3) (SEQ ID NO: 3) в сравнении с кодон-оптимизированной последовательностью, описанной в данном документе (SEQ ID NO: 1).

На Фиг. 2 показана оценка трансдукции в головном и спинном мозге с помощью иммуногистохимического анализа (IHC) и гибридизации *in situ* (ISH). Иммуногистохимический анализ SMN1 был выполнен на срезах коры головного мозга, мозжечка и спинного мозга, и репрезентативные изображения отображаются на трех верхних вкладках. ISH для кодон-оптимизированной hSMN1

рибонуклеиновой кислоты (РНК) проводили на срезах коры головного мозга, и репрезентативные результаты показаны на нижней вкладке. Образцы собирали у мышей SMN Δ 7 (KO), получавших или не получавших 3×10^{10} GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG на детеныша. Положительными контролями служили однопометные животные дикого типа (ДТ) и гетерозиготные (Гет.).

На Фиг. 3А представлена кривая выживаемости мышей SMN Δ 7 (KO), получавших или не получавших 3×10^{10} или $8,76 \times 10^{10}$ GC/детеныша AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG. Контролем служили однопометные мыши дикого типа (ДТ)/гетерозиготные (Гет.), а также мыши, которым вводили PBS.

Фиг. 3В представляет собой таблицу статистического анализа кривой выживания, описанной на Фиг. 3А. Медиана выживаемости рассчитана и приведена.

Фиг. 4А представляет собой линейный график массы тела мышей SMN Δ 7 (KO), получавших 3×10^{10} или $8,76 \times 10^{10}$ GC/детеныша векторов AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG. Контролем служили однопометные мыши дикого типа (ДТ)/гетерозиготные (Гет.), а также мыши, которым вводили PBS.

Фиг. 4В представляет собой график массы тела в постнатальный день 15 мышей SMN Δ 7 (KO), получавших 3×10^{10} или $8,76 \times 10^{10}$ GC/детеныша AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG. Контролем служили однопометные мыши дикого типа (ДТ)/гетерозиготные (Гет.), а также мыши, которым вводили PBS.

Фиг. 4С представляет собой график массы тела в постнатальный день 30 мышей SMN Δ 7 (KO), получавших 3×10^{10} или $8,76 \times 10^{10}$ GC/детеныша AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG. Контролем служили однопометные животные дикого типа (ДТ)/гетерозиготные (Гет.).

На Фиг. 4D–4J представлены линейные графики массы тела после нормализации по полу. Эксперимент проводился каждые два дня с постнатального дня 3 по 13 или 15 на мышах SMN Δ 7 (KO), получавших 3×10^{10} или $8,76 \times 10^{10}$ GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG на детеныша. Однопометных мышей дикого типа/гетерозиготных (ДТ) и мышей, которым инъецировали PBS, использовали в качестве контролей. *P*-значение было рассчитано с помощью статистического анализа и указано на фигуре.

На Фиг. 5А показана система подсчета баллов, используемая в тесте подвешивания за задние конечности.

На Фиг. 5В представлены графики оценки задних конечностей,

записанные каждые два дня с постнатального дня 3 по 13 у мышей SMNΔ7 (KO), получавших 3×10^{10} или $8,76 \times 10^{10}$ GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG на детеныша. Контролем служили однопометные мыши дикого типа (ДТ)/гетерозиготные (Гет.), а также мыши, которым вводили PBS.

На Фиг. 6A–6C представлены графики, показывающие время, которое животному потребовалось, чтобы вернуться в свое нормальное положение в тесте рефлекса переворачивания. Эксперимент проводился каждые два дня с постнатального дня 7 по 17 на мышах SMNΔ7 (KO), получавших 3×10^{10} или $8,76 \times 10^{10}$ GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG на детеныша. Контролем служили однопометные мыши дикого типа (ДТ)/гетерозиготные (Гет.), а также мыши, которым вводили PBS.

На Фиг. 6D–6J представлены графики, показывающие время, которое животному потребовалось, чтобы вернуться в свое нормальное положение в тесте рефлекса переворачивания после нормализации по полу. Эксперимент проводился каждые два дня с постнатального дня 7 по 17 на мышах SMNΔ7 (KO), получавших 3×10^{10} или $8,76 \times 10^{10}$ GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG на детеныша. Однопометных мышей дикого типа/гетерозиготных (ДТ) и мышей, которым инъецировали PBS, использовали в качестве контролей. Р-значение было рассчитано с помощью статистического анализа и указано на фигуре.

Фиг. 7 представляет собой изображение устройства для интрацистернальной доставки, включая опциональную проводниковую иглу для коаксиального способа введения, которая включает шприц объемом 10 куб. см с вектором, предварительно наполненный промывочный шприц объемом 10 куб. см., набор удлинителя с T-образным соединителем, спинальную иглу 22G × 5", дополнительную проводниковую иглу 18G × 3,5".

На Фиг. 8A представлено выравнивание, показывающее аминокислотную последовательность последовательностей капсидных vp1, кодируемых последовательностями нуклеиновых кислот Фиг. 8B–8D. Выравнивание включает белок vp1 AAVhu68 [SEQ ID NO: 8], с AAV9 [SEQ ID NO: 16], AAVhu31 (отмечен как hu.31 в выравнивании) [SEQ ID NO: 18], и AAVhu32 (отмечен как hu.32 в выравнивании) [SEQ ID NO: 19]. По сравнению с AAV9, AAVhu31 и AAVhu32 были обнаружены как критические две мутации (A67E и A157V) в AAVhu68 и обведены кружком на фигуре.

На Фиг. 8B–8D представлено выравнивание последовательности

нуклеиновой кислоты, кодирующей vp1 капсида AAVhu68 [SEQ ID NO: 7], с AAV9 [SEQ ID NO: 22], AAVhu31 [SEQ ID NO: 20] и AAVhu32 [SEQ ID NO: 21].

На Фиг. 9А–9В представлены графики, показывающие результаты мониторинга массы у взрослых мышей дикого типа (ГЕТ./ДТ, Фиг. 9А) или мышей SMNΔ7 (КО, Фиг. 9В), получавших ICV с AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG в различных дозах (1×10^9 GC, ДТ, n=7, КО, n=1; 3×10^9 GC, ДТ, n=7, КО, n=1; 1×10^{10} GC, ДТ, n=3, КО, n=5; 3×10^{10} GC, ДТ, n=1, КО, n=1 или 7×10^{10} GC, ДТ, n=5, КО, n=3). Животные, которым инъецировали PBS (ДТ, n=3; КО, n=4), представлены в качестве контроля.

На Фиг. 10А–10В представлены графики, показывающие результаты теста рефлекса переворачивания у взрослых мышей дикого типа (ГЕТ./ДТ, Фиг. 10А) или мышей SMNΔ7 (КО, Фиг. 10В), получавших ICV с AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG в различных дозах (1×10^9 GC, ДТ, n=7, КО, n=1; 3×10^9 GC, ДТ, n=7, КО, n=1; 1×10^{10} GC, ДТ, n=3, КО, n=5; 3×10^{10} GC, ДТ, n=1, КО, n=1 или 7×10^{10} GC, ДТ, n=5, КО, n=3). Животные, которым инъецировали PBS (ДТ, n=3; КО, n=5), представлены в качестве контроля.

На Фиг. 11А–11Н представлены графики, показывающие клиническую патологию, химический анализ СМЖ и цитологический анализ СМЖ у взрослых макак-резусов, которые интратекально получали AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG, как описано в примере 10.

На Фиг. 12А–12В представлено количественное определение трансдукции моторных нейронов с помощью ISH (Фиг. 12А) и IHC (Фиг. 12В) у взрослых макак-резусов, которые интратекально получали AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG, как описано в примере 10. Для подтверждения расположения иглы в мостомозжечковой цистерне (интрамостомозжечковая цистерна; ICM) или в люмбальной цистерне (люмбальная пункция; LP) использовали флюороскопический контроль направления и контрастный материал. Общий объем инъекции составлял 1,0 мл для группы ICM (n=3) и 2,5 мл (n=4) или 5,0 мл (n=4) для групп LP. Через один месяц после инъекции животных умерщвляли и количественно определяли трансдукцию моторных нейронов в срезах спинного мозга путем гибридизации *in situ* (ISH) для транскрипционной мРНК и иммуногистохимического анализа (IHC) для белка SMN человека.

На Фиг. 13 показано биораспределение у взрослых макак-резусов, которые интратекально получали AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG, как описано в примере 10.

На Фиг. 14А-14В представлены результаты мониторинга массы у взрослых мышей C57BL/6J, получавших ICV с AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG, как описано в примере 9. На Фиг. 14А представлены результаты мониторинга массы у самок. На Фиг. 14В представлены результаты мониторинга массы у самцов.

На Фиг. 15А-15В показана технологическая схема получения вектора AAVhu68.SMN.

На Фиг. 16А-16Е представлены графики, показывающие резкое повышение уровня трансаминаз после внутривенного введения вектора AAV, экспрессирующего человеческий SMN, приматам, отличным от человека. На Фиг. 16А представлена схема исследования, описанная в примере 14. Фиг. 16В представляет график сывороточного АЛТ. Фиг. 16С представляет график сывороточного АСТ. Фиг. 16D представляет график сывороточной щелочной фосфатазы. Фиг. 16Е представляет график общего сывороточного билирубина. Внеплановые лабораторные оценки были выполнены для всех животных на 5-й день исследования после того, как у животного 16С176 развилась острая печеночная недостаточность, требующая эвтаназии. АСТ не измерялся на 5-й день исследования для животных 16С116 и 16С215. Пунктирные линии обозначают лабораторный эталонный диапазон.

На Фиг. 17А-17D представлены репрезентативные изображения ИНС, показывающие гистопатологические данные печени для животного 16С176. Массивный острый гепатоцеллюлярный некроз (Фиг. 17А) с отложением фибрина в синусоидальных капиллярах (Фиг. 17В, стрелки) и острый фибриновый тромб (Фиг. 17С) в воротных венах (гематоксилин и эозин; масштабная шкала=10 мкм (Фиг. 17А и 17С), 50 мкм (Фиг. 17В)). Иммуногистохимический анализ для фибриногена показывает заметное перипортальное отложение фибрина в синусоидальных капиллярах (Фиг. 17D) (фибриноген ИНС, масштабная шкала представляет 100 мкм (Фиг. 17D)).

На Фиг. 18А-18D представлены репрезентативные гистопатологические данные по нервной системе у новорожденных NHR, получавших внутривенный (в/в) AAVhu68, экспрессирующий SMN человека через 28 дней после инъекции. У обоих животных была аксонопатия дорсального тракта белого вещества спинного мозга (Фиг. 18А). Дорсальная аксонопатия обычно была двусторонней и характеризовалась расширенными миелиновыми оболочками с миеломакрофагами и без них, что согласуется с дегенерацией

аксонов. Ганглии дорсальных корешков спинного мозга (Фиг. 18В) демонстрируют минимальную или легкую дегенерацию тел нейронных клеток, характеризующуюся центральным хроматолизом, сателлитозом и инфильтратами мононуклеарных клеток, которые окружают и проникают в тела нейронных клеток (нейрофагия). Аналогичная аксонопатия наблюдалась в периферических нервах задней конечности (седалищный нерв, Фиг. 18С) и передней конечности (срединный нерв, Фиг. 18D). Животное (16С176), которое было умерщвлено на 5-й день по поводу острой печеночной недостаточности, не обнаружило никаких признаков в нервной системе. (Окрашивание гематоксилином и эозином; масштабная шкала=200 мкм (Фиг. 18А), 100 мкм (Фиг. 18В-18D).)

На Фиг. 19 представлено биораспределение векторов у макак-резус. Макаки-резус, получавшие внутривенно AAVhu68, экспрессирующий человеческий SMN, были умерщвлены через 28 дней после инъекции, за исключением животного 16С176, у которого развились печеночная недостаточность и шок и которое было умерщвлено через 5 дней после введения вектора. Векторные геномы были обнаружены в образцах ДНК ткани с помощью количественной ПЦР. Значения выражены в виде копий векторного генома (GC – genome copies) на диплоидный геном хозяина. DRG=ганглии дорсальных корешков. Данные приведены для четырех долей печени (каудальная, левая, средняя и правая).

На Фиг. 20А-20G показана экспрессия SMN у макак-резус, РНК SMN человека была обнаружена с помощью ISH в печени (Фиг. 20А). Печень окрашивали контрольными зондами на альбумин (Фиг. 20В) и GFP (Фиг. 20С). Экспрессирующие SMN клетки были идентифицированы в спинном мозге с помощью ISH (Фиг. 20D). Моторные нейроны были идентифицированы с помощью ChAT ISH (Фиг. 20Е). С помощью SMN ISH в головном мозге были обнаружены редкие участки трансдуцированных нейронов (Фиг. 20F, окрашивание DAPI ядер). Процент ChAT+ моторных нейронов, трансдуцированных на каждом уровне спинного мозга, определяли количественно (Фиг. 20G). Столбики ошибок=SEM.

На Фиг. 21А-21D представлены репрезентативные гистопатологические данные о поросятах, которые получали внутривенно AAVhu68, экспрессирующий SMN человека, в возрасте 7 и 30 дней. В обеих группах наблюдалась аксонопатия дорсального тракта белого вещества спинного мозга (Фиг. 21А). Дорсальная аксонопатия была двусторонней и характеризовалась расширенными

миелиновыми оболочками с миеломакрофагами и без них, что согласуется с дегенерацией аксонов. Ганглии дорсальных корешков спинного мозга (Фиг. 21В) демонстрируют разную степень дегенерации тел нейронных клеток, характеризующуюся центральным хроматолизом, сателлитозом и инфильтратами мононуклеарных клеток, которые окружают и проникают в тела нейронных клеток (нейронофагия). Подобная аксонопатия наблюдалась в различной степени в периферических нервах задней конечности (седалищный нерв, Фиг. 21С) и передней конечности (срединный нерв, Фиг. 21D) у большинства поросят. (Гематоксилин и эозин; масштабная шкала=200 мкм (Фиг. 21А), 100 мкм (Фиг. 21В–21D).)

На Фиг. 22 представлено биораспределение векторов у поросят. Новорожденных поросят, получавших внутривенную инъекцию AAVhu68, экспрессирующего SMN человека, умерщвляли через 13–14 дней после инъекции. Векторные геномы были обнаружены в образцах ДНК ткани с помощью количественной ПЦР. Значения выражены в виде копий векторного генома (GC) на диплоидный геном хозяина. DRG=ганглии дорсальных корешков. Данные приведены для четырех долей печени (каудальная, левая, средняя и правая).

На Фиг. 23А–23F представлены репрезентативные изображения, показывающие экспрессию SMN в спинном мозге поросят. РНК SMN человека была обнаружена с помощью ISH в сегментах шейного (Фиг. 23А), грудного (Фиг. 23В) и поясничного (Фиг. 23С) отделов спинного мозга. Моторные нейроны были идентифицированы с помощью ChAT ISH в соответствующих сегментах (Фиг. 23D–23F). Показаны репрезентативные изображения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе представлен рекомбинантный вектор AAVhu68, имеющий капсид AAVhu68 и нуклеиновую кислоту, кодирующую ген выживания моторного нейрона (SMN) под контролем регуляторных последовательностей, управляющих его экспрессией, у пациентов, нуждающихся в этом. Капсид rAAVhu68 содержит белки, независимо имеющие аминокислотную последовательность, полученную из SEQ ID NO: 7, и/или имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Предоставляются композиции, содержащие эти векторы, а также применение этих векторов в композициях для лечения пациентов с SMA. Хотя в этих примерах основное внимание уделяется лечению SMA 3 (иногда называемой болезнью Кугельберга–Веландера), использование этих rAAV векторов отдельно или в сочетании с другими видами сопутствующей терапии предполагается

для SMA типов 1, 2 или 4. SMA можно диагностировать с помощью анализа крови на делеционную мутацию в гене SMN1 в хромосоме 5. Для диагностики могут использоваться дополнительные исследования мышц, такие как электромиограмма или биопсия мышц.

I. AAV

Используемый в данном документе термин «клада» в том смысле, как он относится к группам AAV, относится к группам AAV, которые филогенетически связаны друг с другом, как определено с использованием алгоритма Neighbor-Joining по бутстреп-значению по меньшей мере 75% (по меньшей мере 1000 повторов) и величине расстояния коррекции Пуассона не более чем 0,05, на основе выравнивания аминокислотной последовательности vp1 AAV. Алгоритм Neighbor-Joining был описан в литературе. См., например, M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, New York (2000)). Доступны компьютерные программы, которые можно использовать для реализации этого алгоритма. Например, программа MEGA v2.1 реализует модифицированный метод Ней-Годжобори. Используя эти методики и компьютерные программы, а также последовательность капсидного белка AAV vp1, специалист в данной области может легко определить, содержится ли выбранный AAV в одной из указанных в данном документе клад, в другой кладе или находится за пределами этих клад. См., например, G Gao, et al, *J Virol*, 2004 Jun; 78(10: 6381-6388, который идентифицирует клады А, В, С, D, Е и F и предоставляет последовательности нуклеиновых кислот нового AAV, регистрационные номера GenBank от AY530553 до AY530629. См., также, WO 2005/033321.

Используемый в данном документе термин «капсид AAV9» представляет собой самоорганизующийся капсид AAV, состоящий из множества белков vp AAV9. Белки vp AAV9 обычно экспрессируются как альтернативные варианты сплайсинга, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 22, или последовательность на по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% соответствующая ей, которая кодирует аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 16 (доступ GenBank: AAS99264). Эти варианты сплайсинга приводят к белкам различной длины SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления изобретения «капсид AAV9» включает в себя AAV, имеющий аминокислотную

последовательность, которая на 99% идентична AAS99264 или на 99% идентична SEQ ID NO: 16. См., также US7906111 и WO 2005/033321. Используемые в данном документе «варианты AAV9» включают варианты, описанные, например, в WO2016/049230, US 8927514, US 2015/0344911 и US 8734809.

rAAVhu68 состоит из капсида AAVhu68 и векторного генома. Капсид AAVhu68 представляет собой совокупность гетерогенной популяции белков vp1, гетерогенной популяции белков vp2 и гетерогенной популяции белков vp3. Используемый в данном документе, когда используется для обозначения капсидных белков vp, термин «гетерогенный» или любая его грамматическая вариация относится к популяции, состоящей из элементов, которые не являются одинаковыми, например, имеющие мономеры (белки) vp1, vp2 или vp3 с различными модифицированными аминокислотными последовательностями. SEQ ID NO: 8 обеспечивает закодированную аминокислотную последовательность белка vp1 AAVhu68. См. также предварительные патентные заявки США №№ 62/614,002, 62/591,002 и 62/464,748, каждая из которых озаглавлена «Новый вектор аденоассоциированного вируса (AAV) клады F и его применение», и которые включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Капсид AAVhu68 содержит субпопуляции в белках vp1, в белках vp2 и в белках vp3, которые имеют модификации от предсказанных аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 8. Эти субпопуляции включают, как минимум, определенные дезамидированные остатки аспарагина (N или Asn). Например, некоторые субпопуляции содержат по меньшей мере одно, два, три или четыре сильно дезамидированных аспарагинов (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 8 и необязательно дополнительно содержат другие дезамидированные аминокислоты, где дезамидирование приводит к изменению аминокислоты и другим необязательным модификациям. SEQ ID NO: 26 обеспечивает аминокислотную последовательность модифицированного капсида AAVhu68, иллюстрирующая положения остатков, которые могут быть дезамидированы или модифицированы иным образом.

Используемый в данном документе термин «субпопуляция» белков vp относится к группе белков vp, которая имеет по меньшей мере одну общую определенную характеристику и которая состоит по меньшей мере из от одного члена группы до менее чем всех членов контрольной группы, если не указано иное. Например,

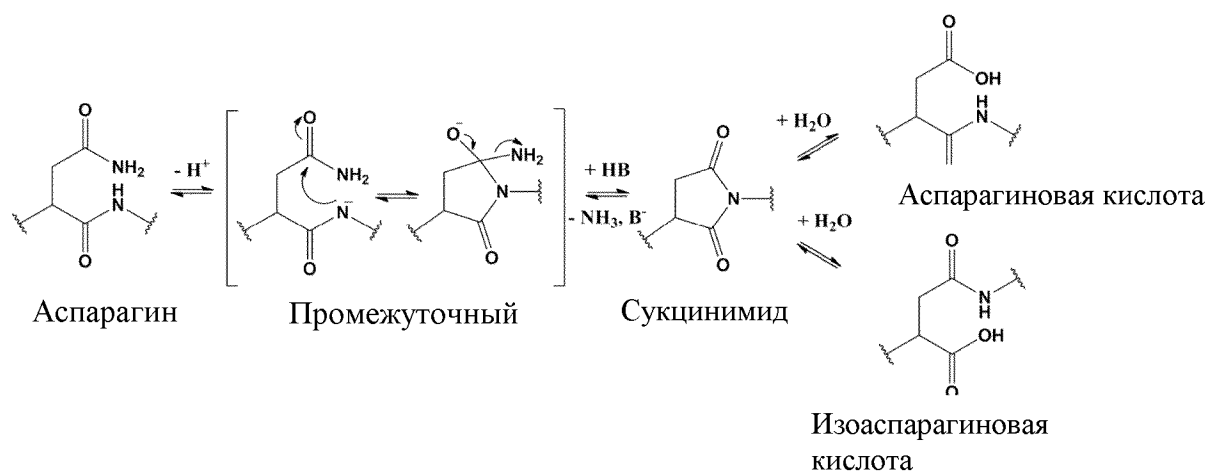
«субпопуляция» белков vp1 представляет собой по меньшей мере один (1) белок vp1 и менее чем все белки vp1 в собранном капсиде AAV, если не указано иное. «Субпопуляция» белков vp3 может быть от одного (1) белка vp3 до менее чем всех белков vp3 в собранном капсиде AAV, если не указано иное. Например, белки vp1 могут быть субпопуляцией белков vp; белки vp2 могут представлять собой отдельную субпопуляцию белков vp, а vp3 представляют собой еще одну субпопуляцию белков vp в собранном капсиде AAV. В другом примере белки vp1, vp2 и vp3 могут содержать субпопуляции, имеющие различные модификации, например, по меньшей мере один, два, три или четыре сильно дезамидированных аспарагина, например, в парах аспарагин-глицин.

Если не указано иное, термин «сильно дезамидированный» относится к по меньшей мере 45% дезамидирования, по меньшей мере 50% дезамидирования, по меньшей мере 60% дезамидирования, по меньшей мере 65% дезамидирования, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 97%, 99%, вплоть до около 100% дезамидирования в положении эталонной аминокислоты по сравнению с предсказанной аминокислотной последовательностью в положении эталонной аминокислоты (например, по меньшей мере 80% аспарагинов в аминокислоте 57 SEQ ID NO: 8 могут быть дезамидированы из расчета общего количества белков vp1 или 20% аспарагинов в аминокислоте 409 SEQ ID NO: 8 могут быть дезамидированы из расчета общего количества белков vp1, vp2 и vp3). Такие проценты могут быть определены с использованием анализа на основе 2D-геля, методов масс-спектрометрии или других подходящих методов.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что дезамидирование по меньшей мере сильно дезамидированных остатков в белках vp в капсиде AAVhu68 в основном является неферментативным по природе, вызванным функциональными группами в капсидном белке, которые дезамидируют выбранные аспарагины и, в меньшей степени, глутаминовые остатки. Эффективная сборка капсида из большинства дезамидированных белков vp1 указывает, что либо эти события происходят после сборки капсида, либо что дезамидирование в отдельных мономерах (vp1, vp2 или vp3) хорошо переносится структурно и в значительной степени не влияет на динамику сборки. Обширное дезамидирование в VP1-уникальном участке (VP1-u) (~ ак 1-137), который обычно считается

расположенным внутри до входа в клетку, позволяет предположить, что дезамидирование VP может происходить до сборки капсида.

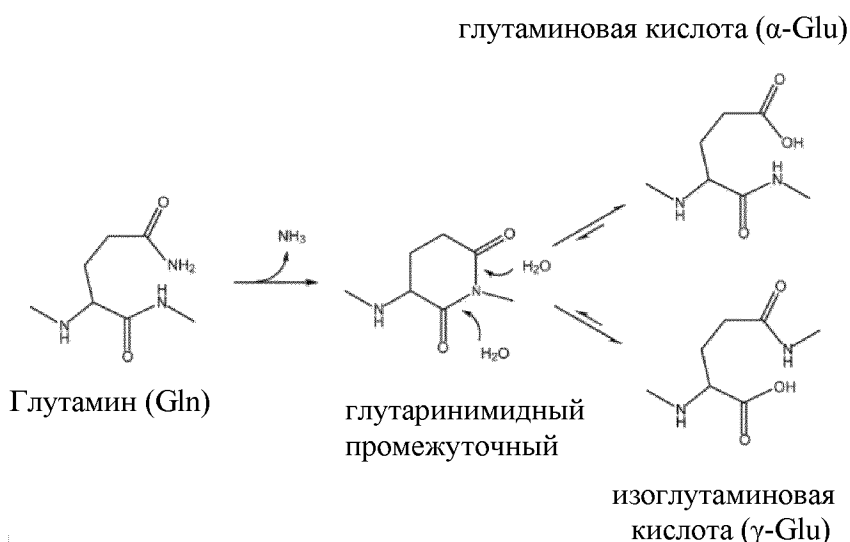
Не желая быть связанными какой-либо теорией, дезамидирование N может происходить посредством атома азота C-концевого остатка его остова, что приводит к нуклеофильной атаке на атом углерода амидной группы боковой цепи Asn. Предполагается, что образуется промежуточный сукцинимидный остаток с замкнутым кольцом. Затем остаток сукцинимидина проходит быстрый гидролиз, что приводит к получению конечного продукта аспарагиновой кислоты (Asp) или изоаспарагиновой кислоты (IsoAsp). Следовательно, в определенных вариантах осуществления изобретения, дезамидирование аспарагина (N или Asn) приводит к Asp или IsoAsp, которые могут взаимно превращаться через сукцинимидное промежуточное соединение, например, как показано ниже.



Как представлено в данном документе, каждый дезамидированный N из SEQ ID NO: 8 может независимо представлять собой аспарагиновую кислоту (Asp), изоаспарагиновую кислоту (isoAsp), аспартат и/или взаимопревращающуюся смесь Asp и isoAsp или их комбинации. Может присутствовать любое подходящее соотношение α - и изоаспарагиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение может составлять от 10:1 до 1:10 аспарагиновой к изоаспарагиновой, около 50:50 аспарагиновой:изоаспарагиновой или около 1:3 аспарагиновой:изоаспарагиновой, или другое выбранное соотношение.

В определенных вариантах осуществления изобретения один или более глутаминов (Q) в SEQ ID NO: 8 дезамидируются до глутаминовой кислоты (Glu), т.е. α -глутаминовой кислоты, γ -

глутаминовой кислоты (Glu) или смеси α - и γ -глутаминовой кислоты, которые могут взаимно превращаться через общий глутаринимидный промежуточный продукт. Может присутствовать любое подходящее соотношение α - и γ -глутаминовой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение может составлять от 10:1 до 1:10 α к γ , около 50:50 α : γ или около 1:3 α : γ , или другое выбранное соотношение.



Таким образом, rAAVhu68 включает в себя субпопуляции в капсиде rAAVhu68 белков vp1, vp2 и/или vp3 с дезамидированными аминокислотами, включая как минимум по меньшей мере одну субпопуляцию, содержащую по меньшей мере один сильнодезамидированный аспарагин. Кроме того, другие модификации могут включать изомеризацию, особенно в выбранных положениях остатков аспарагиновой кислоты (D или Asp). В еще других вариантах осуществления изобретения модификации могут включать амидирование в положении Asp.

В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 содержит субпопуляции vp1, vp2 и vp3, имеющие по меньшей мере от 4 до по меньшей мере около 25 положений дезамидированных аминокислотных остатков, из которых по меньшей мере от 1 до 10% дезамидированы по сравнению с кодированной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. Большинство из них могут быть остатками N. Однако остатки Q также могут быть дезамидированы.

В определенных вариантах осуществления изобретения капсид AAV68 дополнительно характеризуется одним или более из следующих. Капсидные белки AAV hu68 содержат: белки vp1 AAVhu68, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную

последовательность от 1 до 736 последовательности SEQ ID NO: 8, белки vp1, полученные из SEQ ID NO: 7, или белки vp1, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 SEQ ID NO: 8; белки vp2 AAVhu68, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно из аминокислот от 138 до 736 SEQ ID NO: 8, белки vp2, полученные из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 412 до 2211 SEQ ID NO: 7, или белки vp2, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2211 последовательности SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно из аминокислот от 138 до 736 SEQ ID NO: 8, и/или белки vp3 AAVhu68, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно из аминокислот от 203 до 736 SEQ ID NO: 8, белки vp3, полученные из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 607 до 2211 SEQ ID NO: 7, или белки vp3, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 607 до 2211 SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно из аминокислот от 203 по 736 SEQ ID NO: 8.

Дополнительно или альтернативно обеспечивается капсид AAV, который содержит гетерогенную популяцию белков vp1, гетерогенную популяцию белков vp2, необязательно содержащую валин в положении 157, и гетерогенную популяцию белков vp3, причем по меньшей мере субпопуляция белков vp1 и vp2 содержат валин в положении 157 и, необязательно, дополнительно содержат глутаминовую кислоту в положении 67 на основе нумерации капсида vp1 SEQ ID NO: 8. Дополнительно или альтернативно обеспечивается капсид AAVhu68, который содержит гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей

аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно из аминокислот от 138 до 736 SEQ ID NO: 8, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 203 до 736 SEQ ID NO: 8, при этом белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с модификациями аминокислот.

Белки vp1, vp2 и vp3 AAVhu68 обычно экспрессируются как альтернативные варианты сплайсинга, кодируемые одной и той же последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует полноразмерную аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 8 (аминокислота от 1 до 736). Необязательно, vp1-кодирующая последовательность используется отдельно для экспрессии белков vp1, vp2 и vp3. Альтернативно, эта последовательность может быть совместно экспрессирована с одной или более последовательностями нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность AAVhu68 vp3 SEQ ID NO: 8 (примерно ак от 203 до 736) без vp1-уникального участка (примерно ак 1 до примерно ак 137) и/или vp2-уникального участка (примерно от ак 1 до примерно ак 202), или комплементарной ей цепи, соответствующей мРНК или тРНК (от примерно нуклеотида 607 до примерно нуклеотида 2211 SEQ ID NO: 7) или последовательность по меньшей мере от 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 7, которая кодирует ак от 203 до 736 SEQ ID NO: 8. Дополнительно или альтернативно, vp1-кодирующая и/или vp2-кодирующая последовательность может быть совместно экспрессирована с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность vp2 AAVhu68 SEQ ID NO: 8 (примерно ак от 138 до 736) без vp1-уникального участка (примерно ак от 1 до примерно 137), или комплементарной ей цепи, соответствующей мРНК или тРНК (нуклеотиды от 412 до 2211 SEQ ID NO: 7) или последовательность по меньшей мере от 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 7, которая кодирует примерно ак от 138 до 736 SEQ ID NO: 8.

Как описано в данном документе, rAAVhu68 имеет капсид rAAVhu68, полученный в системе продуцирования, экспрессирующей капсиды из нуклеиновой кислоты AAVhu68, которая кодирует

аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 8, и необязательно дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты, например кодирующие белок vp 3, свободный от участков, уникальных для vp1 и/или vp2. rAAVhu68, полученный в результате продуцирования с использованием одной последовательности нуклеиновой кислоты vp1, продуцирует гетерогенные популяции белков vp1, белков vp2 и белков vp3. В частности, капсид AAVhu68 содержит субпопуляции в белках vp1, в белках vp2 и в белках vp3, которые имеют модификации от предсказанных аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 8. Эти субпопуляции включают, как минимум, дезамидированные остатки аспарагина (N или Asn). Например, аспарагины в парах аспарагин-глицин сильно дезамидированы.

В одном варианте осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты vp1 AAVhu68 имеет последовательность SEQ ID NO 7, или комплементарную ей цепь, например, соответствующей мРНК или тРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения белки vp2 и/или vp3 могут экспрессироваться дополнительно или альтернативно из последовательностей нуклеиновых кислот, отличных от последовательностей vp1, например, для изменения соотношения белков vp в выбранной системе экспрессии. В некоторых вариантах осуществления изобретения также предоставлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность AAVhu68 vp3 SEQ ID NO: 8 (примерно ак от 203 до 736) без vp1-уникального участка (примерно ак 1 до примерно ак 137) и/или vp2-уникального участка (примерно от ак 1 до примерно ак 202), или комплементарной ей цепи, соответствующей мРНК или тРНК (от примерно нуклеотида 607 до примерно нуклеотида 2211 SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления изобретения также предоставлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность AAVhu68 vp2 SEQ ID NO: 8 (примерно ак от 138 до 736) без vp1-уникального участка (примерно ак от 1 до примерно 137), или комплементарной ей цепи, соответствующей мРНК или тРНК (nt от 412 до 2211 SEQ ID NO: 7).

Однако другие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 могут быть выбраны для использования при получении капсидов rAAVhu68. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность

нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7) или последовательность по меньшей мере от 70% до 99% идентична, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 7, который кодирует SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты от примерно нуклеотида 412 до примерно нуклеотида 2211 SEQ ID NO: 7 или последовательность по меньшей мере на от 70% до 99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентична от примерно нуклеотида 412 до примерно нуклеотида 2211 из SEQ ID NO: 7, который кодирует капсидный белок vp2 (примерно от ак 138 до 736) SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты от примерно нуклеотида 607 до примерно нуклеотида 2211 SEQ ID NO: 7 или последовательность по меньшей мере от 70% до 99% по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентична от примерно нуклеотида 607 до примерно нуклеотида 2211 из SEQ ID NO: 7, который кодирует капсидный белок vp3 (примерно от ак 203 до 736) SEQ ID NO: 8.

Специалист в данной области техники может разработать последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие этот капсид AAVhu68, включая ДНК (геномную или кДНК) или РНК (например, мРНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая капсидный белок vp1 AAVhu68, представлена в SEQ ID NO: 7. См., также Фиг. 8B-8D. В других вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, от 70% до 99,9% идентичная последовательности SEQ ID NO: 7, может быть выбрана для экспрессии капсидных белков AAVhu68. В некоторых других вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере около на 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% идентична или по меньшей мере на от 99% до 99,9% идентична

SEQ ID NO: 7. Такие последовательности нуклеиновой кислоты могут быть оптимизированы по кодонам для экспрессии в выбранной системе (т.е. типе клетки), которая может быть сконструирована различными способами. Эта оптимизация может быть выполнена с использованием методов, которые доступны в режиме онлайн (например, GeneArt), опубликованных методов или компании, которая предоставляет услуги по оптимизации кодонов, например, DNA2.0 (г. Менло-Парк, штат Калифорния, США). Один способ оптимизации кодонов описан, например, в международной патентной публикации США № WO 2015/012924, которая включена в данное описание посредством ссылки во всей ее полноте. См. также, например, патентную публикацию США № 2014/0032186 и патентную публикацию США № 2006/0136184. Соответствующим образом, модифицируется вся длина открытой рамки считывания (ОРС) для продукта. Однако в некоторых вариантах осуществления может быть изменен только фрагмент ОРС. Используя один из этих методов, к любой заданной полипептидной последовательности можно применить значения встречаемости и получить нуклеотидный фрагмент кодон-оптимизированного кодирующего участка, который кодирует этот полипептид. Доступен ряд опций для выполнения фактических изменений кодонов или для синтезирования кодон-оптимизированных кодирующих участков, разработанных в соответствии с тем, как описано в настоящем документе. Такие модификации или синтез могут осуществляться с помощью стандартных и обычных манипуляций молекулярной биологии, хорошо известных специалистам в данной области техники. В одном подходе с помощью стандартных методов синтезируют серию комплементарных олигонуклеотидных пар, каждая из которых имеет 80–90 нуклеотидов в длину и охватывает длину требуемой последовательности. Эти олигонуклеотидные пары синтезируют таким образом, что при ренатурации они образуют двухцепочечные фрагменты из 80–90 пар оснований, содержащих «липкие» концы, например, каждый олигонуклеотид в паре синтезируется с удлинением на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более оснований за пределы участка, который является комплементарным другому олигонуклеотиду в паре. Одноцепочечные концы каждой пары олигонуклеотидов разработаны с возможностью ренатурации с одноцепочечным концом другой пары олигонуклеотидов. Олигонуклеотидным парам позволяют ренатурироваться, и затем приблизительно пяти или шести из этих двухцепочечных фрагментов позволяют совместно ренатурироваться посредством «липких»

одноцепочечных концов, затем они совместно лигируются и клонируются в стандартный бактериальный клонирующий вектор, например вектор TOPO®, доступный от Invitrogen Corporation, г. Карлсбад, штат Калифорния, США. После этого конструкцию секвенируют с помощью стандартных методов. Несколько из этих конструкций, содержащих 5–6 фрагментов из совместно лигированных фрагментов размером 80–90 пар оснований, т. е. фрагменты из около 500 пар оснований, получают таким образом, что вся требуемая последовательность представлена сериями плазмидных конструкций. Вставки этих плазмид затем разрезаются с помощью соответствующих рестрикционных ферментов и совместно лигируются для образования конечной конструкции. Конечную конструкцию затем клонируют в стандартный бактериальный клонирующий вектор и секвенируют. Дополнительные методы будут очевидны специалисту в данной области техники. Кроме того, коммерчески доступным является синтез генов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения аспарагин (N) в парах N–G в белках vp1, vp2 и vp3 AAVhu68 сильно дезамидирован. В определенных вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 содержит субпопуляции капсидных белков vp1, vp2 и/или vp3 AAV, имеющих по меньшей мере четыре положения аспарагина (N) в капсидных белках AAVhu68, которые являются сильно дезамидированными. В некоторых вариантах осуществления изобретения около от 20 до 50% N–N пар (исключая N–N–N–триплеты) показывают дезамидирование. В определенных вариантах осуществления изобретения первый N является дезамидированным. В определенных вариантах осуществления изобретения второй N является дезамидированным. В определенных вариантах осуществления изобретения дезамидирование составляет между около 15% до около 25% дезамидирования. Дезамидирование у Q в положении 259 SEQ ID NO: 8 составляет от около 8% до около 42% капсидных белков AAVhu68 vp1, vp2 и vp3 белка AAVhu68.

В определенных вариантах осуществления изобретения капсид rAAVhu68 дополнительно характеризуется амидированием в D297 белков vp1, vp2 и vp3. В некоторых вариантах осуществления изобретения от около 70% до около 75% D в положении 297 белков vp1, vp2 и/или vp3 в капсиде AAVhu68 амидированы, на основе нумерации SEQ ID NO: 8.

В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один Asp в vp1, vp2 и/или vp3 капсида изомеризуется

в D-Asp. Такие изомеры обычно присутствуют в количестве менее чем около 1% Asp в одном или более положениях остатков 97, 107, 384, на основе нумерации SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения rAAVhu68 имеет капсид AAVhu68, имеющий белки vp1, vp2 и vp3, имеющие субпопуляции, содержащие комбинации из двух, трех, четырех или более дезамидированных остатков в положениях, указанных в таблице ниже. Дезамидирование в rAAV может быть определено с использованием 2D гель-электрофореза и/или масс-спектрометрии, и/или методов моделирования белка. Хроматография в режиме онлайн может выполняться с колонкой Acclaim PepMap и системой Thermo UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific), соединенной с Q Exactive HF с источником NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Данные MS получают с использованием "зависимого от данных лучшего из 20" метода (a data-dependent top-20 method) для Q Exactive HF, динамически выбирая наиболее обширные, еще не секвенированные ионы-предшественники из сканирующих просмотров (200–2000 m/z). Секвенирование выполняется посредством высокоэнергетичной фрагментации ударной диссоциации с целевым значением $1e5$ ионов, определенным с помощью прогнозирующей автоматической регулировки усиления и выделения предшественников, выполнено с окном 4 m/z. Сканирующие просмотры были получены с разрешением 120000 при значении m/z 200. Разрешение для спектров HCD может быть установлено на 30000 при m/z 200 с максимальным временем введения ионов 50 мс и нормированной энергией столкновения 30. Уровень RF S-объектива может быть установлен на 50, чтобы обеспечить оптимальную передачу области m/z, занятой пептидами, полученными в результате расщепления протеазами. Ионы-предшественники могут быть исключены с единичными, не назначенными или шестью и более высокими зарядовыми состояниями из выбора фрагментации. Программное обеспечение BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific) может использоваться для анализа полученных данных. Для пептидного картирования поиск проводят с использованием базы данных белка FASTA с одним входом с набором карбамидометилирования в качестве фиксированной модификации; и окислением, дезамидированием и фосфорилированием, заданными как переменные модификации, для спектров MS/MS точность определения массы 10 ppm, высокая специфичность протеаз и уровень достоверности 0,8. Примеры подходящих протеаз могут включать,

например, трипсин или химотрипсин. Масс-спектрометрическая идентификация дезамидированных пептидов относительно проста, поскольку дезамидирование увеличивает массу интактной молекулы +0,984 Да (разница масс между группами -ОН и -NH₂). Процент дезамидирования конкретного пептида определяется площадью массы дезамидированного пептида, деленной на сумму площади дезамидированного и нативного пептидов. Учитывая количество возможных участков дезамидирования, изобарические типы, которые дезамидированы в разных местах, могут совместно мигрировать в одном пике. Следовательно, фрагментные ионы, происходящие из пептидов с несколькими потенциальными сайтами дезамидирования, могут быть использованы для определения местоположения или дифференциации множественных сайтов дезамидирования. В этих случаях относительные интенсивности в пределах наблюдаемых изотопных структур могут использоваться для конкретного определения относительного содержания различных дезамидированных пептидных изомеров. Этот способ предполагает, что эффективность фрагментации для всех изомерных типов одинакова и не зависит от места дезамидирования. Специалисту в данной области техники будет понятно, что может быть использован ряд вариантов этих иллюстративных способов. Например, подходящие масс-спектрометры могут включать, например, квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр (QTOF), такой как Waters Xevo или Agilent 6530, или прибор с орбитальной ловушкой, такой как Orbitrap Fusion или Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Подходящие системы жидкостной хроматографии включают, например, систему Acquity UPLC от Waters или системы Agilent (серии 1100 или 1200). Подходящее программное обеспечение для анализа данных может включать, например, MassLynx (Waters), Pinpoint и Peppinder (Thermo Fisher Scientific), Mascot (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Другие способы могут быть описаны, например, в X. Jin et al., Nu Gene Therapy Methods, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267, опубликовано в сети 16 июня 2017 г.

Дезамидирование На основе предсказанного AAVhu68 [SEQ ID NO: 8]	Средний % на основе белков VP1/VP2/VP3 в капсиде AAVhu68	
Дезамидированный остаток+1 (соседняя АК)	Широкий диапазон процентов (%)	Узкие диапазоны (%)
N57 (N-G)	от 78 до 100%	от 80 до 100, от 85 до 97

N66 (N-E)	от 0 до 5	от 0, 1 до 5
N94 (N-H)	от 0 до 15,	от 0, 1 до 15, от 5 до 12, 8
N113 (N-L)	от 0 до 2	от 0, 1 до 2
~N253 (N-N)	от 10 до 25	от 15 до 22
Q259 (Q-I)	от 8 до 42	от 10 до 40, от 20 до 35
~N270 (N-D)	от 12 до 30	от 15 до 28
~N304 (N-N) (положение 303 также N)	от 0 до 5	от 1 до 4
N319 (N-I)	от 0 до 5	от 0, 1 до 5, от 1 до 3
N329 * (N-G)* (положение 328 также N)	от 65 до 100	от 70 до 95, от 85 до 95, от 80 до 100, от 85 до 100,
N336 (N-N)	от 0 до 100	от 0, 1 до 10, от 25 до 100, от 30 до 100, от 30 до 95
~N409 (N-N)	от 15 до 30	от 20 до 25
N452 (N-G)	от 75 до 100	от 80 до 100, от 90 до 100, от 95 до 100,
N477 (N-Y)	от 0 до 8	от 0, 1 до 5
N512 (N-G)	от 65 до 100	от 70 до 95, от 85 до 95, от 80 до 100, от 85 до 100,
~N515 (N-S)	от 0 до 25	от 0, 1 до 10, от 5 до 25, от 15 до 25
~Q599 (Asn-Q-Gly)	от 1 до 20	от 2 до 20, от 5 до 15
N628	от 0 до 10	от 0, 1 до 10, от 2

(N-F)		до 8
N651 (N-T)	от 0 до 3	от 0, 1 до 3
N663 (N-K)	от 0 до 5	от 0, 1 до 5, от 2 до 4
N709 (N-N)	от 0 до 25	от 0,1 до 22, от 15 до 25
N735	от 0 до 40	0. от 1 до 35, от 5 до 50, от 20 до 35

В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 характеризуется наличием капсидных белков, в которых по меньшей мере 45% N-остатков дезамидированы по меньшей мере в одном из положений N57, N329, N452 и/или N512 на основе нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере, около 80% или по меньшей мере 90% N-остатков в одном или более из этих N-G положений (т.е. N57, N329, N452 и/или N512, на основе нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8) дезамидированы. В этих и других вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 дополнительно характеризуется наличием популяции белков, в которой от около 1% до около 20% N-остатков имеют дезамидирование в одном или более положениях: N94, N253, N270, N304, N409, N477 и/или Q599, на основе нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения AAVhu68 содержит по меньшей мере субпопуляцию белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дезамидированы в одном или более положениях N35, N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, N735, на основе нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсидные белки могут иметь одну или более амидированных аминокислот.

Наблюдаются и другие модификации, большинство из которых не приводит к превращению одного аминокислотного остатка в другой аминокислотный остаток. Необязательно, по меньшей мере один Lys в vp1, vp2 и vp3 капсида является ацетилованным. Необязательно, по меньшей мере один Asp в vp1, vp2 и/или vp3

капсида изомеризуется в D-Asp. Необязательно, по меньшей мере один S (Ser, Серин) в vp1, vp2 и/или vp3 капсида является фосфорилированным. Необязательно, по меньшей мере один T (Thr, треонин) в vp1, vp2 и/или vp3 капсида является фосфорилированным. Необязательно, по меньшей мере один W (Trp, триптофан) в vp1, vp2 и/или vp3 капсида является окисленным. Необязательно, по меньшей мере один M (Met, метионин) в vp1, vp2 и/или vp3 капсида является окисленным. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсидные белки имеют одно или более фосфорилирований. Например, некоторые капсидные белки vp1 могут быть фосфорилированы в положении 149.

В определенных вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 содержит гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, причем белки vp1 содержат глутаминовую кислоту (Glu) в положении 67 и/или валин (Val) в положении 157; гетерогенную популяцию белков vp2, необязательно содержащую валин (Val) в положении 157; и гетерогенную популяцию белков vp3. Капсид AAVhu68 содержит по меньшей мере одну субпопуляцию, в которой по меньшей мере 65% аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин расположены в положении 57 белков vp1 и по меньшей мере 70% аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в положениях 329, 452 и/или 512 белков vp1, vp2 и vp3 дезамидированы на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты. Как обсуждается более подробно в данном документе, дезамидированные аспарагины могут быть дезамидированы до аспарагиновой кислоты, изоаспарагиновой кислоты, пары взаимопревращающихся аспарагиновой кислоты/изоаспарагиновой кислоты или их комбинаций. В определенных вариантах осуществления изобретения rAAVhu68 дополнительно характеризуется одним или более из следующего: (a) каждый из белков vp2 независимо представляет собой продукт последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере белок vp2 SEQ ID NO: 8; (b) каждый из белков vp3 независимо представляет собой продукт последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере белок vp3 SEQ ID NO: 8; (c) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белки vp1, является SEQ ID NO: 7, или последовательность по меньшей мере от 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей

мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 7, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Необязательно, эта последовательность используется отдельно для экспрессии белков vp1, vp2 и vp3. Альтернативно, эта последовательность может быть совместно экспрессирована с одной или более последовательностями нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность AAVhu68 vp3 SEQ ID NO: 8 (примерно ак от 203 до 736) без vp1-уникального участка (примерно ак 1 до примерно ак 137) и/или vp2-уникального участка (примерно от ак 1 до примерно ак 202), или комплементарной ей цепи, соответствующей мРНК или тРНК (от примерно нуклеотида 607 до примерно нуклеотида 2211 SEQ ID NO: 7) или последовательность по меньшей мере от 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 7, которая кодирует ак от 203 до 736 SEQ ID NO: 8. Дополнительно или альтернативно, vp1-кодирующая и/или vp2-кодирующая последовательность может быть совместно экспрессирована с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность vp2 AAVhu68 SEQ ID NO: 8 (примерно ак от 138 до 736) без vp1-уникального участка (примерно ак от 1 до примерно 137), или комплементарной ей цепи, соответствующей мРНК или тРНК (нуклеотиды от 412 до 2211 SEQ ID NO: 7) или последовательность по меньшей мере от 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентична SEQ ID NO: 7, которая кодирует примерно ак от 138 до 736 SEQ ID NO: 8.

Дополнительно или альтернативно, капсид rAAVhu68 содержит, по меньшей мере субпопуляцию белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дезамидированы в одном или более положениях N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N512, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, на основе нумерации SEQ ID NO: 8 или их комбинаций; (e) капсид rAAVhu68 содержит субпопуляцию белков vp1, vp2 и/или vp3, которые содержат от 1% до 20% дезамидирования в одном или более положениях N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, на

основе нумерации SEQ ID NO: 8 или их комбинаций; (f) капсид rAAVhu68 содержит субпопуляцию vp1, в которой от 65% до 100% N в положении 57 белков vp1 на основе из нумерации SEQ ID NO: 8 дезамидировано; (g) капсид rAAVhu68 содержит субпопуляцию белков vp1, в которой от 75% до 100% N в положении 57 белков vp1 дезамидировано; (h) капсид rAAVhu68 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которых от 80% до 100% N в положении 329 на основе нумерации SEQ ID NO: 8 дезамидировано; (i) капсид rAAVhu68 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которых от 80% до 100% N в положении 452 на основе нумерации SEQ ID NO: 8 дезамидировано; (j) капсид rAAVhu68 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которых от 80% до 100% N в положении 512 на основе нумерации SEQ ID NO: 8 дезамидировано; (k) rAAV содержит около всего 60 капсидных белков в соотношении около 1 vp1 к от около 1 до 1,5 vp2 к от 3 до 10 vp3 белков; (l) rAAV содержит около всего 60 капсидных белков в соотношении около 1 vp1 к около 1 vp2 к от 3 до 9 vp3 белков.

В некоторых вариантах осуществления изобретения AAVhu68 модифицируют, чтобы изменить глицин в паре аспарагин-глицин для уменьшения дезамидирования. В других вариантах осуществления изобретения аспарагин заменяется другой аминокислотой, например глутамином, который дезамидируется с более низкой скоростью; или аминокислотой, в которой отсутствуют амидные группы (например, глутамин и аспарагин содержат амидные группы); и/или аминокислотой, в которой отсутствуют аминогруппы (например, лизин, аргинин и гистидин содержат амидные группы). Используемые в данном документе аминокислоты, в которых отсутствуют амидные или аминные боковые группы, относятся, например, к глицину, аланину, валину, лейцину, изолейцину, серину, треонину, цистину, фенилаланину, тирозину или триптофану и/или пролину. Модификации, такие как описанные, могут быть в одной, двух или трех парах аспарагин-глицин, обнаруженных в кодированной аминокислотной последовательности AAVhu68. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие модификации не производятся во всех четырех парах аспарагин-глицин. Таким образом, предложен способ уменьшения дезамидирования AAVhu68 и/или сконструированных вариантов AAVhu68, имеющих более низкие скорости дезамидирования. Дополнительно или альтернативно, одну или более других амидных аминокислот можно заменить неамидной

аминокислотой для уменьшения дезамидирования AAVhu68.

Эти модификации аминокислот могут быть сделаны обычными методами генной инженерии. Например, может быть создана последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая модифицированные *vp*-кодоны AAVhu68, в которой от одного до трех из кодонов, кодирующих глицин, в положении 58, 330, 453 и/или 513 в SEQ ID NO: 8 (пары аргинин-глицин) модифицированы для кодирования аминокислоты, отличной от глицина. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая модифицированные аргининовые кодоны, может быть сконструирована с одной-тремя парами аргинин-глицин, расположенными в положениях 57, 329, 452 и/или 512 в SEQ ID NO: 8, так что модифицированный кодон кодирует аминокислоту, отличную от аргинина. Каждый модифицированный кодон может кодировать разные аминокислоты. Альтернативно, один или более измененных кодонов могут кодировать одну и ту же аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти модифицированные последовательности нуклеиновой кислоты AAVhu68 можно использовать для получения мутанта rAAVhu68, имеющего капсид с более низким дезаминированием, чем нативный капсид hu68. Такой мутантный rAAVhu68 может иметь пониженную иммуногенность и/или повышенную стабильность при хранении, в частности при хранении в форме суспензии. Используемый в данном документе термин «кодон» относится к трем нуклеотидам в последовательности, которая кодирует аминокислоту.

В одном варианте осуществления изобретения предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), который содержит: (А) капсид AAV68, содержащий одно или более из: (1) капсидных белков AAV hu68, содержащих: белки *vp1* AAVhu68, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 SEQ ID NO: 8, белки *vp1*, полученные из SEQ ID NO: 7, или белки *vp1*, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 SEQ ID NO: 8, белки AAVhu68 *vp2*, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно из аминокислот от 138 до 736 SEQ ID NO: 8, белки *vp2*,

полученные из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 412 до 2211 SEQ ID NO: 7, или белки vp2, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2211 SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из примерно аминокислот от 138 до 736 SEQ ID NO: 8, белки AAVhu68 vp3, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно из аминокислот от 203 до 736 SEQ ID NO: 8, белки vp3, полученные из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 607 до 2211 SEQ ID NO: 7, или белки vp3, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 607 до 2211 SEQ ID NO: 7, которые кодируют предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно из аминокислот от 203 до 736 SEQ ID NO: 8; и/или (2) капсидные белки AAV, содержащие гетерогенную популяцию белков vp1, необязательно содержащую валин в положении 157 и/или глутаминовую кислоту в положении 67, гетерогенную популяцию белков vp2, необязательно содержащую валин в положении 157, и гетерогенную популяция белков vp3, причем по меньшей мере субпопуляция белков vp1 и vp2 содержит валин в положении 157 и необязательно дополнительно содержит глутамин в положении 67 на основе нумерации капсида vp1 SEQ ID NO: 8; и/или (3) гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно из аминокислот от 138 до 736 SEQ ID NO: 8, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 203 до 736 SEQ ID NO: 8, причем белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с модификациями аминокислот, содержащими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 8 и необязательно дополнительно включают субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, при этом дезамидирование приводит к замене

аминокислоты; и (В) векторный геном в капсиде AAVhu68, причем векторный геном содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированного концевых повтора AAV, и последовательность нуклеиновой кислоты не-AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине. Например, четыре остатка (N57, N329, N452, N512) обычно показывают высокие уровни дезамидирования. Дополнительные остатки (N94, N253, N270, N304, N409, N477 и Q599) также показывают уровни дезамидирования до ~ 20% по различным партиям.

В некоторых вариантах осуществления изобретения дезамидированные аспарагины дезамидируют до аспарагиновой кислоты, изоаспарагиновой кислоты, пары взаимопревращающихся аспарагиновой кислоты/изоаспарагиновой кислоты или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения дезамидированный (-ые) глутамин (-ы) дезамидируют до (α)-глутаминовой кислоты, γ -глутаминовой кислоты, пары (α)-глутаминовая кислота/ γ -глутаминовая кислота или их комбинаций.

В определенных вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 содержит субпопуляции, имеющие одно или более из: (а) по меньшей мере 65% аспарагинов (N) в парах аспарагин-глицин, расположенных в положениях 57 белков vp1, дезамидированных, на основе нумерации SEQ ID NO: 8; (b) по меньшей мере 75% N в парах аспарагин-глицин в положении 329 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированных, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; (с) по меньшей мере 50% N в парах аспарагин-глицин в положении 452 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированных, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и/или (d) по меньшей мере 75% N в парах аспарагин-глицин в положении 512 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированных, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид hu68 содержит субпопуляцию vp1, в которой от 75% до 100% N в положении 57 белков vp1 дезамидировано, как определено с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которых от 75% до 100% N в положении 329 на основе нумерации SEQ ID NO: 8 дезамидировано, как определено с использованием масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления изобретения

капсид hu68 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которых от 75% до 100% N в положении 452 на основе нумерации SEQ ID NO: 8 дезамидировано, как определено с использованием масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид hu68 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которых от 75% до 100% N в положении 512 на основе нумерации SEQ ID NO: 8 дезамидировано. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белки, представляет собой SEQ ID NO: 7, или последовательность от по меньшей мере на 80% до по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность по меньшей мере на от 80% до 97% идентична последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид rAAVhu68 дополнительно содержит по меньшей мере субпопуляцию белков vp1, vp2 и/или vp3, имеющих аминокислотные модификации из SEQ ID NO: 8, содержащие по меньшей мере от около 50% до 100% дезамидирования по меньшей мере в четырех положениях, выбранных из одного или более из N57, 329, 452, 512 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 содержит субпопуляции белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дополнительно содержат от 1% до около 40% дезамидирования по меньшей мере в одном или более положениях N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709 или их комбинациях. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид hu68 содержит субпопуляции белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дополнительно содержат одну или более модификаций, выбранных из одной или более модификаций в одном или более из следующих компонентов: ацетилированный лизин, фосфорилированный серин и/или треонин, изомеризованная аспарагиновая кислота, окисленный триптофан и/или метионин или амидированная аминокислота. В некоторых вариантах осуществления изобретения rAAVhu68 содержит около всего 60 капсидных белков в соотношении около 1 vp1 к от около 1 до 1,5 vp2 к от 3 до 10 vp3 белков. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 содержит около всего 60 капсидных белков в соотношении около 1 vp1 к около 1 vp2 к от 3 до 9 vp3 белков. В некоторых вариантах

осуществления изобретения векторный геном содержит последовательности ITR AAV из источника AAV, отличного от AAVhu68.

В определенных вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая содержит смешанную популяцию рекомбинантного аденоассоциированного вируса hu68 (rAAVhu68), причем каждый из rAAVhu68 независимо выбран из rAAVhu68, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения средний капсид AAVhu68 содержит около всего 60 капсидных белков в соотношении около 1 vp1 к от около 1 до 1,5 vp2 к от 3 до 10 vp3 белков. В некоторых вариантах осуществления изобретения средний капсид AAVhu68 содержит около всего 60 капсидных белков в соотношении около 1 vp1 к около 1 vp2 к от около 3 до 6 vp3 белков. В определенных вариантах осуществления изобретения композиция составлена для внутривенной доставки. В определенных вариантах осуществления изобретения композиция составлена для интраназальной или внутримышечной доставки. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит по меньшей мере векторный исходный набор rAAVhu68 и необязательный носитель, эксципиент и/или консервант.

Может быть использована любая подходящая система продуцирования rAAV, пригодная для получения рекомбинантного AAVhu68. Например, такая система продуцирования может содержать: (a) последовательность нуклеиновой кислоты капсида AAVhu68, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; (b) молекулу нуклеиновой кислоты, подходящую для упаковки в капсид AAVhu68, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) AAV и последовательность нуклеиновой кислоты не-AAV, кодирующую продукт гена, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине; и (c) достаточные функции гер AAV и вспомогательные функции, чтобы обеспечить упаковку молекулы нуклеиновой кислоты в рекомбинантный капсид AAVhu68. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты (a) содержит по меньшей мере SEQ ID NO: 7, или последовательность от по меньшей мере на 70% до по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения система необязательно

дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты от около нуклеотида 607 до около нуклеотида 2211 SEQ ID NO: 7, кодирующую *vr3* AAVhu68 от около ак 203 до около аминокислоты 736 SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления изобретения система содержит клетки эмбриональной почки человека 293 или бакуловирусную систему.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ уменьшения дезамидирования капсида AAVhu68. Способ включает продуцирование капсида AAVhu68 из последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей модифицированные *vr*-кодоны AAVhu68, причем последовательность нуклеиновой кислоты содержит независимо модифицированные глициновые кодоны в одной-трех парах аргинин-глицин, расположенных в положениях 58, 330, 453 и/или 513 в SEQ ID NO: 8, так что модифицированный кодон кодирует аминокислоту, отличную от глицина. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает получение капсида AAVhu68 из последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей модифицированные *vr*-кодоны AAVhu68, причем последовательность нуклеиновой кислоты содержит независимо модифицированные кодоны аргинина в одной-трех парах аргинин-глицин, расположенных в положениях 57, 329, 452 и/или 512 в SEQ ID NO: 8, так что модифицированный кодон кодирует аминокислоту, отличную от аргинина. В определенных вариантах осуществления изобретения каждый модифицированный кодон кодирует другую аминокислоту. В определенных вариантах осуществления изобретения два или более модифицированных кодонов кодируют одну и ту же аминокислоту. В определенных вариантах осуществления изобретения мутантный капсид AAVhu68, как описано в данном документе, содержит мутацию в паре аргинин-глицин, так что глицин заменен на аланин или серин. Мутантный AAVhu68 капсид может содержать один, два или три мутанта, причем эталонный AAVhu68 изначально содержит четыре пары NG. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный капсид AAVhu68 содержит только одну мутацию в паре NG. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный капсид AAVhu68 содержит мутации в двух разных парах NG. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный капсид AAVhu68 содержит мутации двух разных пар NG, которые расположены в структурно отдельном месте в капсиде AAVhu68. В определенных вариантах осуществления изобретения мутация не находится в VP1-уникальном участке. В определенных вариантах осуществления

изобретения одна из мутаций находится в VP1-уникальном участке. Необязательно, мутантный капсид AAVhu68 не содержит модификаций в парах NG, но содержит мутации для минимизации или устранения дезамидирования в одном или более аспарагинах или глутамине, расположенном вне пары NG.

Используемый в данном документе, термин «кодированная аминокислотная последовательность» относится к аминокислоте, которая прогнозируется на основе трансляции известного кодона ДНК эталонной последовательности нуклеиновой кислоты, которая транслируется в аминокислоту. Следующая таблица иллюстрирует кодоны ДНК и двадцать обычных аминокислот, показывая как однобуквенный код (SLC), так и трехбуквенный код (3LC).

Аминокислота	SLC	3 LC	ДНК-кодоны
Изолейцин	I	Ile	ATT, ATC, ATA
Лейцин	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Валин	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
Фенилаланин	F	Phe	TTT, TTC
Метионин	M	Met	ATG
Цистеин	C	Cys	TGT, TGC
Аланин	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
Глицин	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
Пролин	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
Треонин	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
Серин	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Тирозин	Y	Tyr	TAT, TAC
Триптофан	W	Trp	TGG
Глутамин	Q	Gln	CAA, CAG
Аспарагин	N	Asn	AAT, AAC
Гистидин	H	His	CAT, CAC
Глутаминовая кислота	E	Glu	GAA, GAG
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GAT, GAC
Лизин	K	Lys	AAA, AAG
Аргинин	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG

Стоп кодоны	Стоп	ТАА, TAG, TGA
-------------	------	---------------

Описаны способы получения капсида, кодирующие его последовательности и способы получения вирусных векторов rAAV. См., например, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) и US 2013/0045186A1. Другие капсиды, такие как, например, те, которые описаны в WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2, которые включены в данный документ посредством ссылки, могут быть использованы у субъектов-людей. В одном варианте осуществления изобретение предоставляет сконструированную молекулу, содержащую спейсерную последовательность между кодирующей последовательностью AAVhu68 vp1 и последовательностями, кодирующими повтор AAVhu68.

Как указано выше, последовательности и белки AAVhu68 пригодны для получения rAAV. Приведенные ниже примеры описывают получение векторов rAAV, содержащих векторы AAVhu68 или AAV9. Однако в других вариантах осуществления изобретения выбран другой капсид AAV. Специфичность ткани определяется типом капсида. Например, вирусный вектор, имеющий AAVhu68, проиллюстрирован в приведенных ниже примерах как пригодный для трансформации эпителиальных клеток носа. Последовательности AAVhu68 описаны в данном документе. Кроме того, были описаны способы создания векторов, имеющих капсид AAV9 и химерные капсиды, полученные из AAV9. См., например, US 7906111, который включен в данный документ посредством ссылки. Другие серотипы AAV, которые трансдуцируют назальные клетки или другую подходящую мишень (например, мышцу или легкое), могут быть выбраны в качестве источников капсидов вирусных векторов AAV (устойчивых к ДНКазе вирусных частиц), включая, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh10, AAVrh64R1, AAVrh64R2, rh8 (см., например, опубликованную заявку на патент США № 2007-0036760-A1; опубликованную заявку на патент США № 2009-0197338-A1 и EP 1310571). См. также WO 2003/042397 (AAV7 и другие обезьяньи AAV), патент США 7790449 и патент США 7282199 (AAV8), WO 2005/033321 (AAV9) и WO 2006/110689, или в качестве источника для капсида AAV может использоваться еще не раскрытый, или рекомбинантный AAV, основанный на этих сведениях. Эти документы также описывают другие AAV, которые могут быть выбраны для создания AAV и включены посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления капсид (cap) AAV для использования в вирусном векторе может быть получен путем

мутагенеза (т.е. путем вставок, делеций или замен) одного из упомянутых выше капсидов AAV или кодирующей его нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAV является химерным, содержащим домены из двух или трех, или четырех, или более из упомянутых выше капсидных белков AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой мозаику из мономеров Vp1, Vp2 и Vp3 от двух или трех различных AAV или рекомбинантных AAV. В некоторых вариантах осуществления композиция rAAV содержит более одного из упомянутых выше капсидов.

Капсиды AAVhu68 могут быть пригодны в определенных вариантах осуществления изобретения. Например, такие капсиды могут использоваться для создания моноклональных антител и/или создания реагентов, пригодных в анализах для мониторинга уровней концентрации AAVhu68 у пациентов получающих генную терапию. Методы получения пригодных антител против AAVhu68, меченая таких антител или пустых капсидов и подходящие форматы анализа известны специалистам в данной области.

Более типично, капсиды AAVhu68, представленные в данном документе, пригодны для создания рекомбинантных векторов AAV, в которых сконструированная последовательность нуклеиновой кислоты упакована в капсид AAVhu68. Эти рекомбинантные векторы AAV, называемые векторами rAAVhu68 или rAAVhu68, и их использование более подробно обсуждаются в другом разделе данной заявки. Эти векторы rAAVhu68 пригодны для создания рекомбинантных векторов AAV (rAAV), которые обеспечивают хороший выход и/или эффективность упаковки, и для предоставления векторов rAAV, пригодных для трансдукции ряда различных типов клеток и тканей. Такие клетки и типы тканей включают, без ограничения, легкие, сердце, мышцу, печень, поджелудочную железу, почку, головной мозг, гиппокамп, моторную кору, мозжечок, эпителиальные клетки носа, клетки сердечной мышцы или кардиомиоциты, гепатоциты, эндотелиальные клетки легкого, миоциты, эпителиальные клетки легкого, островковые клетки, ацинарные клетки, почечные клетки и/или моторные нейроны.

В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы, имеющие капсиды AAVhu68, обеспечивают по меньшей мере 15% увеличение выхода упакованного вектора по сравнению с векторами на основе AAV9. При сравнении между AAVhu68 и AAVrh10 было обнаружено, что AAVhu68 обеспечивает лучшую эффективность

трансдукции, чем AAVrh10 при низкой дозе (например, около 1×10^9) после интрацеребровентрикулярного введения. В дальнейшем сравнении AAVhu68 и AAV9 было обнаружено, что AAVhu68 обеспечивает лучшую эффективность трансдукции, чем AAV9 в мозжечке, моторной коре и гиппокампе головного мозга (например, при около 1×10^{11} GC) после интрацеребровентрикулярного введения.

«Рекомбинантный AAV» или «rAAV» представляет собой устойчивую к ДНКазе вирусную частицу, содержащую два элемента, капсид AAV и векторный геном, содержащий по меньшей мере не кодирующие AAV последовательности, упакованные в капсид AAV. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид содержит около 60 белков, состоящих из белков vp1, белков vp2 и белков vp3, которые самоорганизуются с образованием капсида. Если не указано иное, «рекомбинантный AAV» или «rAAV» могут использоваться взаимозаменяемо с фразой «вектор rAAV». rAAV представляет собой «вирус, дефектный по репликации» или «вирусный вектор», так как в нем отсутствует какой-либо функциональный ген *rep* AAV или функциональный ген *cap* AAV, и он не может создавать потомство. В некоторых вариантах осуществления изобретения единственными последовательностями AAV являются последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV, обычно расположенные на крайних 5' и 3' концах векторного генома, чтобы обеспечить упаковку гена и регуляторных последовательностей, расположенных между ITR, внутрь капсида AAV.

В целом, термин «устойчивый к нуклеазе» указывает, что капсид AAV собран вокруг экспрессионной кассеты, которая предназначена для доставки гена в клетку-хозяина, и защищает эти упакованные геномные последовательности от деградации (расщепления) во время этапов инкубации нуклеазы, предназначенных для удаления загрязняющих нуклеиновых кислот, которые могут присутствовать в процессе производства.

В определенных вариантах осуществления изобретения невирусные генетические элементы, используемые при продуцировании rAAV, будут упоминаться как векторы (например, векторы продукции). В некоторых вариантах осуществления изобретения эти векторы являются плазмидами, но предполагается использование других подходящих генетических элементов. Такие плазмиды продукции могут кодировать последовательности,

экспрессируемые во время продуцирования rAAV, например белки капсида AAV или гер-белки, необходимые для продуцирования rAAV, которые не упакованы в rAAV. Альтернативно, такая плаزمиды продукции может нести векторный геном, который упакован в rAAV.

Используемый в данном документе, термин «векторный геном» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, упакованной внутри капсида rAAV, который образует вирусную частицу. Такая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. В приведенных в данном документе примерах векторный геном содержит, как минимум, от 5' до 3', 5' ITR AAV, кодирующую последовательность (-и) и 3' ITR AAV. Могут быть выбраны ITR из AAV2, источника AAV, отличного от капсида, или отличные от полноразмерных ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения ITR получены из того же источника AAV, что и AAV, который обеспечивает функцию гер (репликации) во время продуцирования или транскомплементации AAV. Кроме того, могут использоваться другие ITR. Кроме того, векторный геном содержит регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию генных продуктов. Подходящие компоненты векторного генома обсуждаются более подробно в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения термин «экспрессионная кассета» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательности hSMN и, следовательно, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер, полиА), причем эта кассета может быть упакована в капсид вирусного вектора (например, вирусную частицу). Как правило, такая экспрессионная кассета для создания вирусного вектора содержит последовательности hSMN, описанные в данном документе, фланкированные сигналами упаковки вирусного генома и другими последовательностями экспрессионного контроля, такими как описанные в данном документе. Например, для вирусного вектора AAV сигналами упаковки являются 5'-инвертированный концевой повтор (ITR) и 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин «трансен» можно использовать взаимозаменяемо с «экспрессионной кассетой». В других вариантах осуществления изобретения термин «трансен» относится исключительно к кодирующим последовательностям для выбранного гена, например «hSMN1».

Используемый в данном документе термин «SMN» включает в

себя любую изоформу SMN, которая восстанавливает желаемую функцию, уменьшает симптом или обеспечивает другой желаемый физиологический результат при доставке композиции или в способе, представленных в данном документе. В приведенных в данном документе примерах используется самая длинная изоформа, изоформа D, которая, как полагают, является преобладающим транскриптом, продуцируемым геном, у пациента, не затронутого дефицитом или дефектом SMN. Изоформа D представляет белок из 294 аминокислот [см., например, регистрационный номер NCBI NM_000334/NP_000335; ENSEMBL ID ENST00000380707], последовательность белка воспроизведена в SEQ ID NO: 2, и кодирующая последовательность воспроизведена в SEQ ID NO: 3. Однако может быть выбрана другая изоформа. Например, изоформа В имеет альтернативный внутрирамочный экзон в 3' кодирующей последовательности, что приводит к белку, который короче по длине (262 аминокислоты), чем изоформа D, но имеет те же N- и C-концы, что и эта изоформа. См. регистрационный номер NCBI NM_022874/NP_075012; ENSEMBL ID ENST00000503079. Кодирующие изоформу В и белковые последовательности воспроизводятся в SEQ ID NO: 11 и 12, соответственно. Изоформе А не хватает предпоследнего экзона, что приводит к альтернативному стоп-кодону трансляции по сравнению с изоформой D. Таким образом, изоформа А короче (282 аминокислоты) и имеет отличный C-конец по сравнению с изоформой D. См. номер доступа NCBI NM_001297715/NP_001284644; ENSEMBL ID ENSTL00000506163. Кодирующие изоформу А и белковые последовательности воспроизводятся в SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно.

В определенных вариантах осуществления изобретения в данном документе предоставлена сконструированная человеческая (h) кДНК выживания моторных нейронов (SMN), которая была разработана для максимизации трансляции по сравнению с нативной последовательностью hSMN (SEQ ID NO: 3). Интрон может быть включен перед кодирующей последовательностью для улучшения 5'-кэппинга и стабильности мРНК. См., например, SEQ ID NO: 15 и 25. Эти композиции могут быть использованы в способах лечения спинальной мышечной атрофии, как описано в данном документе. Для целей сравнения выравнивание нативной кодирующей последовательности SMN человека и сконструированной кДНК показано на Фиг. 1В-1С.

Последовательности кДНК hSMN, описанные в данном документе,

могут быть получены *in vitro* или синтетическим путем, или любым другим подходящим способом с использованием методик, хорошо известных в данной области. Например, может быть использован способ точного синтеза на основе ПЦР (PAS) длинных последовательностей ДНК, как описано Xiong et al., PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences, Nature Protocols 1, 791-797 (2006). Способ, объединяющий методы двойной асимметричной ПЦР и ПЦР с перекрывающимся удлинением, описан Young и Dong, Two-step total gene synthesis method, Nucleic Acids Res. 2004; 32(7):e59. См. также Gordeeva et al, J Microbiol Methods. Усовершенствованный способ синтеза генов на основе ПЦР и его применение для модификации кодонов гена фитазы *Citrobacter freundii*. 2010 May; 81(2):147-52. Epub 2010 Mar 10; см. также следующие патенты на синтез олигонуклеотидов и синтез генов, Gene Seq. 2012 Apr; 6(1):10-21; US 8008005 и US 7985565. Каждый из этих документов включен в данный документ посредством ссылки. Кроме того, коммерчески доступны наборы и протоколы для генерации ДНК с помощью ПЦР. Они включают использование полимераз, в том числе, без исключения, Taq-полимеразы; OneTaq® (New England Biolabs); ДНК-полимеразы высокой точности Q5® (New England Biolabs) и GoTaq® G2-полимеразы (Promega). ДНК также может быть получена из клеток, трансфицированных плазмидами, содержащими последовательности hOTC, описанные в данном документе. Наборы и протоколы известны и коммерчески доступны и включают, без ограничения, наборы плазмид QIAGEN; наборы плазмид Chargeswitch® Pro Filter (Invitrogen) и наборы плазмид GenElute™ (Sigma Aldrich). Другие способы, используемые в данном документе, включают специфичные для последовательности изотермические способы амплификации, которые устраняют необходимость термоциклирования. Вместо нагревания эти способы обычно используют ДНК-полимеразу с вытесняющей цепью активностью, например Bst ДНК-полимеразу, Large Fragment (New England Biolabs), для разделения дуплексной ДНК. ДНК также может быть получена из молекул РНК путем амплификации посредством использования обратных транскриптаз (ОТ), которые являются РНК-зависимыми ДНК-полимеразами. ОТ полимеризуют цепь ДНК, которая комплементарна исходной матрице РНК и называется кДНК. Затем эта кДНК может быть дополнительно амплифицируется с помощью ПЦР или изотермических способов, как описано выше. Специальная ДНК также может быть получена коммерчески от компаний, включая, но не

ограничиваясь, GenScript; GENEWIZ®; GeneArt® (Life Technologies); и Integrated DNA Technologies.

В данном документе также представлены вирусные векторы, которые включают сконструированные последовательности hSMN. В одном варианте осуществления изобретения rAAVhu68.SMN представляет собой вирусный вектор, который состоит из внешнего компонента и внутреннего генома ДНК. Внешний векторный компонент представляет собой капсид AAVhu68, как определено в данном документе. Внутри капсида упакован геном одноцепочечной ДНК, состоящий из трансгена выживания моторного нейрона (hSMN) человека, фланкированного двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV. Энкансер, промотор, интрон, кодирующая последовательность hSMN1 и (полиА) сигнал содержат трансген hSMN. ITR являются генетическими элементами, ответственными за репликацию и упаковку генома во время продуцирования вектора, и являются единственными вирусными цис-элементами, необходимыми для генерации rAAV. Экспрессия кодирующей последовательности hSMN управляется промотором CB7, гибридом между немедленным ранним энхансером цитомегаловируса (CMV) (C4) и промотором куриного бета-актина. Транскрипция с этого промотора усиливается присутствием CI. ПолиА сигнал rBG включается для обеспечения терминации транскриптов мРНК hSMN человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения «hSMN» представляет собой hSMN1.

В одном аспекте предоставляется кодирующая последовательность, которая кодирует функциональный белок SMN. Под «функциональным hSMN» подразумевается ген, который кодирует белок SMN, который обеспечивает по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или около того же, или более чем 100% от уровня биологической активности нативного белка выживания моторных нейронов или его природного варианта или полиморфа, который не связан с заболеванием. Кроме того, SMN1 гомолог – SMN2 также кодирует белок SMN, но обрабатывает функциональный белок менее эффективно. На основании количества копий SMN2 субъекты, у которых отсутствует функциональный ген hSMN, демонстрируют SMA в различной степени. Таким образом, для некоторых субъектов может быть желательным, чтобы белок SMN обеспечивал менее чем 100% биологической активности нативного белка SMN. В определенном варианте осуществления изобретения термины «hSMN1», «hSMN» и

«функциональный hSMN» используются взаимозаменяемо.

Существует множество анализов для измерения экспрессии SMN и уровней активности *in vitro*. См., например, Tanguy et al., 2015, процитировано выше. Способы, описанные в данном документе, также можно комбинировать с любой другой терапией для лечения SMA или ее симптомов. В некоторых вариантах осуществления изобретения стандарт медицинской помощи может включать нусинерсен, который представляет собой SMN2 пре-матричная рибонуклеиновая кислота (мРНК)-направляющий антисмысловой олигонуклеотид (ASO), одобренный FDA и EMA [SPINRAZA™, Biogen]. См., например, патенты США № 6166197, US 6210892, US 7101993; US 7838657; US 8110560; US 8361977; US 8980853. Это SMN2-направленный антисмысловой олигонуклеотид, который вводят интратекально. Рекомендуемая дозировка составляет 12 мг (5 мл на введение). Лечение начинается с 4 нагрузочных доз; первые три ударные дозы вводили с 14-дневными интервалами, 4^{-ю} ударную дозу вводили через 30 дней после 3^{-й} и поддерживающую дозу вводили один раз каждые 4 месяца после этого.

В одном варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность функционального SMN представляет собой последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, разделяющую 95% идентичность с ней. В одном варианте осуществления изобретения предоставляется модифицированная кодирующая последовательность hSMN. Предпочтительно модифицированная кодирующая последовательность hSMN имеет идентичность менее чем около 80%, предпочтительно около 75% или менее по сравнению с полноразмерной нативной последовательностью, кодирующей hSMN (Фиг. 1B-1C SEQ ID NO: 3). В одном варианте осуществления изобретения модифицированная кодирующая последовательность hSMN характеризуется улучшенной скоростью трансляции по сравнению с нативной hSMN после AAV-опосредованной доставки (например, rAAV). В одном варианте осуществления изобретения модифицированная кодирующая последовательность hSMN разделяет менее чем около 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61% или менее идентичности с полной нативной кодирующей последовательностью hSMN1. В одном варианте осуществления изобретения модифицированная кодирующая последовательность hSMN представляет собой SEQ ID NO: 1, или последовательность, разделяющую 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или

более идентичности с SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления изобретения выбирается другая кодирующая последовательность SMN.

В еще других вариантах осуществления изобретения выбирается кодирующая последовательность для изоформы SMN, отличной от изоформы D. Дополнительно или альтернативно, композиция или схема, представленные в данном документе, могут комбинировать лечение с использованием исходного AAVhu68.SMN, кодирующего белок SMN изоформы D, в сочетании с исходным вектором, кодирующим другой белок SMN. Этот исходный вектор может иметь капсид AAVhu68 или другой капсид.

Термин «процент (%) идентичности», «идентичность последовательности», «процент идентичности последовательности» или «на процентов идентичная» в контексте последовательностей нуклеиновых кислот относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются аналогичными при выравнивании на совпадение. Сравнение идентичности последовательностей может выполняться по всей длине генома, желательна полная длина последовательности, кодирующей ген, или фрагмента по меньшей мере около от 500 до 5000 нуклеотидов. Однако также может быть необходима идентичность между более мелкими фрагментами, например из по меньшей мере около девяти нуклеотидов, как правило, из по меньшей мере около от 20 до 24 нуклеотидов, из по меньшей мере около от 28 до 32 нуклеотидов, из по меньшей мере около 36 или более нуклеотидов.

Процент идентичности можно легко определить для аминокислотных последовательностей по всей длине белка, полипептида, от около 32 аминокислот до около 330 аминокислот, или для их пептидного фрагмента, или кодирующих последовательностей соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот. Длина подходящего аминокислотного фрагмента может составлять по меньшей мере 8 аминокислот и может быть до около 700 аминокислот. Как правило, когда речь идет об «идентичности», «гомологии» или «сходстве» между двумя различными последовательностями, «идентичность», «гомология» или «сходство» определяются по отношению к «выровненным» последовательностям. «Выровненные» последовательности или «выравнивания» относятся к множеству нуклеотидных последовательностей или белковых (аминокислотных) последовательностей, часто содержащих коррекции для

отсутствующих или дополнительных оснований или аминокислот по сравнению с эталонной последовательностью.

Идентичность может быть определена путем подготовки выравнивания последовательностей и использования различных алгоритмов и/или компьютерных программ, известных в данной области техники или коммерчески доступных [например, BLAST, ExPASy; ClustalO; FASTA; используя, например, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритм Смита-Уотермана]. Выравнивания выполняются с помощью любой из разнообразных общедоступных или коммерчески доступных программ для множественного выравнивания последовательностей. Программы выравнивания последовательностей доступны для аминокислотных последовательностей, например программы Clustal Omega, Clustal X, MAP, PIMA, MSA, BLOCKMAKER, MEME и Match-Box. Как правило, любая из этих программ используется с настройками по умолчанию, хотя специалист в данной области техники может при необходимости менять эти настройки. Альтернативно, специалист в данной области техники может использовать другой алгоритм или компьютерную программу, которая обеспечивает по меньшей мере такой уровень идентичности или выравнивания, который обеспечивается указанными алгоритмами и программами. См., например, J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

Многочисленные программы выравнивания последовательностей также доступны для нуклеотидных последовательностей. К примерам таких программ относится Clustal Omega, Clustal W, CAP Sequence Assembly, BLAST, MAP и MEME, доступ к которым можно получить через веб-серверы в интернете. Специалистам в данной области техники известны другие источники таких программ. Альтернативно, также применяются утилиты Vector NTI. В данной области техники также известен ряд алгоритмов, которые могут использоваться в данной области техники для измерения идентичности нуклеотидных последовательностей, включая те алгоритмы, которые входят в описанные выше программы. В качестве другого примера полинуклеотидные последовательности могут сравниваться с помощью Fasta™ - программы в GCG версии 6.1. Fasta™ обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательностей участков наилучшего перекрытия между запрашиваемой и искомой последовательностями. Например, процент идентичности последовательностей между последовательностями нуклеиновых

кислот может быть определен с использованием Fasta™ с его параметрами по умолчанию (размер слова 6 и коэффициент NOPAM для матрицы оценки), как это предусмотрено в GCG версии 6.1, включенной в данный документ посредством ссылки.

II. Экспрессионная кассета и векторы

В одном варианте осуществления изобретения гены hSMN, описанные в данном документе, встроены в подходящий генетический элемент (вектор), пригодный для генерации вирусных векторов и/или для доставки в клетку-хозяина, например голую ДНК, фаг, транспозон, космиду, эписому и т.д., который переносит последовательности hSMN1, переносимые в нем. Выбранный вектор может быть доставлен любым подходящим способом, включая трансфекцию, электропорацию, липосомную доставку, с помощью методик слияния мембран, с помощью введения с высокой скоростью покрытых ДНК гранул, вирусную инфекцию и слияние протопластов. Способы, которые используются для создания таких конструкций, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают в себя генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методики. См., например, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. В одном аспекте предложена экспрессионная кассета, содержащая последовательности нуклеиновой кислоты hSMN.

Таким образом, в одном аспекте предложен аденоассоциированный вирусный вектор, который содержит капсид AAV и по меньшей мере одну экспрессионную кассету, причем по меньшей мере одна экспрессионная кассета содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие SMN, и последовательности контроля экспрессии, которые направляют экспрессию последовательностей SMN в клетке-хозяине. Вектор AAV также содержит последовательности ITR AAV. В одном варианте осуществления изобретения ITR взяты из AAV, отличного от того, который предоставляет капсид. В предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательности ITR из AAV2 или их удаленная версия (Δ ITR) могут использоваться для удобства и ускорения нормативного утверждения. Однако могут быть выбраны ITR из других источников AAV. Если источник ITR взят из AAV2, а капсид AAV – из другого источника AAV, результирующий вектор может быть назван псевдотипированным. Как правило, векторный геном AAV содержит 5' ITR AAV, кодирующие последовательности

hSMN и любые регуляторные последовательности и 3' ITR AAV. Однако другие конфигурации этих элементов могут быть подходящими. Была описана сокращенная версия 5' ITR, называемая Δ ITR, в которой удалены D-последовательность и сайт концевое разделения (trs). В других вариантах осуществления изобретения используются полноразмерные ITR 5' и 3' AAV.

В одном аспекте предложена конструкция, которая представляет собой молекулу ДНК (например, плазмиду), пригодную для создания вирусных векторов. Экспрессионная кассета обычно содержит промоторную последовательность как часть последовательностей контроля экспрессии, например, расположенных между выбранной 5' ITR последовательностью и кодирующей последовательностью hSMN. Иллюстративная плазида и вектор, описанные в данном документе, используют повсеместный промотор куриного β -актина (CB) с немедленным ранним энхансером CMV (IE CMV). В качестве альтернативы можно использовать нейрон-специфичные промоторы [см., например, базу данных нейрон-специфических промоторов Lockery Lab, доступную по адресу chinook.uoregon.edu/promoters.html]. Такие нейрон-специфические промоторы включают, без ограничения, например, промоторы синапсина I (SYN), кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, тубулина-альфа I, нейрон-специфической энолазы и бета-цепи тромбоцитарного фактора роста. См. Nioki et al., *Gene Therapy*, June 2007, 14 (11): 872-82, которая включена в данный документ посредством ссылки. Другие нейрон-специфические промоторы включают промотор декарбоксилазы глутаминовой кислоты 67 кДа (GAD67), гомеобокс Dlx5/6, рецептора 1 глутамата (GluR1), промотор препратахикинина 1 (Tac1), промоторы нейрон-специфической энолазы (NSE) и дофаминергического рецептора 1 (Drd1a). См., например, Delzor et al., *Human Gene Therapy Methods*. August 2012, 23(4): 242-254. В другом варианте осуществления изобретения промотор представляет собой промотор GUSb www.jci.org/articles/view/41615#B30.

Другие промоторы, такие как конститутивные промоторы, регулируемые промоторы [см., например, WO 2011/126808 и WO 2013/04943] или промотор, чувствительный к физиологическим сигналам, могут быть использованы в векторах, описанных в данном документе. Промотор (-ы) может (могут) быть выбран (-ы) из различных источников, например как немедленный ранний энхансер/промотор цитомегаловируса (CMV), ранний

энхансер/промотор SV40, промотор JC-полимовируса, промоторы основного белка миелина (MBP) или глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), промотор, связанный с латентностью вируса простого герпеса (HSV-1) (LAP), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV), нейрон-специфический промотор (NSE), промотор фактора роста тромбоцитов (PDGF), hSYN, промотор меланин-концентрирующего гормона (MCH), CBA, промотор матричного металлопротеина (MPP) и промотор куриного бета-актина.

В дополнение к промотору экспрессионная кассета и/или вектор могут содержать одну или более других подходящих последовательностей инициации, терминации транскрипции, последовательностей энхансера, сигналов эффективного процессирования РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК, например WPRE; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. Примеры подходящих последовательностей полиА включают, например, полиА SV40, SV50, бычьего гормона роста (bGH), человеческого гормона роста и синтетические полиА. Примером подходящего энхансера является энхансер CMV. Другие подходящие энхансеры включают те, которые подходят для показаний со стороны ЦНС. В одном варианте осуществления изобретения экспрессионная кассета содержит один или более энхансеров экспрессии. В другом варианте осуществления изобретения экспрессионная кассета содержит два или более энхансеров экспрессии. Эти энхансеры могут быть одинаковыми или могут отличаться друг от друга. Например, энхансер может включать немедленным ранний энхансер CMV. Этот энхансер может присутствовать в двух копиях, которые расположены рядом друг с другом. Альтернативно, двойные копии энхансера могут быть разделены одной или более последовательностями. В еще одном варианте осуществления изобретения экспрессионная кассета дополнительно содержит интрон, например интрон куриного бета-актина. Другие подходящие интроны включают известные в данной области техники, например, такие как описанные в WO 2011/126808. Необязательно, одна или более последовательностей могут быть

выбраны для стабилизации мРНК. Примером такой последовательности является модифицированная последовательность WPRE, которая может быть сконструирована выше от последовательности полиА и ниже от кодирующей последовательности [см., например, MA Zanta-Boussif et al., *Gene Therapy* (2009) 16: 605–619.

Эти контрольные последовательности «функционально связаны» с последовательностями гена hSMN. Как используется в настоящем документе, термин «функционально связаны» относится к обеим последовательностям регулирующим экспрессию, которые являются смежными с представляющим интерес геном, так и регулирующими экспрессию последовательностями, которые действуют в виде транс-факторов (*in trans*) или дистанционно для контроля представляющего интерес гена.

В одном варианте осуществления представлен самокомплементарный AAV. Аббревиатура «sc» в данном контексте относится к самокомплементарному. «Самокомплементарный AAV» относится к конструкции в которой кодирующий участок, переносимый нуклеотидной последовательностью рекомбинантного AAV, был разработан для образования внутримолекулярной матрицы двухцепочечных ДНК. При инфицировании вместо того, чтобы ожидать клеточноопосредованного синтеза второй цепи, две комплементарные половины одноцепочечной AAV (оцAAV) будут связываться с образованием одной единицы двухцепочечной ДНК (дцДНК), которая готова к немедленной репликации и транскрипции. См., например, D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248–1254. Самокомплементарные AAV описаны, например, в патентах США № 6596535; 7125717 и 7456683, полное описание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Способы получения и выделения вирусных векторов AAV, подходящих для доставки субъекту, известны в данной области техники. См., например, опубликованную заявку на патент США № 2007/0036760 (15 февраля 2007 г.), патент США 7790449; патент США 7282199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689 и US 7588772 B2]. В одной системе клеточную линию-производитель временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует трансген, фланкированный ITR, и конструкцией (-ями), которая (-ые) кодирует (-ют) *rep* и *cap*. Во второй системе линию упаковывающих

клеток, которая стабильно поставляет *rep* и *cap*, временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует трансген, фланкированный ITR. В каждой из этих систем вирионы AAV вырабатываются в ответ на инфекцию хелперным аденовирусом или вирусом герпеса, что требует отделения rAAV от контаминирующего вируса. Совсем недавно были разработаны системы, которые не требуют инфицирования хелперным вирусом для восстановления AAV – необходимые хелперные функциональные элементы (т.е. аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29, а также полимераза вируса герпеса) также поставляются системой *in trans*. В этих более новых системах хелперные функциональные элементы могут поставляться путем временной трансфекции клеток конструкциями, которые кодируют требуемые хелперные функции, или клетки могут быть искусственно сконструированы с возможностью стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функции, экспрессию которых можно контролировать на транскрипционном или посттранскрипционном уровне. В еще одной системе трансген, фланкированный ITR, и *rep/cap*-гены вводятся в клетки насекомых путем инфицирования векторами на основе бакуловируса. Обзоры этих систем продуцирования см., в целом, например, у Zhang et al, 2009, "Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922–929, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Способы создания и использования этих и других систем продуцирования AAV также описаны в следующих патентах США, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки: 5139941; 5741683; 6057152; 6204059; 6268213; 6491907; 6660514; 6951753; 7094604; 7172893; 7201898; 7229823 и 7439065.

Необязательно, гены *hSMN*, описанные в данном документе, могут быть встроены в другие системы доставки, включая вирусные векторы, отличные от rAAV. Такие другие вирусные векторы могут включать любой вирус, подходящий для генной терапии, включая, но не ограничиваясь этим, аденовирус; вирус герпеса; лентивирус; ретровирус; бокавирус и т.д. Соответственно, когда генерируется один из этих других векторов, он создается как вирусный вектор с дефектом репликации.

В определенных вариантах осуществления изобретения представлены сконструированные векторы AAVhu68.SMN. В одном варианте осуществления изобретения векторный геном rAAVhu68SMN

имеет последовательность SEQ ID NO: 15. В другом варианте осуществления изобретения векторный геном rAAVhu68SMN имеет последовательность SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления изобретения термины «rAAVhu68.SMN1» и «rAAVhu68.SMN» используются взаимозаменяемо.

III. Композиции и использование

В данном документе также представлены фармацевтические композиции. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, разработаны для доставки нуждающимся в этом субъектам с помощью любого подходящего пути или комбинации различных путей.

Эти средства доставки представлены для того, чтобы избежать прямой системной доставки суспензии, содержащей композицию (-ии) AAV, описанную (-ые) в данном документе. Соответственно, это может иметь преимущество в снижении дозы по сравнению с системным введением, снижении токсичности и/или уменьшении нежелательных иммунных реакций на AAV и/или трансгенный продукт.

Альтернативно, могут быть выбраны другие пути введения (например, пероральный, ингаляционный, интраназальный, интратрахеальный, внутриартериальный, внутриглазный, внутривенный, внутримышечный и другие парентеральные пути).

Необязательно иммуносупрессивная совместная терапия может использоваться у нуждающегося субъекта. Иммунодепрессанты для такой совместной терапии включают, но не ограничиваются ими, глюкокортикоид, стероиды, антиметаболиты, ингибиторы Т-клеток, макролид (например, рапамицин или рапалог) и цитостатические агенты, включая алкилирующий агент, антиметаболит, цитотоксический антибиотик, антитело или агент активный на иммунофиллине. Иммунодепрессанты могут включать азотистый иприт, нитрозомочевину, соединение платины, метотрексат, азатиоприн, меркаптопурин, фторурацил, дактиномицин, антрациклин, митомицин С, блеомицин, митрамицин, антитела к рецептору ИЛ-2 (CD25) или CD3-направленные антитела, анти-ИЛ-2 антитела, циклоспорин, такролимус, сиролимус, ИФН- β , ИФН- γ , опиоид или агент, связывающий ФНО- α (фактор некроза опухолей-альфа). В определенных вариантах осуществления изобретения иммуносупрессивная терапия может быть начата за 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более дней до или после введения генной терапии. Такая иммуносупрессивная терапия может включать введение одного, двух или более лекарственных средств (например,

глюкокортикоидов, преднелизона, микофенолята мофетила (MMF) и/или сиролимуса (т.е. рапамицина)). Такие иммуносупрессивные лекарственные средства могут вводиться нуждающемуся субъекту один, два или более раз в той же дозе или в скорректированной дозе. Такая терапия может включать совместное введение двух или более лекарственных средств (например, преднелизона, микофенолята мофетила (MMF) и/или сиролимуса (т.е. рапамицина)) в один и тот же день. Один или более из этих лекарственных средств могут быть продлены после введения генной терапии, в той же дозе или скорректированной дозе. Такая терапия может длиться около 1 недели (7 дней), около 60 дней или дольше, если это необходимо. В определенных вариантах осуществления выбран режим без такролимуса.

Векторы rAAVhu68.hSMN, описанные в данном документе, могут быть дозированы в одной композиции или в нескольких композициях. Необязательно, могут быть доставлены два или более разных rAAV [см., например, WO 2011/126808 и WO 2013/049493]. В другом варианте осуществления изобретения такие множественные вирусы могут содержать разные вирусы с дефектом репликации (например, AAV, аденовирус и/или лентивирус). Альтернативно, доставка может быть опосредована не вирусными конструкциями, например «голой ДНК», «голой плазмидной ДНК», РНК и мРНК; в сочетании с различными композициями для доставки и наночастицами, включая, например, мицеллы, липосомы, композиции катионных липидов-нуклеиновых кислот, композиции полигликанов и других полимеров, липидные и/или холестериновые конъюгаты с нуклеиновыми кислотами и другие конструкции, такие как описаны в данном документе. См., например, X. Su et al., *Mol. Pharmaceutics*, 2011, 8 (3), pp 774-787; веб-публикация: March 21, 2011; WO2013/182683, WO 2010/053572 и WO 2012/170930, которые включены в данное описание в качестве ссылки. Такие невирусные конструкции доставки hSMN могут вводиться способами, описанными ранее. Вирусные векторы или невирусные фрагменты переноса ДНК или РНК могут быть составлены с физиологически приемлемым носителем для использования в применениях переноса генов и генной терапии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения rAAVhu68.SMA очищают от любых загрязнений, связанных с производством, до хранения и/или приготовления состава для доставки субъекту. Можно выбрать ряд подходящих способов очистки. Примеры подходящих способов очистки описаны, например,

в международной заявке на патент № PCT/US2016/065,970, поданной 9 декабря 2016 г., и ее приоритетных документах, заявках на патент США № 62/322,071, поданная 13 апреля 2016 г. и 62/226,357, поданная 11 декабря 2015 г. и озаглавленная «Масштабируемый способ очистки AAV9», которые включены в данный документ посредством ссылки. Способы очистки AAV8, Международная патентная заявка № PCT/US2016/065,976, поданная 9 декабря 2016 г., и являющиеся приоритетными документами патентная заявка США № 62/322,098, поданная 13 апреля 2016 г. и 62/266341, поданная 11 декабря 2015 г., и rh10, Международная патентная заявка № PCT/US16/66013, поданная 9 декабря 2016 г., и ее приоритетные документы, патентная заявка США № 62/322,055, поданная 13 апреля 2016 г. и 62/266,347, озаглавленная «Масштабируемый способ очистки AAVrh10», также поданная 11 декабря 2015 г., и AAV1 – Международная патентная заявка № PCT/US2016/065,974, поданная 9 декабря 2016 г., и ее приоритетные документы патентная заявка США № 62/322,083, поданная 13 апреля 2016 г. и 62/26351 «Масштабируемый способ очистки AAV1», поданная 11 декабря 2015 года, включенные в данный документ посредством ссылки.

Для векторов rAAVhu68.SMN1, описанных в данном документе, количественное определение геномных копий (GC) можно использовать в качестве величины дозы, содержащейся в составе. Может применяться любой известный в данной области техники способ для определения количества геномных копий (GC) у композиций дефектных по репликации вирусов настоящего изобретения. Один способ осуществления титрования количества GC AAV заключается в следующем: Очищенные образцы вектора AAV сначала обрабатывают ДНКазой для удаления загрязняющей ДНК хозяина, полученной в результате производственного процесса. Устойчивые к ДНКазе частицы затем подвергают термообработке, чтобы высвободить геном из капсида. Высвобожденные геномы затем количественно определяют с помощью ПЦР в режиме реального времени, используя наборы праймеров/зондов, которые нацеливаются на специфический участок вирусного генома (например, сигнал полиА). Другим подходящим методом для определения копий генома является количественная ПЦР (кПЦР), в частности оптимизированная кПЦР или цифровая капельная ПЦР [Lock Martin et al., Human Gene Therapy Methods. April 2014, 25(2): 115–125. doi:10.1089/hgtb.2013.131, опубликовано онлайн перед редактированием 13 декабря 2013 г.]. Альтернативно, ViroCyt3100

можно использовать для количественного анализа частиц или проточной цитометрии.

Композиции rAAVhu68.SMN1 могут быть составлены в дозированных единицах, чтобы содержать количество rAAV, которое находится в диапазоне от около $1,0 \times 10^9$ GC до около 9×10^{15} GC (например, в расчете на массу тела от около 2,5 кг до около 70 кг), включая все целые или дробные количества в пределах этого диапазона, и предпочтительно от $1,0 \times 10^{12}$ GC до $1,0 \times 10^{14}$ GC для пациента-человека. В одном варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 или 9×10^9 GC на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} или 9×10^{10} GC на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} или 9×10^{11} GC на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} или 9×10^{12} GC на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} или 9×10^{13} GC на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} или 9×10^{14} GC на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} или 9×10^{15} GC на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В одном варианте осуществления с целью применения для человека доза может находиться в диапазоне от 1×10^{10} до около 1×10^{15} GC на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне.

В некоторых вариантах осуществления изобретения доза может находиться в диапазоне от около 1×10^9 GC/г массы головного

мозга до около 1×10^{12} GC/г массы головного мозга. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза может находиться в диапазоне от около 3×10^{10} GC/г массы головного мозга до около 3×10^{11} GC/г массы головного мозга. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза может находиться в диапазоне от около 5×10^{10} GC/г массы головного мозга до около $1,85 \times 10^{11}$ GC/г массы головного мозга.

В одном варианте осуществления изобретения rAAVhu68.SMN1 может доставляться в дозах от по меньшей мере около 1×10^9 GC до около 1×10^{15} или от около 1×10^{11} до 5×10^{13} GC. Подходящие объемы для доставки этих доз и концентраций могут быть определены специалистом в данной области. Например, могут быть выбраны объемы от 1 мкл до 150 мл, причем более высокие объемы выбираются для взрослых. Как правило, для новорожденных младенцев подходящий объем составляет от около 0,5 мл до около 10 мл, для более старших детей может быть выбран от около 0,5 мл до около 15 мл. Для малышей может быть выбран объем от около 0,5 мл до около 20 мл. Для детей могут быть выбраны объемы до 30 мл. Для пред-подростков и подростков могут быть выбраны объемы до 50 мл. В еще других вариантах осуществления изобретения пациент может получать интратекальное введение в выбранном объеме от около 5 мл до около 15 мл, или от около 7,5 мл до около 10 мл. Могут быть определены другие подходящие объемы и дозировки. Дозировка будет подбираться таким образом, чтобы сбалансировать терапевтическую пользу с любыми побочными эффектами, и такие дозы могут варьироваться в зависимости от терапевтического применения, для которого используется рекомбинантный вектор.

Вышеописанный rAAVhu68.SMN1 может быть доставлен в клетки-хозяева согласно опубликованным способам. В определенных вариантах осуществления изобретения для введения пациенту-человеку rAAV подходящим образом суспендируют в водном растворе, содержащем солевой раствор, поверхностно-активное вещество и физиологически совместимую соль или смесь солей. Соответственно, состав доводят до физиологически приемлемого значения pH, например, в диапазоне pH от 6 до 9, или pH от 6,5 до 7,5, pH от 7,0 до 7,7 или pH от 7,2 до 7,8. Поскольку pH спинномозговой жидкости составляет от около 7,28 до около 7,32, для интратекальной доставки может быть желательным значение pH в этом диапазоне; тогда как для внутривенной доставки может быть желательным pH от 6,8 до 7,2. Однако другие значения pH в самых

широких диапазонах и эти поддиапазоны могут быть выбраны для другого пути доставки.

Подходящее поверхностно-активное вещество или комбинация поверхностно-активных веществ могут быть выбраны среди неионных поверхностно-активных веществ, которые являются нетоксичными. В одном варианте осуществления изобретения выбирают поверхностно-активное вещество с бифункциональным блок-сополимером, оканчивающееся первичными гидроксильными группами, например, такое как Pluronic® F68 [BASF], также известное как полксамер 188, которое имеет нейтральный pH, имеет среднюю молекулярную массу 8400. Могут быть выбраны другие поверхностно-активные вещества и другие полксамеры, т.е. неионогенные триблок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли(пропиленоксида)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксида)), SOLUTOL HS 15 (макрогол-15 гидроксистеарат), LABRASOL (полиоксикаприловый глицерид), полиокси-10-олеиловый эфир, TWEEN (сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты), этанол и полиэтиленгликоль. В одном варианте осуществления изобретения композиция содержит полксамер. Эти сополимеры обычно называют буквой «Р» (для полксамера), за которой следуют три цифры: первые две цифры $\times 100$ дают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового ядра, а последняя цифра $\times 10$ показывает процентное содержание полиоксиэтилена. В одном варианте осуществления изобретения выбран полксамер 188. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в количестве от около 0,0005% до около 0,001% суспензии.

В одном примере композиция может содержать, например, забуференный солевой раствор, содержащий один или более из хлорида натрия, бикарбоната натрия, декстрозы, сульфата магния (например, сульфата магния $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), хлорида калия, хлорида кальция (например, хлорида кальция $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), двухосновный фосфат натрия и их смеси в воде. Соответственно, для интратекальной доставки осмолярность находится в диапазоне, совместимом со спинномозговой жидкостью (например, от около 275 до около 290); см., например, emedicine.medscape.com/-article/2093316-overview. Необязательно, для интратекальной доставки коммерчески доступный разбавитель может быть использован в качестве суспендирующего агента или в комбинации с другим суспендирующим агентом и другими необязательными эксципиентами. См., например, раствор

Elliotts B® [Lukare Medical]. Каждые 10 мл раствора Эллиотта В содержат:

Хлорид натрия, USP 73 мг

Бикарбонат натрия, USP 19 мг

Декстроза, USP 8 мг

Сульфат магния • 7H₂O, USP 3 мг

Хлорид калия, USP 3 мг

Хлорид кальция • 2H₂O, USP 2 мг

Фосфат натрия, двухосновный • 7H₂O, USP 2 мг

Вода для инъекций, USP до 10 мл

Концентрация электролитов:

Натрий 149 мгЭкв/литр Бикарбонат 22,6 мгЭкв/литр

Калий 4,0 мгЭкв/литр Хлорид 132 мгЭкв/литр

Кальций 2,7 мгЭкв/литр Сульфат 2,4 мгЭкв/литр

Магний 2,4 мгЭкв/литр Фосфат 1,5 мгЭкв/литр

Формулы и молекулярные массы ингредиентов:

ИНГРЕДИЕНТ	МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФОРМУЛА	МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА
Хлорид натрия	NaCl	58,44
Бикарбонат натрия	NaHCO ₃	84,01
Декстроза	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16
Сульфат магния • 7H ₂ O	Mg ₂ SO ₄ • 7H ₂ O	246,48
Хлористый калий	KCl	74,55
Хлорид кальция • 2H ₂ O	CaCl ₂ • 2H ₂ O	147,01
Фосфат натрия двухосновный • 7H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	268,07

Значение pH раствора Эллиотта В составляет от 6 до 7,5, а осмолярность составляет 288 мОсмоль на литр (рассчитанная). В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция, содержащая ген rAAVhu68.SMN1, доставляется при pH в диапазоне от 6,8 до 8 или от 7,2 до 7,8, или от 7,5 до 8. Для интратекальной доставки может быть желательным pH выше 7,5, например от 7,5 до 8 или 7,8.

В определенных вариантах осуществления изобретения композиция может содержать забуференный солевой водный раствор,

не содержащий бикарбонат натрия. Такая композиция может содержать забуференный солевой водный раствор, содержащий один или более из фосфата натрия, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида кальция, хлорида магния и их смесей в воде, такой как буфер Гарварда. Водный раствор может дополнительно содержать Kolliphor® P188, полуксамер, который коммерчески доступен от BASF, который ранее продавался под торговым названием Lutrol® F68. Водный раствор может иметь pH 7,2.

В другом варианте осуществления изобретения композиция может содержать забуференный солевой водный раствор, содержащий 1 мМ фосфата натрия (Na_3PO_4), 150 мМ хлорида натрия (NaCl), 3 мМ хлорида калия (KCl), 1,4 мМ хлорида кальция (CaCl_2), 0,8 мМ хлорида магния (MgCl_2) и 0,001% Kolliphor® 188. См., например, harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html. В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительным является буфер Гарварда из-за лучшей стабильности pH, наблюдаемой с буфером Гарварда. В таблице ниже приведено сравнение буфера Гарварда и буфера Эллиота В.

Композиции спинномозговой жидкости (СМЖ)

Компонент	Единицы	СМЖ	Эллиота В	Гарварда
Na+	мгЭкв/л	117–137	149	150
K+	мгЭкв/л	2,3–4,6	4,0	3,0
Mg+	мгЭкв/л	2,2	2,4	0,8
Ca ²⁺	мгЭкв/л	2,2	2,7	1,4
Cl ⁻	мгЭкв/л	113–127	132	155
НСО ₃ ⁻	мгЭкв/л	22,9	22,6	0
Фосф.	мг/дл	1,2–2,1	1,5	1,0
Глюкоза	мг/дл	45–80	80	–
Плюроник	%	–	0,001% (добавлено)	0,001% (добавлено)
Осмолярность	мОсм/л	295	288	290
pH		7,31	6,0–7,5* Дрейф до 9+ (8,2+ без	7,2 (титруется до)

			титрации)	
--	--	--	-----------	--

В других вариантах осуществления изобретения композиция может содержать один или более усилителей проницаемости. Примеры подходящих усилителей проницаемости могут включать в себя, например, маннит, гликохолат натрия, таурохолат натрия, дезоксихолат натрия, салицилат натрия, каприлат натрия, капрат натрия, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауреловый эфир или ЭДТА.

В другом варианте осуществления изобретения композиция включает в себя носитель, разбавитель, эксципиент и/или адъювант. Подходящие носители могут быть легко выбраны специалистом в данной области с учетом показания, для которого предназначен вирус переноса. Например, один подходящий носитель включает физиологический раствор, который может быть приготовлен с различными буферными растворами (например, натрий-фосфатным буфером). Другие типичные носители включают в себя стерильный физиологический раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло и воду. Буфер/носитель должен включать в себя компонент, который предотвращает прилипание rAAV к инфузионной трубке, но не мешает активности связывания rAAV *in vivo*.

Необязательно, композиция данного изобретения может содержать, помимо rAAV и носителя (-ей), другие традиционные фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы. К подходящим примерам консервантов относится хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновая кислота, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол и параклорфенол. К подходящим химическим стабилизаторам относятся желатин и альбумин.

Композиции согласно данному изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, такой как определено выше. Соответственно, композиции, описанные в данном документе, содержат эффективное количество одного или более AAV, суспендированных в фармацевтически подходящем носителе и/или смешанных с подходящими эксципиентами, предназначенными для доставки субъекту посредством инъекции, осмотического насоса, интратекального катетера или для доставки другим устройством или путем. В одном примере композиция составлена для интратекальной доставки. В одном варианте осуществления изобретения

интратекальная доставка включает инъекцию в позвоночный канал, например в субарахноидальное пространство.

Описанные в данном документе вирусные векторы могут быть использованы для приготовления лекарственного средства для доставки hSMN субъекту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом, для поставки функционального SMN субъекту и/или для лечения спинальной мышечной атрофии. Курс лечения может необязательно включать повторное введение одного и того же вирусного вектора (например, вектора AAVhu68) или другого вирусного вектора (например, AAVhu68 и AAVrh10). Еще другие комбинации могут быть выбраны с использованием вирусных векторов и невирусных систем доставки, описанных в данном документе.

Используемые в данном документе термины «интратекальная доставка» или «интратекальное введение» относятся к пути введения лекарственных средств посредством инъекции в позвоночный канал, более конкретно в субарахноидальное пространство, так что он достигает спинномозговой жидкости (СМЖ). Интратекальная доставка может включать люмбальную пункцию, внутрижелудочковую (включая интрацеребровентрикулярную (ICV)), субокципитальную/интрацистермальную и/или C1-2 пункцию. Например, материал может быть введен для диффузии по всему субарахноидальному пространству посредством люмбальной пункции. В другом примере инъекция может осуществляться в мостомозжечковую цистерну.

Используемые в данном документе термины «интерцистермальная доставка» или «интерцистермальное введение» относятся к способу введения лекарственных средств непосредственно в спинномозговую жидкость *cisterna magna cerebellomedularis*, более конкретно, через субокципитальную пункцию или путем прямой инъекции в мостомозжечковую цистерну или через постоянно установленную трубку.

В одном варианте осуществления изобретения доставка может быть выполнена с использованием устройства, описанного в данном документе.

IV. Устройство и способ доставки фармацевтической композиции в спинномозговую жидкость

В одном аспекте векторы, представленные в данном документе, можно вводить интратекально с помощью способа и/или устройства, представленного в этом разделе и описанного далее в примерах и на Фиг. 7. В качестве альтернативы могут быть выбраны другие

устройства и способы. Способ включает в себя этапы введения спинальной иглы в мостомозжечковую цистерну пациента, подсоединения гибкой трубки к проксимальной канюле спинальной иглы и выходного отверстия клапана к проксимальному концу гибкой трубки, и после указанные этапы подготовки и соединения и после обеспечения возможности самонаполнения трубки спинномозговой жидкостью пациента, подсоединение первого сосуда, содержащего некоторое количество изотонического раствора, к промывочному впускному отверстию клапана и последующее соединение второго сосуда, содержащего некоторое количество фармацевтической композиции, к векторному впускному отверстию клапана. После подключения первого и второго сосудов к клапану открывается путь для потока жидкости между векторным впускным отверстием и выпускным отверстием клапана, и фармацевтическая композиция вводится пациенту через спинальную иглу, и после введения фармацевтической композиции путь для потока жидкости открывается через впускное отверстие для промывки и выпускное отверстие клапана, и изотонический раствор вводится в спинальную иглу для смывания фармацевтической композиции в организм пациента.

В другом аспекте предложено устройство для интерцистернальной доставки фармацевтической композиции. Устройство включает в себя первый сосуд, содержащий некоторое количество фармацевтической композиции, второй сосуд, содержащий изотонический раствор, и спинальную иглу, через которую фармацевтическая композиция может быть впрыснута из устройства непосредственно в спинномозговую жидкость внутри мостомозжечковой цистерны пациента. Устройство дополнительно включает в себя клапан, имеющий первое впускное отверстие, соединенное с первым сосудом, второе впускное отверстие, соединенное со вторым сосудом, выпускное отверстие, соединенное со спинальной иглой, и затвор конуса Люэра для управления потоком фармацевтической композиции и изотонического раствора, проходящих через спинальную иглу.

Используемый в данном документе термин «компьютерная томография» (КТ) относится к рентгенографии, в которой трехмерное изображение структуры тела создается компьютером из серии плоских изображений поперечного сечения, сделанных вдоль оси.

Устройство или медицинское устройство 10, как показано на Фиг. 7, включает в себя один или более сосудов 12 и 14,

соединенных между собой клапаном 16. Сосуды 12 и 14 обеспечивают свежий источник фармацевтической композиции, лекарственного средства, вектора или подобного вещества и свежий источник изотонического раствора, такого как физиологический раствор, соответственно. Сосуды 12 и 14 могут представлять собой медицинское устройство любой формы, которое позволяет вводить жидкости пациенту.

Например, каждый сосуд 12 и 14 может быть выполнен в форме шприца, канюли или тому подобного. Например, в проиллюстрированном варианте осуществления изобретения сосуд 12 выполнен в виде отдельного шприца, содержащего некоторое количество фармацевтической композиции, и он называется в данном документе «векторным шприцем». Только для целей примера сосуд 12 может содержать около 10 куб. см фармацевтической композиции или тому подобного.

Аналогично, сосуд 14 может быть выполнен в форме отдельного шприца, канюли или тому подобного, который содержит некоторое количество солевого раствора и может называться «промывочным шприцем». Только для целей примера сосуд 14 может содержать около 10 куб. см солевого раствора.

В качестве альтернативы сосуды 12 и 14 могут быть выполнены в формах, отличных от шприцов, и могут быть интегрированы в одно устройство, например интегрированное медицинское инъекционное устройство, иметь пару отдельных камер, одну для фармацевтической композиции и одну для солевого раствора. Кроме того, размер камер или сосудов может быть предоставлен по необходимости, чтобы содержать желаемое количество жидкости.

В показанном варианте осуществления изобретения клапан 16 предусмотрен в качестве 4-ходового запорного крана, имеющего поворотный шарнир конуса Люэра 18. Клапан 16 соединяет сосуды 12 и 14 (т. е. векторный шприц и промывочный шприц в проиллюстрированном варианте осуществления изобретения), и поворотный шарнир конуса Люэра позволяет закрывать или открывать путь через клапан 16 к каждому из сосудов 12 и 14. Таким образом, путь через клапан 16 может быть закрыт как для векторного шприца, так и для промывочного шприца, или может быть открыт для выбранного одного из векторного шприца и промывочного шприца. В качестве альтернативы 4-ходового запорного крана, клапан может быть 3-ходовым запорным краном или устройством управления текучей средой.

В проиллюстрированном варианте осуществления изобретения клапан 16 соединен с одним концом удлинительной трубки 20 или подобного контура для жидкости. Трубка 20 может быть выбрана на основе желаемой длины или внутреннего объема. Только в качестве примера длина трубки может составлять от 6 до 7 дюймов.

В проиллюстрированном варианте осуществления изобретения противоположный конец 22 трубки 12 соединен с набором 24 удлинителей Т-образного соединителя, который, в свою очередь, соединен со спинальной иглой 26. В качестве примера игла 26 может представлять собой спинальную иглу диаметром пять дюймов, калибром 22 или 25. Кроме того, в качестве опции, спинальная игла 26 может быть соединена с проводниковой иглой 28, такой как проводниковая игла на три с половиной дюйма, калибром 18.

При использовании спинальная игла 26 и/или необязательная проводниковая игла 28 могут продвигаться у пациента по направлению к мостомозжечковой цистерне. После продвижения иглы могут быть получены изображения компьютерной томографии (КТ), которые позволяют визуализировать иглу 26 и/или 28 и соответствующие мягкие ткани (например, параспинальные мышцы, кости, ствол головного мозга и спинной мозг). Правильное размещение иглы подтверждается наблюдением за спинномозговой жидкостью (СМЖ) в игольной канюле и визуализацией кончика иглы в мостомозжечковой цистерне. После этого относительно короткая удлинительная трубка 20 может быть прикреплена к вставленной спинальной игле 26, а затем 4-ходовой запорный кран 16 может быть прикреплен к противоположному концу трубки 20.

Вышеуказанная сборка может стать «самонаполняющейся» СМЖ пациента. После этого, предварительно наполненный нормальным солевым раствором промывочный шприц 14 прикрепляется к промывному впускному отверстию 4-ходового запорного крана 16, а затем векторный шприц 12, содержащий фармацевтическую композицию, прикрепляется к векторному впускному отверстию 4-ходового запорного крана 16. После этого выпускное отверстие 16 запорного крана открывается к векторному шприцу 12, и содержимое векторного шприца может быть медленно введено через клапан 16 и собранный аппарат в организм пациента в течение определенного периода времени. Только для целей примера этот период времени может составлять приблизительно 1-2 минуты и/или любое другое время по желанию.

После впрыскивания содержимое векторного шприца 12

поворотные затворы 18 на запорном кране 16 поворачиваются во второе положение, таким образом, чтобы запорный кран 16 и узел иглы может быть промыт с желаемым количеством нормального солевого раствора с использованием прилагаемого предварительно наполненного промывочного шприца 14. В качестве примера можно использовать от 1 до 2 куб. см физиологического раствора; хотя при необходимости могут использоваться большее или меньшее количество. Обычный физиологический раствор обеспечивает принудительное введение всей или большей части фармацевтической композиции через собранное устройство пациенту и, таким образом, небольшое количество фармацевтической композиции остается на собранном устройстве или не остается совсем.

После того, как собранное устройство было промыто физиологическим раствором, собранное устройство целиком, включая иглу (-ы), удлинительную трубку, запорный кран и шприцы, медленно удаляется из субъекта и помещается на хирургический лоток для переноса в емкость для биологически опасных отходов или жесткий контейнер (для иглы (игл)).

Главный исследователь может провести процесс скрининга, что в конечном итоге приведет к интерцистеральной (IC) процедуре. Главный исследователь может описать процесс, процедуру, саму процедуру введения и все потенциальные риски для безопасности с целью того, чтобы субъект (или назначенный опекун) был полностью информирован. Получают данные истории болезни, сопутствующих лекарств, медицинского осмотра, показателей жизненно важных функций, электрокардиограмму (ЭКГ) и результатов лабораторных исследований или они выполняются и предоставляются нейрорадиологу, нейрохирургу и анестезиологу для использования при скрининговой оценке пригодности субъекта для проведения процедуры IC.

Чтобы обеспечить достаточное время для проверки соответствия требованиям, в любое время между первым визитом скрининга и до одной недели до визита исследования могут быть выполнены следующие процедуры. Например, в «день 0» может быть получена магнитно-резонансная томография (МРТ) головы/шеи с гадолинием и без него (т. е., $eGFR > 30$ мл/мин/1,73 м²). В дополнение к МРТ головы/шеи, исследователь может определить необходимость любой дальнейшей оценки шеи с помощью исследований сгибания/разгибания. Протокол МРТ может включать в себя изображения протокола T1, T2, DTI, FLAIR и CINE.

Кроме того, MRA/MRV головы/шеи может быть получено в соответствии с институциональным протоколом (т.е., субъекты с историей интра/трансдуральных операций могут быть исключены или могут нуждаться в дальнейшем тестировании (например, радионуклеотидная цистернография)), что позволяет адекватно оценивать поток СМЖ и определять возможную блокировку или отсутствие сообщения между пространствами СМЖ.

Нейрорадиолог, нейрохирург и анестезиолог в конечном итоге обсуждают и определяют пригодность каждого субъекта для проведения процедур IC на основе всей доступной информации (сканы, история болезни, медицинский осмотр, лабораторные анализы и т.д.). Предоперационная оценка анестезии может быть также получена с «дня -28» до «дня 1», которая обеспечивает детальную оценку дыхательных путей, шеи (укороченная/утолщенная) и диапазона движения головы (степень сгибания шеи), имея в виду особые физиологические потребности субъекта MPS.

Перед процедурой IC, комплекс КТ подтвердит наличие следующего оборудования и лекарств: набор для люмбальной пункции у взрослых (LP) (предоставляется для каждого учреждения); BD (Becton Dickinson) спинальная игла калибра 22 или 25 × 3–7" (Quincke bevel); коаксиальная проводниковая игла, используемая по усмотрению интервенциониста (для введения спинальной иглы); 4-х ходовой запорный кран малого диаметра с поворотным шарниром конуса Люэра (Spin); набор удлинителей с Т-образным соединителем (трубки) с адаптером канюли Люэра, приблизительной длины 6,7 дюйма; Omnipaque 180 (йогексол) для интратекального введения; йодированный контраст для внутривенного (в/в) введения; 1% раствор лидокаина для инъекций (если не входит в комплект LP для взрослых); предварительно заполненный 10 куб. см обычного солевого раствора (стерильный) промывочный шприц; рентгеноконтрастный (-ые) маркер (-ы); оборудование для хирургической подготовки/бритья для бритья; подушки/опоры для правильного позиционирования интубированного субъекта; оборудование для эндотрахеальной интубации, аппарат общей анестезии и аппарат искусственной вентиляции легких; оборудование для интраоперационного нейрофизиологического мониторинга (IONM) (и необходимый персонал); и шприц объемом 10 куб. см, содержащий вектор; подготовленные и доставленные в комплекс КТ/операционной комнаты (OR) в соответствии с отдельным аптечным справочником.

Информированное соглашение на проведение процедуры подтверждено и задокументировано в медицинской карте и/или файле исследования. Отдельное согласие на проведение процедуры от рентгенологов и анестезиологов получено в соответствии с институциональными требованиями. Субъект имеет внутривенный доступ, размещенный в соответствующем отделении стационарной помощи в соответствии с институциональными инструкциями (например, два сайта для в/в доступа). Внутривенные жидкости назначаются по усмотрению анестезиолога. По усмотрению анестезиолога и в соответствии с институциональными инструкциями субъекту может быть осуществлена и проведена эндотрахеальная интубация под общей анестезией в соответствующем отделении ухода за пациентами, в зоне ожидания или в комплексе хирургических/КТ процедур.

Выполняется люмбальная пункция, сначала для удаления 5 куб. см спинномозговой жидкости (СМЖ), а затем для внутривенного введения контраста (Omnipaque 180), чтобы помочь визуализации мостомозжечковой цистерны. Соответствующие маневры для позиционирования субъекта могут быть выполнены для облегчения диффузии контраста в мостомозжечковую цистерну.

Оборудование интраоперационного нейрофизиологического мониторинга (IONM) прикрепляют к субъекту. Субъект помещается на стол сканера КТ в положении лежа или в положении лежа на боку. Должен присутствовать соответствующий персонал для обеспечения безопасности субъекта во время транспортировки и размещения. Если это будет сочтено целесообразным, субъект может быть расположен таким образом, который обеспечивает сгибание шеи до степени, определяемой как безопасная во время предоперационной оценки, и с нормальными сигналами нейрофизиологического монитора, задокументированными после позиционирования.

Соответствующий персонал может быть подтвержден в отношении присутствия и идентифицирован на сайте: Интервенционист/нейрохирург, выполняющий процедуру; Анестезиолог и лаборант (-ы) обеспечения дыхания; Медсестры и помощники врача; лаборанты КТ (или OR); специалист по нейрофизиологии; и координатор центра. «Тайм-аут» может быть выполнен в соответствии с протоколом Объединенной комиссии/больницы, чтобы проверить правильность субъекта, процедуры, сайта, расположения и наличия всего необходимого оборудования в комнате. Ведущий исследователь сайта может затем подтвердить сотрудникам, что

он/она может приступить к подготовке субъекта.

Кожа субъекта под основанием черепа выбривается соответствующим образом. Выполняются снимки предварительного сканирования КТ с последующим КТ предпроцедурного планирования с в/в контрастом, если интервенционист посчитает необходимым локализовать целевое местоположение и изображение сосудистой системы. После того, как целевой участок (мостомозжечковая цистерна) определен и спланирована траектория иглы, кожа подготавливается и драпируется с использованием стерильной техники в соответствии с установленными инструкциями. Рентгеноконтрастный маркер помещается на целевую область кожи, как указано интервенционистом. Кожа под маркером анестезируется путем инфильтрации 1% лидокаином. Спинальная игла 22G или 25G затем продвигается к мостомозжечковой цистерне с возможностью использования коаксиальной проводниковой иглы.

После продвижения иглы КТ-изображения получают с использованием наименьшей толщины среза КТ, возможной с использованием установленного оборудования (в идеале $\leq 2,5$ мм). Получают серийные КТ-изображения с использованием минимально возможной дозы облучения, которая обеспечивает адекватную визуализацию иглы и соответствующих мягких тканей (например, параспинальных мышц, кости, ствола мозга и спинного мозга). Правильное размещение иглы подтверждается наблюдением за СМЖ в игольной канюле и визуализацией кончика иглы в мостомозжечковой цистерне.

Интервенционист подтверждает, что векторный шприц расположен близко, но вне стерильного поля. Перед обработкой или введением фармацевтической композиции в векторный шприц персонал, выполняющий процедуру в стерильной области, надевает перчатки, маску и средства защиты глаз.

Удлинительная трубка прикрепляется к вставленной спинальной игле, которая затем прикрепляется к 4-ходовому запорному крану. После того, как этот аппарат «самополняется» СМЖ субъекта, 10 куб. см предварительно заполненный обычным физиологическим раствором промывочный шприц прикреплен к промывочному впускному отверстию 4-ходовой запорного крана. Векторный шприц затем предоставляется интервенционистам и присоединяется к векторному впускному отверстию на 4-ходовом запорном кране.

После того, как выпускное отверстие из крана открыто к векторному шприцу путем помещения поворотного шарнира запорного

крана в первое положение, содержимое векторного шприца вводят медленно (в течение примерно 1–2 минут), с осторожностью чтобы не применять чрезмерное усилие к поршню шприца во время инъекции. После того, как содержимое векторного шприца впрыскивается, поворотный шарнир на запорном кране поворачиваются во второе положение, таким образом, чтобы запорный кран и узел иглы могли быть промыты 1–2 куб. см нормального физиологического раствора с использованием прилагаемого предварительно заполненного промывочного шприца.

При готовности, интервенционист предупреждает персонал, чтобы он/она снимал аппарат с субъекта. Одним движением игла, удлинительная трубка, запорный кран и шприцы медленно удаляется из субъекта и помещаются на хирургический лоток для перемещения в емкость для биологически опасных отходов или жесткий контейнер (для иглы).

Место введения иглы исследуется на наличие признаков кровотечения или утечки СМЖ и обрабатывается в соответствии с указаниями исследователя. Место закрывается с помощью марли, хирургической ленты и/или повязки Tegaderm, как указано. Затем субъекта убирают из КТ-сканера и помещают в положении на спине на носилки. Присутствует соответствующий персонал для обеспечения безопасности субъекта во время транспортировки и размещения.

Анестезия прекращается, и пациент должен соблюдать следующие институциональные рекомендации по лечению после анестезии. Нейрофизиологические мониторы удаляют с субъекта. Изголовок носилок, на которых лежит субъект, должен быть слегка приподнят (~ 30 градусов) во время восстановления. Субъект доставляется в подходящее отделение ухода после анестезии в соответствии с институциональными инструкциями. После того, как субъект адекватно восстановил сознание и находится в стабильном состоянии, он/она будет допущен к соответствующему этажу/блоку для обязательных оценок, указанных в протоколе. В соответствии с протоколом будут проводиться неврологические оценки, и главный исследователь наблюдает за уходом за субъектом в сотрудничестве с больничным и исследовательским персоналом.

В одном варианте осуществления изобретения способ доставки композиции, представленный в данном документе, включает стадии: введение спинномозговой иглы в мостомозжечковую цистерну пациента;

соединение отрезка гибкой трубки с проксимальной канюлей спинномозговой иглы и выпускного отверстия клапана с проксимальным концом гибкой трубки; после указанных этапов введения и соединения и после того, как трубка сможет самонаполняться спинномозговой жидкостью пациента, подсоединяют первый сосуд, содержащий некоторое количество изотонического раствора, к промывочному впускному отверстию клапана и затем соединяют второй сосуд, содержащий некоторое количество фармацевтической композиции, с векторным впускным отверстием клапана; после соединения указанных первого и второго сосудов с клапаном открывают путь для потока жидкости между векторным впускным отверстием и выпускным отверстием клапана и вводят фармацевтическую композицию пациенту через спинномозговую иглу; и после инъекции фармацевтической композиции открывают путь для потока жидкости через промывочное впускное отверстие и выпускное отверстие клапана и впрыскивают изотонический раствор в спинномозговую иглу, чтобы смыть фармацевтическую композицию пациенту. В определенном варианте осуществления изобретения способ дополнительно включает подтверждение правильного размещения дистального кончика спинномозговой иглы внутри мостомозжечковой цистерны перед тем, как соединить трубку и клапан с канюлей спинномозговой иглы. В некоторых вариантах осуществления изобретения этап подтверждения включает визуализацию дистального кончика спинномозговой иглы в пределах мостомозжечковой цистерны с помощью визуализации компьютерной томографии (КТ). В некоторых вариантах осуществления изобретения этап подтверждения включает в себя наблюдение за наличием спинномозговой жидкости пациента в канюле спинномозговой иглы.

В вышеописанном способе клапан может быть запорным краном с поворотным шарниром Люэра, выполненным с возможностью поворота в первое положение, открывающее поток из векторного впускного отверстия в выпускное отверстие, одновременно блокируя поток через впускное отверстие для промывки, и во второе положение открывающее поток от впускного отверстия для промывки до выпускного отверстия, одновременно блокируя поток через векторное впускное отверстия, и при этом поворотный шарнир Люэра расположен в указанном первом положении, когда указанная фармацевтическая композиция впрыскивается пациенту, и расположен в указанном втором положении, когда указанную фармацевтическую композицию промывают у указанного пациента изотоническим

раствором. В некоторых вариантах осуществления изобретения после введения изотонического раствора в спинальную иглу для промывки фармацевтической композиции пациенту спинальная игла у пациента извлекается с трубкой, клапаном и первым и вторым сосудами, соединенными с ней в этой сборке. В определенных вариантах осуществления изобретения клапан представляет собой 4-ходовой запорный кран с поворотным шарниром конуса Люэра. В определенных вариантах осуществления изобретения первый и второй сосуды представляют собой отдельные шприцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-образный соединитель расположен на канюле спинномозговой иглы и соединяет трубку со спинальной иглой. Необязательно, спинальная игла включает в себя проводниковую иглу на дистальном конце спинальной иглы. Спинальная игла может быть пятидюймовой, спинальной иглой 22 или 24 калибра. В некоторых вариантах осуществления изобретения проводниковая игла представляет собой 3,5-дюймовую проводниковую иглу 18 калибра.

В определенных аспектах в способе используется устройство, которое состоит, как минимум, из первого сосуда для содержания некоторого количества фармацевтической композиции; второго сосуда для содержания изотонического раствора; спинномозговой иглы, через которую фармацевтическая композиция может быть извлечена из устройства непосредственно в спинномозговую жидкость внутри мостомозжечковой цистерны пациента; и клапана, имеющего первое впускное отверстие, соединенное с первым сосудом, второе впускное отверстие, соединенное со вторым сосудом, выпускное отверстие, соединенное со спинальной иглой, и люэровский затвор для управления потоком фармацевтической композиции и изотонического раствора через спинальную иглу. В некоторых вариантах осуществления изобретения клапан представляет собой запорный кран с поворотным шарниром Люэра, выполненным с возможностью поворота в первое положение, открывающее поток из первого впускного отверстия в выпускное отверстие, одновременно блокируя поток через второе впускное отверстие, и во второе положение, открывающее поток из второго впускного отверстия к выпускному отверстию, одновременно блокируя поток через первое впускное отверстие. Необязательно клапан представляет собой 4-ходовой запорный кран с поворотным шарниром конуса Люэра. В определенных вариантах осуществления изобретения первый и второй сосуды представляют собой отдельные

шприцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения спинальная игла соединена с клапаном посредством длины гибкой трубки. Т-образный соединитель может соединять трубку со спинальной иглой. В некоторых вариантах осуществления изобретения спинальная игла представляет собой пятидюймовую, спинальную иглу 22 или 24 калибра. В некоторых вариантах осуществления изобретения устройство дополнительно содержит проводниковую иглу, соединенную с дистальным концом спинальной иглы. Необязательно, проводниковая игла представляет собой 3,5-дюймовую проводниковую иглу 18 калибра.

□ Этот способ и это устройство каждый необязательно может использовать для интратекальной доставки композиций, представленных в данном документе. Альтернативно, для такой интратекальной доставки могут использоваться другие способы и устройства.

В одном варианте осуществления изобретения однократную дозу AAVhu68.SMA, как предоставлено в данном документе, вводят взрослым (по меньшей мере возрастом 18 лет (≥ 18)) с генетически подтвержденной 5q SMA и/или историей болезни SMA типа 3. В других вариантах осуществления изобретения пациенты могут быть моложе (например, от 12 лет до 18 лет; от 6 лет до 12 лет; от 3 лет до 6 лет; от 18 месяцев до 3 лет; от 6 месяцев до 18 месяцев; новорожденный). Пациенты могут быть неамбулаторными или амбулаторными. Дозирование может осуществляться посредством однократной дозы вектора путем инъекции в ICM (интрамостомозжечковая цистерна). В одном варианте осуществления изобретения доза составляет от около 3×10^{13} GC до высокой дозы 1×10^{14} GC. Однако в данном документе предоставлены другие подходящие диапазоны. Оценки эффективности могут включать в себя одно или более из: моторных оценок, таких как шестиминутный тест Уолта (6MWT), время 10-метровой ходьбы, оценка RULM, подъем на 4 ступени, тест с 9 отверстиями и стержнями; легочные функциональные тесты, такие как форсированная жизненная емкость (FVC), максимальное давление на выдохе (MEP) и максимальное давление на вдохе (MIP); измерения дыхательной функции, PedsQL (шкала усталости), SMA-FRS (функциональная шкала оценки), электрофизиология, такая как тестирование нервной проводимости, СМАР (например, амплитуда СМАР в локтевом и перионеальном отделах, а также сенсорное тестирование, концентрация белка SMN и другие исследовательские биомаркеры оцениваются в СМЖ.

В одном варианте осуществления изобретения используется вектор, содержащийся в шприце в соответствующей концентрации. Перед введением вектора выполняется люмбальная пункция, чтобы удалить заданный объем СМЖ, а затем ввести интратекально (IC) йодированный контраст, чтобы помочь в визуализации релевантной анатомии мостомозжечковой цистерны. Внутривенный (в/в) контраст можно вводить до или во время введения иглы в качестве альтернативы интратекальному контрасту. Решение об использовании в/в или IC контраста принимается по усмотрению интервенциониста. Пациента анестезируют, интубируют и располагают на процедурном столе. Оборудование интраоперационного нейрофизиологического мониторинга (IONM) прикрепляют к участнику. Место инъекции подготавливается и драпируется в стерильной технике. Спинальную иглу (22–25 G) продвигают в мостомозжечковую цистерну под рентгеноскопическим контролем. Более крупная проводниковая игла используется для облегчения размещения иглы. После подтверждения размещения иглы удлинительный набор прикрепляется к спинальной игле и обеспечивается его наполнение СМЖ пациента. По усмотрению интервенциониста шприц, содержащий контрастирующий материал, может быть присоединен к удлинительному набору, и может быть введено небольшое количество, чтобы подтвердить размещение иглы в мостомозжечковой цистерне. После того как положение иглы подтверждено с помощью КТ-сопровождения +/- контрастной инъекции, шприц, содержащий вектор (например, 5,6 мл), подключается к удлинительному набору. Содержимое шприца медленно вводят в течение 1–2 минут, доставляя объем около 5 мл. Иглу медленно удаляют из пациента.

Как используется в данном документе, «субъект» представляет собой млекопитающее, например, человека, мышь, крысу, морскую свинку, собаку, кошку, лошадь, корову, свинью или отличного от человека примата, такого как обезьяна, шимпанзе, бабуин или горилла. В одном варианте осуществления изобретения субъект представляет собой пациента-человека, который имеет SMA.

Классификация Международного консорциума SMA определяет несколько степеней тяжести фенотипа SMA в зависимости от возраста проявления и основных этапов развития моторики. Предложено обозначение SMA 0 для отображения пренатального проявления и тяжелых контрактур суставов, лицевой диплегии и дыхательной недостаточности. SMA типа I, болезнь Верднига-Гофмана I, является наиболее тяжелой постнатальной формой с

проявлением в течение 6 месяцев после рождения. Пациенты не могут сидеть и имеют серьезные нарушения дыхания. SMA типа II является промежуточной формой с проявлением в течение первых 2 лет; дети могут сидеть, но не могут ходить. Клиническое течение является различным. Тип III (также называемый болезнью Кугельберга-Веландера) начинается после 2 лет и обычно имеет хроническое развитие. Дети могут стоять и ходить без посторонней помощи по меньшей мере в младенческом возрасте. Форма для взрослых (тип IV) – самая легкая, проявляется в возрасте после 30 лет; было зарегистрировано несколько случаев заболевания, и его распространенность точно не известна.

В некоторых случаях SMA обнаруживается у плода примерно на 30 до 36 неделях беременности. В этой ситуации может быть желательно лечить новорожденного как можно скорее после родов. Также может быть желательно лечить плод в утробе матери. Таким образом, предложен способ спасения и/или лечения неонатального субъекта, имеющего SMA, включающий стадию доставки гена hSNM1 в нейрональные клетки новорожденного субъекта (например, пациента-человека). Предложен способ спасения и/или лечения плода, имеющего SMA, включающий стадию доставки гена hSMN в нейрональные клетки плода в утробе матери. В одном варианте осуществления изобретения ген доставляется в композиции, описанной в данном документе, посредством интратекальной инъекции. Этот способ может использовать любую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный белок hSMN, будь то hSMN, оптимизированный по кодонам, как описано в данном документе, или нативный hSMN, или аллель hSMN с потенцированной активностью по сравнению с белком «дикого типа» или их комбинацией. В одном варианте осуществления изобретения внутриутробное лечение определяется как введение конструкции hSMN, как описано в данном документе, после обнаружения SMA у плода. См., например, David et al., Recombinant adeno-associated virus-mediated in utero gene transfer gives therapeutic transgene expression in the sheep, Hum Gene Ther. 2011 Apr;22(4):419–26. doi: 10.1089/hum.2010.007. Epub 2011 Feb 2, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления изобретения лечение новорожденных определяется как введение конструкции hSMN, как описано в данном документе, в течение 8 часов, первых 12 часов,

первых 24 часов или первых 48 часов после родов. В другом варианте осуществления изобретения особенно для примата (человека или отличного от человека), доставка новорожденных происходит в течение периода от около 12 часов до около 1 недели, 2 недель, 3 недель или около 1 месяца, или после около 24 часов до около 48 часов. В другом варианте осуществления изобретения для SMA с поздним проявлением композиция доставляется после появления симптомов. В одном варианте осуществления изобретения лечение пациента (например, первую инъекцию) начинают до первого года жизни. В определенных вариантах осуществления изобретения например, у детей, конструкция вводится повторно, например, после 1 года. Необязательно разрешено более одного повторного введения. Такое повторное введение может осуществляться с помощью вектора того же типа, другого вирусного вектора или посредством невирусной доставки, как описано в данном документе. В другом варианте осуществления изобретения лечение начинают после первого 1 года или в возрасте после первых от 2 до 3 лет, в возрасте после 5 лет, в возрасте после 11 лет или в более старшем возрасте.

Согласно данному изобретению «терапевтически эффективное количество» AAV.hSMN доставляется, как описано в данном документе, для достижения желаемого результата, т. е. лечения SMA или одного или более его симптомов. Другие желаемые результаты включают уменьшение мышечной слабости, увеличение мышечной силы и тонуса, предотвращение или уменьшение сколиоза, или поддержание или улучшение дыхательного здоровья, или уменьшение тремора или подергивания. Другие желаемые конечные точки могут быть определены врачом.

В определенных вариантах осуществления изобретения терапевтическая эффективность композиции, содержащей AAV.hSMN, как предоставлено в данном документе, может оцениваться по одному или более из следующих параметров. Такие оценки могут проводиться каждые 52 недели или с более длинным или коротким интервалом, например 8 недель, 12 недель, 36 недель, 48 недель или промежутки времени между ними. Оценки RULM в предопределенное время после дозирования сравниваются с показателями исходного уровня. Моторную функцию можно измерить с помощью теста 6MWT и времени 10-метровой ходьбы у амбулаторных субъектов. Моторную функцию можно измерить с помощью теста с 9 отверстиями и стержнями (амбулаторный и неамбулаторный) и теста

на подъем на 4 ступени (только амбулаторный). Легочную функцию можно измерить с помощью форсированной жизненной емкости (FVC), максимального давления на выдохе (MEP), максимального давления на вдохе (MIP). Могут быть оценены изменения от исходной линии в локтевой и перионеальной амплитуде СМАР. PedQLVersion 3.0 – многомерная шкала усталости, может оценивать модуль отчетов для взрослых. Может быть оценена SMA-FRS (функциональная шкала оценки). Может быть измерена фармакокинетика вектора в ДНК и других компонентах лекарственного средства на основе AAV в СМЖ, сыворотке и моче.

Как используется в данном документе, 6MWT – это мера расстояния, пройденного амбулаторным субъектом в 6MWT. 6MWT будет проводиться в длинном прямом коридоре с низкой интенсивностью движения, расположенном в помещении. 30-метровое расстояние будет помечено оранжевыми конусами на обоих концах. Стартовая линия будет отмечена яркой лентой.

RULM: Пересмотренный модуль для верхней конечности состоит из 20 двигательных заданий, выполняемых с одной верхней конечностью, выбранной субъектом. Производительность по каждому заданию оценивается оценщиком по шкале 0–2.

Тест с 9 отверстиями и стержням: 9-NPT – это краткий стандартизированный количественный тест функции верхних конечностей. Как доминантные, так и недоминантные руки тестируются дважды. Субъект сидит за столом с небольшим мелким контейнером с девятью кольшками и деревянным или пластиковым блоком с девятью пустыми отверстиями. По команде старта, когда запускается секундомер, субъект поднимает девять кольшков по одному за раз как можно быстрее, помещает их в девять лунок и, как только они попадают в лунки, снова удаляет их как можно быстрее, поместив их в мелкий контейнер. Общее время выполнения задания записывается. За двумя последовательными испытаниями с доминирующей рукой сразу же следуют два последовательных испытания с не доминирующей рукой. Оценка для 9-NPT является средней из четырех испытаний. Два испытания для каждой руки усредняются, преобразуются в обратные значения среднего времени для каждой руки, а затем два обратных значения усредняются.

Время 10-метровой ходьбы: Время 10-метровой ходьбы – это показатель времени, необходимого для ходьбы на 10 метров. Тест будет проводиться в длинном прямом коридоре с низкой интенсивностью движения, расположенном в помещении. 10 метровое

расстояние будет помечено оранжевыми конусами на обоих концах. Стартовая линия будет отмечена яркой лентой.

Подъем на 4 ступени: Тест подъема на 4 ступени оценивает время, необходимое для того, чтобы субъект поднялся и спустился по 4 ступенькам. Задание будет выполнено обученным оценщиком, который обеспечит, чтобы субъект мог безопасно выполнить задание. Ступени должны иметь подъем 16–20 см и перила. Субъекты проинструктированы как можно быстрее и подниматься и опускаться безопасным способом. Время, необходимое для выполнения задачи, а также необходимость использования поручня будут записаны.

Электрофизиологические исследования проводятся для оценки функции моторных единиц. СМАР: Исследования моторной нервной проводимости локтевого нерва должны проводиться преимущественно на правой руке, если нет веской причины избегать исследования этой конечности (например, преморбидное повреждение наложенного нерва). Оно включает в себя подачу тока к нерву и запись моторного ответа в мышце. Этот ответ называется суммарным потенциалом действия мышцы. Высота и площадь СМАР (амплитуда и АУС) могут быть измерены.

Функциональная шкала и шкала усталости:

Шкала усталости PedsQL, отчет для взрослых: Многомерная шкала усталости PedsQL представляет собой опросник из 18 пунктов, в котором оценивается общая утомляемость (6 пунктов), сон и отдых (6 пунктов), а также когнитивная усталость (6 пунктов).

SMA-FRS: SMA-FRS – это легко ведома порядковая рейтинговая шкала, основанная на 10 аспектах действий повседневной жизни. Каждый поднабор оценивается от 0 (полностью зависимый) до 5 (полностью независимый) субъектом или лицом, осуществляющим уход, с максимальной оценкой 50.

В одном варианте осуществления изобретения последовательность оценок выполняется в следующем порядке для пациента следующим образом: PedsQL (шкала усталости), SMA-FRS (функциональная шкала оценки), 6MWT, 15-минутный отдых (минимум), RULM, тест с 9 отверстиями и стержнями, 10-метровая ходьба, 15-минутный отдых (минимум), подъем на 4 ступени, PFT* и локтевой и перионеальный СМАР*. * Может быть выполнен в любом порядке. Тесты, которые не могут быть безопасно выполнены пациентом, будут опущены.

До лечения, пациента с SMA можно оценивать на наличие

нейтрализующих антител (Нат) к капсиду вектора rAAV, используемого для доставки гена hSMN-1. Такие Нат могут мешать эффективности трансдукции и снижать терапевтическую эффективность. Пациенты с SMA, у которых исходный сывороточный титр Нат \leq от 1:5 до \leq 1:20 или от \leq 1:2,5 до \leq 1:10, являются хорошими кандидатами для лечения по протоколу генной терапии rAAV.hSMN1. Лечение пациентов с SMA с титрами Нат $>$ 1:5 в сыворотке может потребовать комбинированной терапии, такой как временное совместное лечение с иммунодепрессантом до и/или во время лечения доставкой вектора rAAV.hSMN. Необязательно, иммунодепрессивная совместная терапия может использоваться в качестве меры предосторожности без предварительной оценки нейтрализующих антител к капсиду вектора AAV и/или другим компонентам препарата. В некоторых вариантах осуществления изобретения предшествующая иммунодепрессивная терапия может быть желательной для предотвращения потенциальной неблагоприятной иммунной реакции на трансгенный продукт hSMN, особенно у пациентов, у которых практически нет уровней активности SMN, при которых трансгенный продукт может рассматриваться как «чужой».

Иммунодепрессанты для такой совместной терапии включают, но не ограничиваются ими, глюкокортикоид, стероиды, антиметаболиты, ингибиторы Т-клеток, макролид (например, рапамицин или рапалог) и цитостатические агенты, включая алкилирующий агент, антиметаболит, цитотоксический антибиотик, антитело или агент активный на иммунофиллине. Иммунодепрессанты могут включать азотистый иприт, нитрозомочевину, соединение платины, метотрексат, азатиоприн, меркаптопурин, фторурацил, дактиномицин, антрациклин, митомицин С, блеомицин, митрамицин, антитела к рецептору ИЛ-2 (CD25) или CD3-направленные антитела, анти-ИЛ-2 антитела, циклоспорин, такролимус, сиролимус, ИФН- β , ИФН- γ , опиоид или агент, связывающий ФНО- α (фактор некроза опухолей-альфа). В определенных вариантах осуществления изобретения иммунодепрессивная терапия может быть начата до введения генной терапии. Такая терапия может включать совместное введение двух или более лекарственных средств (например, преднизона, микофенолата мофетила (MMF) и/или сиролимуса (т. е. рапамицина)) в один и тот же день. Один или более из этих лекарственных средств могут быть продлены после введения генной терапии, в той же дозе или скорректированной дозе. Такая терапия может проводиться в течение около 1 недели, около 15 дней, около

30 дней, около 45 дней, 60 дней или дольше, если это необходимо. В определенных вариантах осуществления изобретения пациент, получающий генную терапию rAAVhu68.SMA, описанную в данном документе, ранее получал лечение нусинерсеном. В других вариантах осуществления изобретения пациент получает постоянное лечение нусинерсеном и находится под наблюдением постгенной терапии для снижения или устранения необходимости такого лечения нусинерсеном. Пациенты, получающие rAAVhu68.SMA, могут получать другие виды лечения, включая, без ограничения, пиридостигмин [UMC Utrecht], R07034067 [Hoffman-LaRoche], целекоксиб, СК-2127107 [Astellas Pharma]. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность rAAVhu68.SMA измеряется по уменьшению частоты и/или дозы такой совместной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения поскольку терапия AAVhu68-SMN1, хотя и обладает длительным действием, может не приводить к столь высокой коррекции, которая требуется для выбранного пациента, поэтому может потребоваться переходна терапию нусинерсеном (Spinraza™) уже через 6 месяцев после лечения AAVhu68-SMN1, введение нусинерсена (Spinraza™) пациентам можно рассматривать как одновременное введение двух препаратов. См. также Wang et al., Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy, в котором обсуждается нынешний стандарт лечения SMA и www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1352/.

Например, когда проблема с SMA связана с питанием, целесообразно разместить гастростомическую трубку. Поскольку дыхательная функция ухудшается, предлагается трахеотомия или неинвазивная респираторная поддержка. Нарушение сна во время дыхания можно лечить с помощью ночного использования постоянного положительного давления в дыхательных путях. Операции при сколиозе у людей с SMA II и SMA III можно безопасно проводить, если форсированная жизненная емкость больше 30% -40%. Кресло с электроприводом и другое оборудование могут улучшить качество жизни. См. также патент США № 8211631, который включен в данный документ посредством ссылки.

Следует отметить, что формы единственного числа включают ссылки на одно или более. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или более» и «по меньшей мере один» взаимозаменяемо используются в настоящем документе.

Слова «содержат», «содержит» и «содержащий» должны

интерпретироваться включительно, а не исключительно. Слова «состоит», «состоящий» и его варианты должны толковаться исключительно, а не включительно. Хотя различные варианты осуществления изобретения в описании представлены с использованием «содержащего» языка, при других обстоятельствах связанный вариант осуществления изобретения также предназначен для интерпретации и описания с использованием «состоящего из» или «состоящего по существу из» языка.

Как используется в настоящем документе термин «около» означает вариабельность на 10% ($\pm 10\%$) от заданной эталонной величины, если не указано иное.

Как используется в данном документе, «заболевание», «расстройство» и «состояние» используются взаимозаменяемо для обозначения аномального состояния у субъекта.

Термин «экспрессия» используется в данном документе в его самом широком значении и включает в себя продуцирование РНК или РНК и белка. Что касается РНК, термин «экспрессия» или «трансляция» относится, в частности, к продукции пептидов или белков. Экспрессия может быть временной или может быть стабильной.

Термин «трансляция» относится к процессу в рибосоме, в котором цепь мРНК контролирует сборку аминокислотной последовательности с образованием белка или пептида.

Если в настоящем описании не указано иное, технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимает средний специалист в данной области техники, и используются со ссылкой на опубликованные тексты, которые обеспечивают специалиста в данной области техники общим руководством по многим из терминов, используемых в настоящей заявке.

Следующие примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

Пример 1. Новая клада F AAV – AAVhu68

ДНК ткани извлекали из образцов тканей человека в виде матрицы для ПЦР с помощью колонок QIAamp (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя со следующими модификациями. ДНК-полимераза Q5 (Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, NEB) была выбрана за ее необычайно высокую точность и надежную эффективность для восстановления полноразмерного гена VP1 потенциальных AAV в образцах, как описано Gao et al [Proc Natl

Acad Sci USA, 2002 Sep 3, 99(18): 11854–11859 (Epub 2002 Aug 21)] с набором праймеров, модифицированных следующим образом: были использованы вместо AV1NS, праймер, prm504, [GCTGCGTCAACTGGACCAATGAGAAC, SEQ ID NO: 23] и вместо обратного праймера AV2CAS, prm505 [CGCAGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA, SEQ ID NO: 24]. Условия ПЦР были изменены следующим образом:

	мкл
Вода	9
prm504	1,25
prm505	1,25
матрица	1
2X Q5	12,5

Программа ПЦР

	Время (секунды)	Цикл (-ы)
98	30	1
98	10	50
59	10	
72	93	
72	120	1

Полосы ~ 3 т.п.о. после ПЦР вырезали из геля; ДНК экстрагировали с помощью набора для экстракции из геля QIAquick (Qiagen) и клонировали в наборе для клонирования Zero Blunt® TOPO® PCR (Thermo Fisher Scientific). Плазмиды секвенировали для получения полной длины гена AAV VP1. Для большинства образцов по меньшей мере три плазмиды были полностью секвенированы, и консенсусные последовательности были взяты в качестве конечной последовательности AAV для этого образца.

Полученная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая капсидный белок vp1 AAVhu68, представлена в SEQ ID NO: 7. Смотрите также Фиг. 8B–8D. Аминокислотная последовательность vp1 AAVhu68 представлена на Фиг. 8A и SEQ ID NO: 8. По сравнению с AAV9, AAVhu31 и AAVhu32 две мутации (A67E и A157V) были идентифицированы как критические для AAVhu68 (обведено кружком на Фиг. 8A).

Затем *транс*-плазмиду pAAV2/hu68 получали путем загрузки гена VP1 hu68 в основную цепь pAAV2/9 вместо гена AAV9 VP1 для оценки эффективности упаковки, выхода и свойств трансдукции. Плазмида pAAV2/9 содержит 5' и 3' ITR AAV2, фланкирующие ген

капсида, и доступна от Penn Vector Core [Университет Пенсильвании, г. Филадельфия, штат Пенсильвания, США, pennvectorcore.med.upenn.edu].

Пример 2. Векторы AAVhu68

Были созданы и оценены векторы AAVhu68 и AAV9, несущие различные метки, такие как GFP и LacZ. Каждый из векторов создавали с использованием метода тройной трансфекции в клетках 293, как описано Gao et al. [Gao, Guang-Ping et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002): 11854-11859].

1. Получение транс-плазмиды pAAVhu68

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая капсидный белок vp1, представлена в SEQ ID NO: 7.

Транс-плазмиду pAAV2/hu68 получали путем загрузки гена VP1 hu68 в основную цепь pAAV2/9 вместо гена AAV9 VP1 для оценки эффективности упаковки, выхода и свойств трансдукции. Плазмида pAAV2/9 содержит 5' и 3' ITR AAV2, фланкирующие ген капсида, и доступна от Penn Vector Core [Университет Пенсильвании, г. Филадельфия, штат Пенсильвания, США, pennvectorcore.med.upenn.edu].

2. Выход векторов AAVhu68

Клетки 293 культивировали и поддерживали в DMEM, 1X (модификация Дульбекко среды Игла) с 4,5 г/л глюкозы, L-глутамина и пирувата натрия с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки в атмосфере с 5% CO₂ при 37 °C. Трансфекции выполняли, как описано Gao et al. [Gao, Guang-Ping et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002): 11854-11859.] с векторной плазмидой, замененной на pAAV2/hu68 или pAAV2/9. В качестве трансгенной кассеты использовали CB7.CI.ffLuciferase.RBG. Трансфицированные клетки затем культивировали в 6-луночных планшетах. Общий лизат клеток, а также супернатант собирали для количественного определения вируса с помощью анализа TaqMan (Applied Biosystems) с использованием зондов и праймеров, нацеленных на полиА-участок бета-глобина кролика в трансгенной кассете, как описано в Gao et al. [Gao, Guangping, et al. "Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo." Human gene therapy 11.15 (2000): 2079-2091.]. Выходы шести плазмид pAAV2/9 и шести плазмид pAAV2/hu.68

сравнивали в 6-луночной планшете, сравнивая друг с другом, с точки зрения как титра супернатанта, так и общего титра лизата. Каждая плазмида была получена из отдельной бактериальной колонии.

Выход AAVhu68 оказался аналогичным выходу AAV9 с точки зрения общего лизата. Однако в супернатанте выход AAVhu68 был значительно выше, чем выход AAV9. Таким образом, AAVhu68 был продемонстрирован как лучший вектор по сравнению с AAV9 с точки зрения продукции, так как супернатант является предпочтительным для крупномасштабного производства вируса.

3. *In vivo* трансдукция AAVhu68.LacZ

AAVhu68.CB7.nLacZ (также называемый AAVhu68.LacZ) создавали путем вставки последовательности, кодирующей локализованную в ядре бактериальную β -галактозидазу (nLacZ) в качестве трансгена, и затем получали, как описано выше. Для оценки эффективности упаковки, выхода, свойств трансдукции, эффективности трансдукции и тропизма AAVhu68 *in vivo*, мышам инъецировали 5×10^{11} копий генома вектора AAVhu68.LacZ с помощью различных способов введения, таких как внутривенное, внутримышечное и интраназальное введение. Мышцы, легкие, печень и сердце собирали после умерщвления мышей через две недели после введения вектора. Замороженные срезы каждого органа готовили, обрабатывали и анализировали в соответствии с традиционным протоколом, детектирующим экспрессию гена LacZ [Bell, Peter, et al. "An optimized protocol for detection of E. coli β -galactosidase in lung tissue following gene transfer." *Histochemistry and cell biology* 124.1 (2005): 77-85]. Эти результаты показали, что AAVhu68 продемонстрировал высокую эффективность трансдукции и широкий тропизм ткань/орган.

4. *In vivo* трансдукция AAVhu68.GFP по сравнению с AAV9.GFP

AAVhu68.GFP и AAV9.GFP были получены путем вставки гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP), в качестве трансгена, а затем получены, как описано выше. Для оценки эффективности упаковки, выхода, свойств трансдукции, эффективности трансдукции и тропизма AAVhu68 и AAV9 *in vivo*, мышам вводили AAVhu68.GFP или AAV9.GFP в дозах 1×10^{10} GC или 1×10^{11} GC. Были исследованы срезы из различных областей головного мозга (гиппокампа, моторной коры и мозжечка) мышей с интрацеребровентрикулярным введением векторов. Трансдукция векторов AAV наблюдалась во всех протестированных образцах

гиппокампа, за исключением одной из мышей, которым инъецировали 1×10^{10} GC AAV9.GFP. Лучшая трансдукция AAVhu68.GFP по сравнению с AAV9 наблюдалась в моторной коре. Кроме того, трансдукция в мозжечке AAVhu68.GFP наблюдалась, когда мышам вводили только 1×10^{11} GC вектора. У этих мышей AAVhu68 продемонстрировал более высокую эффективность трансдукции, а также более широкий тропизм в головном мозге по сравнению с AAV9.

В следующем эксперименте различные органы, такие как печень, почка, сердце и поджелудочная железа, извлекали у мышей, которым вводили AAVhu68.GFP внутривенно, подготавливали и обрабатывали, как описано Wang et al. [Wang L, Calcedo R, Bell P, Lin J, Grant RL, Siegel DL, Wilson JM, Hum Gene Ther. 2011 Nov; 22(11):1389-401; Wang L, Calcedo R, Wang H, Bell P, Grant R, Vandenberghe LH, Sanmiguel J, Morizono H, Batshaw ML, Wilson JM, Mol Ther. 2010 Jan; 18(1):126-34]. Сильный положительный сигнал наблюдался в печени, при этом почка, сердце и поджелудочная железа также демонстрировали трансдукцию вектора, что указывает на широкий тропизм вектора AAVhu68 в тканях/органах.

Пример 3. Векторы AAV, содержащие hSMN

AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG состоит из внешнего компонента и внутреннего генома ДНК. Внешний компонент вектора представляет собой $T=1$ икосаэдрический капсид серотипа hu68, состоящий из 60 копий трех вирусных AAV белков, VP1, VP2 и VP3, в соотношении приблизительно 1:1:8-10. Капсид содержит геном одноцепочечной ДНК, состоящий из трансгена выживания моторного нейрона 1 (hSMN1) человека, фланкированного двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV. Эхансер, промотор, интрон, кодирующая последовательность hSMN1 и сигнал полиаденилирования (полиА) содержат трансген SMN1 человека. ITR являются генетическими элементами, ответственными за репликацию и упаковку генома во время продуцирования вектора, и являются единственными вирусными цис-элементами, необходимыми для генерации rAAV. Экспрессия кодирующей последовательности hSMN1 управляется промотором CB7, гибридом между немедленным ранним эхансером цитомегаловируса (CMV) (C4) и промотором куриного бета-актина. Транскрипция с этого промотора усиливается присутствием интрона куриного бета-актина (CI). ПолиА сигнал бета-глобина кролика включается для обеспечения терминации транскриптов мРНК hSMN1 человека. Схема векторного генома

AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG показана на Фиг. 1А.

Описание элементов последовательности:

1. Инвертированные концевые повторы (ITR): ITR AAV (GenBank № NC001401) являются последовательностями, которые идентичны на обоих концах, но находятся в противоположной ориентации. Последовательности ITR AAV2 функционируют вместе как точка начала репликации векторной ДНК и как сигнал упаковки векторного генома, когда хелперные функции AAV и аденовируса предоставляются *in trans*. Как таковые, последовательности ITR представляют собой только *цис*-последовательности, необходимые для репликации и упаковки векторного генома.

2. CMV с немедленным ранним энхансером (382 п.о., GenBank № K03104.1).

3. Промотор промотора куриного β -актина (282 п.о.; GenBank № X00182.1) используется для обеспечения высокого уровня экспрессии белка выживания моторного нейрона 1 (hSMN1) человека.

4. Интрон куриного β -актина: Интрон размером 973 п.о. из гена куриного β -актина (GenBank № X00182.1) присутствует в кассете векторной экспрессии. Интрон транскрибируется, но удаляется из зрелой мРНК путем сплайсинга, объединяя вместе последовательности по обе стороны от него. Было показано, что присутствие интрона в экспрессионной кассете облегчает транспорт мРНК из ядра в цитоплазму, тем самым усиливая накопление устойчивого уровня мРНК для трансляции. Это общая черта в генных векторах, предназначенных для повышения уровня экспрессии генов.

5. Кодированная последовательность: Последовательность SMN1 человека (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/NM_000344.3) была оптимизирована по кодонам и синтезирована (UPenn). Спинальная мышечная атрофия (SMA) вызвана мутациями в теломерном гене выживания моторного нейрона 1 (SMN1). Мутации в SMN1 приводят к селективной токсичности для нижних моторных нейронов, что приводит к прогрессирующей потере нейронов и связанной с этим мышечной слабости и дегенерации. Трансген, который используется – SMN1, изоформа D. Изоформа D кодирует самую длинную изоформу, и считается, что этот вариант является преобладающим транскриптом/изоформой, продуцируемой SMN1 как в ЦНС, так и повсеместно.

6. Сигнал полиаденилирования: Сигнал полиаденилирования β -глобина кролика длиной 127 п.о. (GenBank № V00882.1) предоставляет собой *цис*-последовательности для эффективного

полиаденилирования мРНК антитела. Этот элемент функционирует как сигнал для терминации транскрипции, специфического события отщепления на 3'-конце образующегося транскрипта и добавления длинного полиаденильного хвоста.

Вектор получали с использованием обычных методик тройной трансфекции в клетках 293, как описано [Mizukami, Hiroaki, et al. A Protocol for AAV vector production and purification. Diss. Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, 1998.]. Все векторы были получены с помощью Vector Core в Университете Пенсильвании, как описано ранее [Lock, M., et al., Hum Gene Ther, 21: 1259-1271 (2010)].

Для определения титра копий генома (GC) для векторов AAV была выполнена методика с использованием капельной цифровой полимеразной цепной реакции (кцПЦР), как описано ранее (Lock, Martin, et al. "Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR." Human gene therapy methods 25.2 (2013): 115-125). Этот способ является практичным, сообщает об эквивалентных или более точных титрах, чем кПЦР, и не требует стандартной кривой для плазмиды. Используемый анализ включал расщепление ДНКазой I с последующим цифровым ПЦР-анализом для измерения инкапсулированных векторных геномных копий. Детекцию ДНК осуществляли с использованием специфичных для последовательности праймеров, нацеленных на участок полиА, в комбинации с флуоресцентно меченным зондом, гибридизующимся с тем же участком.

Пример 4. AAVhu68.CB7.CI.hSMN.RBG в модели SMA

Все процедуры на животных выполнялись в соответствии с протоколами, утвержденными Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Университета Пенсильвании. Все мыши содержались в отделении для животных Лабораторий трансляционных исследований в Университете Пенсильвании.

У мышей существует один ген SMN, который эквивалентен SMN1 человека (hSMN1). Полная потеря этого гена приводит к эмбриональному летальному фенотипу (Monani UR, Sendtner M, Coover DD et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 2000;9:333-9; Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM et al. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene

for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:9920-5). Одной из наиболее часто используемых доклинических моделей SMA для оценки терапевтических средств является модель мышцы SMN Δ 7. Модель мышцы SMN Δ 7 представляет собой трансгенную мышцу, разработанную на основе FVB, которая имеет 2 копии SMN2 человека (hSMN2) и 2 копии hSMN2 с удаленным экзоном 7 (SMN Δ 7). Мыши SMN Δ 7 дикого типа (ДТ) содержат 2 копии мышечных SMN (mSMN), гетерозиготные (ГЕТ.) мыши имеют 1 копию mSMN, а мыши с нокаутом (КО) SMN Δ 7 не имеют копий mSMN. У мышей КО SMN Δ 7 средняя продолжительность жизни составляет 13-15 дней, и демонстрируют сниженное количество моторных нейронов в спинном мозге, уменьшенный размер мышечных волокон, уменьшенную массу, нарушение правильного положения и передвижения, а также увеличенное количество частично и неиннервированных нервно-мышечных соединений. Основным преимуществом модели мышцы SMN Δ 7 является увеличенный интервал лечения по сравнению с моделями тяжелой SMA со средней продолжительностью жизни приблизительно 5 дней, при этом также отображается достаточно тяжелый фенотип для быстрого определения, влияют ли терапевтические вмешательства на ослабление заболевания. См. Le TT, Pham LT, Butchbach ME et al. SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. Hum Mol Genet 2005;14:845-57.

В примере 4 были использованы мыши mSMN $^{-/-}$ hSMN2 $^{+/+}$ SMN Δ 7 $^{+/+}$ (КО SMN Δ 7, также отмеченные как SMN Δ 7 в следующих примерах). Иммуногистохимический анализ SMN продемонстрировал, что в коре, мозжечке и спинном мозге у детенышей SMN Δ 7 не было экспрессии SMN1 (Фиг. 2). Через 23 дня после инъекции 3×10^{10} GC векторов AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG при рождении наблюдали детенышей SMN Δ 7, дикого типа и гетерозиготных однопаметников с повышенной экспрессией SMN. Введение осуществлялось путем интрацеребровентрикулярной инъекции в левый боковой желудочек.

Вирусную трансдукцию тестируемого вектора дополнительно оценивали гибридизацией *in-situ* (ISH) для кодон-оптимизированной рибонуклеиновой кислоты (РНК) hSMN1 в коре головного мозга животных, получавших AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG. Животные дикого типа и SMN Δ 7 были предоставлены в качестве контроля. Результат, показанный на нижней вкладке Фиг. 2, демонстрирует высокую

скорость трансдукции при тестовой дозе.

Выполнен анализ для определения процента трансдукции моторных нейронов посредством иммуногистохимического анализа. Дальнейший анализ проведен с помощью вестерн-блоттинга для выявления SMN-экспрессии гомогенатов из головного и спинного мозга.

Пример 5. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG увеличивает выживаемость в модели SMA на грызунах

Эффективность интрацеребровентрикулярной инъекции AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG оценивали у новорожденных детенышей $mSMN1^{-/-}$ $hSMN2^{+/+}$ $SMN\Delta7^{+/+}$ ($SMN\Delta7$), гетерозиготных однопометников (ГЕТ.) и детенышей C57BL/6J дикого типа (ДТ). Испытуемые мыши получали одну интрацеребровентрикулярную (ICV) инъекцию в левый боковой желудочек либо с 3×10^{10} , либо с $8,76 \times 10^{10}$ GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG в течение 24 часов после рождения с забуференным -фосфатом солевым раствором (PBS). Детеныши, которым инъецировали PBS, служили в качестве контролей (Фиг. 3А). Мышей контролировали ежедневно. Любые мыши, отвечающие критериям эвтаназии (потеря массы 20% от предыдущего взвешивания или пальцевого некроза) или найденные мертвыми до отъема, были генотипированы, и все мыши, которые выжили до отъема, были генотипированы.

В течение двухмесячного периода наблюдения показатели выживаемости дикого типа, гетерозиготных детенышей, которым инъецировали PBS, и гетерозиготных детенышей, которых инъецировали вектором, были сходными, что указывает на отсутствие токсичности, связанной с вектором или путем введения (Фиг. 3А). Не наблюдалось существенных различий в рефлексе переворачивания между животными ДТ, получавшими PBS, и мышами ДТ, получавшими либо 3×10^{10} GC, либо $\sim 9 \times 10^{10}$ GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG (Фиг. 3А). Медиана выживаемости детенышей $SMN\Delta7$, которым вводили только PBS ($n=8$), составила 15 дней. Однако при лечении более низкой дозой вектора (3×10^{10} GC/1,5 г на детеныша) средняя выживаемость значительно возросла до 37 дней ($n=7$). Если доза вектора была повышена до $8,76 \times 10^{10}$ GC на детеныша ($n=10$), медиана выживаемости составляла 23 дня (Фиг. 3В). Этот результат показал, что интрацеребровентрикулярная инъекция AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG обеими дозами при рождении выявила успешное улучшение выживаемости детенышей $SMN\Delta7$ при минимальной токсичности.

Пример 6. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG способствует росту в модели SMA на грызунах

Начиная с 3 дня после родов (PND) мышей взвешивали каждые 2 дня, пока они не соответствовали критериям эвтаназии или не были найдены мертвыми, и результат был нанесен на график на Фиг. 4А. Общее изменение переменной во всех временных точках сравнивалось между каждыми двумя группами.

Детеныши дикого типа и гетерозиготные детеныши, получившие PBS или векторы как в низких, так и в высоких дозах, показали сходную кривую роста, что указывает на отсутствие токсичности, связанной с вектором или путем введения. У детенышей SMNΔ7, получавших PBS, наблюдалась прогрессирующая потеря массы и средняя выживаемость в течение 15 дней. Однако при инъекции векторов AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG масса тела детенышей медленно, но неуклонно увеличивается после рождения. В постнатальный день 15 (P15), хотя детеныши дикого типа из всех трех групп были сопоставимы по массе, спасенные вектором детеныши SMNΔ7 были значительно тяжелее по сравнению с группой, получавшей только PBS (Фиг. 4В). В постнатальный 30-й день (P30) как у детенышей SMNΔ7, так и у гетерозиготных/дикого типа однопометников не было различий в массе тела между высокой дозой и низкой дозой лечения вектором (Фиг. 4С).

Дальнейшие сравнения проводились с использованием линейного моделирования смешанных эффектов в программе R (версия 3.3.1; cran.r-project.org) с использованием функции «lme» в пакете «nlme». Пол был включен в анализ как ковариата. Линейная модель смешанных эффектов учитывает зависимость наблюдений в разные моменты времени в пределах каждого субъекта и является предпочтительным способом для анализа данных в динамике. Не наблюдалось значительных различий в массе между животными, получавшими PBS, и животными ДТ, получавшими либо 3×10^{10} GC, либо $\sim 9 \times 10^{10}$ GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG (Фиг. 4D и 4E), что указывает на отсутствие токсичности, связанной с вектором или путем введения. По сравнению со здоровыми однопометниками, у детенышей SMNΔ7 наблюдалась более медленная скорость роста массы тела (Фиг. 4F), в то время как лечение с 3×10^{10} GC/детеныша или $8,76 \times 10^{10}$ GC/детеныша AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG у детенышей SMNΔ7 значительно увеличило прирост массы тела (Фиг. 4I и 4J).

Эти результаты свидетельствуют о том, что AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG улучшил рост SMNΔ7 детенышей,

отмеченный по массе тела.

Пример 7. Функциональные оценки показывают положительные эффекты AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG в модели SMA на грызунах

Для оценки развития и прогрессирования SMA при лечении вектором, описанным в данном документе, были выполнены две функциональные оценки: тест вывешивания задних конечностей и тест рефлекса переворачивания.

Для оценки силы и усталости проксимальных мышц задних конечностей в модели SMA у новорожденных мышей был адаптирован протокол для теста вывешивания задних конечностей, который был оптимизирован по поведенческому фенотипу для новорожденных: тест вывешивания задних конечностей (известный как Tube Test), СОП № SMA_M.2.2.001 от TREAT-NMD (El-Khodor et al.). Показатель вывешивания задних конечностей (HLS) и затраченное на зависание время (TSH) были включены в качестве параметров для измерения мышечной силы и усталости задних конечностей. Тест проводился в 2 последовательных испытаниях каждые 2 дня после рождения. Каждое испытание длилось не более 60 секунд. Оба показателя HLS и TSH были измерены в одном и том же испытании. Первые 15 секунд были использованы для определения показателя HLS. Для TSH время продолжало отсчитываться, пока животное не падало или время не достигло 60 секунд, в зависимости от того, что было первым. Кроме того, помет из более чем 10 животных был исключен из этого исследования, чтобы избежать погрешности из-за конкуренции в питании. Помет до 5 детенышей был исключен из этого исследования, так как усиление материнской заботы могло вызвать более легкий фенотип и привести к погрешности исследования.

Вместо увеличения показателя HLS при росте, наблюдаемого у детенышей дикого типа или гетерозиготных детенышей, получавших PBS или вектор, у детенышей SMNΔ7, которым инъецировали PBS, наблюдалось снижение показателя HLS, указывающее на ослабленную силу мышц задних конечностей (Фиг. 5B). Однако при однократном введении AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG в дозе 3×10^{10} GC на детеныша показатель HLS оставался стабильным во время развития детенышей SMNΔ7. Кроме того, если доза увеличилась до $8,76 \times 10^{10}$ GC на детеныша, наблюдалось небольшое увеличение показателя HLS с течением времени. Эти результаты показали, что вектор AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG улучшал функциональное развитие SMNΔ7 детенышей.

Затраченное на зависание время (TSH) регистрировалось, как

описано выше, и служило индикатором снижения латентности без различий, наблюдаемых у детенышей SMNΔ7 и их здоровых однопометников. Этот результат показал, что TSH не смог выявить нарушенную функцию мышц в модели SMNΔ7, поэтому исключен из дальнейшей оценки.

Чтобы проверить двигательные способности и оценить мышечную силу в модели SMA у новорожденных мышей, был адаптирован протокол теста рефлекса переворачивания, и оптимизирован по поведенческому фенотипу для новорожденных: рефлекс переворачивания, СОП № MD_M.2.2.002 от TREAT-NMD (Didonato et al.). Он исследовал общую силу тела, на которую могут влиять мышечная слабость и/или общее плохое состояние здоровья, измеряя способность мышцей корректировать ориентацию тела, когда его выводят из нормального вертикального положения. Отдельное животное вынимали из домашней клетки и помещали в положение лежа на спине так, чтобы все 4 лапы были направлены вверх. Палец был помещен на грудь, чтобы стабилизировать животных в перевернутом положении. Затем палец удаляли, и запускали таймер. Таймер останавливали, как только животное повернулось на живот, и все 4 лапы упирались в поверхность, на которой оно стояло. После каждого испытания животное возвращали в домашнюю клетку и давали ему отдохнуть в течение 5 минут.

Детенышей SMNΔ7 проверяли каждые два дня, начиная с постнатального 7 дня до постнатального 17 дня. Каждое испытание занимало максимум 60 секунд. Время, которое требовалось животному, чтобы перевернуться в нормальное положение в течение этого периода времени, использовалось для количественной оценки мышечной силы. Если животное не смогло выровняться в течение заданного времени, испытание прекращали, а время до выравнивания записывали как 60 секунд.

Кроме того, помет из более чем 10 животных был исключен из этого исследования, чтобы избежать погрешности из-за конкуренции в питании. Помет до 5 детенышей был исключен из этого исследования, так как усиление материнской заботы могло вызвать более легкий фенотип и привести к погрешности исследования. Когда тест рефлекса переворачивания был использован в сочетании с тестом вывешивания задних конечностей в один и тот же день, он всегда проводился первым, чтобы предотвратить утомление мышц животного.

Дальнейший анализ был проведен, чтобы обеспечить подробные

сравнения между группами и уменьшить вариацию, вызванную полом. Общее изменение переменной во всех временных точках сравнивалось между каждым двумя группами. Сравнения проводились с использованием линейного моделирования смешанных эффектов в программе R (версия 3.3.1; cran.r-project.org) с использованием функции «lme» в пакете «nlme». Пол был включен в анализ как ковариата. Записанное время, необходимое животному, чтобы вернуться в вертикальное положение, было нормализовано по полу, и данные были нанесены на Фиг. с 6D по 6J. Не наблюдалось существенных различий в рефлексе переворачивания между получавшими PBS животными ДТ и мышами ДТ, получавшими либо 3×10^{10} GC, либо $\sim 9 \times 10^{10}$ GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG (Фиг. 6D и 6E).

Результат продемонстрировал, что детенышам дикого типа или гетерозиготным детенышам требовалось ограниченное время, чтобы вернуться в вертикальное положение, и этот период времени уменьшался с ростом, в то время как детеныши SMNΔ7 не могли корректировать свою ориентацию в течение данного времени (Фиг. 6). С инъекцией AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG при рождении в дозе 3×10^{10} GC на детеныша или $8,76 \times 10^{10}$ GC на детеныша у детенышей SMNΔ7 время, потраченное на исправление положения, значительно уменьшилось и вернулось к нормальному уровню, отмеченному для детенышей дикого типа и гетерозиготных в постнатальный день 17, что указывает на то, что AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG успешно улучшает функциональное развитие в модели SMA на грызунах.

Интересно, что при нокауте медиана выживаемости и прибавки в массе не улучшались в зависимости от дозы, в то время как рефлекс переворачивания улучшался в зависимости от дозы. На основании этих данных делается вывод о том, что дозы 3×10^{10} GC и $\sim 9 \times 10^{10}$ GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG оказываются выше минимальной эффективной дозы (MED) у KO SMNΔ7.

В заключение следует отметить, что однократная интрацеребровентрикулярная инъекция вектора AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG приводила к значительной трансдукции моторных нейронов и сопутствующей функциональной коррекции при интратекальном введении (интрацеребровентрикулярно) новорожденным мышам SMNΔ7.

Пример 8. Гистологический анализ выявляет положительные эффекты AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG в модели SMA на грызунах

Дальнейшее исследование проводится для оценки гистологического и морфологического нарушения мышечных волокон в

модели SMA и восстановления после инъекции AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG. Мышечное волокно в передней большеберцовой мышце, четырехглавой мышце, диафрагме, межреберной мышце, длинной мышце и языке обнаруживается посредством окрашивания гематоксилином и эозином и иммуногистохимического окрашивания α -дистрофина. В качестве параметров используются площадь поперечного сечения (CSA), диаметр волокна и процентное соотношение центронуклеарных волокон (CNF). Для определения CSA учитываются только волокна круглой или многоугольной формы.

Пример 9. Определение оптимальной дозы и эффективность трансдукции AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG у мышей дикого типа и мышей SMN Δ 7

Чтобы определить потенциальную токсичность самой высокой дозы, дозозависимую экспрессию AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG, а также определить минимальную эффективную дозу (MED) AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG у мышей SMN Δ 7 все пометы, полученные в результате спаривания ГЕТ./ГЕТ., вводят в левый боковой желудочек (интрацеребровентрикулярно) (ICV) в течение 24 часов после рождения с помощью забуференного фосфатом солевого раствора (PBS), 1×10^9 GC, 3×10^9 GC, 1×10^{10} GC, 3×10^{10} GC или 7×10^{10} GC AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG на мышь. Мышей контролировали ежедневно на протяжении всего исследования. Все мыши, отвечающие критериям эвтаназии (потеря массы 15% от предыдущего взвешивания или неспособность к вскармливанию) были подвергнуты эвтаназии. Мышей, найденных мертвыми или умерщвленных до 13-го дня исследования, не подвергали вскрытию.

В дни исследований 3, 5, 7, 9, 11 и 13 мышей взвешивали. На день 3 исследования мышей татуировали и генотипировали. В дни исследования 7 и 13 мыши прошли 3 раунда тестов рефлекса переворачивания. На день 9 исследования пометы отбраковывались для поддержания однородного размера помета. Пометы отбракованы для включения всех КО и соответствующего количества ГЕТ. и ДТ, так чтобы размер помета был равен 4 животным. На день 13 исследования животных подвергали эвтаназии и вскрытию для анализа трансдукции моторных нейронов и размера мышечных волокон.

Все дозы AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG хорошо переносились мышами ГЕТ./ДТ и КО SMN Δ 7. Данные на Фиг. 9А и 9В представляют только 2 пометных животных на дозу, поэтому, предположили, что

значительно уменьшенная масса у животных ГЕТ./ДТ, получавших 1×10^9 GC, обусловлена изменчивостью размеров матерей и помета (Фиг. 9B). Кроме того, одно животное КО, включенное в группу 1×10^9 GC, пришлось подвергнуть эвтаназии из-за потери массы более чем на 15% в день исследования 9. Более высокие дозы AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG не влияли на увеличение массы у животных ГЕТ./ДТ и улучшали увеличение массы у животных КО по сравнению с контрольными КО, получавшими PBS (Фиг. 9A и 9B). На основании этих данных делается вывод, что 1×10^{10} GC представляет собой MED AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG у мышей SMN Δ 7.

Для рефлекса переворачивания на 7-й день исследования наблюдались заметная вариация между животными ГЕТ./ДТ в различных группах с различными дозами (Фиг. 10A). Тем не менее, к 13-му дню исследования животные ГЕТ./ДТ во всех группах доз имели среднее время переворачивания ~1 секунда (Фиг. 10A). Считалось, что это изменение на 7-й день исследования связано с изменчивостью размеров матерей и помета. Подобно данным мониторинга массы, при дозах 1×10^{10} GC и выше, КО, получавшие AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG, продемонстрировали значительное улучшение времени переворачивания в 13-й день исследования по сравнению с контрольными КО, получавшими PBS (Фиг. 10B).

Таким образом, на основании измерений массы и рефлекса переворачивания в течение жизни был сделан вывод о том, что текущее значение MED для AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG у мышей SMN Δ 7 составляет 1×10^{10} GC.

Оценены гистологические параметры трансдукции моторного нейрона и размера мышечных волокон. Дополнительные пометы, включенные в эксперимент, описаны выше в Примере 9.

Кроме того, во включенных пометах никаких признаков острой токсичности, связанных с какой-либо дозой вектора, не наблюдалось, и в течение 13-дневного периода исследования не было никаких признаков токсичности, связанных с вектором.

Для дальнейшей оценки потенциальной токсичности и переносимости AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG у взрослых мышей после введения ICV взрослым самцам и самкам C57BL/6J инъецировали AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG интратекально. Общие дозы, использованные в этом исследовании, были эквивалентны тем, которые использовались в неонатальном эксперименте, описанном выше, в то время как дозы на грамм массы головного мозга отличались в 2 раза из-за предполагаемой массы головного мозга

0,4 г для взрослой мыши по сравнению с оценкой массы головного мозга 0,2 г для новорожденной мыши. Все дозы были включены в момент времени 14-го дня исследования, в то время как в момент времени 28-го дня были дублированы только носитель и доза 7×10^{10} GC.

Массы контролировались в день исследования 0, 7, 14, 21 и 28, в зависимости от обстоятельств. Клинический химический анализ проводится на сыворотке, собранной при вскрытии (день исследования 14 или день исследования 28, соответственно). Мозг, спинной мозг, сердце, легкие, печень, селезенка, почки, седалищный нерв и четырехглавая мышца бедра были собраны для микроскопической гистопатологической оценки. Все параметры сравнивали с животными, получавшими носителем.

На 14 день исследования ни в одной группе не было отмечено ни заболеваемости, ни смертности. Все дозы AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG не оказывали влияния на траекторию изменения массы по сравнению с контролем подобраным по полу и получавшим м носитель (Фиг. 14А-14В).

Дальнейшее исследование проводится для оценки гистологического и морфологического нарушения мышечных волокон в вышеописанных моделях в Примере 9 и восстановления после инъекции AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG. Мышечное волокно в передней большеберцовой мышце, четырехглавой мышце, диафрагме, межреберной мышце, длиннейшей мышце и языке обнаруживается посредством окрашивания гематоксилином и эозином и иммуногистохимического окрашивания α -дистрофина. В качестве параметров используются площадь поперечного сечения (CSA), диаметр волокна и процентное соотношение центронуклеарных волокон (CNF). Для определения CSA учитываются только волокна круглой или многоугольной формы.

Пример 10. Векторы AAV, содержащие hSMN1 у макак-резус

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить различные интратекальные пути введения у макак-резусов, чтобы определить, какой путь приводит к наиболее надежной трансдукции моторных нейронов спинного мозга, а также оценить фармакокинетический профиль и безопасность AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG у макак-резусов. В этом исследовании использовались макаки-резус, потому что их размер и анатомия центральной нервной системы служат гораздо лучшим приближением для людей, чем для мышей.

Для подтверждения расположения иглы в мостомозжечковой цистерне (интрамостомозжечковая цистерна) (ICM) или в люмбальной цистерне (люмбальная пункция) (LP) в межпозвоночном пространстве между L4 и L5 использовали рентгеновское сопровождение и контрастный материал. Группы получали 1,0 мл ICM (n=3), 2,5 мл LP (n=4) и 5,0 мл LP (n=4). Каждая группа содержала животных с диапазоном титров нейтрализующих антител (НАТ) к AAV9 от неопределяемого до более чем 1:20. Все группы получали $3,3 \times 10^{11}$ GC/г головного мозга (всего 3×10^{13} GC) AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG. Не было контрольной группы носителя, включенной в это исследование.

Животные ежедневно наблюдались на аномальное поведение и признаки дистресса специальным персоналом во время исследования. Анализ клинической патологии выполняли на исходном уровне в день введения AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG (день исследования 0), день исследования 3, день исследования 7 и затем еженедельно до завершения исследования. Химический и цитологический анализ ЦСЖ выполняли в день исследования 0, день исследования 7 и затем еженедельно до завершения исследования. Животных подвергали эвтаназии и вскрытию на 28 день исследования для гистологической оценки трансдукции моторных нейронов в спинном мозге, биораспределения и предварительной гистопатологической оценки.

Ни одно животное не проявляло аномального поведения или признаков дистресса в течение всего исследования. У 1 животного (RA1871) имелось повышение уровня АЛТ от 55 ед./л до ~80 ед./л между днем исследования 0 и днем исследования 21, хотя это не соответствовало каким-либо клиническим признакам (Фиг. 11В). Ни у одного животного не наблюдалось тенденций увеличения АЛТ (Фиг. 11В), АСТ (Фиг. 11А), лимфоцитов (Фиг. 11С) или моноцитов (Фиг. 11D) после введения AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG.

На протяжении всего исследования не было выявлено каких-либо тенденций изменения содержания белка или глюкозы ЦСЖ у любых животных (Фиг. 11Е-11Н). На 28-й день исследования у 1 животного (RA1327) было 17 лейкоцитов/мкл в ЦСЖ (Фиг. 11Е). При тщательном осмотре ЦСЖ, по-видимому, не имела загрязнения крови, но содержала 250 эритроцитов/мкл. Неясно, был ли это истинный плеоцитоз или нечистым забором ЦСЖ. Цитология ЦСЖ из предыдущих интратекальных исследований показала постепенное увеличение количества лейкоцитов ЦСЖ от однозначных до двузначных цифр в течение нескольких недель (данные не показаны), что позволяет

сделать вывод, что этот единичный случай с 17 лейкоцитами/мкл в день исследования 28 (от 0 лейкоцитов/мкл на 21 день исследования), вероятно, происходило из-за нечистого забора ЦСЖ, в отличие от настоящего плеоцитоза.

При вскрытии каждый спинной мозг был разделен на шейный, грудной и поясничный отделы. Каждый уровень спинного мозга был впоследствии разделен на 4 части. 1 кусок был быстро заморожен для биораспределения, 1 кусок был помещен в формалин для гистопатологической оценки, а 2 оставшихся куска были помещены в формалин для оценки трансдукции моторных нейронов.

Трансдукцию моторных нейронов измеряли с помощью ISH (3 предметных стекла/кусочек уровня спинного мозга/животное равные 6 предметным стеклам/уровень спинного мозга/животное) для определения кодон-оптимизированной рибонуклеиновой кислоты hSMN1 (РНК) и проведения IHC (2 предметных стекла/кусочек уровня спинного мозга/животное равные 4 предметным стеклам/уровень спинного мозга/животное) для определения белка hSMN1. Моторные нейроны были помечены красителем Nissl для определения процента трансдуцированных моторных нейронов. ICM-введение AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG привело к значительно более высокой трансдукции моторных нейронов, чем LP-введение AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG, измеренное с помощью ISH и IHC на всех уровнях спинного мозга (Фиг. 12A и 12B). Существовала согласованность в эффективности трансдукции между ISH и IHC в каждой группе, хотя процент трансдуцированных моторных нейронов был выше при измерении с помощью IHC (Фиг. 12A и 12B). Хотя может происходить перекрестная реактивность антитела с резус-белком SMN, используемый для ISH РНК-зонд специфичен для кодон-оптимизированной РНК hSMN1, полученной из AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG, что исключает возможность перекрестной реактивности с РНК резуса SMN. В соответствии с опубликованными данными, процент трансдуцированных моторных нейронов увеличился во всех группах от каудального до роstralного (шейного или поясничного) (Hinderer C, Bell P, Vite CN et al. Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. *Molecular therapy Methods & clinical development* 2014;1:14051) (Фиг. 12A и 12B).

Инtrateкальная доставка AAV может выполняться с использованием различных путей для доступа к ЦСЖ. Люмбальная

пункция является наиболее распространенным методом доступа к ЦСЖ и поэтому была оценена как путь для введения AAV у приматов, отличных от человека. Примечательно, что доставка вектора AAV9 в ЦСЖ посредством люмбальной пункции оказалась, по меньшей мере, в 10 раз менее эффективной при трансдукции клеток головного и спинного мозга по сравнению с инъекцией вектора более эффективно на уровне мостомозжечковой цистерны [Hinderer C, et al. (2014) Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. Mol Ther Methods Clin Dev 1:14051]. Этот результат был подтвержден в исследовании NHP с использованием вектора AAVhu68-SMN1. У взрослых макак-резусов, которым инъецировали вектор-кандидат через субокципитальную пункцию в мостомозжечковую цистерну (n=3), обнаружена трансдукция моторных нейронов на всех уровнях спинного мозга, как показано гибридизацией *in situ* (ISH) для транскрипционной мРНК и иммуногистохимическим окрашиванием (IHC) на белок SMN человека. Напротив, у животных, получавших инъекцию вектора через люмбальную пункцию, трансдукция была значительно ниже на всех уровнях спинного мозга, даже когда объем инъекции был увеличен до 5 мл, примерно 40% от объема ЦСЖ животного, для стимулирования роstralного распределения. Это исследование продемонстрировало необходимость доставки вектора на уровне мостомозжечковой цистерны и подтвердило выбор субокципитальной пункции в качестве клинического пути введения.

Биораспределение было выполнено на отдельных тканях из исследования, чтобы определить трансдукцию после различных интратекальных путей введения. Существенные различия трансдукции в головном и спинном мозге после введения вектора ICM и LP в предыдущих исследованиях могут быть связаны с низким объемом, используемым для LP (Hinderer C, Bell P, Vite CH et al. Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. Molecular therapy Methods & clinical development 2014;1:14051). В настоящем исследовании трансдукция головного и спинного мозга была эквивалентной после ICM и LP введения AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG (Фиг. 13).

Интересно, что НАТ действительно оказывают влияние на трансдукцию периферических органов. В каждой группе у животного с НАТ более 1:20 была самая низкая трансдукция в сердце, печени и селезенке (Фиг. 13).

Предварительная гистопатологическая оценка была выполнена на головном мозге, спинном мозге, ганглиях дорсальных корешков (DRG), седалищном нерве и печени. В головном мозге первичные данные представляли минимальную или легкую инфильтрацию моноклеарных клеток и глиоз. Эти результаты были в равной степени распределены по всем группам. В спинном мозге результаты были представлены в основном в группе ICM, с увеличенной встречаемостью данных в поясничном отделе спинного мозга. Наиболее распространенными данными были минимальная или легкая дегенерация аксонов в дорсальных пучках и от минимальной до легкой инфильтрации моноклеарных клеток и гистиоцитов. В шейном, грудном и поясничном DRG первичные результаты представляли минимальную или легкую инфильтрацию моноклеарных клеток, от минимальной или легкой нейрональной вакуолизации и от минимальной до умеренной аксональной дегенерации. Эти результаты представлены с большим преобладанием в группе ICM по сравнению с обеими группами LP. В седалищном нерве наблюдалась минимальная или умеренная дегенерация аксонов и минимальная инфильтрация макрофагов. Эти результаты были в основном представлены в группе ICM. В печени отмечено от минимальной до легкой инфильтрации моноклеарных клеток и минимальные микрогранулемы во всех группах.

Кроме того, надпочечник, восходящая аорта, костный мозг, головной мозг, слепая кишка, эпидидимиды шейки матки, пищевод, глаз, желчный пузырь, сердце, почка, толстая кишка, легкое, слезная железа, лимфатический узел, мышцы, яичники, поджелудочная железа, предстательная железа, прямая кишка, слюнные железы, семенная железа, кожа, тонкая кишка, спинной мозг, селезенка, желудок, яички, мочевого пузырь, матка, гипофиз, тимус, щитовидная железа, трахея, влагалище и обширные поражения (если таковые имеются) были собраны для гистопатологического анализа. Ткани окрашивают гематоксилином и эозином (H&E) и/или другими иммуногистохимическими красителями для выявления/уточнения гистологических особенностей.

Пример 11. Исследования токсичности и биораспределения векторов AAV, содержащих hSMN1, у макак-резус

Проводится 180-дневное исследование GLP на макаках-резусах для изучения фармакологии и токсикологии AAVhu68.CB7.C1.hSMN1co.RBG после введения ICM. Макаки-резусы получают одну из трех доз: $1,85 \times 10^{10}$ GC/г головного мозга,

$5,56 \times 10^{10}$ GC/г головного мозга или $1,85 \times 10^{11}$ GC/г головного мозга (n=3/группа/временная точка – оба пола) или носитель (буфер состава Эллиота, EFB) (n=1/группа/временная точка – любой пол). Клиническая патология на исходном уровне (подсчет клеток с дифференцировками, клинические химические анализы и панель коагуляции), химический анализ ЦСЖ и цитологическая оценка ЦСЖ. После введения AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG или носителя животных ежедневно контролируют на признаки дистресса и аномального поведения. Клиническая патологическая оценка выполняется еженедельно после введения AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG или носителя. Химический и цитологический анализ ЦСЖ выполняют еженедельно в течение первых 30 дней после введения AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG или носителя, а затем ежемесячно. Исходно и после этого ежемесячно оценивают ответ нейтрализующих антител на AAVhu68 и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) на AAVhu68 и трансен hSMN1 с помощью анализа ELISPOT ИФН- γ .

Через 14, 90 и 180 дней после введения AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG или носителя животных умерщвляют и собирают ткани для всестороннего микроскопического гистопатологического исследования. Гистопатологическое исследование в частности сфокусировано на тканях центральной нервной системы (головной мозг, спинной мозг и ганглии дорсальных корешков), поскольку они наиболее сильно трансдуцированы после интратекального введения AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG. Кроме того, лимфоциты собирают из печени, селезенки и костного мозга для исследования наличия CTL в этих органах во время вскрытия.

Токсикологическое исследование GLP, выполненное с использованием ICM введения AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG у 30 приматов, отличных от человека, выявило временный неврологический дефицит у 1/30 животных после введения вектора, что было связано с прямой пункцией ствола головного мозга во время процедуры, вызванный самопроизвольным движением животного под наркозом. В течение этого 180-дневного периода наблюдения в этом исследовании не было отмечено других клинических нежелательных явлений, и стандартизированные неврологические исследования, выполненные на протяжении всего исследования, не выявили никаких отклонений. Гистопатология выявила дозозависимую аксонопатию сенсорных нейронов, которая не была связана с клиническими последствиями. Количественная оценка трансдукции

спинномозговых моторных нейронов показала, что доза X GC достигла трансдукции X % спинномозговых моторных нейронов, уровень трансдукции, который был связан с улучшенной двигательной функцией в модели мышцы SMNΔ7. Поэтому эта доза была выбрана в качестве MED (обновление с окончательными результатами токсикологического анализа).

В неклиническом исследовании на молодых макаках-резусах внутривенное введение AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG в чрезвычайно высокой дозе (2×10^{14} GC/кг) привело к острой токсичности для печени у 3/3 животных, причем одному животному потребовалась эвтаназия спустя 5 дней после введения вектора. Подобная токсичность не наблюдалась у 9 взрослых и 5 молодых макак-резусов, получавших интратекальную инъекцию в дозах до 3×10^{13} GC, самой высокой дозы, оцененной с использованием этого способа введения, или у 27 взрослых макак-резус, получавших AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG путем инъекции ICM в токсикологическом исследовании GLP.

Пример 12. Клиническое исследование

А. Новорожденные

Иницировано первое исследование на людях, соответствующее дозе MED 5×10^{10} GC/г массы головного мозга, что составляет в общем $\sim 5 \times 10^{13}$ GC для человека, и в 3 раза выше низкой дозы, предложенной для токсикологического исследования, показанного в Примере 11, но все еще в 3 раза ниже высокой дозы (Dekaban AS. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. Ann Neurol 1978;4:345-56). Максимальная доза для введения в первом исследовании на людях будет эквивалентна самой высокой дозе в токсикологическом исследовании, описанном в Примере 11, $1,85 \times 10^{11}$ GC/г головного мозга, что соответствует общему количеству $1,85 \times 10^{14}$ GC.

Чтобы определить безопасность 2 доз AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG у участников с ДНК-верифицированной спинальной мышечной атрофией (SMA), исследуют два разных введения одной дозы указанного вектора AAV в фармацевтически подходящем носителе/растворе.

Последующее развитие включает расширенные популяционные группы и дозы для установления эффективной дозы.

Главная цель - оценка любой связанной с исследованием токсичности степени III или большей, связанной с лечением

токсичности.

Вторичные цели включают

- Частота нежелательных явлений (НЯ) и/или серьезных нежелательных явлений (СНЯ)
- Оценка достижения основных этапов двигательного развития Неврологического обследования младенцев по Хаммерсмиту (HINE)
- Изменение по сравнению с исходным уровнем по шкале моторных функций теста для младенцев по определению нервно-мышечных расстройств Детской больницы Филадельфии (CHOP-INTEND)
- Процент участников, у которых развивается клинически выраженная спинальная мышечная атрофия.
- Процент участников, живущих в отмеченные моменты времени
- Изменение от исходного уровня в соматических измерениях: Масса для возраста/длины; окружность головы, груди и рук, отношение окружности головы к груди
- Изменение по сравнению с исходным уровнем показателей жизнедеятельности в состоянии покоя:
Пульс, кровяное давление, дыхание, температура, пульсоксиметрия и чрескожная углекислота
- Изменение от исходного уровня лабораторных клинических показателей:

Оцениваются следующие лабораторные анализы: Гематология: эритроциты, гемоглобин, гематокрит, тромбоциты, лейкоциты, дифференцировка лейкоцитов, Химические показатели крови: общий белок, альбумин, креатинин, цистатин С, креатинфосфокиназа, азот мочевины крови, общий билирубин (прямой и непрямой), щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, глюкоза, кальций, фосфор, хлорид, натрий, калий. Общий анализ мочи: удельный вес, рН, белок, глюкоза, кетоны, билирубин, эритроциты, лейкоциты, эпителиальные клетки, бактерии, цилиндры, кристаллы

- Изменение от исходного уровня в суммарном потенциале действия локтевой мышцы (СМАР)
- Концентрации белка SMN в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и в плазме

Целевая популяция – дети в возрасте < 6 недель с пре-симптоматическим, генетически документированным SMA и 2 копиями гена выживаемости моторных нейронов 2 (SMN2).

Критерии включения перечислены ниже.

1. Дата рождения: < 6 недель с гестационным возрастом от 37

до 42 недель для одиночных родов; гестационный возраст от 34 до 42 недель для близнецов.

2. Предсимптомная SMA с генетическим подтверждением делеции или мутации 5q гомозиготного гена спинального моторного нейрона 1 (SMN1) или сложной гетерозиготной мутации.

3. Генетическое подтверждение 2 копий выживания моторного нейрона 2 (SMN2).

4. Пост-процедурное наблюдение у невролога с опытом испытаний SMA.

Критерии исключения перечислены ниже.

1. Лечение любым имеющимся в продаже или исследуемым лекарственным средством, биологическим агентом или устройством, назначаемым для SMA, включая историю генной терапии, предшествующее лечение антисмысловыми олигонуклеотидами (ASO) или трансплантацию клеток.

2. Любые клинические признаки или симптомы при скрининге или непосредственно перед первой дозировкой (день 1), которые, по мнению исследователя, убедительно свидетельствуют о наличии SMA.

3. Аномальные лабораторные показатели, считающиеся клинически значимыми (ГГТ > 3XULN, билирубин \geq [X] мг/дл, креатинин \geq [Y] мг/дл, Hgb (гемаглобин) < [Z] или > [A] г/дл; WBC (лейкоциты) > [B] на куб. мм)

4. Основное медицинское заболевание

5. Сопутствующая болезнь, которая, по мнению исследователя, создает ненужные риски для переноса генов

6. Семья не хочет раскрывать информацию об участии пациента в исследовании перед врачом первичной медицинской помощи и другими поставщиками медицинских услуг.

Тестируются две дозы вектора AAV, с каждой когортой дозирования, чтобы включить 6 участников.

- Когорта 1: Низкая доза: 3×10^{13} GC
- Когорта 2: Высокая доза: 1×10^{14} GC

Шесть участников включены в когорту с низкой дозой (3×10^{13} GC). Дозирование участников проводится серийно с 4-недельным периодом наблюдения за безопасностью между включением каждого участника. Безопасность оценивается Комитетом внутренней безопасности (ISC). Если триггеры проверки безопасности (SRT) не наблюдаются, то через 4 недели после введения дозы шестому участнику в когорте с низкой дозой все имеющиеся данные о

безопасности оцениваются Независимым комитетом по мониторингу данных (IDMC) до перехода к включению высокодозовой когорты 2.

В одном варианте осуществления изобретения шприц, содержащий 5,6 мл вектора в соответствующей концентрации, будет доставлен в процедурную комнату. На приеме исследуемого лекарственного средства присутствует следующий персонал: интервенционист, выполняющий процедуру; анестезиолог и лаборант (-ы) обеспечения дыхания; медсестры и помощники врача; лаборанты КТ (или операционной комнаты); специалист по нейрофизиологии; координатор исследования центра.

Перед введением исследуемого препарата выполняется люмбальная пункция, чтобы удалить заданный объем СМЖ, а затем ввести интратекально (IC) йодированный контраст, чтобы помочь в визуализации релевантной анатомии мостомозжечковой цистерны. Внутривенный (в/в) контраст можно вводить до или во время введения иглы в качестве альтернативы интратекальному контрасту. Решение об использовании в/в или IC контраста принимается по усмотрению интервенциониста. Пациента анестезируют, интубируют и располагают на процедурном столе. Оборудование интраоперационного нейрофизиологического мониторинга (IONM) прикрепляют к участнику. Место инъекции подготавливается и драпируется в стерильной технике. Спинальную иглу (22–25 G) продвигают в мостомозжечковую цистерну под рентгеноскопическим контролем. Более крупная проводниковая игла может быть использована для облегчения размещения иглы. После подтверждения размещения иглы удлинительный набор прикрепляется к спинальной игле и обеспечивается его наполнение СМЖ пациента. По усмотрению интервенциониста шприц, содержащий контрастирующий материал, может быть присоединен к удлинительному набору, и может быть введено небольшое количество, чтобы подтвердить размещение иглы в мостомозжечковой цистерне. После того как положение иглы подтверждено с помощью КТ-сопровождения +/- контрастной инъекции, шприц, содержащий 5,6 мл GTP-201, подключается к удлинительному набору. Содержимое шприца медленно вводят в течение 1–2 минут, доставляя объем 5,0 мл. Иглу медленно удаляют из пациента.

После введения исследуемого лекарственного препарата участники доставляются в подходящее отделение после анестезии в соответствии с институциональными рекомендациями. После того, как участник в достаточной мере восстановил сознание и находится

в стабильном состоянии, он/она поступает в соответствующее отделение для обязательного протокола клинического мониторинга. Жизненно важные признаки и неврологические функции многократно контролируются, включая оценки каждые 15 минут в течение 3 часов, а затем ежечасно в течение 24-часового периода непосредственно после процедуры. После первоначального 24-часового периода после процедуры оценки выполняются ежедневно в течение двух дней, после чего участники выписываются и возвращаются еженедельно в течение 4 недель, затем каждые 4 недели для дополнительных двух визитов, после чего следует визит для оценки основной конечной точки на неделе 24.

Кровь отбирается для проверки безопасности, а участники проходят клиническую оценку. Участники проходят люмбальную пункцию для сбора ЦСЖ, чтобы отслеживать признаки воспаления и измерять биомаркеры во время дозирования, на 4, 12 и 24 неделе. В течение периода наблюдения участники оцениваются каждые три месяца до 1 года после процедуры. Участники приходят на ежегодные визиты в течение 5 лет. Через 3 и 6 месяцев после введения вектора участники проходят повторную МРТ и сбор ЦСЖ.

Свидетельство воспаления ЦНС после введения вектора AAV оценивается в образцах ЦСЖ с использованием стандартных методов, включая подсчет ядродержащих клеток и дифференциальный и общий белок. Экспериментальные средства лечения связанного воспаления включают мультиплексный анализ цитокинов ЦСЖ на маркеры воспаления.

Чтобы подтвердить уровни белка SMF в ЦСЖ в качестве биомаркера успешной трансдукции вектора hSMN1 AAV, разрабатываются анализы для предлагаемого интервенционного исследования фазы 1/2.

Суммарный потенциал действия мышцы (СМАР) представляет собой электрофизиологическую мощность мышцы после сверхмаксимальной стимуляции периферического нерва и служит объективным и высокочувствительным индикатором здоровья моторных нейронов (García A, Calleja J, Antolín FM, Berciano J. Peripheral motor and sensory nerve conduction studies in normal infants and children. Clin Neurophysiol 2000;111:513-20). В частности, исследования в естественных анамнезах среди пациентов с SMA типа I показывают, что амплитуда СМАР является аномально низкой и не улучшается после появления симптомов (Finkel RS, McDermott MP, Kaufmann P et al. Observational study of spinal

muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology* 2014;83:810-7; Swoboda KJ, Prior TW, Scott CB et al. Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function. *Ann Neurol* 2005;57:704-12 и Finkel RS. Electrophysiological and motor function scale association in a pre-symptomatic infant with spinal muscular atrophy type I. *Neuromuscul Disord* 2013;23:112-5). Кроме того, исследование SMA на модели нокаутной свиньи, которая демонстрирует электрофизиологические результаты, сходные с пациентами с SMA, показало, что раннее восстановление SMN у предсимптомных животных приводило к коррекции СМАР (Duque SI, Arnold WD, Odermatt P. et al. A large animal model of spinal muscular atrophy and correction of phenotype. *Ann Neurol* 2015;77:399-414). По вышеупомянутым причинам СМАР исследуется как исследовательский биомаркер.

События, которые соответствуют критериям прекращения исследования, включают следующие:

- Любая смерть, которая возможно, вероятно или определенно связана с исследуемым препаратом.
- Повышенные результаты исследования функции печени:
 - АЛТ или АСТ в 3 раза больше верхнего предела нормы.
 - Связанное повышение общего билирубина сыворотки (в возрастной группе для этого исследования, которое определяется как некоторый уровень).
- Более 1 участника испытывает НЯ уровня 3 или более высокого уровня, которое возможно, вероятно или определенно связано с исследуемым препаратом или процедурой инъекции.
- Кровоизлияние в ЦНС, инсульт или острый паралич, который возможно, вероятно или определенно связан с исследуемым препаратом или процедурой инъекции.

Нарушение функции печени определяется как любое увеличение аланинаминотрансферазы (АЛТ) или аспартатаминотрансферазы (АСТ) до уровня, превышающего 3-кратный верхний предел нормы (ULN). Сопутствующие данные – результаты, полученные в результате одного забора крови или отдельных заборов крови, взятых в пределах 8 дней друг от друга. Последующие исследования и расследования инициируются оперативно исследовательским центром, чтобы определить, являются ли полученные результаты воспроизводимыми и/или существуют ли объективные доказательства, которые явно подтверждают причину заболевания (например,

желчнокаменная болезнь и обструкция желчного протока с растянутым желчным пузырем) или агент, отличающийся от исследуемого агента.

В. Взрослые

Это открытое клиническое исследование фазы 1/2 с повышением дозы оценивает безопасность однократного введения AAVhu68.SMA у взрослых с генетически подтвержденным 5q SMA и историей болезни SMA типа 3. В этом исследовании принимают участие как неамбулаторные, так и амбулаторные пациенты. Субъекты получают однократную дозу AAVhu68.SMA путем инъекции в ICM (интрамостомозжечковая цистерна). Когорта 1 (n=3, низкая доза, 3×10^{13} GC) или когорта 2 (n=6; высокая доза, 1×10^{14} GC). Две дозы, оцененные в этом исследовании, были выбраны на основе исследований неклинической фармакологии и токсикологии. Обе дозы для оценки в этом исследовании хорошо переносились у приматов, отличных от человека, и достигли уровней экспрессии SMN спинномозговых моторных нейронов, достаточных для уменьшения моторного дефицита в мышечной модели заболевания, и, следовательно, ожидается, что они будут безопасны для людей. Кроме того, дозы имеют возможность принести пользу для участников исследования. Первые три пригодных субъекта будут включены в когорту 1. После дозирования каждому субъекту существует 4-недельный период наблюдения, в течение которого внутренний комитет по безопасности просматривает данные по безопасности перед дозированием следующему субъекту. Если в течение 4-недельного периода наблюдения за третьим участником когорты 1 не наблюдается триггеров проверки безопасности (SRT), все доступные данные о безопасности оцениваются Советом по мониторингу безопасности данных (DSMB) до перехода к включению когорты 2. Если SRT безопасности не наблюдается, то через 4 недели после введения дозы третьему участнику в когорте 2 все имеющиеся данные о безопасности оцениваются DSMB до перехода к включению остальных 3 пациентов в когорту 2.

Субъекты подвергаются скринингу в период от -35 дня до -1 дня до дозирования. Те, кто соответствует критериям отбора, поступают в больницу в день инъекции (день 1). После получения инъекции ICM AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG, субъектов контролируют как пациентов стационара в течение 2 дней. В одном центре проводят амбулаторное наблюдение и выполняют телефонные оценки в определенные моменты времени в течение оставшегося 52-недельного

периода первичной оценки.

Безопасность и переносимость AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG оцениваются на основе частоты возникновения НЯ и СНЯ, клинических и лабораторных оценок, медицинского осмотра и показателей жизненно важных функций. Также оценивается иммуногенность вектора и трансгенного препарата.

Оценки эффективности включают 6MWT, время 10-метровой ходьбы, показатель RULM, подъем на 4 ступени, тест с 9 отверстиями и стержням, показатели легочной функции, PedsQL (шкала усталости), SMA-FRS (функциональная шкала оценки), а также амплитуда локтевой и перонеальной СМАР. В ЦСЖ оценивают концентрацию белка SMN и другие экспериментальные биомаркеры.

Критерии включения

- Мужчина или женщина возрастом ≥ 18 лет.
- Генетическое подтверждение делеции или мутации 5q гомозиготного гена SMA или сложной гетерозиготной мутации и не менее 2 копий SMN2 при скрининге.
- История болезни SMA типа 3.
- Готовность и наличие возможности предоставить письменное, подписанное информированное согласие.
- Оценка внутренней командой нейроинтервенционистов и главного исследователя центра того, что анатомическое и соматическое состояние субъекта не мешает введению исследуемого препарата.

Неамбулаторные субъекты

- Невозможность ходить ≥ 15 футов без посторонней помощи.
- RULM оценка 5–30 при скрининге.

Амбулаторные субъекты

- Амбулаторный пациент (возможность ходить без помощи ≥ 15 футов).
- Способность безопасно выполнять 6MWT на расстоянии 6MW не более 530 м.

Критерии исключения

- Имеется противопоказание для инъекции ICM.
- Имеется противопоказание к люмбальной пункции.
- Пациент получал лечение любым имеющимся в продаже или исследуемым лекарственным средством или биологическим агентом для SMA, включая историю генной терапии, предшествующего лечения ASO или клеточной трансплантации (OR). Участие в любом другом применении исследуемого лекарственного средства или

терапевтическом исследовании в течение 3 месяцев до скрининга.

- Дыхательная недостаточность, определяемая медицинской необходимостью для инвазивной или неинвазивной вентиляции в течение > 8 часов во время 24-часового периода при скрининге.

- Сопутствующее заболевание, которое, по мнению исследователя, может мешать проведению и оценкам исследования или создавать ненужные риски для переноса генов.

- Имеется аномальный статус коагуляции (протромбиновое время (PT) > 1,5 от нормального, частичное тромбопластиновое время (aPTT) > 1,5 от нормального).

- Имеется тромбоцитопения (например, количество тромбоцитов < 150).

- Имеется патология печени (билирубин > 1,5 ULN, АЛТ, АСТ и щелочная фосфатаза > 2,0 ULN).

- Имеется неконтролируемая гипертония (систолическое артериальное давление [САД] > 180 мм рт. ст., диастолическое артериальное давление [ДАД] > 100 мм рт. ст.).

- Имеется клинически значимое нарушение ЭКГ, которое, по мнению исследователя, может поставить под угрозу безопасность субъекта.

- В анамнезе трансплантация солидного органа или хроническая иммуносупрессия.

- Имеется серьезное или нестабильное медицинское или психологическое состояние, которое, по мнению исследователя, может поставить под угрозу безопасность субъекта или успешное участие в этом исследовании или интерпретацию результатов исследования.

- Использование лекарств, предназначенных для лечения SMA, включая рилузол, вальпроевую кислоту, гидроксимочевину, фенилбутират натрия, производные бутирата, креатин, карнитин, гормон роста, анаболические стероиды, пробенецид, пероральное или парентеральное применение кортикостероидов при поступлении, средства, которые как предполагаются увеличивают или уменьшают мышечную силу, или агенты с известным или предполагаемым ингибированием гистондеацетилазы (HDAC), в течение 30 дней до скрининга. Субъекты, которые используют небулайзер или нуждаются в ингаляторе для стероидов, допущены в исследование; однако пероральное использование стероидов запрещено. Пероральное использование сальбутамола допускается со следующими ограничениями: субъекты должны были принимать сальбутамол в

течение не менее 6 месяцев до включения в исследование с хорошей переносимостью. Доза сальбутамола должна оставаться постоянной на протяжении всего исследования. Допускается использование ингаляционных бета-агонистов (например, для лечения астматического кризиса).

Первичные конечные точки исследования

Основными конечными точками этого исследования являются безопасность и переносимость AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG в течение 52 недель. Эти конечные точки будут оцениваться на основе частоты НЯ и СНЯ, а также любых изменений показателей жизненно важных функций, медицинского осмотра или клинических лабораторных оценок, которые будут признаны клинически значимыми через 52 недели после введения исследуемого лекарственного средства.

Вторичные конечные точки исследования

- Оценка влияния AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG на двигательную функцию, измеренную у неамбулаторных субъектов RULM.
- Показатели RULM будут сравниваться с исходными показателями через 52 недели после введения исследуемого лекарственного средства.
- Оценка влияния AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG на двигательную функцию, измеренную с помощью теста 6MWT и времени 10-метровой ходьбы у амбулаторных субъектов.
- 6MWT и время 10-метровой ходьбы будут сравниваться с исходными значениями через 52 недели после введения исследуемого лекарственного средства.

Исследовательские конечные точки

- Оценка влияния AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG на двигательную функцию, измеренную с помощью теста с 9 отверстиями и стержнями (амбулаторный и неамбулаторный) и теста подъема на 4 ступеньки (только амбулаторный).
- Показатели теста с 9 отверстиями и стержнями и теста подъема на 4 ступеньки будут сравниваться с исходными показателями через 52 недели после введения препарата.
- Оценка влияния препарата на легочную функцию, измеренная с помощью форсированной жизненной емкости (FVC), максимального давления на выдохе (MEP), максимального давления на вдохе (MIP).
- Изменение от исходного уровня амплитуды локтевой и перонеальной СМАР.
- Многомерная шкала усталости PedQLVersion 3.0, модуль

отчетов для взрослых.

- SMA-FRS (функциональная шкала оценок).
- Фармакокинетика вектора в ДНК и других компонентах лекарственного средства на основе AAV в ЦСЖ, сыворотке и моче.

Пример 13. Производство

Вектор AAVhu68.SMN получают тройной плазмидной трансфекцией клеток HEK293 человека: 1) плазмидой векторного генома, 2) хелперной плазмидой AAV, называемой pAAVhu68.KanR, содержащей гены *rep2* AAV и *cap hu68* дикого типа (ДТ), и 3) плазмидой хелперного аденовируса, называемой pAdΔF6 (Kan). Размер генома упакованного вектора AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG составляет 3257 п.о.

1. Плазида векторного генома AAV: pENN.AAV.CB7.CI.hSMN1co.rBG.KanR (p4342)

Плазида векторного генома AAV-hSMN1 pENN.AAV.CB7.CI.hSMN1co.rBG (p3246) имеет размер 6077 п.о. Геном вектора, полученный из этой плазмиды, представляет собой одноцепочечный ДНК геном с ITR, происходящими из AAV2, фланкирующими экспрессионную кассету hSMN1. Экспрессия с трансгенной кассеты управляется промотором CB7, гибридом между немедленным ранним энхансером CMV (C4) и промотором куриного бета-актина, тогда как транскрипция с этого промотора усиливается присутствием CI. ПолиА сигнал для экспрессионной кассеты представляет собой полиА rAB. Плазмиду конструировали кодон-оптимизацией и синтезом последовательности hSMN1 (GeneArt), и полученную конструкцию клонировали в плазмиду pENN.AAV.CB7.CI.rBG (p1044), AAV2 ITR-фланкированную экспрессионную кассету, содержащую элементы экспрессии CB7, CI, и rBG для предоставления pAAV.CB7.CI.hSMN1co.rBG (p3246). Плазида KanR представляет собой pENN.AAV.CB7.CI.hSMN1co.rBG.KanR (p4342). P4342 была сконструирована путем перестановки резистентного к ампициллину остова в pAAV.CB7.CI.hSMN1co.rBG (p3246) с резистентным к канамицину остовом из pENN.AAV.TBG.PI.hLDLr.rBG.KanR (p2017) по двум сайтам PacI.

Описание элементов последовательности:

- ITR: ITR AAV (GenBank № NC001401) являются последовательностями, которые идентичны на обоих концах, но находятся в противоположной ориентации. Последовательности ITR AAV2 функционируют вместе как точка начала репликации векторной ДНК и как сигнал упаковки векторного генома, когда хелперные

функции AAV и аденовируса предоставляются *in trans*. Как таковые, последовательности ITR представляют собой только *цис*-последовательности, необходимые для репликации и упаковки векторного генома.

- CMV с немедленным ранним энхансером (382 п.о., GenBank № K03104.1).

- Промотор куриного β -актина (282 п.о.; GenBank № X00182.1) используется для управления экспрессией hSMN1 высокого уровня.

- Промотор куриного β -актина: интрон размером 973 п.о. из гена куриного β -актина (GenBank № X00182.1) присутствует в кассете векторной экспрессии. Интрон транскрибируется, но удаляется из зрелой мРНК путем сплайсинга, объединяя вместе последовательности по обе стороны от него. Было показано, что присутствие интрона в экспрессионной кассете облегчает транспорт мРНК из ядра в цитоплазму, тем самым усиливая накопление устойчивого уровня мРНК для трансляции.

- Кодированная последовательность: последовательность hSMN1: (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_000344.3) была оптимизирована по кодонам и синтезирована. SMA вызывается мутациями в теломерном гене SMN1. Мутации в SMN1 приводят к селективной токсичности для нижних моторных нейронов, что приводит к прогрессирующей потере нейронов и связанной с этим мышечной слабости и дегенерации. Трансген представляет собой SMN1, изоформа D. Изоформа D кодирует самую длинную изоформу, и считается, что этот вариант является преобладающим транскриптом/изоформой, продуцируемой SMN1 как в ЦНС, так и повсеместно.

- Сигнал полиаденилирования: сигнал полиаденилирования β -глобина кролика длиной 127 п.о. (GenBank № V00882.1) предоставляет собой *цис*-последовательности для эффективного полиаденилирования мРНК антитела. Этот элемент функционирует как сигнал для терминации транскрипции, специфического события отщепления на 3'-конце образующегося транскрипта и добавления длинного полиаденильного хвоста.

2. Хелперная плаزمида AAVhu68: pAAV2/hu68n.KanR (p0068)

Хелперная плазмида AAV2/hu68 pAAV2/hu.68 (партия № p0065; 7329 п.о.) представляет собой хелперную плазмиду AAV, которая кодирует 4 белка *rep* AAV2 ДТ и 3 капсидных белка VP AAV ДТ из AAV серотипа hu68. Новая последовательность AAV была получена из ДНК ткани сердца человека и обозначена как AAV серотипа hu68.

Чтобы создать химерную упаковывающую конструкцию, ген *cap* AAV2 из плазмиды pAAV2/9n (p0061-2), содержащей гены *rep* AAV2 и *cap* AAV9 дикого типа, удаляли и заменяли фрагментом гена *cap* AAVhu68 плазмиды pAAV2/hu68 (p0065). Промотор p5 AAV, который обычно управляет экспрессией *rep*, перемещается в этой конструкции с 5'-конца *rep* на 3'-конец *cap*. Эта компоновка служит для введения спейсера между промотором и геном *rep* (т.е. плазмидного остова), подавления экспрессии *rep* и увеличения способности поддерживать продуцирование вектора. Плазмидный остов в pAAV2/9n взят из pBluescript KS. Все составные части плазмиды были проверены прямым секвенированием. Затем ген устойчивости к ампициллину был заменен геном устойчивости к канамицину с получением pAAV2/hu68n.KanR (p0068).

3. Аденовирусная хелперная плаزمида pAdDeltaF6 (Kan)

Плазмида pAdDeltaF6 (Kan) имеет размер 15774 п.о. Плазмида содержит участки генома аденовируса, которые важны для репликации AAV, а именно E2A, E4 и VA РНК (функции E1 аденовируса обеспечиваются клетками 293), но она не содержит генов репликации других аденовирусов или структурных генов. Плазмида не содержит *cis*-элементов, критических для репликации, таких как аденовирусные инвертированные концевые повторы, и следовательно не ожидается, что может генерироваться инфекционный аденовирус. Она была получена из E1, E3-делетированного молекулярного клона Ad5 (pBHG10, плазмида на основе pBR322). Делеции были введены в ДНК Ad5, чтобы удалить экспрессию ненужных генов аденовируса и уменьшить количество ДНК аденовируса с 32 т.п.о. до 12 т.п.о. Наконец, ген устойчивости к ампициллину был заменен геном устойчивости к канамицину с получением pAdeltaF6 (Kan). Аденовирусные гены E2, E4 и VA1, которые остаются в этой плазмиде, наряду с E1, который присутствует в клетках HEK293, необходимы для продуцирования вектора AAV.

4. Главные банки клеток

Клетки HEK293 первоначально были получены путем трансформации клеток HEK с помощью урезанной ДНК аденовируса типа 5, как описано [Graham FL, et al., (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36(1):59-74]. Клетки экспрессируют генные продукты E1A и E1B, необходимые для продукции rAAV с высоким титром. Клетки HEK293 являются адгезивными и легко

трансфицируемыми, обеспечивающие высокие титры rAAV при трансфекции ДНК-плазмидой. Бактериальные исходные культуры в глицерине из главного банка клеток (ВМСВ) готовят путем смешивания 1 мл из 1 л полученной в течение ночи бактериальной культуры, используемой для амплификации плазмидной ДНК, с равным объемом стерильного 50% глицерина. Из смеси готовят две аликвоты по 0,5 мл исходной культуры ВМСВ в глицерине на конструкцию и хранят в криогенных флаконах Nalgene при -80°C . Для проверки исходных культур ВМСВ в глицерине амплифицированную плазмидную ДНК подвергают внутрिलाбораторному структурному анализу, включающему расщепление рестрикционными ферментами с последующим гель-электрофорезом, и анализу полной плазмидной последовательности с помощью секвенирования Сэнгера в Qiagen. Чтобы приготовить аликвоты бактериальной исходной культуры рабочего банка клеток (ВМСВ) в глицерине для доставки производителю плазмидной ДНК (Puresyn Inc.), инокулировали 3 мл культуры из исходной культуры в глицерине ВМСВ и выращивали ее в течение ночи. Один мл полученной в течение ночи культуры используют для приготовления аликвот исходной культуры ВМСВ в глицерине, как описано выше.

5. Обзор технологического процесса

Процесс производства вектора AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG проиллюстрирован на блок-схеме технологического процесса на Фиг. 15А-15В. Основные реагенты, входящие в состав препарата, указаны в левой части диаграммы, а этапы оценки качества в процессе производства изображены в правой части диаграммы. Предоставляется также описание каждой стадии производства и очистки. Производство препарата осуществляется в соответствии с линейной последовательностью единичных операций и при этом используются одноразовые, закрытые системы биологической обработки, если не указано иное. Все этапы производственного процесса, включающие клеточную культуру, от посева клеток до сбора супернатанта, выполняются в асептических условиях с использованием стерильных одноразовых заменяемых наборов трубок и пакетов. Клетки культивируют в 10-слойных камерах Corning CellSTACKs® (CS-10) и HS-36 и всеми открытыми манипуляциями. Процесс очистки выполняется в замкнутой системе, где это возможно; однако манипуляции с колоночной хроматографией считаются санитарными операциями и это не рассматривается как полностью закрытая система.

6. Описание технологического процесса

а. Посев клеток

Для производственного процесса используется квалифицированная клеточная линия HEK293. WCB был получен в лабораториях Charles River из MCB-2, описанного в разделе 5.2.6, и будет охарактеризован при подаче IND. Культура клеток, используемая для продуцирования векторов, будет иницирована из одного оттаявшего флакона WCB и размножена в соответствии с документом сводного протокола сопровождения серии (MBR). Клетки размножают до содержания от 5×10^9 до 5×10^{10} клеток, используя T-флаконы Corning и CS-10, которые позволяют генерировать достаточную клеточную массу для посева до 48 HS-36 для продуцирования вектора на серию BDS (нерасфасованной лекарственной субстанции). Клетки культивируют в среде, состоящей из модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% гамма-облученной фетальной бычьей сывороткой (FBS), получаемой из США или Новой Зеландии. Клетки являются зависимыми от закрепления на субстрате, и диссоциация клеток будет осуществляться с использованием TrypLE™ Select – реагента для диссоциации клеток, не содержащего животных продуктов. Посев клеток будет осуществляться с использованием стерильных одноразовых заменяемых пакетов для биологических процессов и наборов трубок. Клетки будут поддерживаться при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) в атмосфере 5% ($\pm 0,5\%$) CO_2 .

б. Временная трансфекция

После приблизительно 3 дней роста (среда DMEM+10% FBS) среду для культивирования клеток HS-36 заменят свежей бессывороточной средой DMEM и клетки трансфицируют 3 продуцирующими плазмидами с использованием оптимизированного метода трансфекции на основе полиэтиленимина (PEI). В BSC будет приготовлено достаточное количество комплекса для трансфекции плазмидной ДНК с целью трансфекции 48 HS36 (на серию BDS). Сначала будет приготовлена смесь ДНК/PEI, содержащая *цис* плазмиду (векторный геном), *транс* плазмиду (гены капсида и *rep*) и желперную плазмиду (Ad) в соотношении 0,1:1:2 и PEI класса GMP (PEIPro, PolyPlus Transfection SA). Это соотношение плазмид было определено как оптимальное для продукции AAV в мелкомасштабных оптимизационных исследованиях. После тщательного перемешивания раствору дают отстояться при комнатной температуре в течение 25 минут, затем добавляют к бессывороточной среде для гашения

реакции и, наконец, добавляют к HS-36. Смесь для трансфекции будет выровнена между всеми 36 слоями HS-36, и клетки будут инкубированы при 37 °C (± 2 °C) в атмосфере 5% ($\pm 0,5\%$) CO₂ в течение 5 дней.

с. Сбор среды с клетками

Трансфицированные клетки и среды будут собираться из каждого HS-36 с использованием одноразовых пакетов для биологических процессов путем асептического слива среды из блоков. После сбора среды в объем приблизительно 200 литров будет добавлен MgCl₂ до конечной концентрации 2 мМ (кофактор для бензоназы), а нуклеаза бензоназа будет добавлена до конечной концентрации 25 единиц/мл. Продукт (в одноразовом мешке для биопроцесса) будут инкубировать при 37 °C в течение 2 часов в инкубаторе, чтобы обеспечить достаточное время для ферментативного расщепления остаточной клеточной и плазмидной ДНК, присутствующей в урожае, полученном в результате процедуры трансфекции. Этот этап выполняется для минимизации количества остаточной ДНК в конечном векторе DP. После инкубации будет добавлен NaCl до конечной концентрации 500 мМ, чтобы помочь в извлечении продукта во время фильтрации и последующей фильтрации в тангенциальном потоке.

d. Осветление

Клетки и клеточный дебрис будут удалены из продукта с использованием капсульного глубинного фильтра (1,2/0,22 мкм), соединенной последовательно в виде стерильной закрытой трубки и набора пакетов, который приводится в действие перистальтическим насосом. Осветление гарантирует, что нижестоящие фильтры и хроматографические колонки будут защищены от загрязнения, а фильтрация снижения бионагрузки гарантирует, что в конце последовательности фильтров любая бионагрузка, потенциально вводимая во время предыдущего производственного процесса, будет удалена до последующей очистки. Собранный материал будет пропущен через капсульный фильтр Sartorius Sartoguard PES (1,2/0,22 мкм) (Sartorius Stedim Biotech Inc.).

e. Крупномасштабная тангенциальная поточная фильтрация

Сокращение объема (в 10 раз) осветленного продукта будет достигнуто с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF) с использованием специальной стерильной закрытой трубки для биообработки, пакета и набора мембран. Принцип действия TFF – пропускание раствора под давлением параллельно мембране

подходящей пористости (100 кДа). Перепад давления направляет молекулы меньшего размера через мембрану, и при этом молекулы размером больше пор мембраны эффективно проходят с потоком отходов. Рециркуляцией раствора обеспечивают омывание параллельным потоком поверхности мембраны, предотвращая загрязнение пор мембраны и потерю продукта из-за связывания с мембраной. Выбором подходящего размера пор мембраны и площади поверхности жидкий образец может быть быстро уменьшен в объеме, сохраняя и концентрируя желаемую молекулу. Диафильтрация в применениях TFF включает добавление свежего буфера к рециркулирующему образцу с той же скоростью, с которой жидкость проходит через мембрану и вступает в поток отходов. С увеличением объемов диафильтрации все большее количество малых молекул удаляется из рециркулирующегося образца. Это приводит к умеренной очистке осветленного продукта, но также обеспечивает замену буфера, совместимую с последующей стадией аффинной колоночной хроматографии. Соответственно, авторы используют мембрану из PES на 100 кДа для концентрирование, которая затем сопровождается диафильтрации с минимум 4 диаобъемами буфера, состоящего из 20 mM Трис, pH 7,5 и 400 mM NaCl. Диафильтрованный продукт будет храниться в течение ночи при 4 °C, а затем дополнительно очищаться с помощью глубокой фильтровальной капсулы 1,2/0,22 мкм для удаления любого осажденного материала.

f. Аффинная хроматография

Диафильтрованный продукт будет нанесен на аффинную смолу Poros TM Capture Select™ AAV9 (Life Technologies), которая эффективно захватывает серотип AAVhu68. В этих ионных условиях значительный процент остаточной клеточной ДНК и белков протекает через колонку, в то время как частицы AAV эффективно захватываются. После нанесения колонку обрабатывают 5 объемами раствора бензоназы с низким содержанием соли (2500 ед./мл бензоназы, 20 mM Трис, pH 7,5 и 40 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂) для удаления любых оставшихся клеток-хозяев и плазмидной нуклеиновой кислоты. Колонку промывают для удаления дополнительных питательных примесей с последующей стадией элюирования с низким pH (400 mM NaCl, 20 mM цитрата натрия, pH 2,5), которое немедленно нейтрализуют путем сбора в 1/10 объема буфера для нейтрализации (200 mM Бис Трис Пропан, pH 10,2).

г. Анионообменная хроматография

Для достижения дальнейшего снижения количества полученных

в производственном процессе примесей, включая пустые частицы AAV, пул элюции PorosAAV9 разбавляют в 50 раз (20 mM бис трис пропан, 0,001% Pluronic F68, pH 10,2), чтобы снизить ионную силу и обеспечить связывание с монолитной матрицей CIMultus™ QA (BIA Separations). После промывки раствором с низким содержанием соли векторный продукт элюируют с использованием линейного солевого градиента NaCl в объеме 60 колонок (CV) (10–180 mM NaCl). Этот небольшой градиент соли эффективно отделяет капсидные частицы без векторного генома (пустые частицы) от частиц, содержащих векторный геном (полные частицы), и приводит к получению препарата, обогащенного полными капсидами. Фракции будут собираться в пробирки, содержащие 1/100 объема 0,1% Pluronic F68 и 1/27 объема Бис Трис pH 6,3, чтобы минимизировать неспецифическое связывание с пробирками и продолжительность воздействия высокого pH соответственно. Объединенные пиковые фракции полных частиц разбавляют в 20 раз в 20 mM Бис Трис Пропан, 0,001% Pluronic F68, pH 10,2 и повторно наносят на ту же колонку, которую очищают на месте. Повторно применяют градиент соли NaCl 10–180 mM и собирают соответствующие пиковые фракции полных частиц. Площадь пика оценивается и сравнивается с предыдущими данными для определения приблизительного выхода вектора.

h. Готовый состав и фильтрация уменьшения бионагрузки для получения BDS

TFF с мембраной 100 кДа используют для получения готового состава из объединенных фракций анионообменной хроматографии (АЕХ). Эта стадия будет завершена путем диальтрации буфера готового состава и концентрирования для получения BDS в желаемой целевой концентрации. Образцы будут удалены для тестирования BDS (описано в разделе ниже). BDS стерильно фильтруют (0,22 мкм), хранят в стерильных полипропиленовых пробирках и замораживают при температуре $\leq -60^{\circ}\text{C}$ в зоне карантина до выпуска для финального розлива.

i. Финальный розлив

Замороженный BDS будет размораживаться, объединяться и доводиться до целевой концентрации (стадия разбавления или концентрирования с помощью TFF) с использованием буфера для готового состава. Затем продукт будет окончательно профильтрован через фильтр на 0,22 мкм и разлит в стерильные (полимерные) флаконы Crystal Zenith от West Pharmaceutical и закрыты пробками

с помощью обжимных крышек при объеме наполнения, который необходимо определить. Флаконы будут индивидуально маркированы в соответствии с описанием ниже. Маркированные флаконы хранятся при температуре ≤ 60 °С.

ј. Идентичность векторного генома: Секвенирование ДНК и NGS

Выделяют геномную ДНК вирусного вектора и определяют последовательность с помощью 2-кратного секвенирования с использованием блуждающего праймера. Выполняется выравнивание последовательности и сравнивается с ожидаемой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения выполняется секвенирование следующего поколения (также известное как секвенирование с высокой производительностью), например с использованием оборудования Illumina®.

к. Идентичность векторного капсида: Масс-спектрометрия VP1 капсида AAV

Подтверждение серотипа AAVhu68 вектора достигается с помощью анализа, который был разработан на основе анализа пептидов капсидного белка AAV. Способ включает расщепление VP трипсином с последующим определением характеристик тандемной масс-спектрометрией на масс-спектрометре Q-Exactive Orbitrap для секвенирования пептидов капсидных белков. Спектральная библиотека из секвенированных тандемных масс-спектров и метод целевой масс-спектрометрии используются для анализа сигнатурных пептидов, которые могут однозначно идентифицировать конкретные серотипы вирусных частиц AAV. Банк сигнатурных пептидов, специфичных для восьми AAV (AAVhu68, AAV1, AAV2, AAV6, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVhu37), подвергают скринингу по тандемным масс-спектрам, полученным путем расщепления исследуемого изделия. Для положительной идентификации будут выявлять сигнатурный (-ые) пептид (-ы) только из одного серотипа.

1. Титр геномных копий

Недавно была разработана методика определения титра GC для векторов AAV на основе цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цКПЦР) [Lock M, Alvira MR, Chen SJ, & Wilson JM (2014) Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR. Hum Gene Ther Methods 25(2):115-125.] Этот способ является практичным, сообщает об эквивалентных или более точных титрах,

чем кПЦР, и не требует стандартной кривой для плазмиды. Используемый анализ включает расщепление ДНКазой I с последующим цифровым ПЦР-анализом для измерения инкапсулированных векторных геномных копий. Детекцию ДНК осуществляют с использованием специфичных для последовательности праймеров, нацеленных на участок полиА, в комбинации с флуоресцентно меченным зондом, гибридизующимся с тем же участком. В анализ вводили ряд стандартов, валидационных образцов и контролей (для фона и загрязнения ДНК).

м. Титр инфекционных единиц

Анализ на содержание инфекционных единиц (IU) используют для определения продуктивного поглощения и репликации вектора rAAV в клетках RC32 (клетки HeLa, экспрессирующие *rep2*). Был использован 96-луночный формат конечной точки, аналогичный ранее опубликованному. Вкратце, клетки RC32 совместно инфицируют путем серийных разведений rAAV BDS и равномерного разведения Ad5 с 12 повторами при каждом разведении rAAV. Через семьдесят два часа после заражения клетки лизируют и проводят кПЦР для выявления амплификации вектора rAAV на входе. Для определения репликативного титра, выраженного в IU/мл, проводят расчет (по Спирмену-Карберу) конечной точки разведения 50% инфекционной дозы для культуры ткани (TCID₅₀). Поскольку значения «инфекционности» зависят от контакта частиц с клетками, связывания рецепторов, интернализации, транспорта в ядро и репликации генома, на них влияет геометрия анализа и наличие соответствующих рецепторов и путей пост-связывания в используемой клеточной линии. Рецепторы и пути пост-связывания обычно не поддерживаются в иммортализованных клеточных линиях, и поэтому титры анализа инфекционности не являются абсолютной мерой количества присутствующих «инфекционных» частиц. Тем не менее, соотношение капсидированного GC к «инфекционным единицам» (описанное как отношение GC/IU) может использоваться в качестве показателя постоянства качества препарата от партии к партии.

п. Соотношение пустых и полных частиц

Скорость седиментации, измеренная в аналитической ультрацентрифуге (AUC), может обнаруживать агрегаты, другие второстепенные компоненты, а также обеспечивать хорошее количественное определение относительных количеств различных видов частиц на основе их различных коэффициентов седиментации. Это абсолютный метод, основанный на фундаментальных единицах

длины и времени, не требующий стандартных молекул в качестве эталонов. Векторные образцы загружают в ячейки с 2-канальными центральными элементами из угля-эпона с длиной оптического пути 12 мм. Поставляемый буфер для разведения загружается в контрольный канал каждой ячейки. Затем загруженные ячейки помещают в аналитический ротор AN-60Ti и загружают в аналитическую ультрацентрифугу Beckman-Coulter ProteomeLab XL-I, снабженную как детекторами поглощения, так и детекторами RI. После полного уравнивания температуры при 20°C ротор доводится до конечной скорости вращения 12000 об/мин. Поглощение при сканировании при 280 нм регистрируют приблизительно каждые 3 минуты в течение приблизительно 5,5 часов (всего 110 сканирований для каждого образца). Необработанные данные анализируются с использованием метода $s(s)$ и вводятся в программу анализа SEDFIT. Результирующие распределения по размерам изображают графически изображены и интегрируют пики. Процентные значения, связанные с каждым пиком, представляют долю площади пика от общей площади под всеми пиками и основаны на необработанных данных, полученных при 280 нм; во многих лабораториях эти значения используются для расчета соотношений пустых и полных частиц. Однако, поскольку пустые и полные частицы имеют разные коэффициенты экстинкции на этой длине волны, необработанные данные могут быть соответствующим образом скорректированы. Соотношение значений пика пустой частицы и полного мономера как до, так и после корректировки коэффициента экстинкции было использовано для определения соотношения пустых-полных частиц, и оба соотношения записаны в сертификатах анализа.

о. ДНК клетки-хозяина

Анализ кПЦР используется для обнаружения остаточной ДНК клеток 293 человека. После добавления «нерелевантной ДНК» полную ДНК (нерелевантную, векторную и остаточную геномную) экстрагируют из приблизительно 1 мл продукта. ДНК клетки-хозяина количественно определяют с помощью кПЦР, нацеленного на ген 18S рДНК. Количества обнаруженной ДНК нормализуют на основе извлечения добавленной нерелевантной ДНК. Три различных размера ампликона тестируются, чтобы установить спектр размеров остаточной ДНК клетки-хозяина.

р. Белок клетки-хозяина

Проводится ИФА для измерения уровней загрязнения белками

клеток-хозяев HEK293. Набор для ИФА 2-го поколения белков клеток-хозяев HEK293 Cygnus Technologies используется в соответствии с инструкциями, предоставленными поставщиком.

q. Анализ на компетентный для репликации AAV

Образец анализируется на наличие компетентных для репликации AAV2/hu68 (rcAAV), которые потенциально могут возникать в процессе производства. Был разработан 3-пассажный анализ, состоящий из амплификации и пассажа на основе клеток с последующим обнаружением ДНК rcAAV с помощью кПЦР в реальном времени (мишень *cap* hu68). Компонент на основе клеток состоит из инокулирующих монослоев клеток HEK293 (P1) с разведениями тестируемого образца и аденовируса ДТ типа 5 (Ad5) человека. Максимальное количество тестируемого препарата будет составлять 1×10^{10} GC векторного препарата. Из-за присутствия аденовируса в клеточной культуре будет амплифицироваться rcAAV. Через 2 дня образуется клеточный лизат и Ad5 инактивируют нагреванием. Осветленный лизат затем проводят во втором цикле через клетки (P2) для повышения чувствительности (снова в присутствии Ad5). Через 2 дня образуется клеточный лизат и Ad5 инактивируют нагреванием. Осветленный лизат затем проводят в третьем цикле через клетки (P3) для максимизации чувствительности (снова в присутствии Ad5). Через 2 дня клетки лизируют, чтобы высвободить ДНК, которую затем подвергают кПЦР для выявления последовательностей *cap* AAVhu68. Амплификация последовательностей *cap* AAVu68 зависимым от Ad5 способом указывает на наличие rcAAV. Использование суррогатного положительного контроля AAV2/hu68, содержащего гены *rep* AAV2 и *cap* AAVhu68, позволяет определить предел обнаружения (LOD) анализа (0,1, 1, 10 и 100 IU), и используя серийное разведение rAAV (1×10^{10} , 1×10^9 , 1×10^8 и 1×10^7 GC) можно количественно определить приблизительный уровень rcAAV, присутствующий в тестируемом образце.

r. Активность *in vitro*

Чтобы связать титр кПЦР GC с экспрессией гена, проводят биологический анализ *in vitro*. Вкратце, клетки высевают на лунки в 96-луночный планшет и инкубируют при 37 °C/5% CO₂ в течение ночи. На следующий день клетки инфицируют серийно разведенным вектором AAV и инкубируют при 37 °C/5% CO₂ в течение двух дней. Затем клетки фиксируют 4% параформальдегидом, затем промывают PBS, содержащим 0,1% тритона-100, затем инкубируют с блокирующим

буфером. После блокирования клетки инкубируют с разведением 1:200 первичного антитела (GenTex monoclonal α -Smn1, CAT № GTX60451), промывают и инкубируют с 1:500 α -мышиним-488 (Thermo Fisher). Перед визуализацией клетки обрабатывают PBS, содержащим DAPI, для визуализации ядер. Изображения планшетов получают с помощью высокопроизводительного сканера Cell Insight Cx5 (Thermo Fisher). Текущий способ сбора данных заключается в скрининге 2500 объектов (т.е. клеток) на лунку и использовании модифицированного протокола SpotID для подсчета числа близнецовых телец Кахала на ядро. Образование ядерных близнецовых телец Кахала зависит от функционального белка Smn1. График Векторных MOI наносится на ось X в зависимости от показаний прибора на оси Y. Оптимизация анализа продолжается.

s. Общий белок, капсидный белок, чистота белка и соотношение капсидных белков

Векторные образцы сначала количественно оценивают на общий белок по стандартной кривой белка бычьего сывороточного альбумина (BSA), используя анализ с бицинхониновой кислотой (BCA). Определение производится путем смешивания равных частей образца с реагентом Micro-BCA, входящим в набор. Такая же процедура применяется к разведениям стандарта BSA. Смеси инкубируют при 60 °C и измеряют оптическую плотность при 562 нм. Стандартную кривую получают по стандартной абсорбции известных концентраций с использованием 4-параметрического подбора. Неизвестные образцы количественно определяют по 4-х параметрической регрессии. Чтобы обеспечить полуколичественное определение чистоты rAAV, образцы нормализуют по геномному титру и 5×10^9 GC разделяют на геле для электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях. Затем гель окрашивают красителем SYPRO Ruby. Любые примесные полосы количественно определяют денситометрией. Окрашенные полосы, которые появляются в дополнение к 3 AAV-специфическим белкам VP1, VP2 и VP3, считаются белковыми примесями. Сообщается о массовом процентном содержании примесей, а также о приблизительной молекулярной массе полос загрязнений. Гели SDS-PAGE также будут использоваться для количественной оценки белков VP1, VP2 и VP3 и определения их соотношения.

t. Белок BSA

Этот анализ проводят с использованием набора ИФА для

бычьего альбумина, полученного от Bethyl Laboratories, в соответствии с протоколом, поставляемым с набором для анализа.

и. Эндонуклеаза бензоназа

Бензоназа используется в производственном процессе для разрушения нуклеиновых кислот с целью облегчения очистки вектора и, как таковая, представляет собой технологическую примесь. Коммерческий ИФА (Millipore) используется для измерения концентрации остаточной бензоназы. Поскольку содержание бензоназы, вероятно, будет в следовых количествах, если она вообще обнаружится, необходимо выполнить ИФА с диапазоном стандартов, который включает концентрации < 1 нг/мл.

к. Соотношение GC к IU

Соотношение GC/IU является показателем постоянства качества препарата. Титр цкПЦР (GC/мл) делится на «инфекционную единицу» (IU/мл), чтобы получить расчетное соотношение GC/IU.

л. Тестирования осмолярности, pH и внешнего вида

Осмолярность и pH определяют в соответствии с USP <785> и USP <791> соответственно. Внешний вид препарата определяется визуальным осмотром на предмет прозрачности, цвета и отсутствия/присутствия посторонних частиц. Препарат проверяют на белом и черном фоне.

Пример 14. Сильная токсичность у приматов, отличных от человека, и поросят после внутривенного введения высоких доз вектора AAV, экспрессирующего SMN человека

Было показано, что нейротропные серотипы AAV, такие как AAV9, трансдуцируют альфа-мотонейроны позвоночника при внутривенном введении в высоких дозах. Это наблюдение привело к недавнему успешному применению внутривенной доставки AAV9 для лечения детей со спинальной мышечной атрофией, наследственным дефицитом белка выживания моторных нейронов (SMN), характеризующимся избирательной гибелью нижних моторных нейронов.

Для оценки эффективности трансдукции моторных нейронов с использованием этого подхода три молодых примата, отличных от человека (NHP; возраст 13–14 месяцев) и три новорожденных поросенка (возраст 7–30 дней) получали внутривенную инъекцию вектора AAV, несущего трансген SMN человека, тесно связанный с AAV серотипа 9 (AAVhu68), несущего экспрессионную кассету SMN человека в дозе, подобной той, которая использовалась в клиническом испытании SMA. Животных оценивали на трансдукцию

спинномозговых моторных нейронов, а также на наличие признаков токсичности. Введение 2×10^{14} копий генома на килограмм массы тела привело к широко распространенной трансдукции спинномозговых моторных нейронов у обоих видов. Тем не менее, тяжелая токсичность имела место как у NHP, так и у поросят. Все три NHP имели выраженное повышение уровня трансаминаз, и одно животное было подвергнуто эвтаназии через 5 дней после инъекции с клиническими и гистологическими признаками острой печеночной недостаточности и шока. Также наблюдалась дегенерация сенсорных нейронов ганглиев дорсальных корешков (DRG), хотя у NHP не было клинически выраженного сенсорного дефицита. Не было никакой корреляции между клиническими результатами и ответами Т-клеток на векторный капсид или трансгенный продукт у NHP. Поросята не демонстрировали никаких признаков печеночной токсичности, но в течение 14 дней после инъекции вектора у всех трех животных обнаружился проприоцептивный дефицит и атаксия, которые сильно нарушали передвижение и вызвали необходимость эвтаназии. Эти клинические данные коррелировали с более тяжелыми поражениями сенсорных нейронов DRG, чем те, которые наблюдались у NHP. Данные для печени и сенсорных нейронов у этих видов, по-видимому, являются прямым следствием трансдукции AAV независимо от иммунного ответа на капсид или трансгенный продукт. Доклинические и клинические исследования, связанные с высоким системным воздействием векторов AAV, должны включать тщательный мониторинг сходной токсичности.

А. Результаты:

1. Исследование приматов, отличных от человека:

Трем 13–14-месячным макакам-резусам вводили внутривенную (в/в) дозу 2×10^{14} GC/кг вектора AAVhu68, экспрессирующего SMN человека, под контролем промотора куриного бета-актина с немедленным ранним энхансером цитомегаловируса (таблица 1).

Таблица 1. Макаки-резусы, получавшие AAVhu68.CB7.hSMN1, включенные в пример 14

ID животного	Возраст (месяцы)	Масса (кг)	Исходный уровень титра нАт к AAVhu68	Доза	Путь введения
16C116	13	2,52	< 1:5	2×10^{14} GC/кг	в/в
16C176	14	2,22	< 1:5	2×10^{14} GC/кг	в/в
16C215	14	2,40	< 1:5	2×10^{14} GC/кг	в/в

Все животные демонстрировали стабильные показатели жизненно важных функций во время инфузии и без осложнений восстанавливались после анестезии. В день исследования 5 животное 16C176 стало резко невосприимчивым. Медицинский осмотр выявил бледные слизистые оболочки, примерно на 15% снижение массы тела со времени введения вектора, гепатомегалию и пальпируемую флюктуацию в брюшной полости. Нарушения в анализе крови включали значения объема осажденных клеток 22%, глюкозы < 20 мг/дл, BUN 75 мг/дл и креатинина 2 мг/дл. Состояние этого животного быстро ухудшилось, и впоследствии оно было подвергнуто эвтаназии. Было проведено полное вскрытие.

Во время эвтаназии была собрана кровь, и был проведен полный формат биохимического анализа сыворотки. Необычные результаты включали гипопропротеинемию, значительно повышенные ферменты печени (АСТ, АЛТ, ГГТП, ЩФ), гипербилирубинемия, повышение азота мочевины крови (АМК), повышенное соотношение АМК/креатинин, гиперфосфатемию, гипогликемию, гипокальциемию, гипохлоремия, гипохолестеринемию, гипертриглицеридемию и повышенную креатининфосфокиназу (СРК) (Фиг. 16А–16Е). Эти данные свидетельствуют о печеночной недостаточности с почечной недостаточностью, вероятно, вторичной по отношению к гипоперфузии. Образец, отобранный при вскрытии, был сильно гемолизирован и, следовательно, полный анализ крови (СВС) и формат коагуляции не проводились.

При вскрытии брюшной полости содержалось около 44 мл красной серозно-гемморагической жидкости. Цитологическая оценка абдоминальной жидкости соответствовала транссудату с острым кровоизлиянием. Печень была диффузно увеличена, плотная, покрыта пятнами от рыжевато-коричневого до красного цвета, что соответствовало гистологически массивному гепатоцеллюлярному некрозу и дегенерации, затрагивающей ~ 95% печеночной паренхимы, при этом оставались только редкие скопления относительно нормальных гепатоцитов (Фиг. 17А–17D). Центрилобулярные и среднезональные области были сильно перегружены потерей гепатоцитов, дегенерацией и некрозом. Кроме того, были небольшие очаги фибрина, которые иногда образовывали пробки в синусоидных капиллярах и заполняли просвет воротных вен (острые фибриновые тромбы). Иммуногистохимический анализ (ИНС) по фибриногену подтвердил наличие пробок фибрина в синусоидальных капиллярах. Окрашивание фибриногена было сильно положительным в

перипортальных к мидзональным областям, которые были областями активного гепатоцеллюлярного некроза в паренхиме печени, которая осталась. Окрашивание фибриногена часто выделяет синусоидные капилляры в этих участках. Некротические гепатоциты и связанный с ними дебрис также были сильно положительными.

Селезенка была диффузно увеличена, твердая и застойная. Застой был подтвержден гистологически, и зародышевые центры в белой пульпе были истощены по лимфоцитам с обширным клеточным дебрисом (лимфоцитоллиз) и имели заметные, иногда гиалинизированные, высокие эндотелиальные венулы (HEV). Точно так же в коре вилочковой железы обнаружен легкий лимфоцитоллиз с заметными макрофагами окрашиваемых телец. В целом, брыжеечные лимфатические узлы были диффузно увеличены и переполнены. Гистологически фолликулы показали истощение зародышевого центра при лимфоцитоллизе. Подобные гистологические данные наблюдались в других лимфоидных тканях, включая другие лимфатические узлы (подчелюстные, ректальные), бронхиальную лимфоидную ткань (BALT) в легких и кишечную лимфоидную ткань (GALT) в толстой кишке и слепой кишке. Лимфатические узлы, связанные с прямой кишкой, предположительно являющиеся мезоректальными лимфатическими узлами, имели субкапсулярный и медуллярный синусовый эритроцитоз, что соответствовало дренированию эритроцитов. Гистологические данные в лимфоидных фолликулах свидетельствовали о серьезном системном стрессе. Гистологически, острое кровоизлияние и отек были очевидны в легких, адвентициальной оболочке желчного пузыря, сердце, периректальной жировой ткани и подкожной клетчатке около молочной железы. Поверхностная слизистая тонкого кишечника, слепой кишки и прямой кишки была переполнена случайными кровоизлияниями, а также поверхностными скоплениями нагруженных гемосидерином макрофагов. Наличие кровоизлияний и отеков в легких, желудочно-кишечном тракте и печени наводит на мысль о шоке, поскольку это известные органы шока у приматов, отличных от человека. Наблюдалась дегенерация ацинарных клеток в поджелудочной железе, о которой также сообщалось в случаях шока у приматов, отличных от человека. (Khan, N.A., et al. Mitigation of septic shock in mice and rhesus monkeys by human chorionic gonadotrophin-related oligopeptides. *Clinical and Experimental Immunology* 160, 466-478 (2010).). Минимальная адренкортикальная одиночноклеточная дегенерация и некроз присутствовали в пучковой зоне

надпочечников, что также, вероятно, связано с системным заболеванием, таким как системный стресс, ишемия, кровоизлияние и воспаление. В головном мозге, спинном мозге, черепных нервах и периферических нервах этого животного не было отмечено никаких значительных или гистологических данных исследования. Никаких значимых данных исследования в почках не наблюдалось.

Оставшиеся два примата (16C116 и 16C215) были клинически нормальными на протяжении всего исследования и вскрыты, как и планировалось на 28-й день. Анализ крови, выполненный в определенные моменты времени в течение всего исследования, выявило резкое повышение уровня трансаминаз на день 5, которое уменьшалось ко дню 7 и нормализовалось ко дню 14 (Фиг. 16А-16Е). У одного из двух оставшихся приматов наблюдалась временная тромбоцитопения (количество тромбоцитов 24000/мкл) на день 5; тромбоциты не могли быть определены количественно у другого животного из-за слипания, но, по-видимому, они были нормальными по количеству в периферическом мазке. Анализ крови был ничем не примечателен на протяжении всего исследования. Во время вскрытия печень одного животного (16C116) была от покрыта пятнами от рыжевато-коричневого до красного цвета с подчеркнутым дольчатым рисунком; никаких других значительных отклонений не наблюдалось ни у одного из этих двух приматов.

Гистологически, у печени обоих приматов проявился минимальный мультифокальный одиночный гепатоцеллюлярный некроз, который был наиболее заметным в перипортальной области (Фиг. 17А-17D). Кроме того, животное 16C215 имело многоочаговые агрегаты нерегулярно расположенных гепатоцитов с цитоплазматической базофилией, везикулярными ядрами и случайными митотическими фигурами, свидетельствующими о регенерации. Эти кластеры гепатоцитов обычно окружают портальные области с инфильтратами рассеянных мононуклеарных клеток и пролиферирующими фибробластами (фиброплазия).

Гистологические данные у двух летально вскрытых приматов (16C215 и 16C116) наблюдались в нервной системе, преимущественно в спинном мозге, тригеминальных ганглиях и ганглиях дорсальных корешков, а также в периферических нервах, включая срединный, лучевой, седалищный, большеберцовый и малоберцовый нервы (Фиг. 18А-18D, таблицы 2-4). Гистологические поражения в центральной и периферической нервной системе часто были переменными, причем степень тяжести отличалась между срезами ткани в пределах одного

сегмента, а также между сегментами спинного мозга и периферических нервов у одного и того же животного. Ганглии дорсальных корешков (DRG) демонстрируют минимальную или легкую дегенерацию тел нейронных клеток, характеризующуюся центральным хроматолизом и инфильтратами мононуклеарных клеток, окружающими (сателлитоз) и инфильтрирующими тела нейронных клеток (нейронофагия). Основываясь на иммуногистохимическом анализе (ИНС), инфильтраты мононуклеарных клеток состояли из CD3-положительных Т-клеток с небольшим количеством CD20-положительных В-клеток. У обоих приматов в дорсальном тракте белого вещества шейного, грудного и поясничного отделов спинного мозга обнаружена двусторонняя аксонопатия от минимальной до умеренной, характеризующаяся расширением миелиновых оболочек с миеломакрофагами и без них, что указывает на дегенерацию аксонов. Изредка, от минимальной до выраженной аксонопатии наблюдали в корешках дорсального нерва спинного мозга. Периферические нервы (срединный, лучевой, седалищный, малоберцовый и большеберцовый) проявили сходную аксонопатию, которая варьировала от легкой до выраженной, наряду с переменными инфильтратами мононуклеарных клеток и периаксональным фиброзом. Периферическая аксонопатия наблюдалась двусторонне; однако степень тяжести варьировала между отделами и даже внутри некоторых нервных отделов.

Таблица 2. Частота возникновения и степень тяжести аксонопатии в дорсальных трактах белого вещества спинного мозга у новорожденных отличных от человека приматов и поросят, получавших внутривенно AAVhu68, экспрессирующий SMN человека. Исключая вскрытие NHP на 5-й день, частота и тяжесть дорсальной аксонопатии спинного мозга была относительно одинаковой среди NHP и поросят.

Вид	Младенческий NHP	Поросята
Количество животных, оцененное в группе	3	3
Количество изученных	3	3
Спинальный мозг, шейный (C2) отдел		
Аксонопатия, дорсальные тракты белого вещества		
Отсутствует	1*	-

Степень 1	1	1
Степень 2	–	1
Степень 3	1	1
Спинальный мозг, грудной (T2) отдел		
Аксонопатия, дорсальные тракты белого вещества		
Отсутствует	1*	–
Степень 1	1	1
Степень 2	1	2
Спинальный мозг, поясничный (L2) отдел		
Аксонопатия, дорсальные тракты белого вещества		
Отсутствует	1*	–
Степень 1	1	2
Степень 2	–	1
Степень 3	1	–

* Обозначает незапланированное вскрытие животного 16C176 (5 день)

Таблица 3. Частота и тяжесть нейрональной дегенерации дорсального корешка и тригеминального ганглия у младенческих отличных от человека приматов и поросят, получавших внутривенно AAVhu68, экспрессирующих SMN человека. Исключая вскрытие NHP на 5-й день, частота дегенерации тел нейронных клеток была одинаковой среди NHP и поросят; однако тяжесть была немного увеличена у поросят по сравнению с NHP.

Вид	Младенческий NHP	Поросята
Количество животных, оцененное в группе	3	3
Ганглии дорсальных корешков, шейный отдел		
Количество изученных	3	3
Дегенерация тел нервных клеток с инфильтратом мононуклеарных клеток		
Отсутствует	1*	–
Степень 1	2	–

Степень 2	–	1
Степень 4	–	2
Ганглии дорсальных корешков, грудной отдел		
Количество изученных	2	3
Дегенерация тел нервных клеток с инфильтратом мононуклеарных клеток		
Отсутствует	–	–
Степень 1	1	–
Степень 2	1	3
Ганглии дорсальных корешков, поясничный отдел		
Количество изученных	3	3
Дегенерация тел нервных клеток с инфильтратом мононуклеарных клеток		
Отсутствует	1*	–
Степень 1	1	–
Степень 2	1	1
Степень 3	–	2
Тригеминальный ганглий		
Количество изученных	2	3
Дегенерация тел нервных клеток с инфильтратом мононуклеарных клеток		
Отсутствует	–	–
Степень 1	2	1
Степень 2	–	1
Степень 3	–	1

* Обозначает незапланированное вскрытие животного 16C176 (5 день)

Таблица 4. Частота и степень выраженности аксонопатии периферических нервов у младенческих отличных от человека приматов и поросят, получавших внутривенно AAVhu68, экспрессирующих SMN человека. Исключая вскрытие NHP на 5-й день, частота периферической аксонопатии была одинаковой среди NHP и поросят; однако тяжесть была немного увеличена у NHP по сравнению с поросятами.

Вид	Младенческий ННР	Поросята
Количество животных, оцененное в группе	3	3
Количество изученных	3	3
Срединный нерв		
Аксонопатия		
Отсутствует	1*	1
Степень 1	–	1
Степень 2	1	1
Степень 3	1	–
Малоберцовый нерв		
Аксонопатия		
Отсутствует	1*	2
Степень 1	–	–
Степень 2	1	–
Степень 4	1	1
Лучевой нерв		
Аксонопатия		
Отсутствует	2*	1
Степень 1	–	1
Степень 2	–	1
Степень 3	1	–
Седалищный нерв		
Аксонопатия		
Отсутствует	1*	1
Степень 1	–	1
Степень 3	1	1
Степень 4	1	–
Большеберцовый нерв		
Аксонопатия		
Отсутствует	1*	1
Степень 1	–	1

Степень 3	1	1
Степень 4	1	-

* Обозначает незапланированное вскрытие животного 16C176 (5 день)

Анализ биораспределения вектора продемонстрировал перенос гена во все оцениваемые ткани, включая головной и спинной мозг (Фиг. 19). Следует отметить, что на ганглии дорсальных корешков (DRG) интенсивно воздействовали более чем 10 векторных геномов на клетку во многих образцах. Чрезвычайно высокая трансдукция печени была также очевидна с более чем 1000 копиями векторного генома (GC) на клетку. Копии векторного генома были обнаружены на более высоких уровнях у животных, вскрытых на день 5, чем у вскрытых на день 28, что позволяет предположить, что некоторые из векторных геномов, обнаруженных в тканях в ранние сроки после инъекции, не представляют стабильной трансдукции.

Экспрессию SMN оценивали гибридизацией *in situ* (Фиг. 20A–20G). Была отмечена экспрессия мРНК SMN человека в печени животного, вскрытого на день 5, но экспрессия не обнаруживалась в спинном мозге или головном мозге. У двух животных, вскрытых через 28 дней после инъекции вектора, выявлена устойчивая экспрессия SMN в спинномозговых моторных нейронах, причем примерно 30–90% клеток трансдуцировалось в среднем на каждом уровне оцениваемого спинного мозга. В мозге были также разбросанные участки трансдуцированных нейронов и эпендимальных клеток.

T-клеточные ответы на капсид вектора и продукт транскрипта SMN человека оценивали по гамма-интерферону анализом ELISPOT (таблица 5). Мононуклеарные клетки периферической крови собирали для анализа ELISPOT перед введением вектора и во время вскрытия у всех трех животных. Мононуклеарные клетки также собирали при вскрытии из печени. Все образцы демонстрировали устойчивый ответ гамма-интерферона на стимуляцию положительным контролем с РНА, за исключением лимфоцитов печени, собранных у животных 16C215, которые не проявляли ответа на стимуляцию РНА и были исключены из последующего анализа. Никакого ответа T-клеток на капсид AAVhu68 или hSMN не было обнаружено ни в один момент времени для животных 16C176 или 16C215. Животное 16C116 не проявляло T-клеточного ответа в РВМС в любой момент времени, но имело детектируемый ответ гамма-интерферона как на капсид вектора, так

и на продукт трансгена во время вскрытия.

Таблица 5. Обнаружение Т-клеточных ответов ИФН-гамма анализом ELISPOT на капсид AAVhu68 и трансген hSMN в лимфоцитах периферической крови и печени. Т-клеточные ответы измеряли в отношении объединенных перекрывающихся 15-мерных пептидов, содержащих последовательность VP1 AAVhu68 (3 пептидных пула) или последовательность SMN человека (2 пептидных пула). Значения выражены в бляшкообразующих единицах (SFU) на миллион МКПК. Звездочка обозначает обнаруживаемый ответ Т-клеток (> 50 SFU и в 3 раза больше, чем у нестимулированного контроля). Лимфоциты печени, выделенные из 16С215, показали неадекватный ответ на стимуляцию РНА и были исключены из анализа. РНА: фитогемагглютинин, TNTC: слишком много для подсчета.

ID животного	Источник лимфоцитов	Момент времени	Нестимулированные	РНА	AAVhu68			hSMN	
					Пул А	Пул В	Пул С	Пул А	Пул В
16С116	Периферическая кровь	Исходное значение	8	TNTC	5	8	8	8	5
	Периферическая кровь	Вскрытие	3	TNTC	13	8	8	13	3
	Печень	Вскрытие	0	TNTC	28	40	80*	123*	48
16С215	Периферическая кровь	Исходное значение	0	TNTC	30	13	8	23	15
	Периферическая кровь	Вскрытие	10	TNTC	8	23	18	13	18
16С176	Периферическая кровь	Исходное значение	25	TNTC	8	18	8	28	18
	Периферическая кровь	Вскрытие	13	1043	8	5	0	20	0
	Печень	Вскрытие	5	1023	5	5	0	3	0

2. Исследование поросят

Трем микро-юкатанским поросятам вводили внутривенную дозу 2×10^{14} GC/кг AAVhu68.hSMN в возрасте 7 (n=1; поросенок А) или 30 (n=2; поросята В и С) дней (таблица 6). Все животные восстановились без осложнений после введения вектора. На 14-й день исследования после введения вектора у поросенка А развилась атаксия задних конечностей. Атаксия характеризовалась покачивающейся походкой с перемежающимся патологическим сгибанием щеточного сустава ног и пересечением задних

конечностей. Когда задние лапы были помещены на их дорсальную поверхность, поросенок не смог исправить положение копыта (тест на размещение), что указывает на дефицит сознательной проприоцепции. Эта атаксия прогрессировала до передних конечностей в течение 6 часов. У этого поросенка также развивалась одышка, но аускультация всех полей легкого находилась в пределах нормы. Учитывая прогрессирование клинических признаков, поросенка умерщвляли на 14 день после введения вектора и проводили полное вскрытие.

Таблица 6. Микро-юкатанские поросята, получавшие AAVhu68.CB7.hSMN1, включенные в это исследование

ID животного	Возраст (дни)	Масса (кг)	Доза	Путь введения
Поросенок А	7	1,56	2×10^{14} GC/кг	в/в
Поросенок В	30	3,35	2×10^{14} GC/кг	в/в
Поросенок С	30	4,30	2×10^{14} GC/кг	в/в

На день 13 после введения вектора у поросят, получавшим инъекции в возрасте 30 дней, появились сходные неврологические признаки, хотя и менее тяжелые. Одышка у этих животных не наблюдалась. Поросят умерщвляли и проводили полное вскрытие.

У поросят обеих возрастных групп не было обнаружено значительных обширных аномалий. Поросенок, возрастом 7-дней, после инъекции находился в удовлетворительном или плохом состоянии питания во время вскрытия и имел клинический анамнез диареи на день 7 исследования, которая разрешилась на день 9 исследования после лечения с помощью внутримышечного (в/м) введения цефтиофура. Поросята, возрастом 30-дней, после инъекции находились в адекватном состоянии питания. Полный анализ крови (CBC) из крови, взятой до эвтаназии у 7-дневного поросенка (поросенок А) после инъекции, выявил выраженную нейтрофилию ($22468/\text{мкл}$; эталонный диапазон: $2300\text{--}11900/\text{мкл}$). Других значительных отклонений в анализе крови не было. Нейтрофилия, вероятно, соответствовала гистологическим признакам бактериальной бронхопневмонии. У 30-дневных поросят после инъекции не было отмечено каких-либо значительных отклонений в анализе крови.

В шейных, грудных и поясничных ганглиях дорсальных корешков (DRG) у всех животных наблюдалась дегенерация тел нейронных клеток от легкой до выраженной степени с инфильтратами

мононуклеарных клеток (Фиг. 21А-21D, таблицы 2-4). Гистологические поражения нейрональной дегенерации варьировали от цитоплазматической эозинофилии с яркими эозинофильными цитоплазматическими глобулами и центрального хроматолиза до полной очистки инфильтрирующими мононуклеарными клетками (нейронофагия). Подобные, хотя и менее серьезные, повреждения наблюдались и в тригеминальных ганглиях у всех животных, от минимальных до умеренных. У всех поросят в дорсальном тракте белого вещества шейного, грудного и поясничного отделов спинного мозга обнаружена аксонопатия от минимальной или умеренной, характеризующаяся расширением миелиновых оболочек с миеломакрофагами и без них, что согласуется с дегенерацией аксонов. Частота этих поражений была одинаковой у всех животных; однако, тяжесть была немного уменьшена у одного из 30-дневных поросят (поросенок С) после инъекции.

У 7-дневного поросенка (поросенок А) после инъекции периферические нервы (срединный, лучевой, седалищный, малоберцовый и большеберцовый) содержали сходную со спинным мозгом аксонопатию, которая варьировала от легкой до тяжелой двусторонней. Интересно, что аксонопатия в периферических нервах задних конечностей (от умеренной до выраженной) была более тяжелой, чем передних (легкая). У 30-дневных поросят после инъекции только у 1 животного (поросенок В) была минимальная периферическая аксонопатия в большинстве нервов, за исключением малоберцового нерва. Периферические нервы другого 30-дневного поросенка (поросенок С) после инъекции были гистологически непримечательными. Гистологические поражения в центральной и периферической нервной системе часто были переменными, так как тяжесть часто отличалась между и внутри срезов тканей одного и того же животного, а также между различными сегментами спинного мозга. Гистологических нарушений в головном мозге или печени не отмечено.

В целом, частота и степень поражения периферических нервов были снижены у 30-дневных поросят после инъекции по сравнению с 7-дневными поросятами после инъекции, что совпало с менее выраженными неврологическими признаками до смерти, наблюдаемыми у более старых животных. Кроме того, тяжесть поражений спинного мозга и частота поражений периферических нервов были самыми низкими у одного из 30-дневных поросят (поросенок С) после инъекции, у которых также были наименее тяжелые неврологические

признаки из поросят в обеих возрастных группах.

Векторные геномы были обнаружены во всех анализируемых тканях, включая головной и спинной мозг (Фиг. 22). Перенос гена в DRG обычно был выше, чем в спинной мозг, часто с более чем 1 вектором GC на диплоидный геном (dg) хозяина. Наибольшее количество копий векторного генома было обнаружено в печени, приблизительно 200 GC/dg в образцах печени от всех трех животных. При введении не было очевидного влияния возраста на эффективность переноса гена в оцениваемые ткани.

Экспрессия мРНК SMN человека была обнаружена с помощью ISH в моторных нейронах по всему спинному мозгу всех трех животных (Фиг. 23А–23). Большинство моторных нейронов, по-видимому, были трансдуцированы у всех животных без видимой разницы в трансдукции у поросят в возрасте между 7 и 30 днями.

В. Обсуждение:

В этом примере внутривенное введение вектора AAV, экспрессирующего SMN человека в высокой дозе, приводило к неожиданной токсичности у поросят и молодых NHP. Печеночная токсичность была ограничено проявлена у NHP, тогда как дегенерация сенсорных нейронов произошла у обоих видов. Примерно в 5 раз меньший перенос генов в печень у поросят, получавших ту же самую дозу вектора, позволяет предположить, что меньший печеночный тропизм AAV у этого вида может объяснить отсутствие токсичности для печени, наблюдаемой у NHP. У всех трех NHP развилось быстрое повышение ферментов печени и билирубина после введения вектора. Животное с наиболее выраженным повышением уровня трансаминаз также демонстрировало признаки коагулопатии с обширным отложением фибрина в печени, широко распространенным кровоизлиянием и явным спонтанным кровоизлиянием в брюшную полость, хотя исследования коагуляции не могли быть выполнены во время вскрытия, что ограничивало интерпретацию этих результатов. Наличие отложения фибрина в печени, связанное с широко распространенным кровоизлиянием, наводит на мысль о диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (DIC). Тем не менее, отложение фибрина не было отмечено вне печени, что не соответствует истинной DIC. Полученные данные похожи на те, которые описаны при острой печеночной недостаточности, вызванной токсичностью ацетаминофена, которая характеризуется быстрой печеночно-клеточной дегенерацией и презентацией тканевого фактора в печени, что приводит к внутрипеченочной коагуляции.

См., например, Ganey, P.E., et al. Role of the coagulation system in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Hepatology* 46, 1177-1186 (2007); Kerr, R. New insights into haemostasis in liver failure. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 14 Suppl 1, S43-45 (2003); Payen, C., Dachraoui, A., Pulce, C. & Descotes, J. Prothrombin time prolongation in paracetamol poisoning: a relevant marker of hepatic failure? *Human & experimental toxicology* 22, 617-621 (2003); и James, L.P., Wells, E., Beard, R.H. & Farrar, H.C. Predictors of outcome after acetaminophen poisoning in children and adolescents. *The Journal of pediatrics* 140, 522-526 (2002). Это часто связано с коагулопатией, которая может быть связана с расходом фактора свертывания крови, вызванного внутрипеченочной коагуляцией, снижением синтеза фактора свертывания крови из-за печеночной недостаточности или их сочетанием. См. Ganey et al., 2007 и Kerr, 2003, как указано выше. Временная тромбоцитопения у одного животного на 5 день также может быть связана с внутрипеченочной коагуляцией. Другим возможным объяснением может быть активация системного воспалительного ответа при высокой дозе AAV с активацией тромбоцитов, внутрисосудистой коагуляцией, шоком и дисфункцией печени в качестве вторичных последствий. Проводятся исследования, чтобы определить, является ли повреждение печени первичной причиной этого каскада или вторичным следствием, поскольку попытки снизить печеночный тропизм векторов AAV могут быть пригодны в первом случае, но не во втором. В этом примере недостаточно данных для разграничения этих возможностей, и в настоящее время проводятся дополнительные исследования, чтобы полностью выяснить патофизиологию печеночной токсичности после высокого системного воздействия векторов AAV.

Не сообщалось о дегенерации DRG после введения AAV, хотя в некоторых исследованиях отмечался сильный тропизм к DRG. См., например, Grey S.J., Kalburgi S.N., McCown T.J. & Samulski, R.J. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene therapy* 20, 450-459 (2013). Повреждения, наблюдаемые в настоящем примере, состояли из дегенерации тел сенсорных нейронных клеток DRG, а также их центрального и периферического аксонов. Эти поражения, вероятно, появляются более чем через 5 дней после переноса гена, так как они

отсутствовали у умерщвленного NHP через 5 дней после лечения, и клинические признаки впервые были представлены у поросят через 13–14 дней после введения вектора. Повреждения DRG были чуть более тяжелыми у свиней, чем у NHP, тогда как дегенерация сенсорных аксонов в спинном мозге и периферических нервах была похожа или даже слабее у свиней по сравнению с NHP, – наблюдение, которое можно объяснить более ранним моментом вскрытия у свиней, который, возможно, не допускали дегенерации всех аксонов, связанных с умирающими клетками. Сенсорный дефицит был очевиден у свиней, но не у NHP, что позволяет предположить, что степень поражений DRG у NHP упала ниже порога, при котором появляются клинические признаки. Тип сенсорных волокон, пораженных у обоих видов, не был охарактеризован. Оказалось, что на проприоцепцию влияет дефицит, отмеченный у поросят; воздействие на другие сенсорные волокна было неясным, и дополнительно характеризуется в последующих исследованиях.

T-клеточные ответы на неоантиген являются теоретической причиной токсичности в любом исследовании, оценивающем доставку ксеногенного человеческого трансгена в животную модель, или в клинических исследованиях генной терапии при рецессивных заболеваниях. Кроме того, пептиды, полученные из капсида, перекрестно представленные на ГКГС класса I трансдуцированными клетками, были идентифицированы как потенциальные мишени для цитотоксических ответов T-клеток после AAV-опосредованного переноса гена. См., например, Manno, C.S., et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12, 342–347 (2006); и Martino, A.T., et al. Engineered AAV vector minimizes in vivo targeting of transduced hepatocytes by capsid-specific CD8+ T cells. *Blood* 121, 2224–2233 (2013). Предполагается, что этот последний механизм ответственен за повышение уровня трансаминаз, наблюдаемое в некоторых клинических испытаниях системной доставки AAV, и введение глюкокортикоидов для подавления T-клеточных ответов использовалось для снижения этого риска. См., например, Manno et al., 2006, указанную выше, и George, L.A., et al. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *New England Journal of Medicine* 377, 2215–2227 (2017). В этом примере повышение трансаминаз у NHP, по-видимому, не коррелирует с ответами T-клеток на капсид или трансгенный продукт. Ответы T-

клеток на векторный капсид и трансгенный продукт были обнаружены у лимфоцитов, собранных из печени, но не в периферической крови у одного животного, демонстрируя, что ответы могут возникать на оба антигена, и что ответы, измеренные в периферической крови, не всегда отражают те, которые встречаются в органе-мишени. Однако у животного с наиболее тяжелой токсичностью не обнаруживалось ответа Т-клеток ни в периферической крови, ни в лимфоцитах печени, а у другого животного, демонстрировавшего заметное повышение уровня трансаминаз, в периферической крови ответа Т-клеток не наблюдалось. Более того, быстрое проявление токсичности для печени (менее 5 дней) не согласуется с ответом Т-клеток у нативного хозяина. Обнаружение печеночной токсичности в отсутствие Т-клеточного ответа предполагает, что альтернативный механизм ответственен за повреждение печени. Возможные варианты могут включать токсичность, вызванную массивным накоплением векторного капсида в пределах эндосомального пути, индукцию ответа повреждения ДНК при доставке большого количества векторных геномов, токсичность трансгенного продукта, экспрессируемого на чрезвычайно высоких уровнях, или нарушение нормальной транскрипции и трансляции генов хозяина, вызванное высоким уровнем экспрессии трансгена. Является ли эта токсичность специфичной для трансгена SMN, можно легко проверить в доклинических исследованиях; оценка других возможностей требует более обширных исследований. Наблюдения, что тяжелая токсичность для печени, нарушения свертываемости крови, тромбоцитопения и шок у взрослых NHP, получавших одинаковую дозу другого серотипа AAV, несущего трансген зеленого флуоресцентного белка, продемонстрировали, что эти результаты не являются уникальными ни для векторов AAVhu68, ни для трансгена SMN (данные не показаны). Важно отметить, что если существуют неопосредованные иммунной системой механизмы печеночной токсичности, которые встречаются у людей, протоколы введения глюкокортикоидов, которые в настоящее время включены в клинические испытания, могут быть неэффективными для снижения такого риска.

Критический вопрос для области генной терапии AAV заключается в том, может ли токсичность, наблюдаемая в этом исследовании, быть перенесена на людей, и если да, то какие модели на животных достаточно предсказывают токсичность для проведения информативных доклинических исследований

безопасности. У некоторых пациентов с SMA, получавших аналогичную дозу близкородственного вектора AAV9, отмечалась выраженная печеночная токсичность, что позволяет предположить, что результаты исследования печени в настоящем исследовании могут быть применимы к людям и что макаки могут быть прогностической моделью. Труднее определить, может ли токсичность DRG, наблюдаемая в этом примере, быть перенесена на людей. Сенсорные симптомы не были зарегистрированы в этом клиническом исследовании SMA, хотя субклинические поражения, сходные с таковыми у NHP, могут не отмечаться при рутинных оценках.

Полученные результаты поднимают важные вопросы относительно безопасности системного введения векторов AAV в чрезвычайно высоких дозах. Результаты, показанные в этом примере, подтверждают возможность высокой дозы AAV эффективно трансдуцировать критические клетки-мишени, такие как нижние моторные нейроны, но демонстрируют, что требуемые дозы могут быть связаны со значительной токсичностью. Взрослый NHP, который ранее лечился 10-кратной более низкой дозой вектора AAV9, и у которого не наблюдалось ни значительной трансдукции моторных нейронов, ни токсичности, демонстрирует, что терапевтический индекс для системных AAV, нацеленных на моторные нейроны, может быть довольно узким. См., например, Hinderer C., et al. Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. *Molecular therapy. Methods & clinical development* 1, 14051 (2014). Подобно зарегистрированным повышением трансаминаз в клиническом исследовании SMA, у NHP, получавших одинаковую векторную дозу в этом исследовании, наблюдались межсубъектные различия в степени токсичности для печени, а 2/3 NHP продемонстрировали эффективный перенос генов только с бессимптомными лабораторными отклонениями. Это говорит о том, что системное введение AAV в высоких дозах может быть безопасными и эффективными у некоторых пациентов, хотя узкий терапевтический индекс и серьезность значений в выпадающих показателях могут означать, что случаи тяжелой токсичности возникают при лечении большего числа пациентов.

Проводятся исследования, чтобы понять механизм печеночной и сенсорной нейронной токсичности, наблюдаемой в этом примере, и актуальность каждого из них для человека. В настоящее время

эксперименты с приматами, отличными от человека, могут быть информативными для оценки печеночной и неврологической токсичности, связанной с системным введением AAV в высоких дозах, и эти исследования должны быть выполнены до поступления в клинику. В клинических испытаниях следует тщательно оценить печеночную токсичность, а также симптомы сенсорной нейропатии. Объективные оценки токсичности для сенсорных нейронов, включая соматосенсорные вызванные потенциалы и исследования нервной проводимости, также могут быть содержательными. Когда в клинических испытаниях AAV встречаются повышения уровней трансаминаз или другие признаки токсичности, исследователи должны придерживаться широкого дифференциального диагноза, так как в ответ могут быть задействованы как иммунные, так и неиммунные механизмы.

С. Материалы и методы:

Процедуры с животными: Все процедуры на животных были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Университета Пенсильвании. Для внутривенного введения вектора вектор разводили в стерильном забуференном фосфатом физиологическом растворе и вводили инфузией через подкожную вену (NHP) или ушную вену (поросята) в течение 10 минут. Эвтаназия была выполнена с помощью передозировки пентобарбитала.

Гистология: Ткани фиксировали в формалине, заключали в парафин, делали срезы и окрашивали гематоксилином и эозином в соответствии с традиционными протоколами. ИHC-анализ фибриногена также проводили в соответствии с общепринятыми методами.

Гибридизацию *in situ* (ISH) проводили на фиксированных формалином заключенных в парафин тканях, не превышая время фиксации равное 24 часа, с использованием набора для анализа ткани ViewRNA ISH (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом производителя. Зонды, состоящие из Z-образных пар зондов, были синтезированы производителем набора. Зонды, специфичные для кодон-оптимизированных SMN человека, использовали либо отдельно, либо в комбинации с зондами CHAT для резуса или свиньи в качестве маркеров моторных нейронов. Связанные зонды SMN детектировали путем образования преципитатов Fast Red, отображаемых с помощью набора родаминовых фильтров. Зонды CHAT обнаруживали с помощью отложений Fast Blue, визуализированных с помощью специального набора фильтров (AVR Optics, г. Рочестер, штат Нью-Йорк, США), изготовленного в соответствии с

инструкциями производителя набора. Срезы контрастировали с помощью DAPI, чтобы показать ядра.

Продуцирование вектора: Вектор AAVhu68 получали путем тройной трансфекции прикрепленных клеток НЕК293. Вектор очищали от супернатанта клеток с помощью аффинной хроматографии с использованием смолы *POROS™ CaptureSelect™ AAV9* с последующей анионообменной хроматографией для удаления пустых капсидов и других примесей.

Биораспределение вектора: Во время вскрытия ткани замораживали на сухом льду для анализа биораспределения вектора. ДНК выделяли и векторные геномы количественно определяли с помощью TaqMan ПЦР, как описано ранее. См., Wang, L., et al. Impact of pre-existing immunity on gene transfer to nonhuman primate liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Human gene therapy* 22, 1389–1401 (2011).

ELISPOT: выполняли анализ ELISPOT на интерферон гамма, как описано ранее. См., Brantly, M.L., et al. Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16363–16368 (2009). Пептидные библиотеки SMN человека и VP1 AAVhu68 состояли из 15-мерных пептидов, перекрывающихся на 5 аминокислот, разделенных на 2 (SMN) или 3 (AAVhu68) пула.

Все опубликованные документы, процитированные в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки, как и предварительная патентная заявка США № 62/618,437, поданная 17 января 2018 г., предварительная патентная заявка США № 62/515,902, поданная 6 июня 2017 г., и предварительная патентная заявка США № 62/464,756, поданная 28 февраля 2017 г. Аналогичным образом, SEQ ID NO, ссылки на которые приводятся в настоящем документе и которые показаны в прилагаемом перечне последовательностей (файл назван 17-7988PCT_ST25.txt), включены посредством ссылки. Настоящее изобретение было описано со ссылками на конкретные варианты его осуществления, однако следует понимать, что могут быть выполнены модификации без отступления от сути настоящего изобретения. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

(Произвольный текст перечня последовательностей)

Следующая информация предлагается для последовательностей,

содержащих произвольный текст под числовым идентификатором <223>.

SEQ ID NO:	(содержит произвольный текст)	Произвольный текст под <223>
1		<223> сконструированная последовательность, кодирующая вариант D белка SMN человека <220> <221> CDS <222> (1)..(882)
2		<223> Синтетическая конструкция
4		<223> Сконструированный трансен G2 hSMN
5		<223> Сконструированный трансен G3 SMN
6		<223> Сконструированный трансен G4 SMN
7		<223> AAVhu68 vp1 кодирующая последовательность <220> <221> CDS <222> (1)..(2211) <223> AAVhu68 vp1
8		<223> Синтетическая конструкция
9		<223> AAVhu68 гер кодирующая последовательность <220> <221> CDS <222> (1)..(1866)
10		<223> Синтетическая конструкция
15		<223> геном вектора AAV.CB7.CI.hSMN <220>

	<p><221> повторяющийся_участок <222> (1)..(130) <223> AAV2- 5' ITR <220> <221> промотор <222> (197)..(579) <223> CMV IE промотор <220> <221> промотор <222> (582)..(863) <223> CB промотор <220> <221> Интрон <222> (958)..(1930) <223> CMV IE промотор <220> <221> прочий_признак <222> (1948)..(2829) <220> hSMN кодирующая последовательность <221> полиА_сигнал <222> (2914)..(3040) <220> <221> повторяющийся_участок <222> (3129)..(3258) <223> AAV2- 3' ITR</p>
16	<p><223> Кодированная аминокислотная последовательность vp1 AAV9 <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (1)..(137) <223> кодируемый vp1-уникальный участок <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (1)..(736) <223> кодируемая аминокислотная последовательность vp1 <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p>

	<p><222> (138)..(736)</p> <p><223> кодируемая аминокислотная последовательность белка-варианта вр2 альтернативного сплайсинга</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (203)..(736)</p> <p><223> кодируемая аминокислотная последовательность белка-варианта вр3 альтернативного сплайсинга</p>
17	<p><223> Кодируемая аминокислотная последовательность вр1 AAVrh10</p>
18	<p><223> Кодируемая аминокислотная последовательность вр1 AAVhu31</p>
19	<p><223> Кодируемая аминокислотная последовательность вр1 AAVhu32</p>
20	<p><223> AAVhu31 вр1 кодирующая последовательность</p>
21	<p><223> AAVhu32 вр1 кодирующая последовательность</p>
22	<p><223> AAV9 вр1 кодирующая последовательность</p>
23	<p><223> Праймер prn504</p>
24	<p><223> Праймер prn505</p>
25	<p><223> геном вектора AAV.CB7.CI.hSMN</p> <p><220></p> <p><221> повторяющийся_участок</p> <p><222> (1)..(130)</p> <p><223> 5' ITR</p> <p><220></p> <p><221> промотор</p> <p><222> (198)..(579)</p> <p><223> CMV IE промотор</p> <p><220></p> <p><221> промотор</p> <p><222> (582)..(862)</p> <p><223> CB промотор</p> <p><220></p> <p><221> ТАТА_сигнал</p>

	<p><222> (836)..(839) <220> <221> Интрон <222> (956)..(1928) <223> Интрон куриного бета-актина <220> <221> прочий_признак <222> (1946)..(2827) <223> hSMN кодирующая последовательность <220> <221> полиА_сигнал <222> (2912)..(3038) <223> Кроличьего глобина полиА <220> <221> повторяющийся_участок <222> (3127)..(3256) <223> 3' ITR</p>
26	<p><223> модифицированный hu68vr1 <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (23)..(23) <223> Хаа может представлять собой W (Trp, триптофан) или окисленный W. <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (35)..(35) <223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (57)..(57) <223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (66)..(66) <223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p>

<p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (94)..(94)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (97)..(97)</p> <p><223> Хаа может представлять собой D (asp, аспарагиновая кислота) или изомеризованную D.</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (107)..(107)</p> <p><223> Хаа может представлять собой D (asp, аспарагиновая кислота) или изомеризованную D.</p> <p><220></p> <p><221> прочий_признак</p> <p><222> (113)..(113)</p> <p><223> Хаа может представлять собой любую аминокислоту природного происхождения</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (149)..(149)</p> <p><223> Хаа может представлять собой S (Ser, серин) или фосфорилированный S</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (149)..(149)</p> <p><223> Хаа может представлять собой S (Ser, серин) или фосфорилированный S</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (247)..(247)</p> <p><223> Хаа может представлять собой W (Trp, триптофан) или окисленный W (например, кинуренин) .</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p>

	<p><222> (253)..(253)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (259)..(259)</p> <p><223> Хаа представляет собой Q, или Q, дезамидированный до глутаминовой кислоты (альфа-глутаминовая кислота), гамма-глутаминовой кислоты (Glu) или смеси альфа- и гамма-глутаминовой кислоты</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (270)..(270)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (297)..(297)</p> <p><223> Хаа представляет собой D (Asp, аспарагиновую кислоту) или быть аминированным D до N (Asn, аспарагин)</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (304)..(304)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (306)..(306)</p> <p><223> Хаа может представлять собой W (Trp, триптофан) или окисленный W (например, кинуренин).</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (314)..(314)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть</p>
--	---

<p>дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (319)..(319) <223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (329)..(329) <223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (332)..(332) <223> Хаа может представлять собой К (lys, лизин) или ацетилированный К <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (336)..(336) <223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (384)..(384) <223> Хаа может представлять собой D (asp, аспарагиновая кислота) или изомеризованную D. <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (404)..(404) <223> Хаа может представлять собой М (Met, метионин) или окисленный М. <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК <222> (409)..(409) <223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp <220> <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p>
--

<p><222> (436)..(436)</p> <p><223> Хаа может представлять собой М (Met, метионин) или окисленный М.</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (452)..(452)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (477)..(477)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (499)..(499)</p> <p><223> Хаа может представлять собой S (Ser, серин) или фосфорилированный S</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (512)..(512)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (515)..(515)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (518)..(518)</p> <p><223> Хаа может представлять собой М (Met, метионин) или окисленный М.</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (524)..(524)</p> <p><223> Хаа может представлять собой М (Met, метионин) или окисленный М.</p>

<p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (559)..(559)</p> <p><223> Хаа может представлять собой М (Met, метионин) или окисленный М.</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (569)..(569)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Т (Thr, треонин) или фосфорилированный Т</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (586)..(586)</p> <p><223> Хаа может представлять собой S (Ser, серин) или фосфорилированный S</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (599)..(599)</p> <p><223> Хаа представляет собой Q, или Q, дезамидированный до глутаминовой кислоты (альфа-глутаминовая кислота), гамма-глутаминовой кислоты (Glu) или смеси альфа- и гамма-глутаминовой кислоты</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (605)..(605)</p> <p><223> Хаа может представлять собой М (Met, метионин) или окисленный М.</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (619)..(619)</p> <p><223> Хаа может представлять собой W (Trp, триптофан) или окисленный W (например, кинуренин) .</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (628)..(628)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть</p>

<p>дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (640)..(640)</p> <p><223> Хаа может представлять собой М (Met, метионин) или окисленный М.</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (651)..(651)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (663)..(663)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (666)..(666)</p> <p><223> Хаа может представлять собой К (lys, лизин) или ацетилированный К</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (689)..(689)</p> <p><223> Хаа может представлять собой К (lys, лизин) или ацетилированный К</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (693)..(693)</p> <p><223> Хаа может представлять собой К (lys, лизин) или ацетилированный К</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (695)..(695)</p> <p><223> Хаа может представлять собой W (Trp, триптофан) или окисленный W.</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p>

	<p><222> (709)..(709)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (735)..(735)</p> <p><223> Хаа может представлять собой Asn или быть дезамидированным до Asp, isoAsp или Asp/isoAsp</p>
--	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, содержащий капсид AAVhu68 и по меньшей мере одну экспрессионную кассету, причем по меньшей мере одна экспрессионная кассета содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие функциональный белок SMN, и последовательности контроля экспрессии, которые направляют экспрессию последовательностей SMN в клетке-хозяине,

при этом rAAV имеет капсид AAVhu68, содержащий:

гетерогенную популяцию белков vp1 AAVhu68, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 SEQ ID NO: 8, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 7, или белков vp1, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 SEQ ID NO: 8,

гетерогенную популяцию белков vp2 AAVhu68, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из аминокислот примерно от 138 до 736 SEQ ID NO: 8, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере, нуклеотиды от 412 до 2211 SEQ ID NO: 7, или белков vp2, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 по 2211 SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из аминокислот примерно от 138 до 736 SEQ ID NO: 8,

гетерогенную популяцию белков vp3 AAVhu68, выбранных из: vp3, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из аминокислот примерно от 203 до 736 SEQ ID NO: 8, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 607 до 2211 SEQ ID NO: 7, или белков vp3, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 607 по 2211 SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную

последовательность по меньшей мере из аминокислот примерно от 203 до 736 SEQ ID NO: 8.

2. Вектор rAAV по п. 1, в котором кодируемый белок SMN представляет собой белок изоформы D.

3. Вектор rAAV по п. 1 или 2, в котором кодируемый белок SMN изоформы D имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

4. Вектор rAAV по любому из пп. 1-3, в котором последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая изоформу D SMN, выбрана из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 1 или последовательности, обладающей по меньшей мере 70% идентичностью, которая кодирует белок SMN, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

(b) SEQ ID NO: 4;

(c) SEQ ID NO: 5, или

(d) SEQ ID NO: 6.

5. Вектор rAAV по любому из пп. 1-4, в котором последовательности контроля экспрессии содержат промотор.

6. Вектор rAAV по п. 5, в котором промотор представляет собой промотор куриного β -актина (CB).

7. Вектор rAAV по п. 6, в котором промотор представляет собой промотор CB7.

8. Вектор rAAV по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащий один или более из энхансеров, интрона, последовательности Козак, полиА, посттранскрипционного регуляторного элемента.

9. Вектор AAV по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащий последовательности AAV инвертированного концевого повтора (ITR) из AAV, отличного от AAV, обеспечивающего капсид.

10. Вектор AAV по п. 9, в котором ITR взяты из AAV2.

11. Рекомбинантный аденоассоциированный вирусный (rAAV) вектор, содержащий капсид AAV, в который упакован векторный геном, содержащий 5'-ITR AAV, промотор CB7, интрон, последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, полиА и последовательность 3' инвертированного концевого повтора AAV.

12. rAAV по п. 11, в котором векторный геном имеет последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 25.

13. rAAV по п. 11 или 12, в котором AAV имеет капсид AAVhu68, причем капсид AAVhu68 содержит:

гетерогенную популяцию белков vp1 AAVhu68, выбранных из:

белков vp1, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 SEQ ID NO: 8, белков vp1, полученных из SEQ ID NO: 7, или белков vp1, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 SEQ ID NO: 8,

гетерогенную популяцию белков vp2 AAVhu68, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из аминокислот примерно от 138 до 736 SEQ ID NO: 8, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере, нуклеотиды от 412 до 2211 SEQ ID NO: 7, или белков vp2, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 по 2211 SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из аминокислот примерно от 138 до 736 SEQ ID NO: 8,

гетерогенную популяцию белков vp3 AAVhu68, выбранных из: vp3, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из аминокислот примерно от 203 до 736 SEQ ID NO: 8, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 607 до 2211 SEQ ID NO: 7, или белков vp3, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 607 по 2211 SEQ ID NO: 7, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из аминокислот примерно от 203 до 736 SEQ ID NO: 8.

14. rAAV по п. 13, в котором AAVhu68 дополнительно характеризуется наличием валина в положении 157 и, необязательно, глутаминовой кислоты в положении 67.

15. Аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор по любому из пп. 1-14, причем AAV пригоден для лечения у пациента спинальной мышечной атрофии.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент и/или консервант и вектор AAV по

любому из пп. 1-15.

17. Способ лечения у субъекта спинальной мышечной атрофии, причем указанный способ включает введение композиции по п. 16 нуждающемуся в этом субъекту.

18. Способ по п. 17, в котором указанную композицию вводят интратекально.

19. Способ по п. 17 или 18, в котором указанный субъект представляет собой млекопитающее.

20. Способ по любому из пп. 17-19, в котором указанный субъект представляет собой человека.

21. Способ по любому из пп. 17-20, в котором указанную композицию вводят в сочетании с другой терапией.

22. Способ по любому из пп. 17-21, в котором указанную композицию вводят в дозировке от около 1×10^{10} GC/г массы головного мозга до около 3×10^{14} GC/г массы головного мозга.

23. Способ по п. 22, в котором указанную композицию вводят в дозировке около 5×10^{13} GC.

24. Способ по п. 22, в котором указанную композицию вводят в дозировке около $1,85 \times 10^{14}$ GC.

25. Способ по любому из пп. 17-24, в котором указанную композицию вводят более одного раза.

26. rAAV по любому из пп. 1-15 или композиция по п. 16 для применения при лечении спинальной мышечной атрофии, причем указанный способ включает введение композиции по п. 16 нуждающемуся в этом пациенту.

27. rAAV по п. 26, в котором указанный rAAV находится в композиции, составленной для интратекальной доставки.

28. Способ по п. 26 или 27, в котором указанный rAAV вводят совместно в сочетании с другой терапией.

29. rAAV по любому из пп. 26-28, в котором указанный rAAV вводят в дозировке от около 1×10^{10} GC/г массы головного мозга до около 3×10^{14} GC/ г массы головного мозга, или около $1,85 \times 10^{14}$ GC или около 5×10^{13} GC.

30. rAAV по любому из п. 26-29, в котором указанный rAAV суспендируют в водном растворе, имеющем pH от 7,2 до 7,8.

31. Применение rAAV по любому из пп. 1-15 или композиция по п. 16.

32. Применение по п. 31, в котором указанный rAAV находится в композиции, составленной для интратекальной доставки.

33. Применение по п. 31 или 32, в котором указанный rAAV

вводят совместно в сочетании с другой терапией.

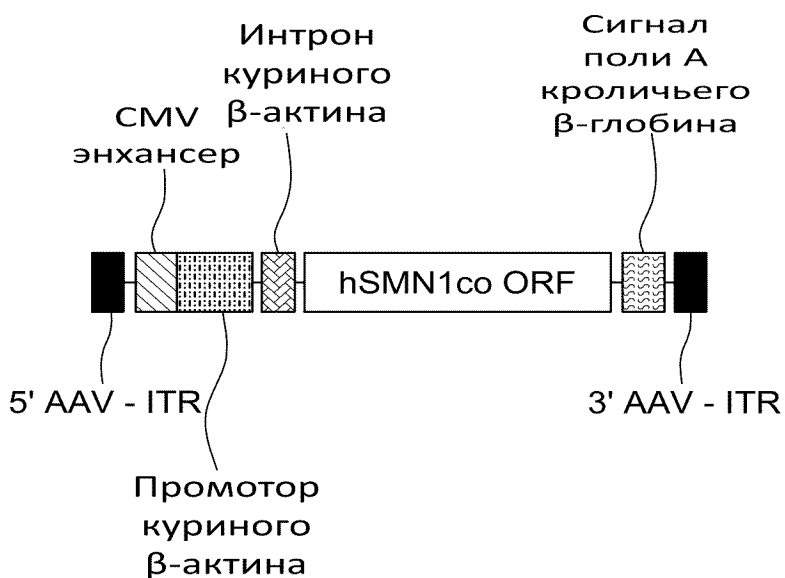
34. Применение по любому из пп. 31-33, в котором указанный rAAV вводят в дозировке от около 1×10^{10} GC/г массы головного мозга до около 3×10^{14} GC/г массы головного мозга, или около $1,85 \times 10^{14}$ GC или около 5×10^{13} GC.

35. Применение по любому из п. 31-34, в котором указанный rAAV суспендируют в водном растворе, имеющем pH от 7,2 до 7,8.

36. Применение по любому из пп. 31-35 для лечения спинальной мышечной атрофии у ребенка возрастом до 18 лет.

37. Применение по любому из пп. 31-35 для лечения спинальной мышечной атрофии у взрослых.

По доверенности



ФИГ. 1А

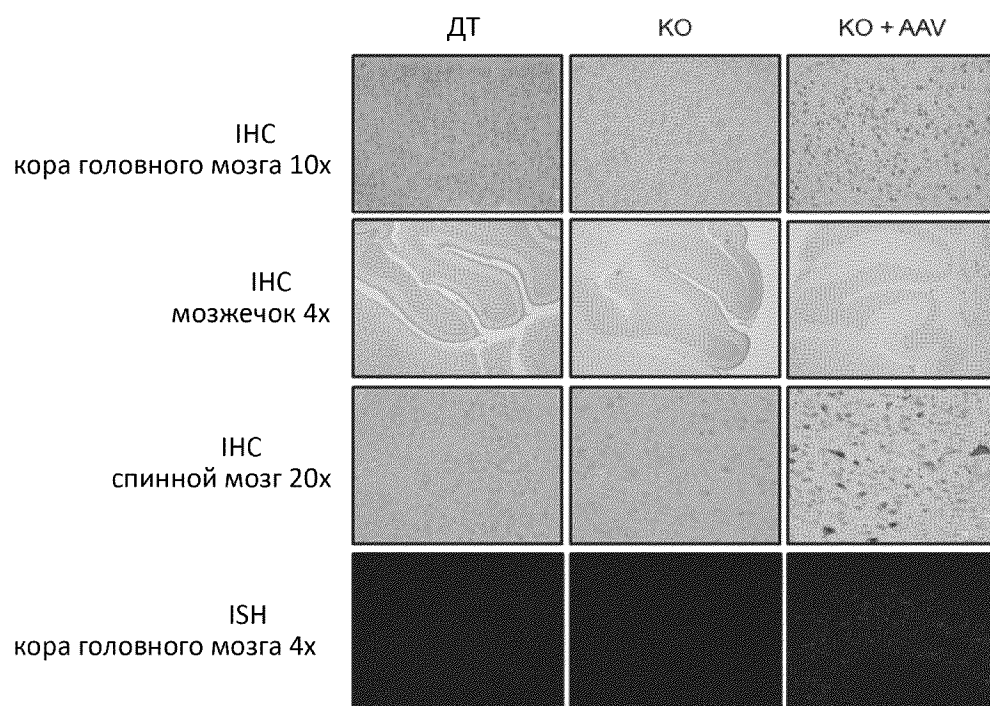
Запрос	1	ATGGCGATGAGCAGCGGCCGCGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTG	60
Объект	1	ATGGCCATGTCTGAGTGGGGGCAGTGGAGGGGGAGTGCCAGAACAGGAAGATTCCGTGCTG	60
Запрос	61	TTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATA	120
Объект	61	TTCAGGCGAGGAACCGGGCAGAGTGACGACAGTGACATTTGGGACGACACGGCCCTGATC	120
Запрос	121	AAAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGT	180
Объект	121	AAGGCCTATGACAAAGCCGTGGCCTCCTTCAAGCACGCGCTGAAGAACGGCGACATTTGC	180
Запрос	181	GAAACTTCGGG taaaccsa aaaaccacacctaaaagaaaacctgctaagaagaataaaagc	240
Объект	181	GAAACCAGCGGCAAGCCTAAGACCACCCCTAAACGGAAGCCCGCCAAGAAAAATAAGTCC	240

ФИГ. 1В

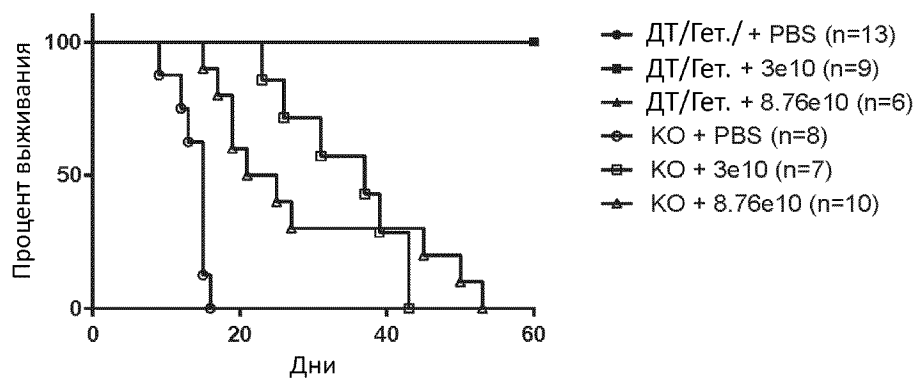
Запрос	241	caaaagaagaa TACTGCAGCTTCCTTACAACAGTGGAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCC	300
Объект	241	CAGAAAAGAACACAGCCGCAAGTCTTCAGCAATGGAAGGTGGGGGATAAGTGCTCCGCG	300
Запрос	301	ATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTTAAGAGA	360
Объект	301	ATATGGAGTGAAGACGGGTGCATCTATCCTGCCACCATCGCCAGCATAGACTTCAAGCGC	360
Запрос	361	GAAACCTGTGTTGTGGTTTACACTGGATATGGAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGAT	420
Объект	361	GAAACCTGCGTGGTGGTGTACACTGGATACGGGAACCGGGAGGAGCAGAACCTGAGCGAC	420
Запрос	421	CTACTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAAAATGCTCAAGAGAATGAA	480
Объект	421	CTGTTGAGCCCTATTTGTGAGGTGGCCAACAACATCGAGCAGAATGCGCAAGAAAATGAA	480
Запрос	481	AATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAATAAATCA	540
Объект	481	AACGAGAGTCAGGTGTCCACCGATGAGAGTGAAAACAGTAGGAGCCCCGGCAACAAATCC	540
Запрос	541	GATAACATCAAGCCCAAATCTGCTCCATGGAAGTCTTTTCTCCCTCCACCACCCCATG	600
Объект	541	GACAATATCAAGCCCAAAGCGCACCCCTGGAATAGCTTCTTCCACCCCCCCCCCAATG	600
Запрос	601	CCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAG	627
Объект	601	CCCGGACCTCGACTGGGCCCGGAAAG	627

ФИГ. 1С

ФИГ. 2



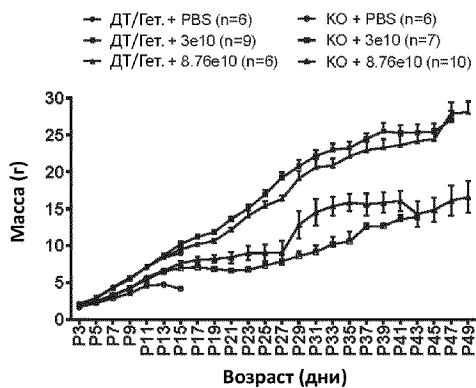
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

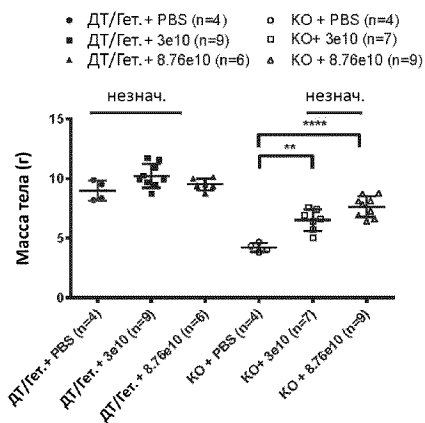
	ГС/детеныш (1,5 г детеныш)	KO + PBS (n=8)	KO + 3e10 (n=7)	KO + 8.76e10 (n=10)
hu68.CB.hSMN	Медиана выживания (день)	15	37	23

ФИГ. 4А



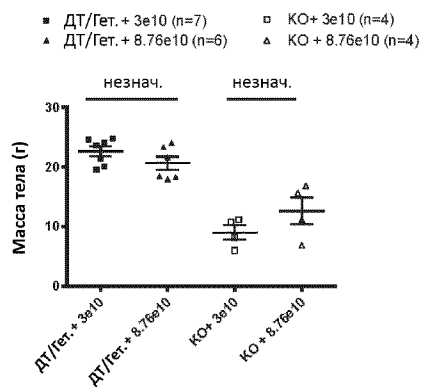
ФИГ. 4В

масса при P15

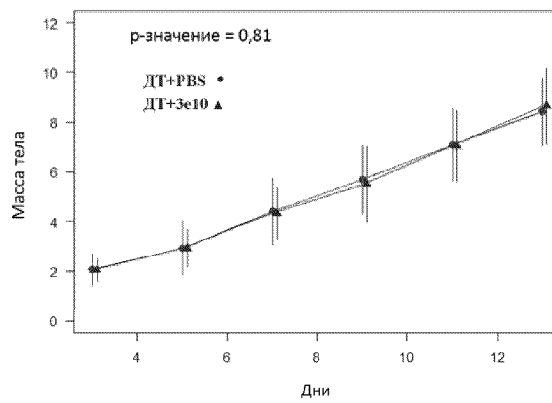


ФИГ. 4С

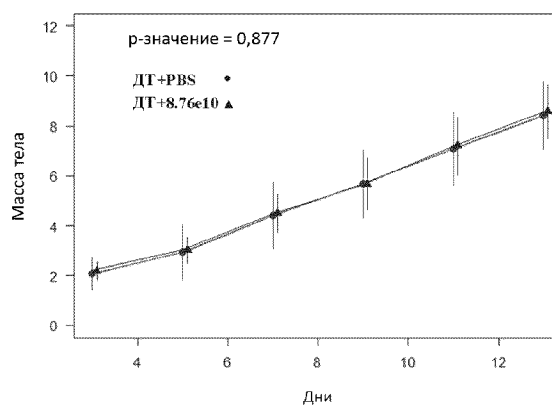
масса при P30



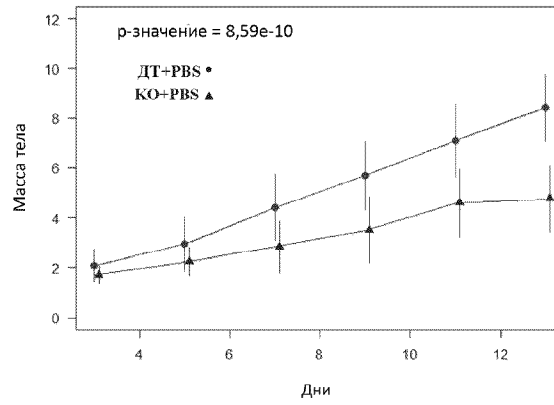
ФИГ. 4D



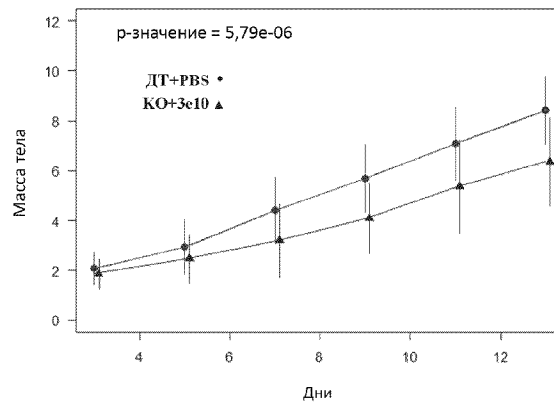
ФИГ. 4E



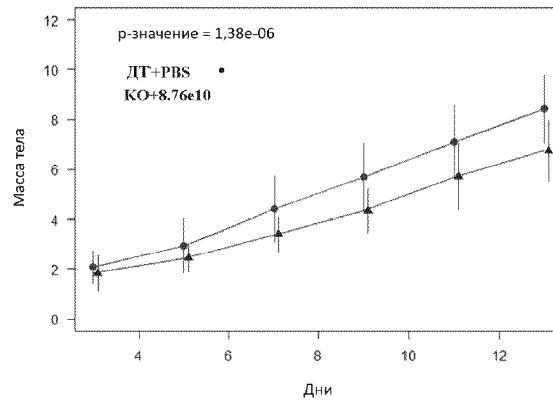
ФИГ. 4F



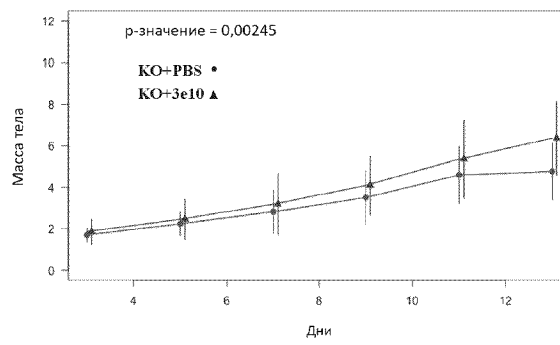
ФИГ. 4G

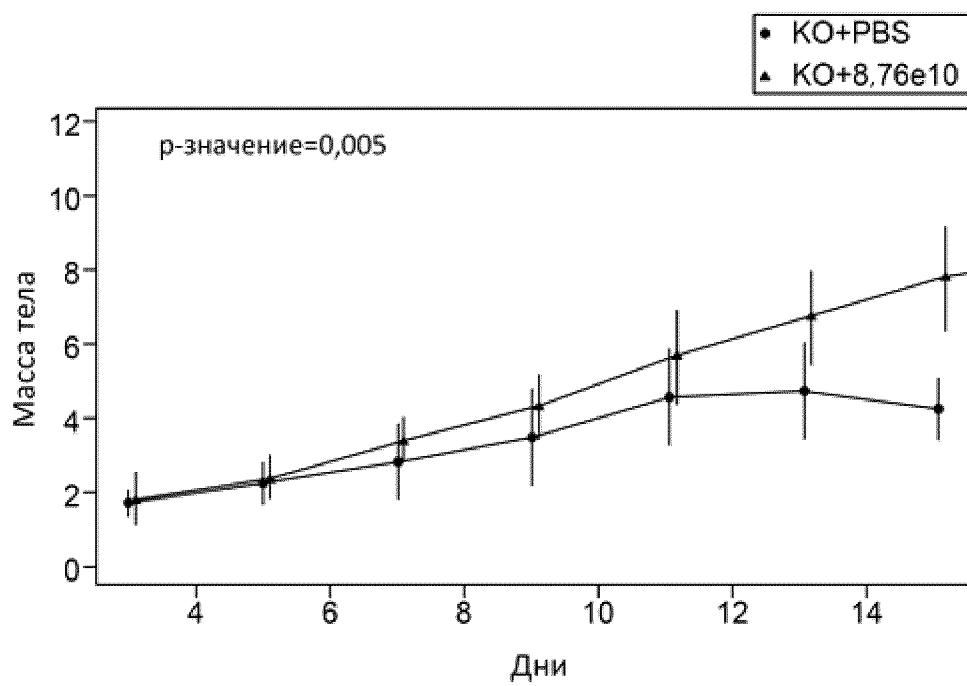


ФИГ. 4Н

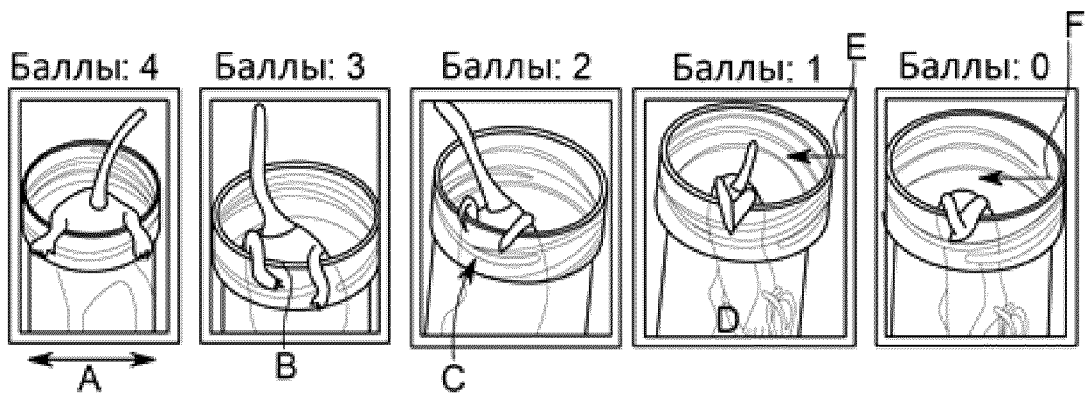


ФИГ. 4I

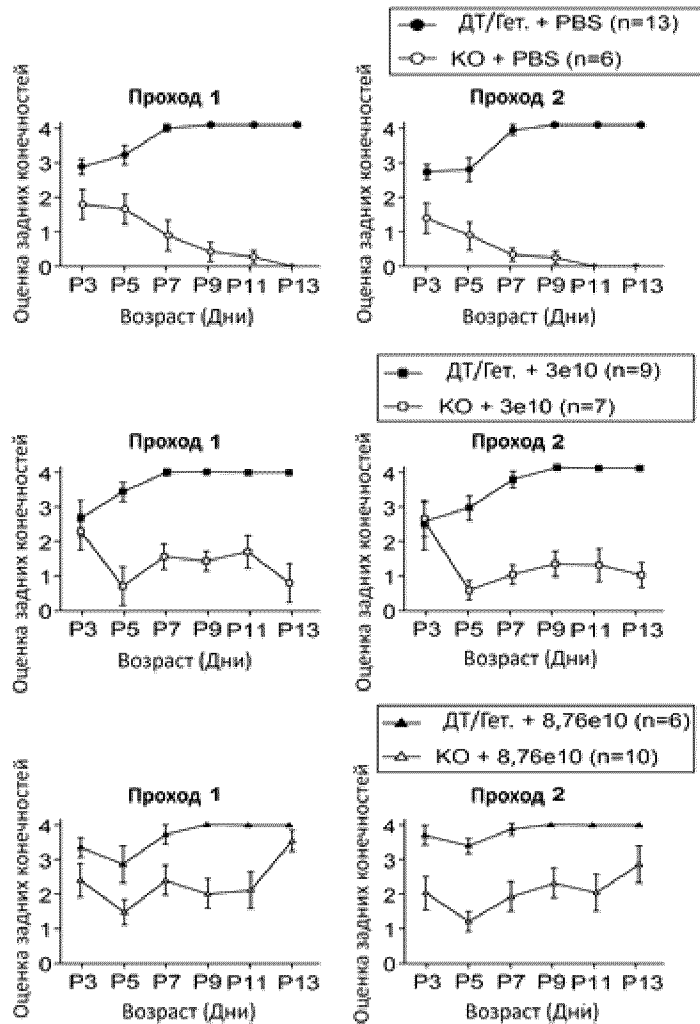




ФИГ. 4J

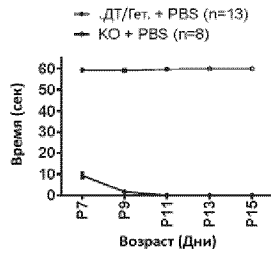


ФИГ. 5А

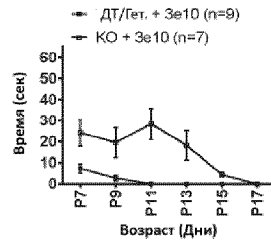


ФИГ. 5В

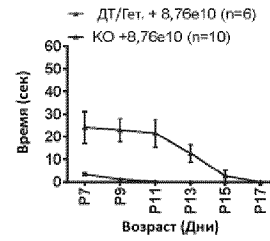
ФИГ. 6А



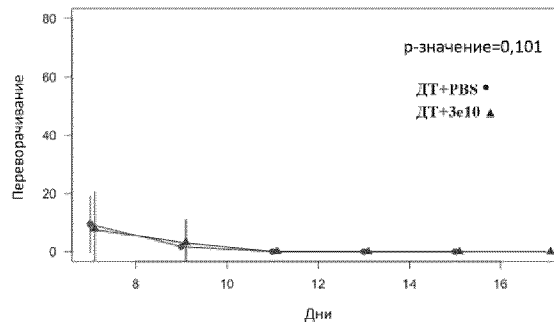
ФИГ. 6В



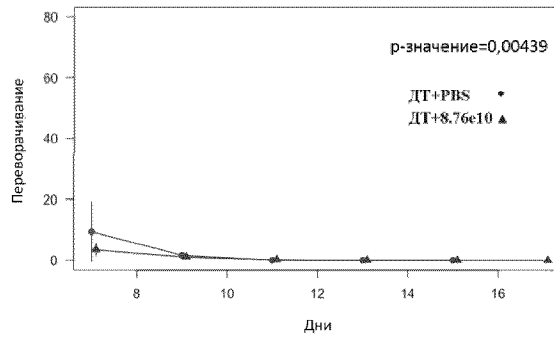
ФИГ. 6С



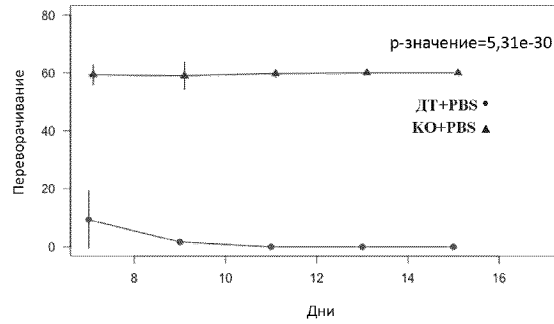
ФИГ. 6D



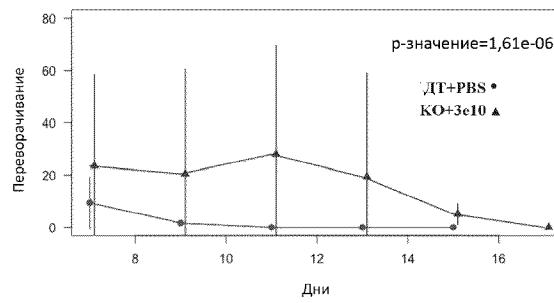
ФИГ. 6Е



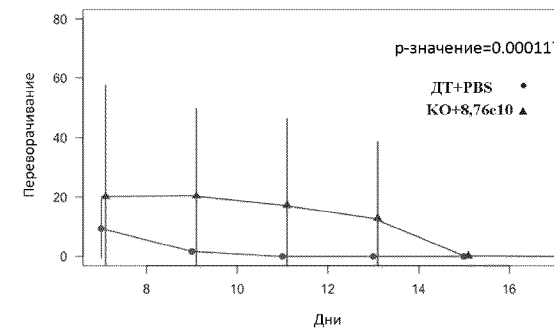
ФИГ. 6F



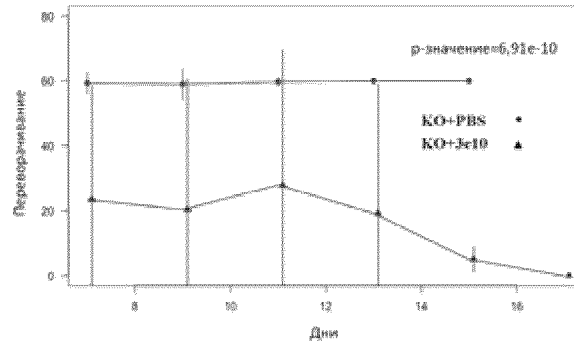
ФИГ. 6G



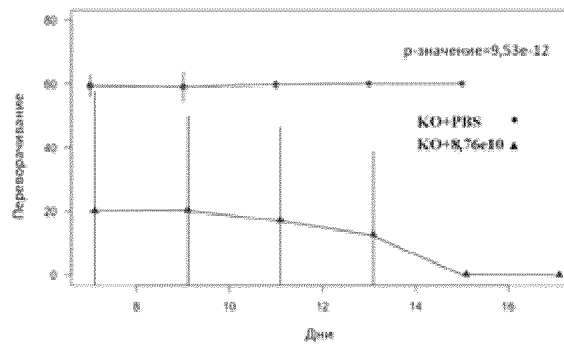
ФИГ. 6H



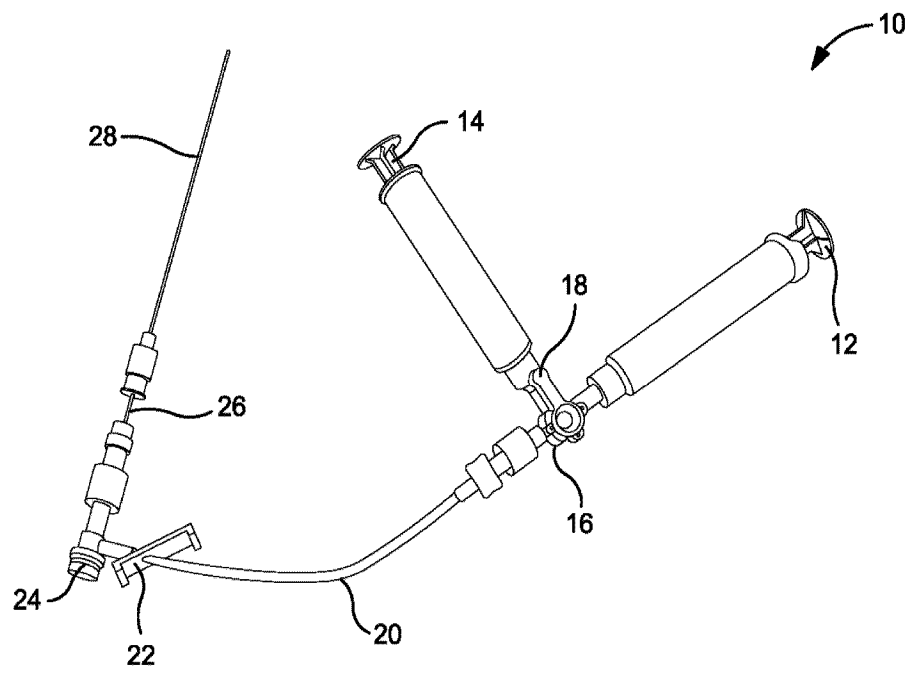
ФИГ. 6I



ФИГ. 6J



ФИГ. 7



		1	100
AAV9	(1)	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWVWALKPAPQPKNQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDKGEVNVADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHDAEF	
hu.68.VP1	(1)	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWVWALKPAPQPKNQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDKGEVNVADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHDAEF	
hu.31	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRBWWKLPKPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPNGLDKGEVNVADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHDAEF	
hu.32	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRBWWKLPKPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPNGLDKGEVNVADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHDAEF	
		101	200
AAV9	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTDTEVSPDPQPIGEPAPAAPSGVGS	
hu.68.VP1	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTDTEVSPDPQPIGEPAPAAPSGVGS	
hu.31	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTDTEVSPDPQPIGEPAPAAPSGVGS	
hu.32	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTDTEVSPDPQPIGEPAPAAPSGVGS	
		201	300
AAV9	(201)	LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVIT TSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR	
hu.68.VP1	(201)	LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVIT TSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR	
hu.31	(201)	LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVIT TSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR	
hu.32	(201)	LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVIT TSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR	
		301	400
AAV9	(301)	LINNNWGF RPKRLNFKL FNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSQYQLPYVLGSAHEGLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGQAVGRSSFYCLEYF	
hu.68.VP1	(301)	LINNNWGF RPKRLNFKL FNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSQYQLPYVLGSAHEGLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGQAVGRSSFYCLEYF	
hu.31	(301)	LINNNWGF RPKRLNFKL FNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSQYQLPYVLGSAHEGLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGQAVGRSSFYCLEYF	
hu.32	(301)	LINNNWGF RPKRLNFKL FNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSQYQLPYVLGSAHEGLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGQAVGRSSFYCLEYF	
		401	500
AAV9	(401)	PSQMLRTGN NFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQRVSTTVTQNNNSE	
hu.68.VP1	(401)	PSQMLRTGN NFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQRVSTTVTQNNNSE	
hu.31	(401)	PSQMLRTGN NFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQRVSTTVTQNNNSE	
hu.32	(401)	PSQMLRTGN NFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQRVSTTVTQNNNSE	
		501	600
AAV9	(501)	FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNDADKVMITNEEIKTTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGQ	
hu.68.VP1	(501)	FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNDADKVMITNEEIKTTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGQ	
hu.31	(501)	FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNDADKVMITNEEIKTTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGQ	
hu.32	(501)	FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNDADKVMITNEEIKTTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGQ	
		601	700
AAV9	(601)	ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQ	
hu.68.VP1	(601)	ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQ	
hu.31	(601)	ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQ	
hu.32	(601)	ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQ	
		701	736
AAV9	(701)	YTSNYYKSNNVEFAVNTTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	
hu.68.VP1	(701)	YTSNYYKSNNVEFAVNTTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	
hu.31	(701)	YTSNYYKSNNVEFAVNTTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	
hu.32	(701)	YTSNYYKSNNVEFAVNTTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	

		1	100
AAV9	(1)	ATGGCTGCCGATGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACAACTCTGTAAGGAATTCGGAGTGGTGGGCTTTGAAACCTGGAGCCCTCAACCAAGG	
hu.68.VP1	(1)	ATGGCTGCCGATGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACAACTCTGTAAGGAATTCGGAGTGGTGGGCTTTGAAACCTGGAGCCCTCAACCAAGG	
hu.31	(1)	ATGGCTGCCGATGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTGTAAGGAATTCGAGTGGTGGAGGCTGAAACCTGGCCGCCCCACCCAAAGG	
hu.32	(1)	ATGGCTGCCGATGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTGTAAGGAATTCGAGTGGTGGAGGCTGAAACCTGGCCGCCCCACCCAAAGG	
		101	200
AAV9	(101)	CAAAATGAAACATCAAGACACCGTCTGGTCTTTGCTTCCGGTTACAATACCTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGTCAACGC	
hu.68.VP1	(101)	CAAAATGAAACATCAAGACACCGTCTGGGCTTTGCTTCCGGTTACAATACCTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGTCAACGC	
hu.31	(101)	CCGCAGAGCGCATGAGGACGACAGGGGCTTTGTCTTCTGGGTACAAGTACCTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGTCAACGC	
hu.32	(101)	CCGCAGAGCGCATGAGGACGACAGGGGCTTTGTCTTCTGGGTACAAGTACCTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGTCAACGC	
		201	300
AAV9	(201)	AGCAGACGGGGCCCTCGAGCAGACAAGGCTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCAACGCCGACGCCGAGTTC	
hu.68.VP1	(201)	AGCAGACGGGGCCCTCGAGCAGACAAGGCTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCAACGCCGACGCCGAGTTC	
hu.31	(201)	AGCAGACGGGGCCCTCGAGCAGACAAGGCTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCAACGCCGACGCCGAGTTC	
hu.32	(201)	AGCAGACGGGGCCCTCGAGCAGACAAGGCTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCAACGCCGACGCCGAGTTC	
		301	400
AAV9	(301)	CAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGCTTTTGGGGCAACCTCGGGGAGCAGTCTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGG	
hu.68.VP1	(301)	CAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGCTTTTGGGGCAACCTCGGGGAGCAGTCTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGG	
hu.31	(301)	CAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGCTTTTGGGGCAACCTCGGGGAGCAGTCTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGG	
hu.32	(301)	CAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGCTTTTGGGGCAACCTCGGGGAGCAGTCTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGG	
		401	500
AAV9	(401)	AAGCGGCTAAGACGGCTCTGGAAGAAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGGGATTTGGCAAAATCGGGTACACAGCCCGC	
hu.68.VP1	(401)	AAGCGGCTAAGACGGCTCTGGAAGAAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGGGATTTGGCAAAATCGGGTACACAGCCCGC	
hu.31	(401)	AAGCGGCTAAGACGGCTCTGGAAGAAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGGGATTTGGCAAAATCGGGTACACAGCCCGC	
hu.32	(401)	AAGCGGCTAAGACGGCTCTGGAAGAAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGGGATTTGGCAAAATCGGGTACACAGCCCGC	
		501	600
AAV9	(501)	TAAAAGAGACTCAATTTGGTCACTGGGACACAGAGTCCCGACCCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGACGCCCTCAGGTGTGGGATCT	
hu.68.VP1	(501)	TAAAAGAGACTCAATTTGGTCACTGGGACACAGAGTCCCGACCCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGACGCCCTCAGGTGTGGGATCT	
hu.31	(501)	TAAAAGAGACTCAATTTGGTCACTGGGACACAGAGTCCCGACCCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGACGCCCTCAGGTGTGGGATCT	
hu.32	(501)	TAAAAGAGACTCAATTTGGTCACTGGGACACAGAGTCCCGACCCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGACGCCCTCAGGTGTGGGATCT	
		601	700
AAV9	(601)	CTTACAATGGCTCAGGTGGTGGCGCACAGTGGCAGACAATAACGAAGTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCCTCGGGAAATGGCAATGGGATCCCAAT	
hu.68.VP1	(601)	CTTACAATGGCTCAGGTGGTGGCGCACAGTGGCAGACAATAACGAAGTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCCTCGGGAAATGGCAATGGGATCCCAAT	
hu.31	(601)	CTTACAATGGCTCAGGTGGTGGCGCACAGTGGCAGACAATAACGAAGTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCCTCGGGAAATGGCAATGGGATCCCAAT	
hu.32	(601)	CTTACAATGGCTCAGGTGGTGGCGCACAGTGGCAGACAATAACGAAGTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCCTCGGGAAATGGCAATGGGATCCCAAT	
		701	800
AAV9	(701)	GGCTGGGGACAGAGTCAACACCAGCACCAGCAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAATCTCCAACAGCACATCTGGAGG	
hu.68.VP1	(701)	GGCTGGGGACAGAGTCAACACCAGCACCAGCAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAATCTCCAACAGCACATCTGGAGG	
hu.31	(701)	GGCTGGGGACAGAGTCAACACCAGCACCAGCAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAATCTCCAACAGCACATCTGGAGG	
hu.32	(701)	GGCTGGGGACAGAGTCAACACCAGCACCAGCAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAATCTCCAACAGCACATCTGGAGG	
		801	900
AAV9	(801)	ATCTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCACCTGCCACTTCTCAACACGTGACTGGCAGCGA	
hu.68.VP1	(801)	ATCTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCACCTGCCACTTCTCAACACGTGACTGGCAGCGA	
hu.31	(801)	ATCTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCACCTGCCACTTCTCAACACGTGACTGGCAGCGA	
hu.32	(801)	ATCTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCACCTGCCACTTCTCAACACGTGACTGGCAGCGA	
		901	1000
AAV9	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGATTCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.68.VP1	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGATTCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.31	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGATTCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.32	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGATTCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	

ФИГ. 8В

		901	1000
AAV9	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.68.VP1	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.31	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.32	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
		1001	1100
AAV9	(1001)	TCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTCCAGGTCTTCACGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTCGGCTCACGAGGGCTGCCTCCCGCCGTT	
hu.68.VP1	(1001)	TCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTCCAGGTCTTCACGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTCGGCTCACGAGGGCTGCCTCCCGCCGTT	
hu.31	(1001)	TCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTCCAGGTCTTCACGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTCGGCTCACGAGGGCTGCCTCCCGCCGTT	
hu.32	(1001)	TCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTCCAGGTCTTCACGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTCGGCTCACGAGGGCTGCCTCCCGCCGTT	
		1101	1200
AAV9	(1101)	CCCAGCGGACGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGTGGGTCGTTTCGTCCTTTTACTGCCTGGAATATTTT	
hu.68.VP1	(1101)	CCCAGCGGACGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGTGGGTCGTTTCGTCCTTTTACTGCCTGGAATATTTT	
hu.31	(1101)	CCCAGCGGACGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGTGGGTCGTTTCGTCCTTTTACTGCCTGGAATATTTT	
hu.32	(1101)	CCCAGCGGACGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGTGGGTCGTTTCGTCCTTTTACTGCCTGGAATATTTT	
		1201	1300
AAV9	(1201)	CCGTCGCAAATGCTAAGAACGGGTAACAACCTCCAGTTCAGCTACGAGTTTGAGAACGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCACAGCCAAAGCCTGGACC	
hu.68.VP1	(1201)	CCGTCGCAAATGCTAAGAACGGGTAACAACCTCCAGTTCAGCTACGAGTTTGAGAACGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCACAGCCAAAGCCTGGACC	
hu.31	(1201)	CCGTCGCAAATGCTAAGAACGGGTAACAACCTCCAGTTCAGCTACGAGTTTGAGAACGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCACAGCCAAAGCCTGGACC	
hu.32	(1201)	CCGTCGCAAATGCTAAGAACGGGTAACAACCTCCAGTTCAGCTACGAGTTTGAGAACGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCACAGCCAAAGCCTGGACC	
		1301	1400
AAV9	(1301)	GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCAAAGACTATTAACGGTTCCTGGACAGAATCAACAAACGCTAAAATTCAGTGTGGCCGG	
hu.68.VP1	(1301)	GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCAAAGACTATTAACGGTTCCTGGACAGAATCAACAAACGCTAAAATTCAGTGTGGCCGG	
hu.31	(1301)	GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCAAAGACTATTAACGGTTCCTGGACAGAATCAACAAACGCTAAAATTCAGTGTGGCCGG	
hu.32	(1301)	GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCAAAGACTATTAACGGTTCCTGGACAGAATCAACAAACGCTAAAATTCAGTGTGGCCGG	





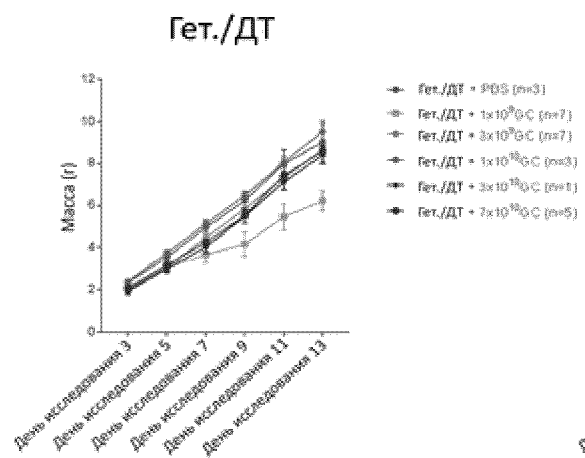
		1401		1500
AAV9	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTGACTCAAAACAACAACAGCGAA		
hu.68.VP1	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTGACTCAAAACAACAACAGCGAA		
hu.31	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTGACTCAAAACAACAACAGCGAA		
hu.32	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTGACTCAAAACAACAACAGCGAA		
		1501		1600
AAV9	(1501)	TTTGCTTGGCCTGGAGCTTCTTCTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAAGGAGAGGACCGTT		
hu.68.VP1	(1501)	TTTGCTTGGCCTGGAGCTTCTTCTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAAGGAGAGGACCGTT		
hu.31	(1501)	TTTGCTTGGCCTGGAGCTTCTTCTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAAGGAGAGGACCGTT		
hu.32	(1501)	TTTGCTTGGCCTGGAGCTTCTTCTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAAGGAGAGGACCGTT		
		1601		1700
AAV9	(1601)	TCTTTCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTTGGCAAACAAGGAACTGGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA		
hu.68.VP1	(1601)	TCTTTCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTTGGCAAACAAGGAACTGGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA		
hu.31	(1601)	TCTTTCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTTGGCAAACAAGGAACTGGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA		
hu.32	(1601)	TCTTTCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTTGGCAAACAAGGAACTGGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA		
		1701		1800
AAV9	(1701)	AACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTCCTATGGACAAGTGGCCACAAACCACCAGAGTGCCCAAGCACAGGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAACCAAGGA		
hu.68.VP1	(1701)	AACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTCCTATGGACAAGTGGCCACAAACCACCAGAGTGCCCAAGCACAGGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAACCAAGGA		
hu.31	(1701)	AACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTCCTATGGACAAGTGGCCACAAACCACCAGAGTGCCCAAGCACAGGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAACCAAGGA		
hu.32	(1701)	AACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTCCTATGGACAAGTGGCCACAAACCACCAGAGTGCCCAAGCACAGGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAACCAAGGA		

ФИГ. 8С-2

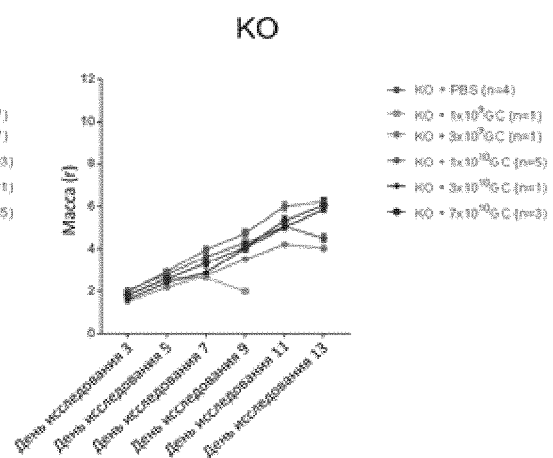
		1801		1900
AAV9	(1801)	ATACTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCAACTTTACCCTTCTCCGC		
hu.68.VP1	(1801)	ATACTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCAACTTTACCCTTCTCCGC		
hu.31	(1801)	ATACTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCAACTTTACCCTTCTCCGC		
hu.32	(1801)	ATACTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCAACTTTACCCTTCTCCGC		
		1901		2000
AAV9	(1901)	TGATGGGAGGGTTTGGAAATGAAGCACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGCTTTCAAAGGACAAGCT		
hu.68.VP1	(1901)	TGATGGGAGGGTTTGGAAATGAAGCACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGCTTTCAAAGGACAAGCT		
hu.31	(1901)	TGATGGGAGGGTTTGGAAATGAAGCACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGCTTTCAAAGGACAAGCT		
hu.32	(1901)	TGATGGGAGGGTTTGGAAATGAAGCACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGCTTTCAAAGGACAAGCT		
		2001		2100
AAV9	(2001)	GAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGCGTGGAGATTGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAG		
hu.68.VP1	(2001)	GAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGCGTGGAGATTGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAG		
hu.31	(2001)	GAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGCGTGGAGATTGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAG		
hu.32	(2001)	GAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGCGTGGAGATTGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAG		
		2101		2200
AAV9	(2101)	TACACTTCCAACCTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTC		
hu.68.VP1	(2101)	TACACTTCCAACCTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTC		
hu.31	(2101)	TACACTTCCAACCTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTC		
hu.32	(2101)	TACACTTCCAACCTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTC		
		2201 2211		
AAV9	(2201)	GTAATCTGTAA		
hu.68.VP1	(2201)	GTAATCTGTAA		
hu.31	(2201)	GTAATCTGTAA		
hu.32	(2201)	GTAATCTGTAA		

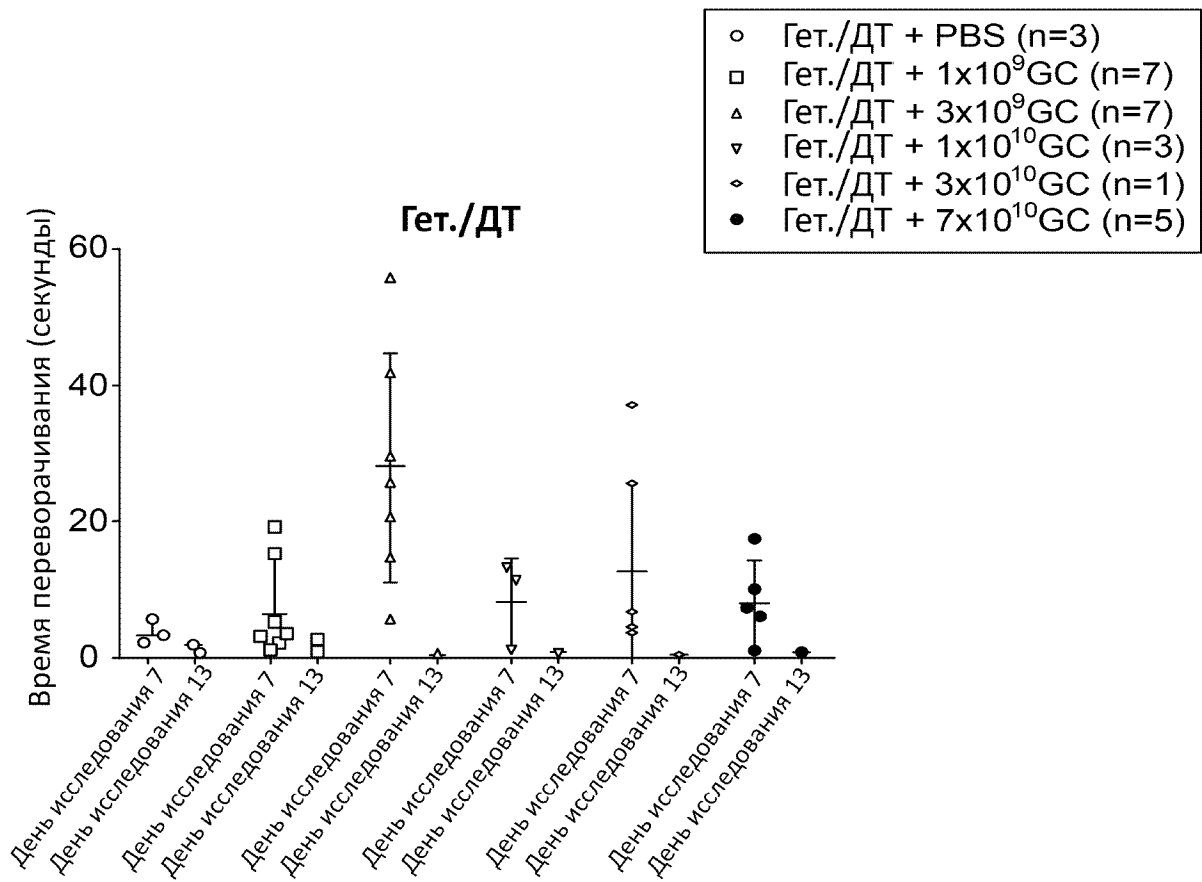
ФИГ. 8D

ФИГ. 9А

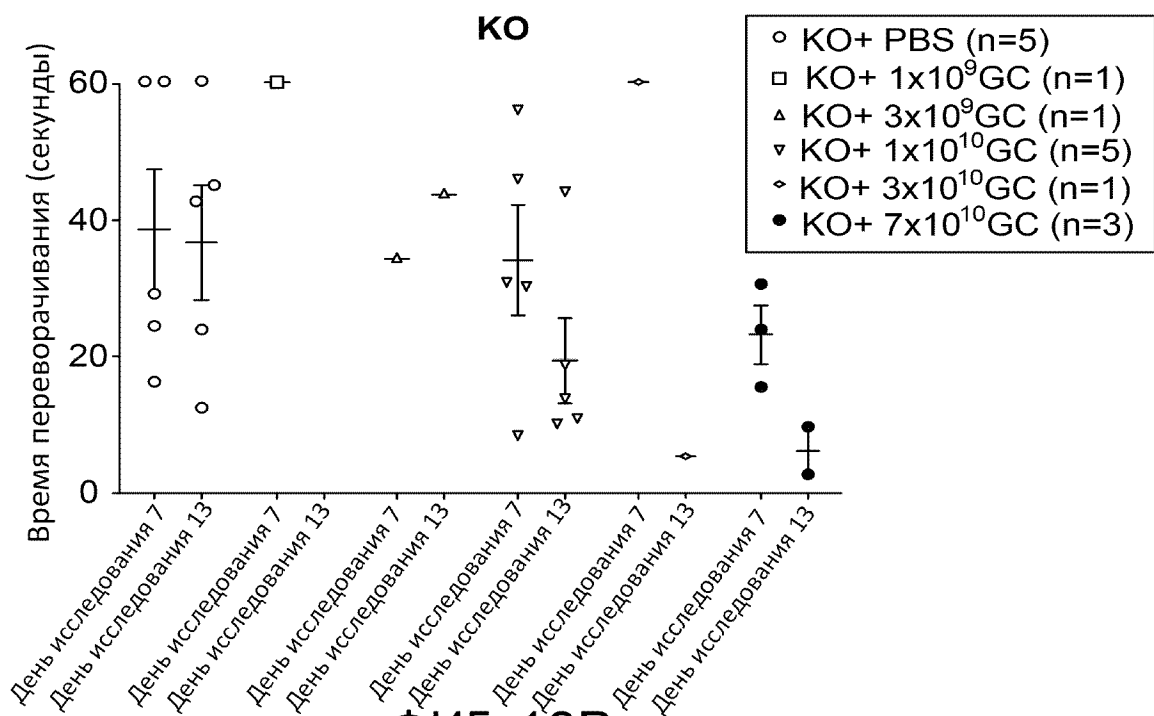


ФИГ. 9В



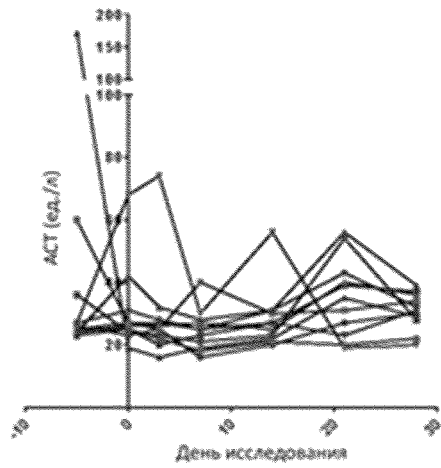


ФИГ. 10А



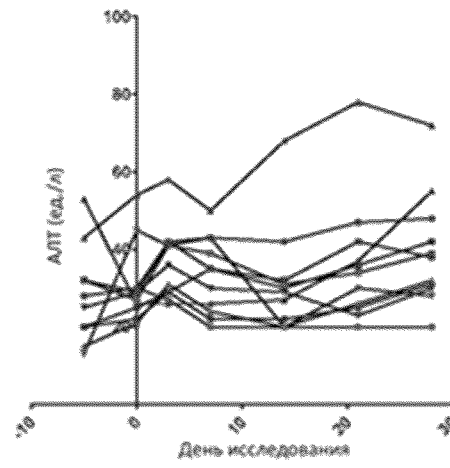
ФИГ. 10В

ФИГ. 11А



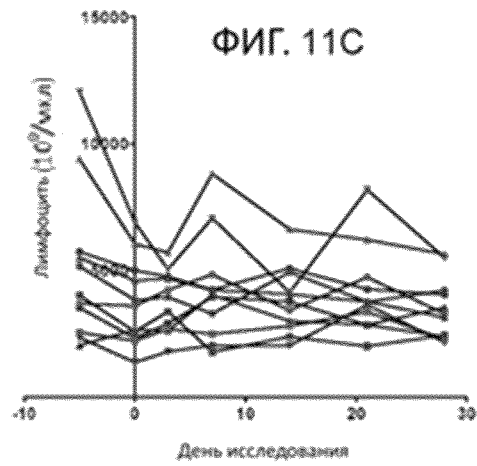
- RA1327
- RA1489
- RA1871
- RA1257
- RA1474
- RA1855
- RA1874
- RA1278
- RA1443
- RA1444
- RA1525

ФИГ. 11В



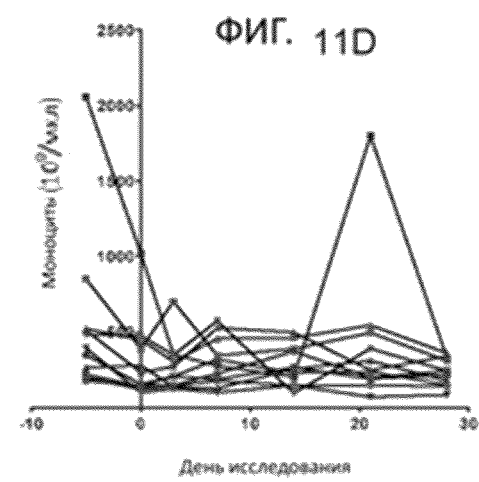
- RA1327
- RA1489
- RA1871
- RA1257
- RA1474
- RA1855
- RA1874
- RA1278
- RA1443
- RA1444
- RA1525

ФИГ. 11С



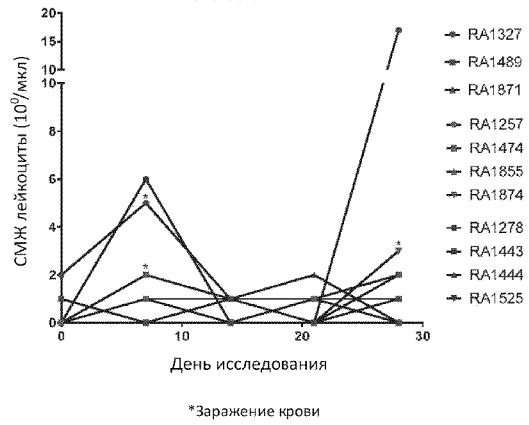
- RA1327
- RA1489
- RA1871
- RA1257
- RA1474
- RA1855
- RA1874
- RA1278
- RA1443
- RA1444
- RA1525

ФИГ. 11D

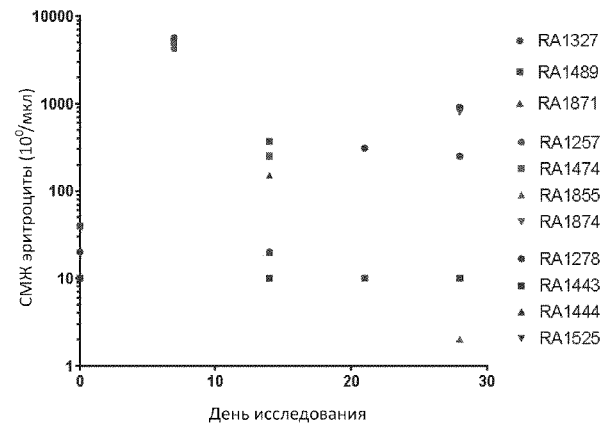


- RA1327
- RA1489
- RA1871
- RA1257
- RA1474
- RA1855
- RA1874
- RA1278
- RA1443
- RA1444
- RA1525

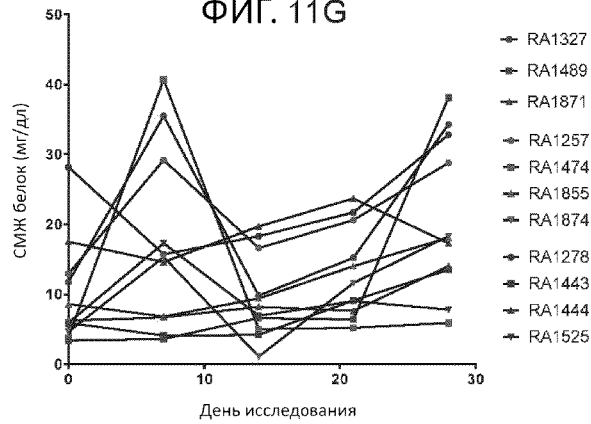
ФИГ. 11Е



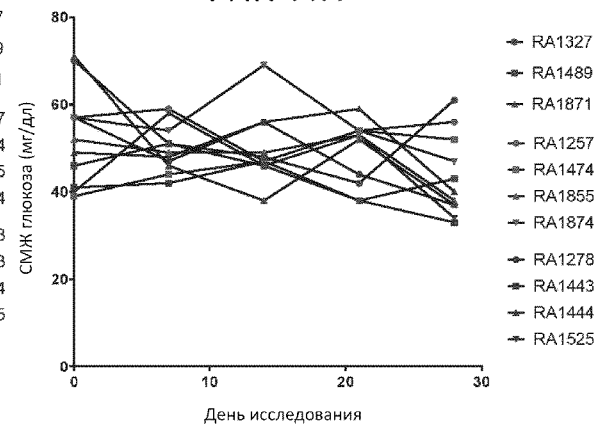
ФИГ. 11F

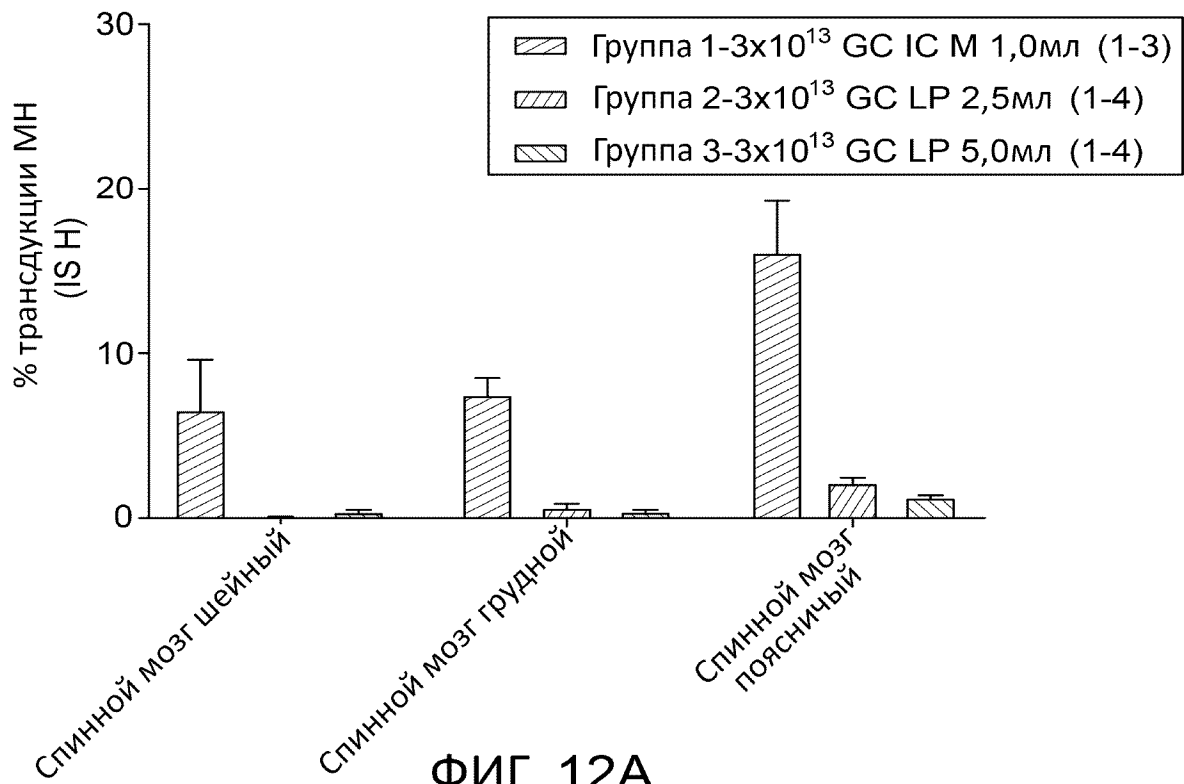


ФИГ. 11G

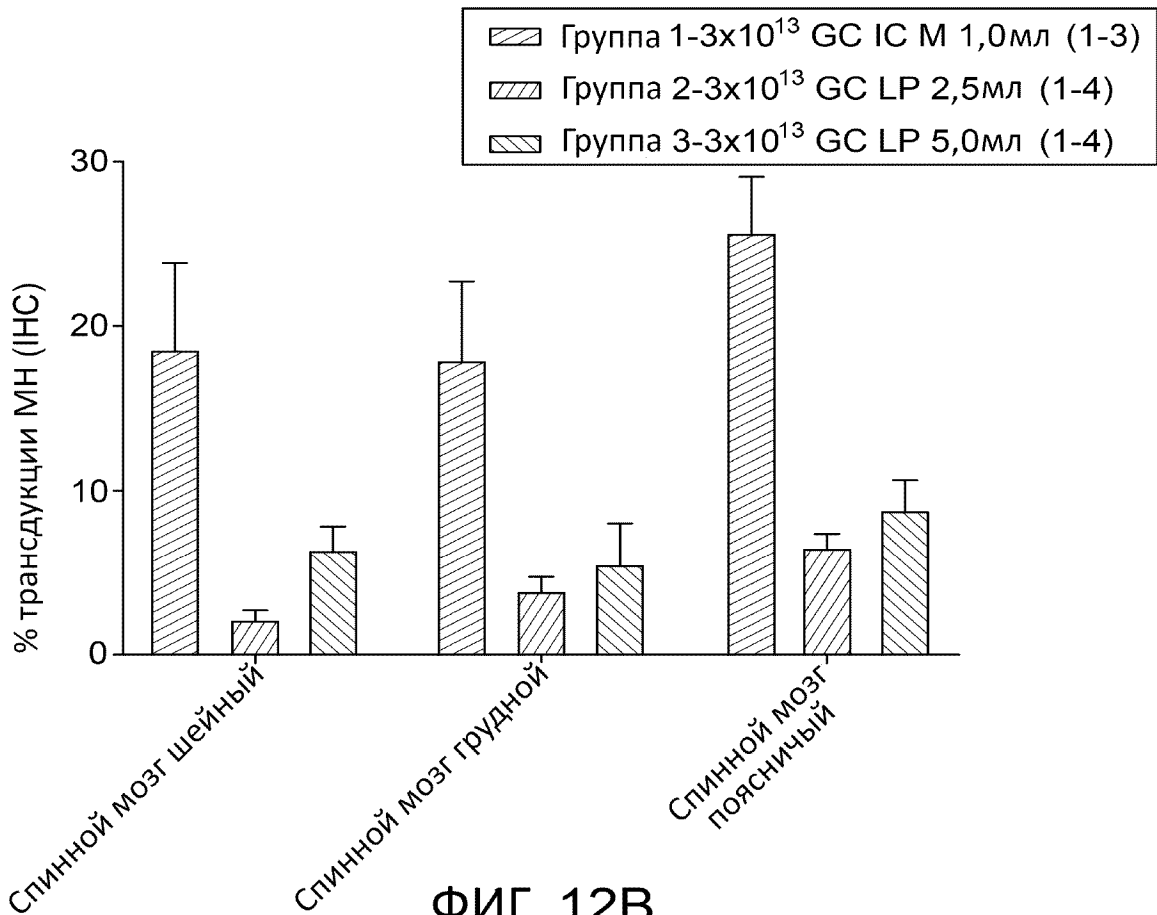


ФИГ. 11H

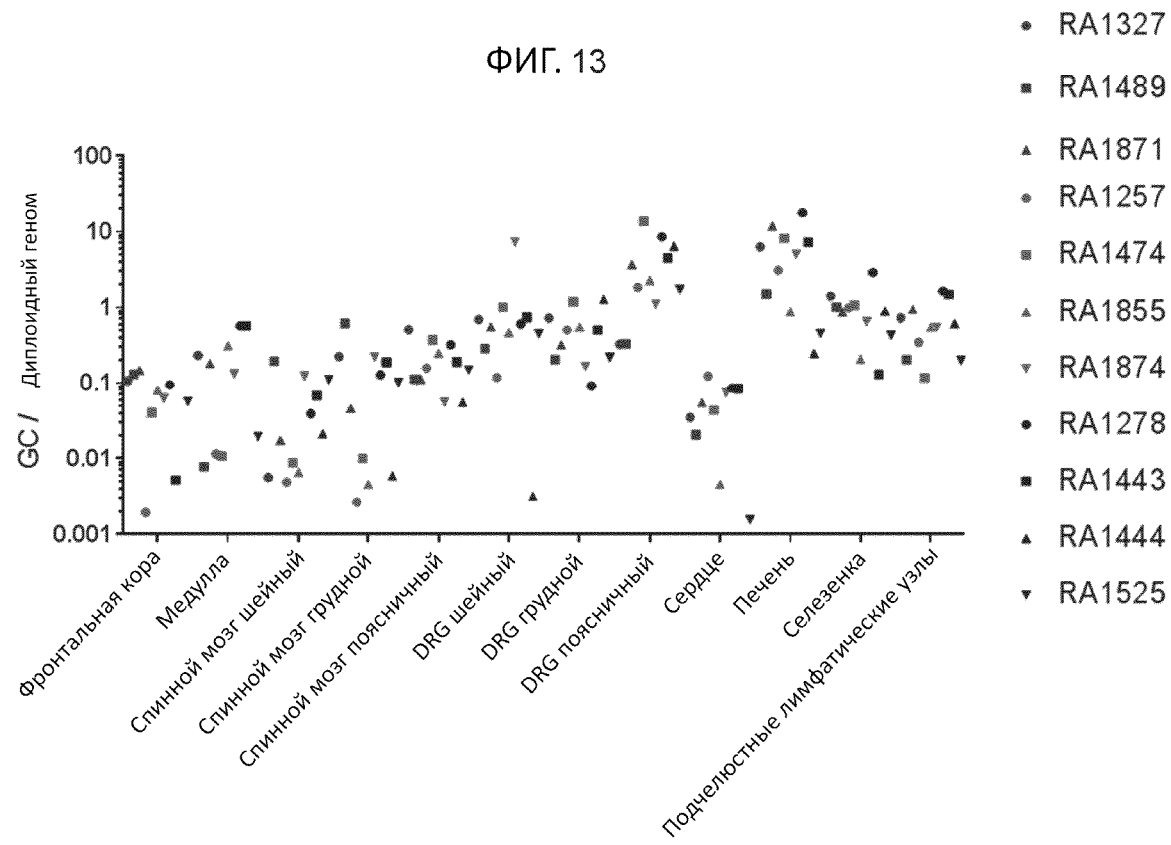


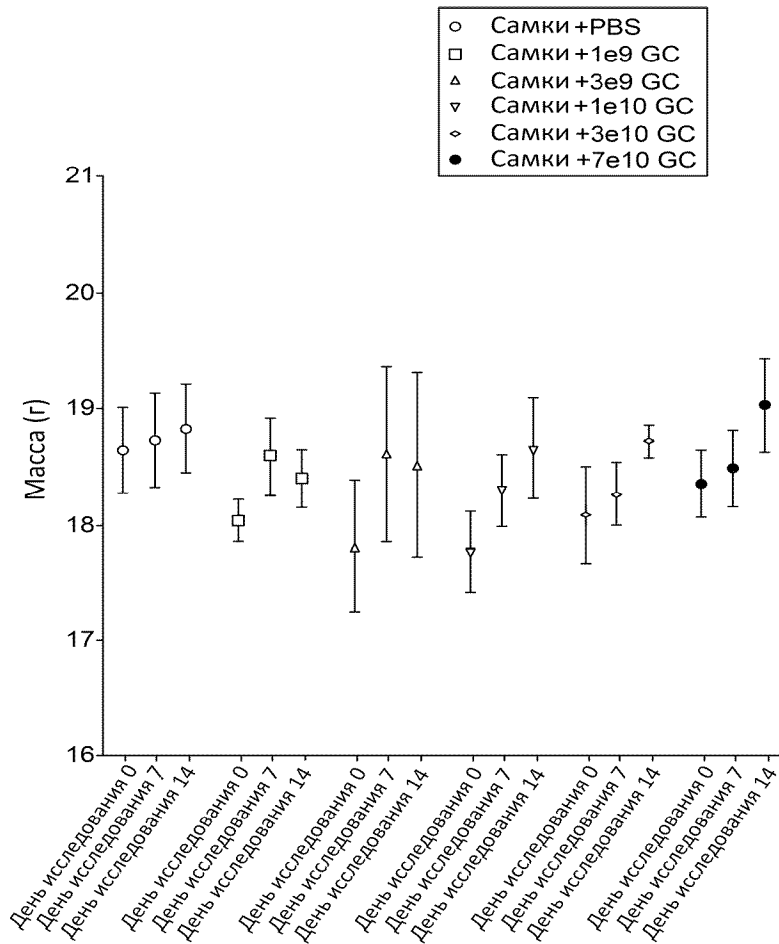


ФИГ. 12А

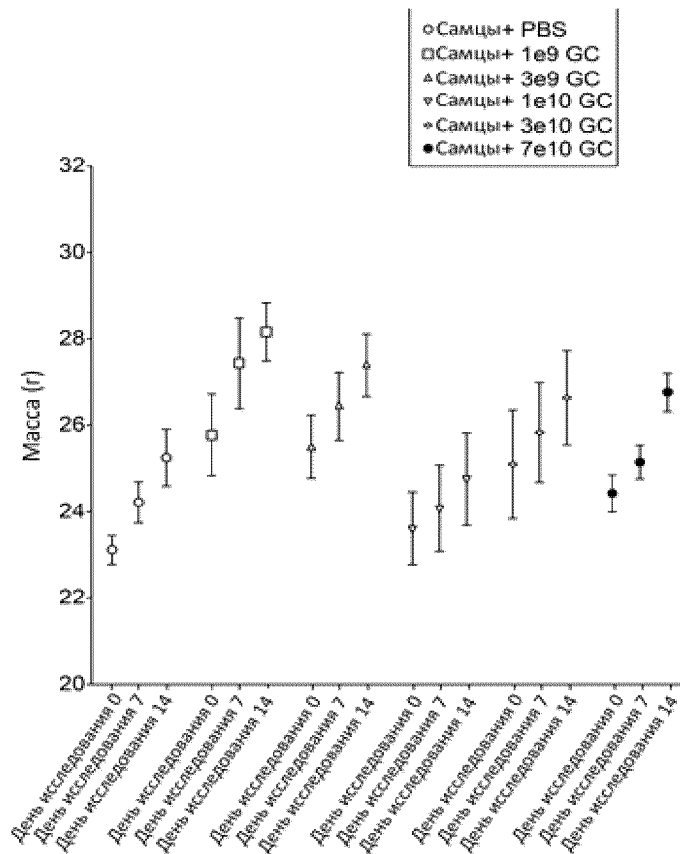


ФИГ. 12В





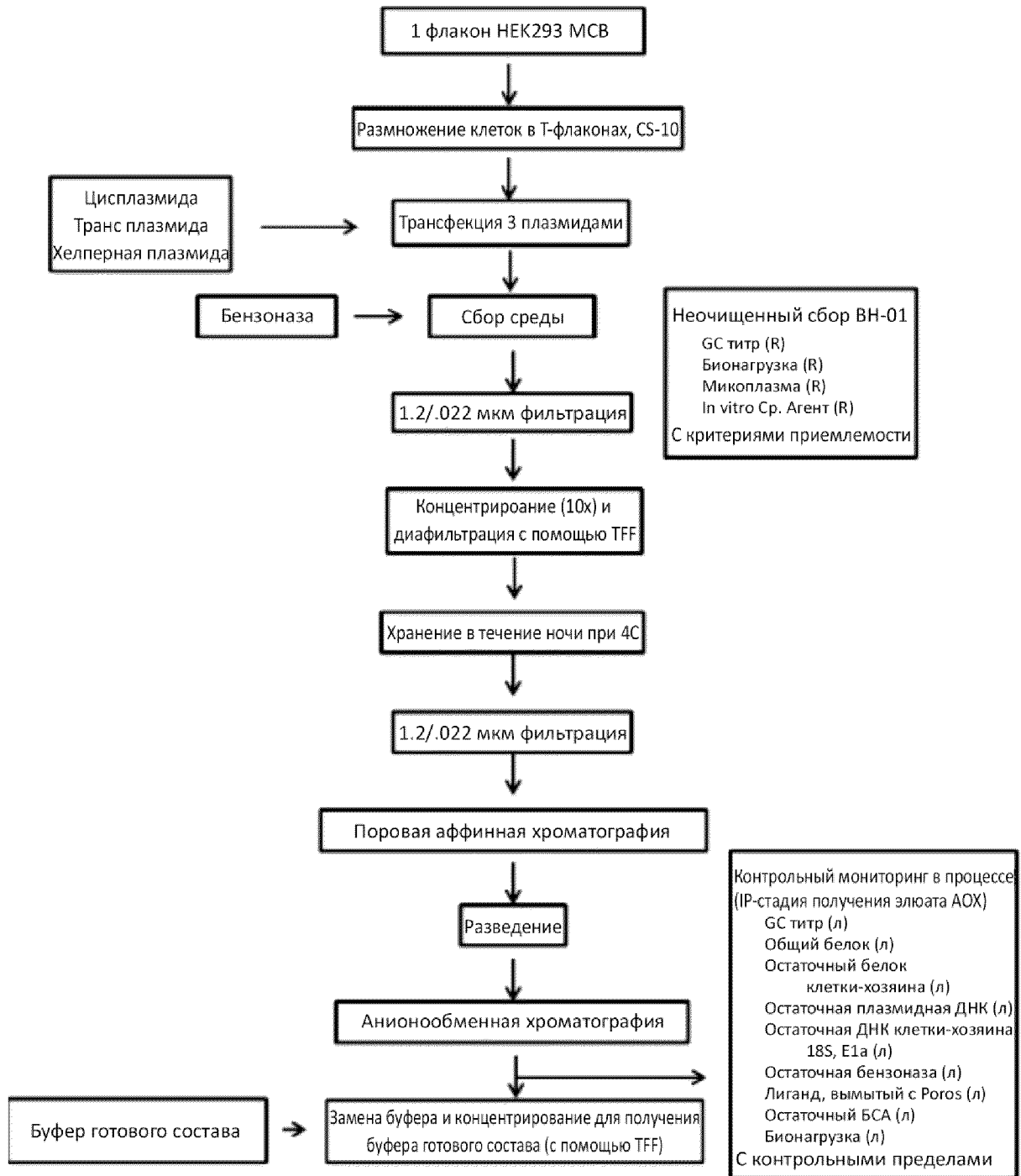
ФИГ. 14А

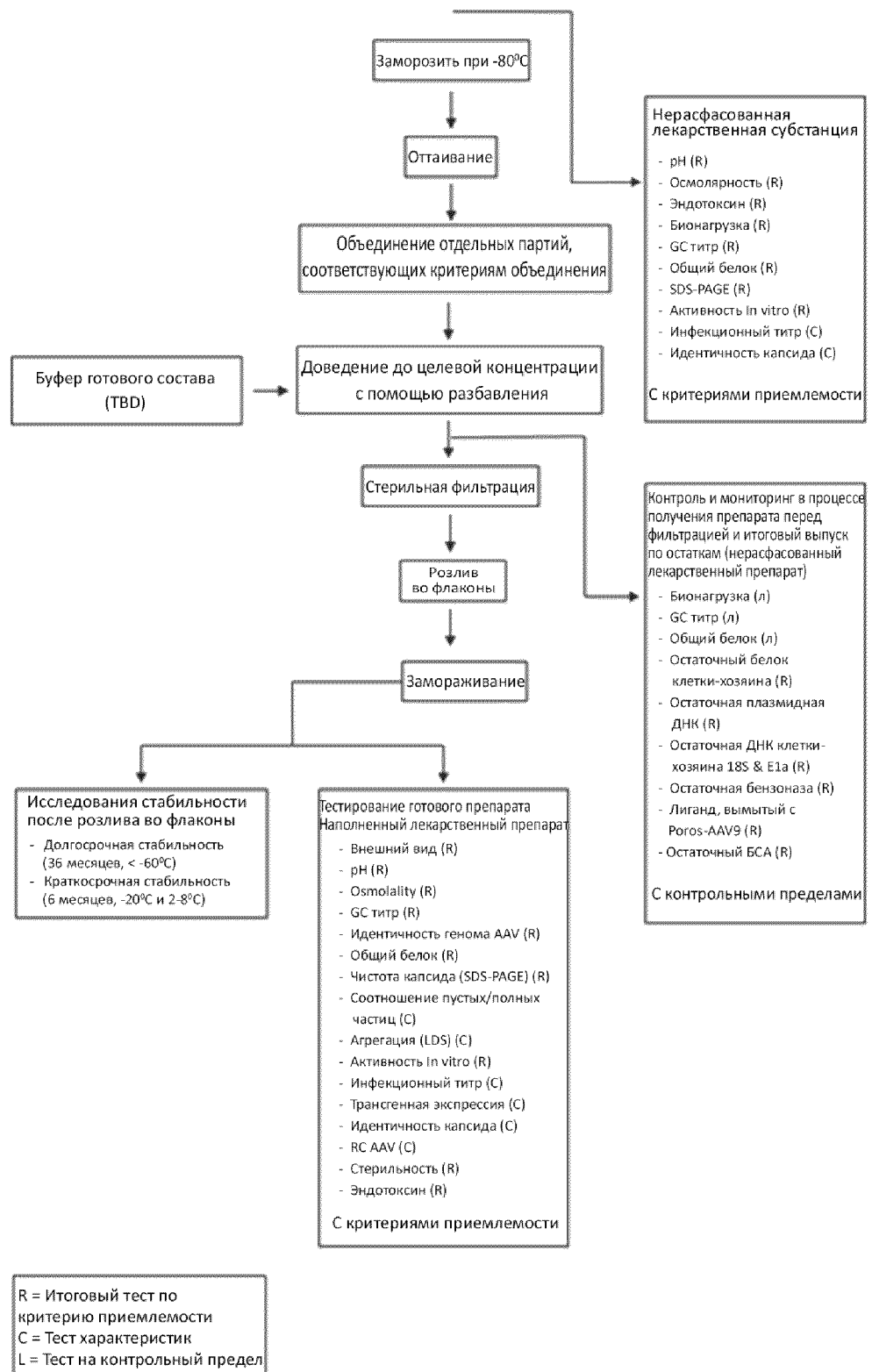


ФИГ. 14В

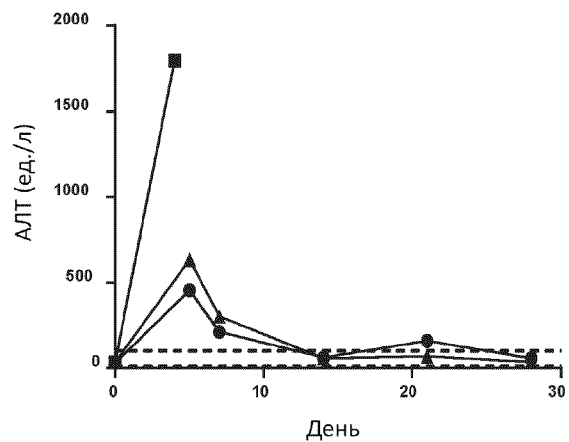
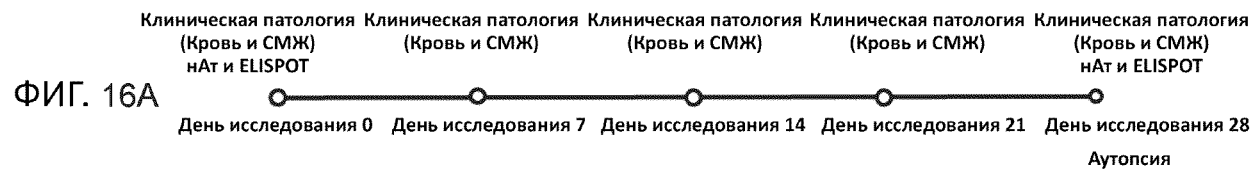
27/37

ФИГ. 15А

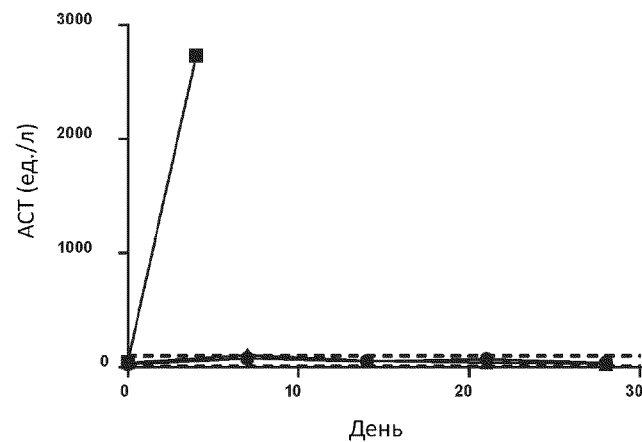




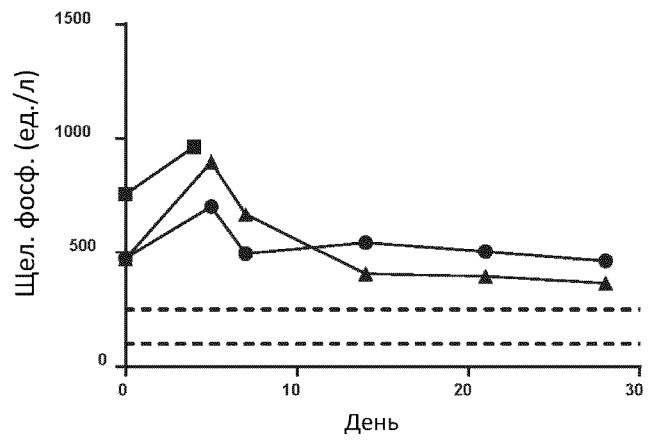
ФИГ. 15В



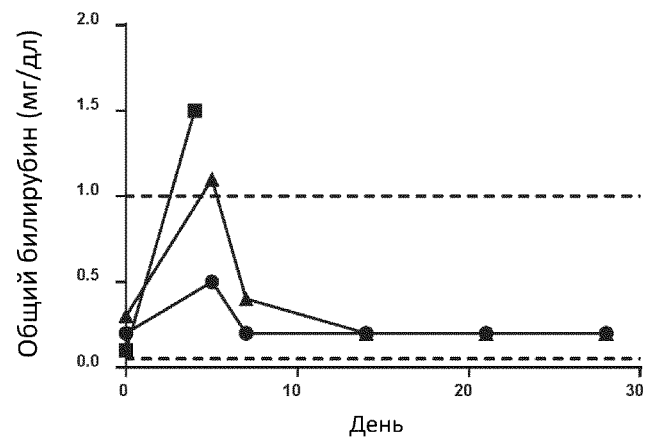
Фиг. 16В



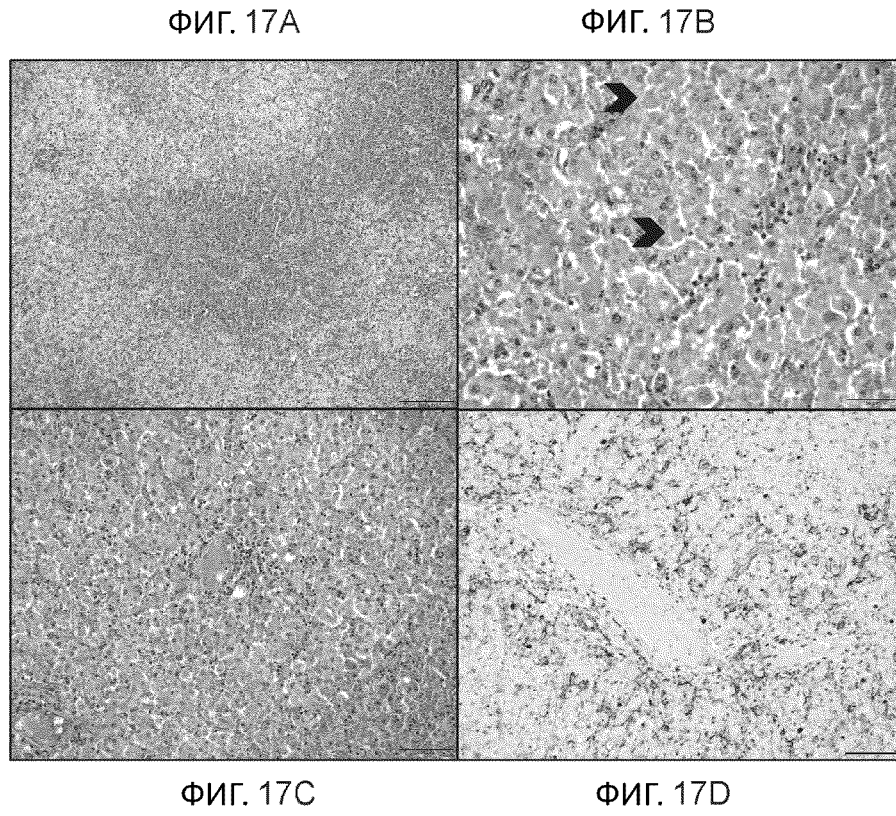
Фиг. 16С



ФИГ. 16D

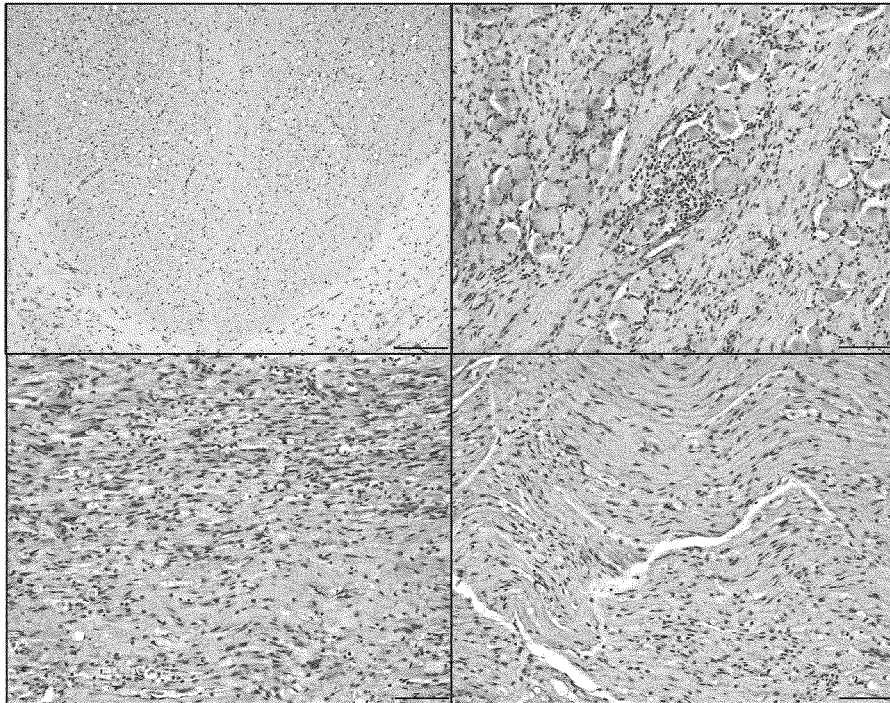


ФИГ. 16E



ФИГ. 18А

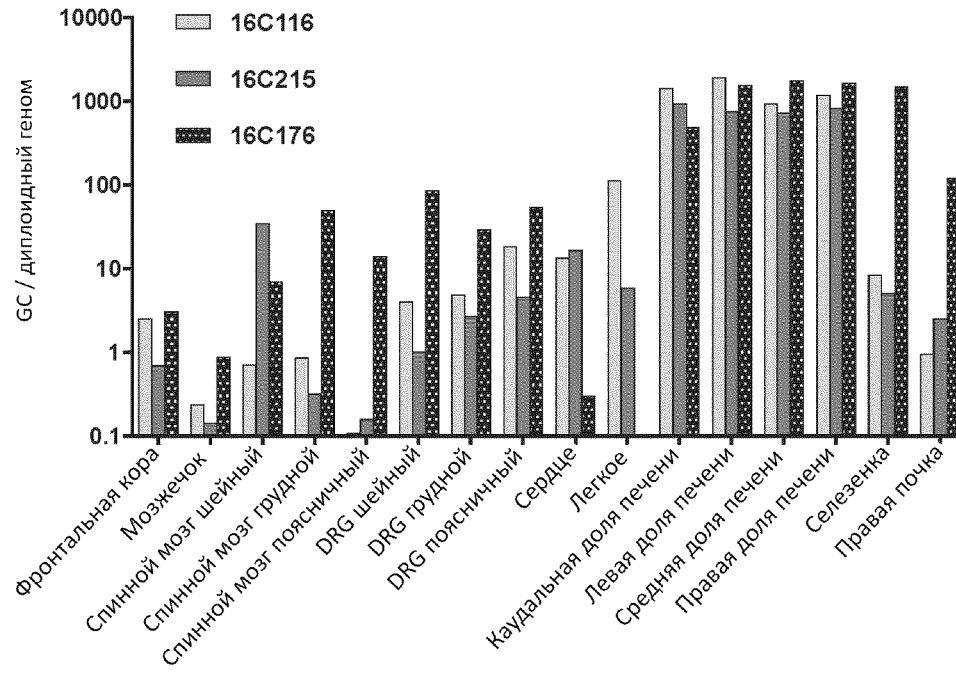
ФИГ. 18В

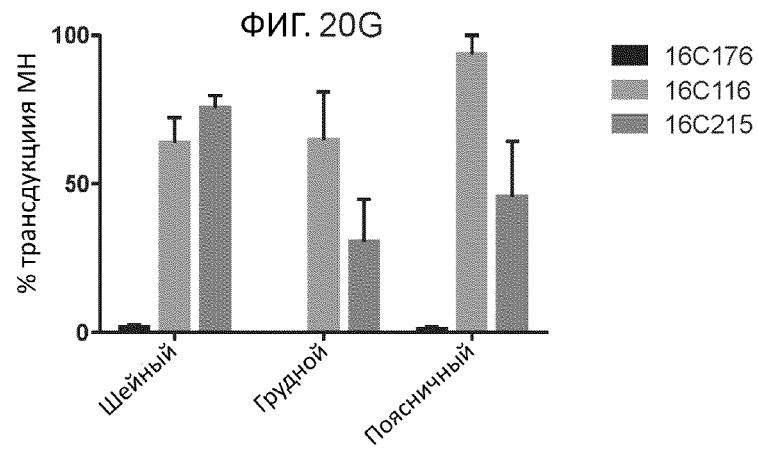
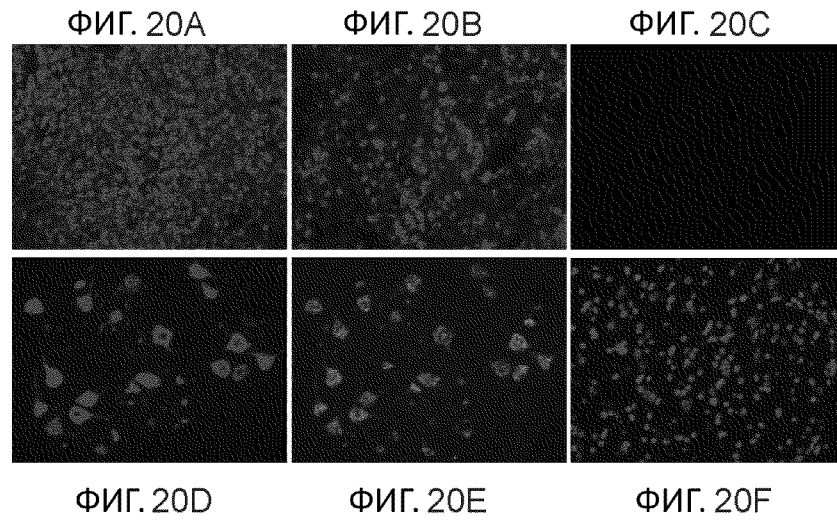


ФИГ. 18С

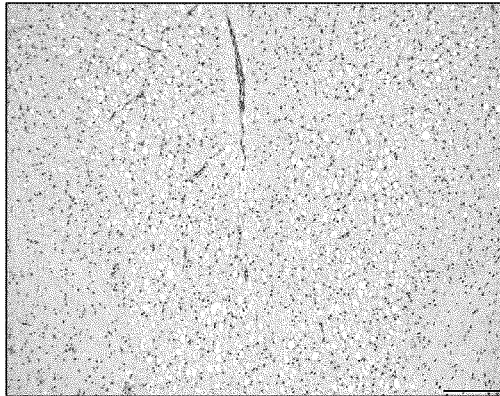
ФИГ. 18Д

ФИГ. 19

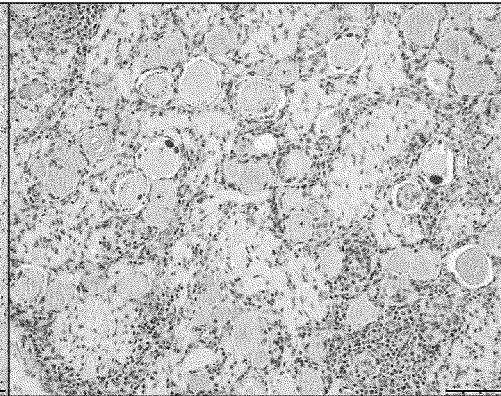




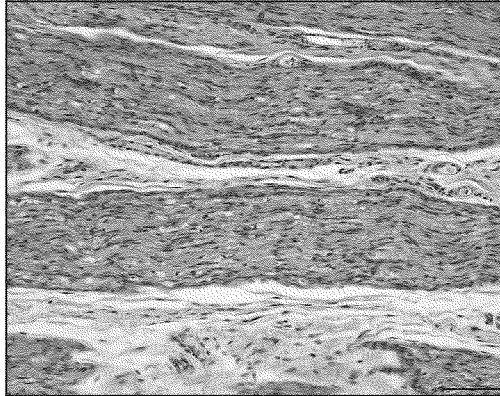
ФИГ. 21А



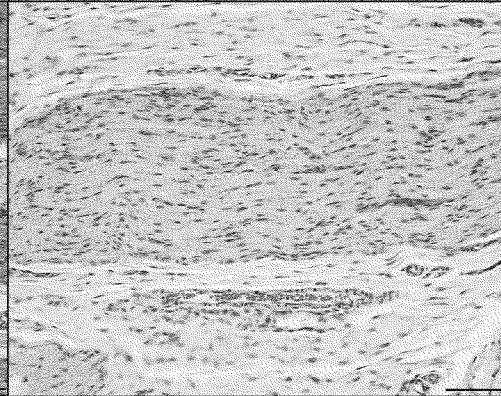
ФИГ. 21В



ФИГ. 21С



ФИГ. 21D



ФИГ. 22

