

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091352** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.27

(22) Дата подачи заявки
2018.11.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) ГЕНОТЕРАПИЯ МУКОПОЛИСАХАРИДОЗА IIIВ

(31) 62/593,090

(32) 2017.11.30

(33) US

(86) PCT/US2018/063166

(87) WO 2019/108856 2019.06.06

(71) Заявитель:
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Изобретатель:
Уилсон Джеймс М., Хиндерер
Кристиан, Ордо Жюльетт (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В данной заявке предложен рекомбинантный AAV (rAAV), содержащий капсид AAV и упакованный в нем геном вектора, где геном вектора содержит AAV 5' инвертированный концевой повтор (ITR), полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную человеческую N-ацетил-альфа-глюкозаминидазу (hNAGLU), регуляторную последовательность, которая направляет экспрессию hNAGLU в клетке-мишени, и AAV 3' ITR. Также представлена фармацевтическая композиция, содержащая rAAV согласно настоящему описанию в буферной смеси, и способ лечения человеческого субъекта, у которого диагностирован MPS IIIВ.

A1

202091352

202091352

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563312EA/025

ГЕНОТЕРАПИЯ МУКОПОЛИСАХАРИДОЗА MPS III

ВКЛЮЧЕНИЕ ПО ССЫЛКЕ МАТЕРИАЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОЙ ФОРМЕ

Заявитель настоящим включает посредством ссылки материал Перечня последовательностей, представленный в электронной форме. Этот файл имеет название "I8-8482PCT_ST25.txt".

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Мукополисахаридоз типа MPS III (MPS III или синдром Санфилиппо типа В, болезнь Санфилиппо типа В) является аутосомно-рецессивным наследственным заболеванием, вызванным дефицитом фермента N-ацетил-альфа-D-глюкозаминидазы (NAGLU), участвующего в лизосомном катаболизме гепарансульфатных гликозаминогликанов (GAG). Этот дефицит приводит к внутриклеточному накоплению нерасщепленного гепарансульфата, а также ганглиозидов GM2 и GM3 в центральной нервной системе, вызывая дисфункцию нейронов и нейровоспаление.

MPS III представляет собой нейродегенеративное расстройство, характеризующееся начальным бессимптомным периодом, за которым следует прогрессирующее снижение интеллектуальных функций, в конечном итоге приводящее к тяжелой деменции. Серьезные поведенческие проблемы являются преобладающим симптомом у большинства пациентов, характеризующимся в основном чрезвычайно гиперактивным поведением. Другие симптомы включают проблемы со сном, рецидивирующую диарею, частые инфекции уха, горла и носа, нарушения слуха и зрения и эпилепсию. Пациенты обычно умирают в конце второго или в начале третьего десятилетия жизни, хотя для пациентов с аттенуированной (ослабленной) формой MPS III сообщается о более длительной продолжительности жизни.

Для MPS III не существует специального лечения. Клиническое ведение пациентов с MPS III в настоящее время все еще состоит в основном из поддерживающей терапии, направленной на облегчение симптомов и профилактику осложнений. Лекарства используют для ослабления симптомов (например, противосудорожные препараты при судорогах) и улучшения качества жизни. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, такая как трансплантация костного мозга или трансплантация пуповинной крови, по-видимому, значительно не уменьшает нейропсихологическое истощение. Ферментозаместительная терапия (ERT) для MPS III посредством внутривенного введения и интрацеребровентрикулярной инфузии показывает повышенную активность фермента NAGLU в мышечной модели и в настоящее время изучается в клинических испытаниях на пациентах с MPS III. Вместе с тем, ERT требует многократного введения, значительно влияет на качество жизни пациента и требует больших затрат. См., например, Aoyagi-Scharber M et al, Clearance of Heparan Sulfate and Attenuation of CNS Pathology by Intracerebroventricular BMN 250 in Sanfilippo Type B Mice, Mol Ther Methods Clin Dev. 2017

Jun 6;6:43-53. doi: 10.1016/j.omtm.2017.05.009. eCollection 2017 Sep 15; и WO2017132675A1.

В данной области техники существует потребность в композициях и способах для эффективного лечения MPS IIIВ.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте в данной заявке предложен вектор, содержащий полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную человеческую N-ацетил-альфа-глюкозаминидазу (hNAGLU), и регуляторную последовательность, которая направляет ее экспрессию в клетке-мишени. В одном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU представляет собой SEQ ID NO: 1.

В другом аспекте предложен рекомбинантный вектор AAV (rAAV), содержащий капсид AAV и упакованный в нем геном вектора, где геном вектора содержит 5' инвертированный концевой повтор AAV (ITR), полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную hNAGLU, регуляторную последовательность, которая направляет экспрессию hNAGLU в клетке-мишени, и AAV 3' ITR. В одном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU представляет собой SEQ ID NO: 1. В еще одном дополнительном варианте воплощения изобретения геном вектора AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 4 (AAV.CB7.CI.hNAGLUco.rBG). В некоторых вариантах воплощения изобретения капсид AAV представляет собой капсид AAV9. В одном варианте воплощения изобретения rAAV (AAV9.CB7.CI.hNAGLUco.rBG) содержит капсид AAV9 и геном вектора, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4.

В еще одном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая rAAV в буферной смеси, где rAAV содержит капсид AAV и упакованный в нем геном вектора, где геном вектора содержит 5' инвертированный концевой повтор AAV (ITR), полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную hNAGLU, регуляторную последовательность, которая направляет экспрессию hNAGLU в клетке-мишени, и AAV 3'-ITR.

В дополнительном аспекте предложен способ лечения человека, у которого диагностирован MPS IIIВ. Способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, суспензии rAAV, согласно настоящему описанию, в буферной смеси. Дополнительно предложена полученная способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая полученную способом генной инженерии последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность, идентичную ей на 95%, и кассету экспрессии, содержащую полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную hNAGLU, и регуляторную последовательность,

которая направляет ее экспрессию. В одном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фиг.1 показано, что активность NAGLU наблюдается в мозге, спинном мозге, печени, сердце и сыворотке через 3 месяца после интрацеребровентрикулярного (icv) введения AAV9.CB7.CI.NAGLUco.rBG. Наблюдается дозозависимое увеличение активности NAGLU в головном, спинном мозге, печени и сердце. По существу отсутствует активность у животных, получающих низкие дозы, частичное облегчение симптомов при средней дозе, и уровни активности, равные или выше гетерозиготным во всех органах у животных, обработанных высокой дозой. Активность в сыворотке очень низкая из-за наличия анти-hNAGLU циркулирующих антител.

На Фиг. 2A и 2B представлено накопление лизосом, оцененное с помощью иммуноокрашивания LIMP2 (Фиг. 2A) и количественного определения (Фиг. 2B) в мозге через 3 месяца после интрацеребровентрикулярного введения AAV9.CB7.CI.hNAGLUco.rBG. LIMP2 иммуноокрашивание лизосомальных мембран показывает снижение нагрузки накопления при высокой дозе (односторонний тест Ановы Краскелла Уоллиса с апостериорным многократным сравнительным тестом Данна, альфа 0,05).

На Фиг. 3A и 3B представлено иммуногистохимическое окрашивание (Фиг. 3A) и совокупный гистопатологический показатель (Фиг. 3B) в мозге через 3 месяца после ICV введения AAV9.CB7.CI.hNAGLUco.rBG. Показатель головного мозга представляет собой совокупную сумму баллов по 4-ступенчатой балльной шкале тяжести вакуолизации глиальных клеток в головном мозге, нейрональной вакуолизации в коре головного мозга, нейрональной вакуолизации в стволовой области мозга и задней части головного мозга, периваскулярной инфильтрации моноклеарных клеток, инфильтрации моноклеарных клеток (максимальный балл 20). Мыши, получавшие низкие дозы MPS 3B, сходны с мышами, получавшими основу, тогда как мыши, получавшие среднюю дозу и высокую дозу, имели сниженный показатель нейропатологии в головном и спинном мозге (спинной мозг не показан). Коррекция невропатологии статистически значима у животных, получавших среднюю и высокую дозу (односторонний тест Ановы Краскелла Уоллиса с апостериорным многократным сравнительным тестом Данна, альфа 0,05).

На Фиг.4 показана неврологическая функция, оцененная при помощи колеблющегося вращающегося стержня через 2 месяца после ICV введения AAV9.CB7.CI.hNAGLU.rBG. Мышей располагали на вращающемся стержне (10 оборотов в минуту) с инверсией направления вращения после каждого оборота. Задержку падения измеряли в течение максимального периода 180 секунд в течение 3 последовательных анализов. Среднюю задержку 3 анализов указывали как показатель баланса и

координации. Обработанные основной мышью MPS IIIb демонстрируют неврологический дефицит, который заставляет их падать с вращающегося стержня до падения гетерозиготных мышей. Обработанные высокой дозой мыши имеют тенденцию к лучшему функционированию, чем необработанные, но статистическая значимость не достигается из-за межиндивидуальной вариабельности.

На Фиг. 5 представлена шкала оценок, используемая для оценки клинического здоровья мышей, использованная в исследованиях для определения длительных эффектов лечения AAV9.CB7.C1.hNAGLU.rBG.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данной заявке предложены композиции, полезные для лечения мукополисахаридоза типа IIIb (MPS IIIb) и/или облегчения симптомов MPSIIIb. Эти композиции содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную человеческую N-ацетил-альфа-D-глюкозаминидазу (hNAGLU), и регуляторную последовательность, которая направляет ее экспрессию в клетке-мишени, где кодирующая последовательность hNAGLU по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1

В одном варианте воплощения изобретения композиции и способы, описанные в данной заявке, включают последовательности нуклеиновых кислот, кассеты экспрессии, векторы, рекомбинантные вирусы, другие композиции и способы экспрессии функциональной человеческой NAGLU (hNAGLU).

В другом варианте воплощения изобретения композиции и способы, описанные в данной заявке, включают последовательности нуклеиновых кислот, кассеты экспрессии, векторы, рекомбинантные вирусы, клетки-хозяева, другие композиции и способы получения композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует функциональную hNAGLU. В еще одном варианте воплощения изобретения композиции и способы, описанные в данной заявке, включают последовательности нуклеиновых кислот, кассеты экспрессии, векторы, рекомбинантные вирусы, другие композиции и способы доставки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональную hNAGLU, субъекту для лечения MPS IIIb. В одном варианте воплощения изобретения композиции и способы, описанные в данной заявке, полезны для обеспечения терапевтического уровня NAGLU в центральной нервной системе (ЦНС). Дополнительно или альтернативно, композиции и способы, описанные в данной заявке, полезны для обеспечения терапевтического уровня NAGLU на периферии, в частности, например, в крови, печени, почках или в периферической нервной системе. В определенных вариантах воплощения изобретения, описанный в данной заявке способ на основе аденоассоциированного вирусного вектора (AAV) предлагает новый вариант лечения, помогающий восстановить желаемую функцию NAGLU, облегчить симптом, связанный с MPS IIIb, улучшить биологические маркеры, связанные с MPS IIIb, или способствовать другому лечению MPS IIIb путем обеспечения экспрессии белка NAGLU у субъекта, который нуждается в таком лечении.

В контексте данного документа, термин „терапевтический уровень“ означает активность фермента по меньшей мере приблизительно 5%, приблизительно 8%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 100%, более чем 100%, приблизительно в 2 раза, приблизительно в 3 раза или приблизительно в 5 раз от уровня здорового контроля. Подходящие анализы для измерения ферментативной активности NAGLU описаны в данной заявке. В некоторых вариантах воплощения изобретения такие терапевтические уровни NAGLU могут приводить к ослаблению симптома(ов), связанных с MPS IIIB; улучшению связанных с MPS IIIB биомаркеров заболевания; или способствовать другому лечению MPS IIIB, например, уровнем GAG в спинномозговой жидкости (CSF), сыворотке, моче или любых других биологических образцах; профилактике нейрокогнитивного ухудшения; купированию определенных симптомов, связанных с MPS IIIB, и/или профилактике прогрессирования определенных симптомов, связанных с MPS IIIB; или любой их комбинации.

В контексте данного документа, термин „здоровый контроль“ относится к субъекту или взятому у него биологическому образцу, когда у субъекта отсутствует расстройство MPS. Здоровый контроль может быть от одного субъекта. В другом варианте воплощения изобретения здоровый контроль представляет собой пул от нескольких субъектов.

В контексте данного документа, термин „биологический образец“ относится к любой клетке, биологической жидкости или ткани. Подходящие образцы для использования в данном изобретении могут включать, без ограничения, цельную кровь, лейкоциты, фибробласты, сыворотку, мочу, плазму, слюну, костный мозг, спинномозговую жидкость, амниотическую жидкость и клетки кожи. Такие образцы могут быть дополнительно разбавлены солевым раствором, буфером или физиологически приемлемым разбавителем. Альтернативно, такие образцы концентрируют обычными способами.

Что касается описания данных изобретений, подразумевается, что каждая из описанных в данной заявке композиций полезна в другом варианте воплощения изобретения, в способах в соответствии с данным изобретением. Дополнительно, также предполагается, что каждая из композиций, описанных в данной заявке как полезная в данных способах, в другом варианте воплощения изобретения сама по себе является вариантом воплощения изобретения.

Если в данном описании не указано иное, технические и научные термины, в контексте данного документа, имеют то же значение, которое обычно является понятным специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение, и со ссылкой на опубликованные тексты, которые предоставляют специалистам в данной области техники общее руководство по многим из терминов, используемых в настоящей заявке.

В контексте данного документа, термины „заболевание“, „расстройство“ и „состояние“ представляют собой мукополисахаридоз типа IIIb (MPS IIIb, MPS IIIb, также известный как синдром Санфилиппо типа В или болезнь Санфилиппо типа В).

В контексте данного документа, термин „симптом (ы), связанный(ые) с MPS IIIb“ или „симптом (ы)“ относится к симптому(ам), обнаруженному(ым) у пациентов с MPS IIIb, а также в моделях животных с MPS IIIb. Такие симптомы включают, но не ограничиваются этим, задержку речи; трудности с социальными взаимодействиями и общением; нарушения сна; прогрессирующую умственную отсталость и потерю ранее приобретенных навыков (регрессию развития); судороги и двигательные расстройства; большую голову; слегка увеличенную печень (легкую гепатомегалию); мягкую складку (выпячивание) вокруг пупка (пупочную грыжу) или в нижней части живота (паховую грыжу); низкий рост, тугоподвижность суставов, легкий множественный дизостоз, множественные дефекты скелета; хроническую диарею; рецидивирующие инфекции верхних дыхательных путей; рецидивирующие ушные инфекции; нарушение слуха; нарушения зрения; гипертрофическую обструктивную гипертрофию; грубые черты лица; жесткие волосы; массивный череп; множественный дизостоз; нарушения роста; экскрецию гепарансульфата с мочой; накопление GAG в спинномозговой жидкости (CSF), сыворотке, моче и/или других биологических образцах; аномальную экспрессию и/или ферментативную активность N-сульфогликозаминсульфогидролазы (SGSH) или N-сульфогликозаминсульфогидролазы (IDUA); накопление GM2 и GM3; измененную активность лизосомальных ферментов; накопление свободного неэтерифицированного холестерина в ЦНС; воспалительную реакцию в ЦНС и скелетных тканях; избыточный рост волос (гирсутизм); гиперактивность; яйцевидные грудно-поясничные позвонки; спленомегалию; синофриз; утолщенные ребра; грыжи; и вихляющую и неустойчивую походку.

„Пациент“ или „субъект“, в контексте данного документа, означает людей, женского или мужского пола, собак и животные модели, используемые для клинических исследований. В одном варианте воплощения изобретения субъектом данных способов и композиций является человек, у которого диагностировали MPS IIIb.

В некоторых вариантах воплощения изобретения человеческим субъектом данных способов и композиций является пренатальный, новорожденный, младенец, малыш, дошкольник, школьник, подросток, молодой взрослый или взрослый. В дополнительном варианте воплощения изобретения субъектом данных способов и композиций является педиатрический пациент с MPS IIIb.

Клиническое обследование и анализы мочи (избыток мукополисахаридов выводится с мочой) являются первыми этапами в диагностике заболевания MPS. Ферментные анализы, измеряющие уровни активности фермента в крови, клетках кожи или различных клетках, также используются для точной диагностики MPS IIIb. См. [www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?-term=4669\[genecid\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?-term=4669[genecid]); и [www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086648-\[DISCUI\]&filter=method](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086648-[DISCUI]&filter=method):

1_2;testtype:clinical. Доступны различные генетические тесты, обнаруживающие мутацию NAGLU, связанную с MPS III. См., например, www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/conditions/C0086648/; [www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all-tests/?term=C0086648\[DISCU\]&filter=method:2_7;testtype:clinical](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all-tests/?term=C0086648[DISCU]&filter=method:2_7;testtype:clinical); а также www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/506481/.

Пренатальная диагностика с использованием амниоцентеза и взятия пробы ворсинчатого хориона может проверить, затронут ли плод расстройством. Генетическое консультирование может помочь родителям, имеющим в семейном анамнезе мукополисахаридозы, определить, имеют ли они мутантный ген, который вызывает расстройство. См., например, A Guide to Understanding MPS III, National MPS Society, 2008, mpssociety.org/learn/diseases/mps-iii/.

„Содержащий“ является термином, означающим включение других компонентов или этапов способа. При использовании термина „содержащий“, следует понимать, что связанные варианты воплощения изобретения включают описания, использующие терминологию „состоящий из“, которая исключает другие компоненты или этапы способа, и терминологию „состоящий по существу из“, которая исключает любые компоненты или этапы способа, которые существенно меняют природу варианта воплощения изобретения или самого изобретения. Следует понимать, что, хотя различные варианты воплощения изобретения в описании представлены с использованием терминологии „содержащий“, при различных обстоятельствах связанный вариант воплощения изобретения также описывается с использованием терминологии „состоящий из“ или „состоящий по существу из“.

Следует отметить, что термины, относящиеся к единственному числу, относятся к одному или более, например, „вектор“ подразумевается как представляющий один или более векторов. Как таковые, термины, относящиеся к единственному числу, „один или более“ и „по меньшей мере один“ используются в данной заявке взаимозаменяемо.

В контексте данного документа, термин „приблизительно“ означает вариабельность плюс или минус 10% от приведенной ссылки, если не указано иное.

1. N-ацетил-альфа-глюкозаминидаза (NAGLU)

В контексте данного документа, термины „N-ацетил-альфа-глюкозаминидаза“, „NAGLU“ и „NaGlu“ используются взаимозаменяемо с термином „альфа-N-ацетилглюкозаминидаза“. Изобретение включает любой вариант белка NAGLU, экспрессируемого из последовательностей нуклеиновых кислот, предложенных в данной заявке, или его функциональный фрагмент, который восстанавливает желаемую функцию, ослабляет симптом, улучшает симптомы, связанные с биомаркером, связанным с MPS III, или способствует другому лечению MPS III при доставке в композиции или способом, как предусмотрено в данной заявке. Примеры подходящего биомаркера для MPSIII включают представленный в заявке WO2017/136533, которая включена в данную заявку посредством ссылки.

В контексте данного документа, термин „функциональная NAGLU“ означает

фермент, имеющий аминокислотную последовательность полноразмерной (нативной) человеческой NAGLU дикого типа (как показано в SEQ ID NO: 2 и под номером доступа UniProtKB: P54802), ее вариант, ее мутант с консервативной аминокислотной заменой, ее фрагмент, полноразмерный или фрагмент любой комбинации варианта и мутанта с консервативной аминокислотной заменой, обеспечивая по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20% по меньшей мере приблизительно 30% по меньшей мере приблизительно 40% по меньшей мере приблизительно 50% по меньшей мере приблизительно 60% по меньшей мере приблизительно 70% по меньшей мере приблизительно 75% по меньшей мере приблизительно 80% по меньшей мере приблизительно 90% или приблизительно такой же или выше 100% уровень биологической активности нормальной человеческой NAGLU. В одном варианте воплощения изобретения функциональная NAGLU относится к белку NAGLU дикого типа с последовательностью SEQ ID NO: 2.

Примеры вариантов NAGLU включают, но не ограничиваются приведенным, E705K, который состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 с лизином (Lys, K) у 705-й аминокислоты вместо глутаминовой кислоты (Glu, E) у дикого типа.

В контексте данного документа, термин „консервативная аминокислотная замена“ или „консервативные аминокислотные замещения“ относится к изменению, замене или замещению аминокислоты на другую аминокислоту с аналогичными биохимическими свойствами (например, заряд, гидрофобность и размер), которая является известной практикующим специалистам в данной области техники. Также см., например, French et al. What is a conservative substitution? *Journal of Molecular Evolution*, March 1983, Volume 19, Issue 2, pp 171-175 и YAMPOLSKY et al. The Exchangeability of Amino Acids in Proteins, *Genetics*. 2005 Aug; 170(4): 1459-1472, каждая из которых включена в данную заявку посредством ссылки в полном объеме.

Существует множество анализов для измерения экспрессии NAGLU и уровней активности с помощью традиционных способов. См., например, Пример 1, согласно настоящему описанию; [www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086648\[DISCU\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086648[DISCU]) &filter=method:l_2;testtype:clinical; [www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086648\[DISCU\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086648[DISCU]) &filter=method:l_1;testtype:clinical; Kan SH et al, Delivery of an enzyme-IGFII fusion protein to the mouse brain is therapeutic for mucopolysaccharidosis type IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 14; 111(41): 14870-5. doi: 10.1073/pnas.1416660111. Epub 2014 Sep 29; US 2017/0088859; каждая из которых включена в данную заявку посредством ссылки в полном объеме.

В одном аспекте предложена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует функциональный белок NAGLU. В одном варианте воплощения изобретения последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой кодирующую последовательность дикого типа, воспроизводимую в SEQ ID NO: 3. В одном варианте воплощения изобретения последовательность нуклеиновой кислоты на по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере

приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80% идентична человеческой последовательности NAGLU дикого типа SEQ ID № 3.

Нуклеиновая кислота относится к полимерной форме нуклеотидов и включает в себя РНК, мРНК, кДНК, геномную ДНК, пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК) и синтетические формы и смешанные полимеры, указанные выше. Нуклеотид относится к рибонуклеотиду, дезоксинуклеотиду или модифицированной форме нуклеотида любого типа (например, олигомеру пептидной нуклеиновой кислоты). Термин также включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК. Специалист поймет, что функциональные варианты этих молекул нуклеиновой кислоты также должны быть частью настоящего изобретения. Функциональные варианты представляют собой последовательности нуклеиновых кислот, которые можно напрямую транслировать с использованием стандартного генетического кода, чтобы получить аминокислотную последовательность, идентичную последовательности, транслированной из исходных молекул нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах воплощения изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие функциональную человеческую NAGLU (hNAGLU) и другие конструкты, охватываемые настоящим изобретением и полезные для создания кассет экспрессии и векторных геномов, могут быть сконструированы для экспрессии в клетках дрожжей, клетках насекомых или клетках млекопитающих, таких как клетки человека. Способы известны и были описаны ранее (например, WO 96/09378). Последовательность считается полученной способами генной инженерии, если по меньшей мере один не предпочтительный кодон по сравнению с последовательностью дикого типа заменен более предпочтительным кодоном. В данной заявке не предпочтительный кодон представляет собой кодон, который используется в организме реже, чем другой кодон, кодирующий ту же аминокислоту, а кодон, который является более предпочтительным, представляет собой кодон, который используется в организме чаще, чем не предпочтительный кодон. Частота использования кодонов для конкретного организма может быть найдена в таблицах частот кодонов, таких как www.kazusa.jp/codon. Предпочтительно, более чем один не предпочтительный кодон, предпочтительно, большинство или все нежелательные кодоны, заменены более предпочтительными кодонами.

Предпочтительно, наиболее часто используемые в организме кодоны используются в полученной способами генной инженерии последовательности. Замена предпочтительными кодонами обычно приводит к более высокой экспрессии. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что многочисленные разные молекулы нуклеиновой кислоты могут кодировать один и тот же полипептид в результате вырожденности генетического кода. Также будет понятно, что специалисты в данной области техники могут, используя обычные способы, производить нуклеотидные замещения, которые не влияют на аминокислотную последовательность, кодируемую

молекулами нуклеиновой кислоты, чтобы отображать использование кодонов в любом конкретном организме-хозяине, в котором должны экспрессироваться полипептиды.

Следовательно, если не указано иное, „последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность“ включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Последовательности нуклеиновых кислот можно клонировать, используя обычные способы молекулярной биологии, или генерировать *de novo* с помощью синтеза ДНК, который может быть выполнен с использованием рутинных процедур сервисными компаниями, которые работают в области синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScript, Life Technologies, Eurofins).

В одном аспекте кодирующая последовательность NAGLU является полученной способом генной инженерии последовательностью. В одном варианте воплощения изобретения полученная способом генной инженерии последовательность полезна для улучшения продукции, транскрипции, экспрессии или безопасности у субъекта. В другом варианте воплощения изобретения полученная способом генной инженерии последовательность полезна для повышения эффективности получаемых терапевтических композиций или лечения. В дополнительном варианте воплощения изобретения полученная способом генной инженерии последовательность полезна для повышения эффективности экспрессируемого функционального белка NAGLU, но также может допускать более низкую дозу терапевтического реагента, который доставляет функциональный белок, для повышения безопасности.

В одном варианте воплощения изобретения полученная способом генной инженерии кодирующая последовательность NAGLU характеризуется улучшенной скоростью трансляции по сравнению с кодирующими последовательностями NAGLU дикого типа. В одном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность NAGLU на менее чем 82% идентична последовательности hNAGLU дикого типа SEQ ID NO: 3. В одном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность NAGLU на менее чем приблизительно 99%, менее чем приблизительно 98%, менее чем приблизительно 97%, менее чем приблизительно 96%, менее чем приблизительно 95%, менее чем приблизительно 94%, менее чем приблизительно 93%, менее чем приблизительно 92%, менее чем приблизительно 91%, менее чем приблизительно 90%, менее чем приблизительно 89%, менее чем приблизительно 88%, менее чем приблизительно 87%, менее чем приблизительно 86%, менее чем приблизительно 85%, менее чем приблизительно 84%, менее чем приблизительно 83%, менее чем приблизительно 82%, менее чем приблизительно 81%, менее чем приблизительно 80%, менее чем приблизительно 79%, менее чем приблизительно 78%, менее чем приблизительно 77%, менее чем приблизительно 76%, менее чем приблизительно 75%, менее чем приблизительно 74%, менее чем приблизительно 73%, менее чем приблизительно 72%, менее чем приблизительно 71%, менее чем приблизительно 70%,

менее чем приблизительно 69%, менее чем приблизительно 68%, менее чем приблизительно 67%, менее чем приблизительно 66%, менее чем приблизительно 65%, менее чем приблизительно 64%, менее чем приблизительно 63%, менее чем приблизительно 62%, менее чем приблизительно 61% или менее идентична кодирующей последовательности NAGLU дикого типа.

В другом варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность NAGLU на приблизительно 99%, приблизительно 98%, приблизительно 97%, приблизительно 96%, приблизительно 95%, приблизительно 94%, приблизительно 93%, приблизительно 92%, приблизительно 91%, приблизительно 90%, приблизительно 89%, приблизительно 88%, приблизительно 87%, приблизительно 86%, приблизительно 85%, приблизительно 84%, приблизительно 83%, приблизительно 82%, приблизительно 81%, приблизительно 80%, приблизительно 79%, приблизительно 78%, приблизительно 77%, приблизительно 76%, приблизительно 75%, приблизительно 74%, приблизительно 73%, приблизительно 72%, приблизительно 71%, приблизительно 70%, приблизительно 69%, приблизительно 68%, приблизительно 67%, приблизительно 66%, приблизительно 65%, приблизительно 64%, приблизительно 63%, приблизительно 62%, приблизительно 61% или менее идентична кодирующей последовательности NAGLU дикого типа. В одном варианте воплощения изобретения предоставлена полученная способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность SEQ ID NO: 1. В одном варианте воплощения изобретения в данной заявке предложена полученная способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере приблизительно на 95% идентичная ей, кодирующая функциональный hNAGLU. В другом варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность NAGLU на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 81%, по меньшей мере приблизительно 82%, по меньшей мере приблизительно 83%, по меньшей мере приблизительно 84%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 86%, по меньшей мере приблизительно 87%, по меньшей мере приблизительно 88%, по меньшей мере приблизительно 89%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% идентична SEQ ID NO: 1, где последовательность кодирует функциональную hNAGLU.

Под термином „полученный способом генной инженерии“ подразумевают, что последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие функциональный белок NAGLU, описанные в данной заявке, собирают и помещают в любой подходящий генетический элемент, например, в депротенинизированную ДНК, фаг, транспозон, космиду, эписому и т. д., которые переносят переносимые последовательности NAGLU в клетку-хозяин,

например, для создания невирусных систем доставки (например, систем на основе РНК, депротенизированной ДНК или тому подобное) или для генерации вирусных векторов в упаковывающей клетке-хозяине и/или для доставки в клетку-хозяин в субъекте. В одном варианте воплощения изобретения генетический элемент представляет собой вектор. В одном варианте воплощения изобретения генетический элемент представляет собой плазмиду. Способы, используемые для создания таких сконструированных конструкций, известны специалистам в области манипулирования нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические способы. См., например, Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

Термин „процент (%) идентичности“, „идентичность последовательности“, „процент идентичности последовательности“ или „процент идентичности“ в контексте последовательностей нуклеиновых кислот относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми, когда выровнены для соответствия. Длина сравнения идентичности последовательности может быть по всей длине генома, желательна полная длина последовательности, кодирующей ген, или фрагмента по меньшей мере приблизительно от 500 до 5000 нуклеотидов.

Однако идентичность среди меньших фрагментов, например, по меньшей мере из приблизительно девяти нуклеотидов, обычно по меньшей мере из приблизительно от 20 до 24 нуклеотидов, по меньшей мере из приблизительно от 28 до 32 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно из 36 или более нуклеотидов, также может быть желательна.

Программы многократного выравнивания последовательностей также доступны для последовательностей нуклеиновых кислот. Примеры таких программ включают „Clustal Omega“, „Clustal W“, „CAP Sequence Assembly“, „BLAST“, „MAP“ и „MEME“, которые доступны через веб-серверы в Интернете. Другие источники таких программ известны специалистам в данной области техники.

В качестве альтернативы также используются утилиты Vector NTI. Существует также ряд алгоритмов, известных в данной области техники, которые можно использовать для измерения идентичности нуклеотидных последовательностей, включая те, которые содержатся в программах, описанных выше. В качестве другого примера, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с помощью программы Fasta™ в GCG версии 6.1. Fasta™ обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска. Например, процент идентичности последовательности между последовательностями нуклеиновой кислоты может быть определен с использованием Fasta™ с его параметрами по умолчанию (размер слова 6 и коэффициент NOPAM для матрицы оценки), как предусмотрено в версии 6.1 GCG, включенной в данную заявку посредством ссылки.

Процент идентичности может быть легко определен для аминокислотных

последовательностей по всей длине белка, полипептида, приблизительно 32 аминокислот, приблизительно 330 аминокислот или их пептидного фрагмента или соответствующих последовательностей, кодирующих последовательности нуклеиновых кислот. Подходящий аминокислотный фрагмент может иметь длину по меньшей мере приблизительно 8 аминокислот и может составлять до 700 аминокислот. Обычно при ссылке на „идентичность“, „гомологию“ или „сходство“ между двумя различными последовательностями „идентичность“, „гомология“ или „сходство“ определяют в отношении „выровненных“ последовательностей. „Выровненные“ последовательности или „выравнивания“ относятся к множественным последовательностям нуклеиновых кислот или последовательностей белков (аминокислот), часто содержащим исправления для отсутствующих или дополнительных оснований или аминокислот по сравнению с реперной 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, Clustal Omega, FASTA, с использованием, например, алгоритма Нидлмана-Вунша, алгоритма Смита-Уотермана). Выравнивания выполняются с использованием любой из множества общедоступных или коммерчески доступных программ выравнивания нескольких последовательностей. Программы выравнивания последовательностей доступны для аминокислотных последовательностей, например, программ „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 изменять эти настройки по мере необходимости. 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 упомянутыми 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).

В контексте данного документа, термин „желательная функция“ относится к активности фермента NAGLU, составляющей по меньшей мере, 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 100% или более 100% от здорового контроля.

В контексте данного документа, фразы „облегчают симптом“, „улучшают симптом“ или любые их грамматические варианты, относятся к купированию симптомов, связанных с MPS IIIB, обнаружению или предотвращению прогрессирования симптомов, связанных с MPS IIIB. В одном варианте воплощения изобретения улучшение или

облегчение относится к общему количеству симптомов у пациента после введения описанной композиции (композиций) или применению описанного способа, которое снижается на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% по сравнению с таковым до введения или применения. В другом варианте воплощения изобретения улучшение или облегчение относится к тяжести или прогрессированию симптома после введения описанной композиции (композиций) или использования описанного способа, которое снижается приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% по сравнению с таковым до введения или применения.

Следует понимать, что композиции в функциональном белке NAGLU и кодирующей последовательности NAGLU, описанные в данной заявке, предназначены для применения с другими композициями, режимами, аспектами, вариантами воплощения изобретения и способами, описанными в разделе Описание.

2. Кассета экспрессии

В одном аспекте предложена кассета экспрессии, содержащая полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную hNAGLU, и регуляторную последовательность, которая направляет ее экспрессию.

В одном варианте воплощения изобретения кассета экспрессии содержит полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, согласно настоящему описанию, которая кодирует функциональную hNAGLU, и регуляторную последовательность, которая направляет ее экспрессию. В одном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU представляет собой SEQ ID NO: 1. В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность содержит промотор. В дополнительном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность содержит промотор CB7. В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность дополнительно содержит интрон куриного бета-актина. В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность дополнительно содержит кроличий глобин poly A.

В контексте данного документа, термин „экспрессия“ или „генная экспрессия“ относится к процессу, посредством которого информация из гена используется в синтезе функционального генного продукта. Генный продукт может представлять собой белок, пептид или полимер нуклеиновой кислоты (такой как РНК, ДНК или ПНК).

В контексте данного документа, термин „кассета экспрессии“ относится к

полимеру нуклеиновой кислоты, который содержит кодирующие последовательности для функциональной hNAGLU, промотор, и может включать в себя другие регуляторные последовательности для нее, причем эта кассета может быть упакована в вектор.

В контексте данного документа, термин „регуляторная последовательность“ или „последовательность контроля экспрессии“ относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, таким как последовательности инициатора, последовательности энхансера и последовательности промотора, которые индуцируют, подавляют или иным образом контролируют транскрипцию последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих белок, с которыми они функционально связаны.

В контексте данного документа, термин „функционально связанный“ относится как к последовательностям контроля экспрессии, которые смежны с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные последовательности hNAGLU, так и/или контрольным последовательностям экспрессии, которые действуют в транс положении или на расстоянии, контролируя их транскрипцию и экспрессию.

Термин „экзогенный“, используемый для описания последовательности нуклеиновой кислоты или белка, означает, что нуклеиновая кислота или белок не встречаются в природе в положении, в котором они существуют в хромосоме или клетке-хозяине. Экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты также относится к последовательности, полученной из той же клетки-хозяина или субъекта и введенной в нее, но присутствующей в неприродном состоянии, например, другой номер копии или под контролем различных регуляторных элементов.

Термин „гетерологичный“, используемый для описания последовательности нуклеиновой кислоты или белка, означает, что нуклеиновая кислота или белок были получены из другого организма или другого вида того же организма, чем клетка-хозяин или субъект, в котором они экспрессируются. Термин „гетерологичный“ при использовании со ссылкой на белок или нуклеиновую кислоту в плазмиде, кассете экспрессии или векторе указывает на то, что белок или нуклеиновая кислота присутствует с другой последовательностью или подпоследовательностью, с которой рассматриваемые белок или нуклеиновая кислота не встречаются в одинаковых соотношениях друг с другом в природе.

В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность содержит промотор. В одном варианте воплощения изобретения промотор представляет собой промотор куриного бета-актина. В дополнительном варианте воплощения изобретения промотор представляет собой гибрид энхансера цитомегаловируса немедленного раннего ответа и промотора куриного бета-актина (промотор CB7). В другом варианте воплощения изобретения подходящий промотор может включать, без ограничения, промотор фактора элонгации 1 альфа (EF1 альфа) (см., например, Kim DW et al, Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*. 1990 Jul 16;91(2):217-23), промотор синапсина 1 (см., например, Kugler S et al, Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene

expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther.* 2003 Feb; 10(4):337-47), промотор нейрон-специфической энолазы (NSE) (см., например, Kim J et al, Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. *Endocrinology.* 2004 Feb; 145(2):613-9. Epub 2003 Oct 16) или промотор CB6 (см., например, Large-Scale Production of Adeno-Associated Viral Vector Serotype-9 Carrying the Human Survival Motor Neuron Gene, *Mol Biotechnol.* 2016 Jan;58(1):30-6. doi: 10.1007/s12033-015-9899-5).

В одном варианте воплощения изобретения кассета экспрессии предназначена для экспрессии и секреции у человеческого субъекта. В одном варианте воплощения изобретения кассета экспрессии предназначена для экспрессии в центральной нервной системе (ЦНС), включая спинномозговую жидкость и мозг. В дополнительном варианте воплощения изобретения кассета экспрессии полезна для экспрессии как в ЦНС, так и в печени. Подходящие промоторы могут быть выбраны, включая, но не ограничиваясь приведенным, конститутивный промотор, тканеспецифичный промотор или индуцибельный/регуляторный промотор. Примером конститутивного промотора является промотор куриного бета-актина. Различные промоторы куриного бета-актина были описаны отдельно или в комбинации с различными энхансерными элементами (например, CB7 представляет собой промотор куриного бета-актина с энхансерными элементами цитомегаловируса; CAG-промотор, который включает в себя промотор, первый экзон и первый интрон бета-актина курицы и акцептор сплайсинга гена бета-глобина кролика; промотор CBh, SJ Gray et al, *Hu Gene Ther.* 2011 Sep; 22(9): 1143-1153).

Примеры промоторов, которые являются тканеспецифичными, хорошо известны для печени (альбумин, Miyatake et al, (1997) *J. Virol.*, 71:5124-32; основной промотор вируса гепатита В, Sandig et al, (1996) *Gene Ther.*, 3: 1002-9; альфа-фетопротеин (AFP), Arbuthnot et al, (1996) *Hum. Gene Ther.*, 7: 1503-14), нейрон (такой как нейрон-специфический промотор энолазы (NSE), Andersen et al, (1993) *Cell. Mol. Neurobiol.* 13:503-15; ген нейрофиламента легкой цепи, Piccioli et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5611-5; и нейрон-специфический ген *vgf*, Piccioli et al. (1995) *Neuron*, 15: 373-84) и другие ткани. Альтернативно, может быть выбран регулируемый промотор. См., например WO 2011/126808B2, включенный в данную заявку посредством ссылки.

В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность дополнительно содержит энхансер. В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность содержит один энхансер. В другом варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность содержит два или более энхансера экспрессии. Эти усилители могут быть одинаковыми или разными. Например, энхансер может включать в себя энхансер Alpha mic/bik или 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 последовательностей.

В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность

дополнительно содержит интрон. В дополнительном варианте воплощения изобретения интрон представляет собой интрон куриного бета-актина. Другие подходящие интроны, включающие те, которые известны в данной области техники, могут представлять собой интрон бета-глобулина человека и/или коммерчески доступный интрон Promega®, и те, которые описаны в WO 2011/126808.

В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность дополнительно содержит сигнал полиаденилирования (polyA). В дополнительном варианте воплощения изобретения polyA представляет собой кроличий polyA глобин. См., например, WO 2014/151341. Альтернативно, другой polyA, например, последовательность полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH), polyA SV40 или синтетический polyA, могут быть включены в кассету экспрессии.

Следует понимать, что композиции в кассете экспрессии, описанные в данной заявке, предназначены для применения с другими композициями, режимами, аспектами, вариантами воплощения изобретения и способами, описанным в разделе Описание.

3. Вектор

В одном аспекте в данной заявке предложен вектор, содержащий полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную NAGLU человека, и регуляторную последовательность, которая направляет его экспрессию в клетке-мишени. В одном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU представляет собой SEQ ID NO: 1.

В контексте данного документа, „вектор“ представляет собой биологический или химический фрагмент, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть введена в соответствующую клетку-мишень для репликации или экспрессии указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Примеры вектора включают, но не ограничиваются приведенным, рекомбинантный вирус, плазмиду, липоплексы, полимерному, полиплексы, дендример, конъюгат проникающего в клетки пептида (CPP), магнитную частицу или наночастицу. В одном варианте воплощения изобретения вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, в которую может быть вставлена экзогенная или гетерологичная или сконструированная нуклеиновая кислота, кодирующая функциональную hNAGLU, которая затем может быть введена в соответствующую клетку-мишень. Такие векторы предпочтительно имеют один или более источников репликации и один или более сайтов, в которые может быть вставлена рекомбинантная ДНК.

Векторы часто имеют средства, с помощью которых клетки с векторами могут быть выбраны из тех, без которых, например, они кодируют гены устойчивости к лекарственным средствам. Обычные векторы включают плазмиды, вирусные геномы и „искусственные хромосомы“. Обычные способы генерации, получения, характеристики или количественного определения векторов доступны специалистам в данной области

техники.

В одном варианте воплощения изобретения вектор представляет собой невирусную плазмиду, которая содержит описанную кассету экспрессии, например, „открытую ДНК“, „открытую плазмидную ДНК“, РНК и мРНК; в сочетании с различными композициями и наночастицами, включая, например, мицеллы, липосомы, композиции катионных липидов и нуклеиновых кислот, композиции полигликанов и других полимеров, конъюгаты на основе липидов и/или холестерина и нуклеиновых кислот и другие конструкции, такие как описаны в данной заявке. См., например, X. Su et al, *Mol. Pharmaceutics*, 2011, 8 (3), pp 774-787; веб-публикация: 21 марта 2011 г.; WO2013/182683, WO 2010/053572 и WO 2012/170930, все из которых включены в данную заявку посредством ссылки.

В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор, описанный в данной заявке, представляет собой „вирус с дефектом репликации“ или „вирусный вектор“, который относится к синтетической или искусственной вирусной частице, в которой кассета экспрессии, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную hNAGLU, упакована в вирусный капсид или оболочку, где любые вирусные геномные последовательности, также упакованные в вирусный капсид или оболочку, имеют дефект репликации; т.е. они не могут генерировать вирионы потомства, но сохраняют способность инфицировать клетки-мишени. В одном варианте воплощения изобретения геном вирусного вектора не включает гены, кодирующие ферменты, необходимые для репликации (геном может быть сконструирован так, чтобы быть „выпотрошенным“, и содержать только последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую NAGLU, в окружении сигналов, необходимых для амплификации и упаковки искусственного генома), но эти гены могут поставляться во время производства. Следовательно, он считается безопасным для использования в генной терапии, поскольку репликация и инфицирование вирионами-потомками не могут происходить, за исключением случаев присутствия вирусного фермента, необходимого для репликации.

В контексте данного документа, рекомбинантный вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV), аденовирус, бокавирус, гибридный AAV/бокавирус, вирус простого герпеса или лентивирус.

В контексте данного документа, термин „клетка-хозяин“ может относиться к пакующей клеточной линии, в которой продуцируется вектор (например, рекомбинантный AAV). Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку (например, человека, насекомого или дрожжей), которая содержит экзогенную или гетерологичную ДНК, которая была введена в клетку любым способом, например электропорацией, осаждением фосфата кальция, микроинъекцией, трансформацией, вирусной инфекцией, трансфекцией, доставкой липосом, способами слияния мембран, гранулами ДНК, покрытыми на высокой скорости, вирусным инфицированием и слиянием протопластов. Примеры клеток-хозяев могут включать, но не ограничиваются приведенным, изолированную клетку, клеточную культуру, клетку *Escherichia coli*, дрожжевую клетку, человеческую клетку, нечеловеческую клетку, клетку

млекопитающего, клетку не млекопитающего, клетку насекомого, клетку НЕК-293, клетку печени, клетку почки, клетку центральной нервной системы, нейрон, глиальную клетку или стволовую клетку.

В контексте данного документа, термин „клетка-мишень“ относится к любой клетке-мишени, в которой желательна экспрессия функциональной NAGLU. В некоторых вариантах воплощения изобретения термин „клетка-мишень“ предназначен для обозначения клеток субъекта, которого лечат от MPS IIIВ. Примеры клеток-мишеней могут включать, но не ограничиваются приведенным, клетку печени, клетку почки, клетку центральной нервной системы, нейрон, глиальную клетку и стволовую клетку. В определенных вариантах воплощения изобретения вектор доставляется в клетку-мишень *ex vivo*. В определенных вариантах воплощения изобретения вектор доставляется к клетке-мишени *in vivo*.

Следует понимать, что композиции в векторе, описанном в данной заявке, предназначены для применения с другими композициями, режимами, аспектами, вариантами воплощения изобретения и способами, описанным в разделе Описание.

4. Аденоассоциированный вирус (AAV)

В одном аспекте в данной заявке предложен рекомбинантный AAV (rAAV), содержащий капсид AAV и упакованный в нем геном вектора. rAAV предназначен для лечения мукополисахаридоза IIIВ (MPS IIIВ). Геном вектора содержит 5' инвертированный концевой повтор AAV (ITR), полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную hNAGLU, согласно настоящему описанию, регуляторную последовательность, которая направляет экспрессию hNAGLU в клетке-мишени, и ITR 3' AAV. В одном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте воплощения изобретения кодирующая последовательность hNAGLU представляет собой SEQ ID NO: 1. В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность содержит промотор. В дополнительном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность дополнительно содержит энхансер. В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность дополнительно содержит интрон. В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность дополнительно содержит поли А. В некоторых вариантах воплощения изобретения геном вектора AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 4 (AAV.CB7.CI.hNAGLUco.RBG), которая кодирует белок hNAGLU SEQ ID NO: 5.

В одном варианте воплощения изобретения капсид AAV представляет собой капсид AAV9. В одном варианте воплощения изобретения rAAV, описанный в данной заявке, предназначен для применения при лечении мукополисахаридоза III В (MPS IIIВ).

В одном варианте воплощения изобретения регуляторная последовательность является такой, как описано выше. В одном варианте воплощения изобретения геном вектора включает инвертированный концевой повтор AAV 5 '(ITR), кассету экспрессии,

согласно настоящему описанию, и ITR 3' AAV.

В одном варианте воплощения изобретения предоставлен гAAV, содержащий капсид AAV серотипа 9 (AAV 9) и геном вектора, содержащий промотор CB7, экспрессирующий полученную способом генной инженерии версию hNAGLU с последовательностью polyA кроличьего бета-глобина (rBG). В дополнительном варианте воплощения изобретения геном вектора гAAV содержит последовательность SEQ ID NO: 4 (AAV.CB7.CI.hSNAGLUco.rBG).

В одном варианте воплощения изобретения гAAV содержит капсид AAV9 и геном вектора, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4, где гAAV предложен как AAV9.CB7.CI.hSNAGLUco.rBG.

В контексте данного документа, термин „геном вектора“ относится к последовательности нуклеиновой кислоты, упакованной внутри вектора. В одном варианте воплощения изобретения геном вектора относится к последовательности нуклеиновой кислоты, упакованной внутри капсида гAAV, образующей вектор гAAV. Такая последовательность нуклеиновой кислоты содержит инвертированные концевые повторяющиеся последовательности AAV (ITR). В одном примере геном вектора содержит, как минимум, от 5' до 3', AAV2 5' ITR, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную NAGLU, и AAV2 3' ITR. Однако могут быть выбраны ITR из другого источника AAV, отличного от AAV2. Дополнительно, могут использоваться другие ITR. Дополнительно, геном вектора содержит регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию функциональной NAGLU.

ITR являются генетическими элементами, ответственными за репликацию и упаковку генома во время производства вектора, и являются единственными вирусными цис-элементами, необходимыми для генерации гAAV. В одном варианте воплощения изобретения ITR, взятые из AAV, отличаются от тех, которые предоставляет капсид. В предпочтительном варианте воплощения изобретения последовательности ITR из AAV2 или их удаленная версия (Δ ITR), которые могут быть использованы для удобства и для того, чтобы ускорить одобрение регулирующими органами. Однако могут быть выбраны ITR из других источников AAV. Если источник ITR взят из AAV2, а капсид AAV из другого источника AAV, то результирующий вектор может быть назван псевдотипированным. Как правило, геном вектора AAV содержит ITR 5' AAV, кодирующие последовательности NAGLU и любые регуляторные последовательности и ITR 3' AAV. Однако другие конфигурации этих элементов могут быть подходящими. Была описана сокращенная версия 5' ITR, называемая Δ ITR, где D-последовательность и сайт разрешения терминала (trs) удалены. В других вариантах воплощения изобретения используются полноразмерные ITR 5' и 3' AAV.

В контексте данного документа, термин „AAV“ относится к встречающимся в природе аденоассоциированным вирусам, аденоассоциированным вирусам, доступным для специалиста в данной области техники и/или в свете композиции (композиций) и способа(ов), описанных в данной заявке, а также к искусственным AAV. Вирусный вектор

аденоассоциированного вируса (AAV) представляет собой устойчивую к AAV ДНКазу частицу с капсидом белка AAV, в который упакована кассета экспрессии, фланкированная последовательностями с инвертированным концевым повторением AAV (ITR) для доставки в клетки-мишени. Капсид AAV состоит из 60 субъединиц белка капсида (сар), VP1, VP2 и VP3, которые расположены в икосаэдрической симметрии в соотношении приблизительно от 1: 1:10 до 1: 1:20, в зависимости от выбранного AAV. Различные AAV могут быть выбраны в качестве источников капсидов вирусных векторов AAV, как указано выше. См., например, опубликованную заявку на патент США US No. 2007-0036760-A1; опубликованную заявку на патент США US No. № 2009-0197338-A1; EP 1310571. См. также WO 2003/042397 (AAV7 и другие обезьяньи AAV), патент США US 7790449 и патент США US7282199 (AAV8), WO 2005/033321 и патент США US 7906111 (AAV9) и WO 2006/110689 и WO 2003/042397 (rh.10). Эти документы также описывают другие AAV, которые могут быть выбраны для создания AAV и включены в качестве ссылки. Среди AAV, выделенных или полученных способами генной инженерии из человеческих или нечеловеческих приматов (NHP) и хорошо охарактеризованных, человеческий AAV2 является первым AAV, который был разработан как вектор переноса гена; он широко использовался для эффективных экспериментов по переносу генов в различных тканях-мишенях и на животных моделях. Если не указано иное, капсид AAV, ITR и другие выбранные компоненты AAV, описанные в данной заявке, могут быть легко выбраны из любого AAV, включая, без ограничения, AAV, обычно идентифицируемые как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV8bp, AAV7M8 и AAVAnc80, варианты любых известных или указанных AAV или AAV, которые еще предстоит обнаружить, или их варианты или смеси. См., например, WO 2005/033321, которая включена в данную заявку посредством ссылки. В одном варианте воплощения изобретения капсид AAV представляет собой капсид AAV9 или его вариант. В некоторых вариантах воплощения изобретения капсидный белок обозначается цифрой или комбинацией цифр и букв, следующих за термином „AAV“ в названии вектора rAAV. В одном варианте воплощения изобретения предоставлен rAAV (AAV9.CB7.CI.hSNAGLUco.rBG), содержащий капсид AAV серотипа 9 (AAV9) и геном вектора, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4 (AAV.CB7.CI.hSNAGLUco.rBG).

В контексте данного документа, термин „вариант“, по отношению к AAV, означает любую последовательность AAV, которая получена от известной последовательности AAV, включая последовательности с консервативной заменой аминокислот и те, которые имеют 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% или более идентичности последовательности по сравнению с последовательностью аминокислоты или нуклеиновой кислоты. В другом варианте воплощения изобретения капсид AAV включает варианты, которые могут включать до приблизительно 10% отклонения от любой описанной или известной последовательности капсида AAV. То есть капсид AAV имеет от приблизительно 90% идентичности до

приблизительно 99,9% идентичности, от приблизительно 95% до приблизительно 99% идентичности, или от приблизительно 97% идентичности до приблизительно 98% идентичности с капсидом AAV, предложенным в данной заявке и/или известным в данной области техники. В одном варианте воплощения изобретения капсид AAV идентичен по меньшей мере на 95% капсиду AAV. При определении процентной идентичности капсида AAV сравнение может проводиться по любому из переменных белков (например, vp1, vp2 или vp3). ITR или другие компоненты AAV могут быть легко выделены или получены способом генной инженерии с использованием способов, доступных специалистам в данной области техники из AAV. Такой AAV может быть выделен, получен способом генной инженерии или получен из академических, коммерческих или общественных источников (например, Американская коллекция типовых культур, Manassas, VA).

Альтернативно, последовательности AAV могут быть получены способом генной инженерии с помощью синтетических или других подходящих средств посредством ссылки на опубликованные последовательности, такие как доступные в литературе или в базах данных, таких как, например, GenBank, PubMed или тому подобное. Вирусы AAV могут быть получены способом генной инженерии с помощью традиционных способов молекулярной биологии, что позволяет оптимизировать эти частицы для клеточной специфичной доставки последовательностей нуклеиновых кислот, для минимизации иммуногенности, для настройки стабильности и времени жизни частиц, для эффективного распада, для точной доставки в ядро и т.д.

В контексте данного документа, термины „гAAV“ и „искусственный AAV“, используемые взаимозаменяемо, означают, без ограничения, AAV, содержащий капсидный белок и упакованный в нем геном вектора, где геном вектора содержит нуклеиновую кислоту, гетерологичную AAV. В одном варианте воплощения изобретения капсидный белок представляет собой не встречающийся в природе капсид. Такой искусственный капсид может быть получен любым подходящим способом с использованием выбранной последовательности AAV (например, фрагмента капсидного белка vp1) в комбинации с гетерологичными последовательностями, которые могут быть получены из другой выбранной AAV, несмежной части той же AAV, из вирусного источника, отличного от AAV, или из не вирусного источника. Искусственный AAV может быть, без ограничения, псевдотипированным AAV, химерным капсидом AAV, рекомбинантным капсидом AAV или „гуманизированным“ капсидом AAV. Псевдотипированные векторы, в которых капсид одного AAV заменен гетерологичным капсидным белком, являются полезными в данном изобретении. В одном варианте воплощения изобретения AAV2/5 и AAV2/8 являются иллюстративными псевдотипированными векторами.

Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, включая трансфекцию, электропорацию, доставку липосом, способы слияния мембран, гранулы ДНК, покрытые при высокой скорости, вирусную инфекцию и слияние протопластов. Способы, используемые для создания таких конструкций, известны

специалистам в области манипулирования нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические способы. См., например, Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

В контексте данного документа, термин „капсид AAV9“ относится к AAV9, имеющему аминокислотную последовательность (а) номер доступа GenBank: AAS99264, который включен в данную заявку посредством ссылки, и капсидный белок AAV vpl, который воспроизводится в SEQ ID NO: 6, и/или (б) аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, номер доступа GenBank: AY530579.1: (nt 1..2211) (воспроизводится в SEQ ID NO: 7). Некоторое отклонение от этой кодированной последовательности охватывается настоящим изобретением, и может включать в себя последовательности, имеющие приблизительно 99% идентичности приведенной в ссылке аминокислотной последовательности с номером доступа GenBank: AAS99264 и US7906111 (также WO 2005/033321) (т.е. менее чем приблизительно 1% отклонения от указанной последовательности). Такая AAV может включать, например, природные изоляты (например, hu68 (описанные в одновременно рассматриваемых заявке на патент США US No. 62/464748, поданной 28 февраля 2017 г., и заявке на патент США US No. 62/591002, поданной 27 ноября 2019 г., обе имеют название „Novel Adeno-associated virus (AAV) Clade F Vector and Uses Therefor“ и WO 2018/160582), hu31 или hu32) или варианты AAV9, имеющие аминокислотные замещения, делеции или добавления, например, включая, но не ограничиваясь приведенным, аминокислотные замещения, выбранные из альтернативных остатков, „мобилизованных“ из соответствующего положения в любом другом капсиде AAV, выровненном с капсидом AAV9; например, таком как описано в патентах США US 9102949, US 8927514, US2015/349911; WO 2016/049230A11; US 9623120; US 9585971. Однако в других вариантах воплощения изобретения могут быть выбраны другие варианты капсидов AAV9 или AAV9, имеющие по меньшей мере приблизительно 95% идентичности с указанными выше последовательностями. См., например, опубликованную патентную заявку США US No. 2015/0079038. Описаны способы получения капсида, его кодирующие последовательности и способы получения вирусных векторов гAAV. Смотри, например, Gao, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (10), 6081-6086 (2003) и заявку на патент США US 2013/0045186A1.

В одном варианте воплощения изобретения гAAV, согласно настоящему описанию, является самокомплементарным AAV. „Самокомплементарный AAV“ относится к конструкту, в котором кодирующая область, переносимая рекомбинантной последовательностью нуклеиновой кислоты AAV, была разработана для формирования внутримолекулярной двухцепочечной матрицы ДНК. При инфицировании, а не в ожидании клеточно-опосредованного синтеза второй цепи, две комплементарные половины scAAV будут ассоциироваться, образуя одно звено 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. Самодополняющие AAV описаны, например, в патентах США US No. 6596535; 7125717; и 7456683, каждый из которых полностью включен в данную заявку посредством ссылки.

В определенных вариантах воплощения изобретения гAAV, описанный в данной заявке, является устойчивым к нуклеазам. Такая нуклеаза может представлять собой одну нуклеазу или смеси нуклеаз и может быть эндонуклеазами или экзонуклеазами. Устойчивый к нуклеазе гAAV указывает на то, что капсид AAV был полностью собран и защищает эти упакованные геномные последовательности от распада (дигестии) во время этапов инкубации нуклеазы, предназначенных для удаления загрязняющих нуклеиновых кислот, которые могут присутствовать в результате процесса получения. Во многих случаях описанный в данной заявке гAAV является устойчивым к ДНКазе.

Описанный в данной заявке рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV) может быть создан с использованием известных методик. См., например, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Такой способ включает культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсид AAV; функциональный ген гер; кассету экспрессии, согласно настоящему описанию, с перевернутыми концевыми повторами AAV (ITR) по сторонам; и достаточные вспомогательные функции, позволяющие упаковывать кассету экспрессии в капсидный белок AAV. В данной заявке также предложена клетка-хозяин, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсид AAV; функциональный ген гер; геном вектора, как описано; и достаточные вспомогательные функции, позволяющие упаковывать геном вектора в капсидный белок AAV. В одном варианте воплощения изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку НЕК 293. Эти способы более подробно описаны в WO2017160360 A2, которая включена в данную заявку посредством ссылки.

Могут быть использованы другие способы получения гAAV, доступные специалисту в данной области техники. Подходящие способы могут включать, без ограничения, бакуловирусную систему экспрессии или продуцирование через дрожжи. См., например, Robert M. Kotin, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Mol Genet.* 2011 Apr 15; 20(R1): R2-R6. Опубликовано онлайн 2011 Apr 29. doi: 10.1093/hmg/ddrl41; Aucoin MG et al, Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnol Bioeng.* 2006 Dec 20;95(6): 1081-92; SAMI S. THAKUR, Production of Recombinant Adeno-associated viral vectors in yeast. Thesis presented to the Graduate School of the University of Florida, 2012; Kondratov O et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells, *Mol Ther.* 2017 Aug 10. pii: S1525-0016(17)30362-3. doi:10.1016/j.ymthe.2017.08.003. [Epub ahead of print]; Mietzsch M et al, OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal

Encapsidation of Foreign DNA. *Hum Gene Ther Methods*. 2017 Feb;28(1): 15-22. doi: 10.1089/hgtb.2016.164.; Li L et al. Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes: a eukaryotic source of DNA for gene transfer. *PLoS One*. 2013 Aug 1;8(8):e69879. doi: 10.1371/journal.pone.0069879. Print 2013; Galibert L et al, Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. *J Invertebr Pathol*. 2011 Jul;107 Suppl:S80-93. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.008; and Kotin RM, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Mol Genet*. 2011 Apr 15;20(R1):R2-6. doi: 10.1093/hmg/ddr141. Epub 2011 Apr 29.

Двухэтапную аффинную хроматографическую очистку при высокой концентрации соли с последующей хроматографией на анионообменной смоле используют для очистки лекарственного препарата на основе вектора и для удаления пустых капсидов. Эти способы более подробно описаны в заявке WO 2017/160360 под названием „Масштабируемый способ очистки AAV9“, которая включена в данную заявку посредством ссылки. Вкратце, способ отделения частиц гAAV9, имеющих упакованные геномные последовательности, от геном-дефицитных интермедиатов AAV9 включает в себя подвергание суспензии, содержащей рекомбинантные вирусные частицы AAV9 и капсидные интермедиаты AAV9, действию быстродействующей жидкостной хроматографии, где вирусные частицы AAV9 и интермедиаты AAV9 связываются с сильной анионообменной смолой, уравновешенной при pH 10,2, и подвергание действию градиента соли при контроле элюата на поглощение ультрафиолета при приблизительно 260 и приблизительно 280. Хотя это менее оптимально для гAAV9, pH может находиться в диапазоне приблизительно от 10,0 до 10,4. В этом способе полные капсиды AAV9 собирают из фракции, которая элюируется, когда соотношение A260/A280 достигает точки перегиба. В одном примере, для стадии аффинной хроматографии, диафильтованный продукт может быть нанесен на аффинную смолу Capture Select™ Poros-AAV2/9 (Life Technologies), которая эффективно захватывает серотип AAV2/9. В этих ионных условиях значительный процент остаточной клеточной ДНК и белков течет через колонку, в то время как частицы AAV эффективно захватываются.

Обычные способы для характеристики или количественного определения гAAV доступны специалисту в данной области техники. Чтобы рассчитать содержание пустых и полных частиц, объемы полос VP3 для выбранного образца (например, в приведенных в данной заявке примерах, препарат иодиксанола, очищенный градиентной фильтрацией, где количество ГК=количество частиц) нанесены на график относительно загруженных частиц ГК. Полученное линейное уравнение ($y=mx+c$) используется для расчета количества частиц в объемах полос пиков исследуемого препарата. Количество частиц (pt) на 20 мкл навески затем умножают на 50, чтобы получить частицы (pt)/мл. Pt/мл, деленное на ГК/мл, дает соотношение частиц к геномным копиям (pt/ГК). Pt/мл-ГК/мл дает пустые pt/мл. Пустые pt /мл, деленные на pt /мл и умноженные на 100, дают процент пустых частиц. Как правило, в данной области техники известны способы анализа пустых

капсидов и векторных частиц AAV с упакованными геномами. См., например, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6: 1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7: 122- 128. Чтобы протестировать денатурированный капсид, способы включают обработку обработанного исходного материала AAV электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле, состоящем из любого геля, способного разделять три белка капсида, например, градиентном геле, содержащем 3-8% трис-ацетата в буфере. Затем прогоняют гель до отделения материала образца и промокают гель на нейлоновых или нитроцеллюлозных мембранах, предпочтительно нейлоновых.

Капсидные анти-AAV антитела затем используют в качестве первичных антител, которые связываются с денатурированными капсидными белками, предпочтительно с моноклональным анти-AAV антителом, наиболее предпочтительно с моноклональным антителом против AAV-2 B1 (Wobus et al., *J. Viral.* (2000) 74:9281-9293). Затем используется вторичное антитело, которое связывается с первичным антителом и содержит средства для обнаружения связывания с первичным антителом, более предпочтительно, анти-IgG-антитело, содержащее молекулу детекции, ковалентно связанную с ним, наиболее предпочтительно овечье анти-мышинное IgG антитело, ковалентно связанное с пероксидазой хрена. Способ обнаружения связывания используется для полуколичественного определения связывания между первичными и вторичными антителами, предпочтительно используют способ обнаружения, способный обнаруживать радиоактивные изотопные излучения, электромагнитное излучение или колориметрические изменения, наиболее предпочтительно набор для обнаружения хемилюминесценции. Например, для ДНС-ПААГ образцы из фракций колонки можно отбирать и нагревать в загрузочном буфере ДНС-ПААГ, содержащем восстановитель (например, ДТТ), и капсидные белки разделяли на предварительно отлитых градиентных полиакриламидных гелях (например, Novex).

Окрашивание серебром может быть выполнено с использованием SilverXpress (Invitrogen, CA) в соответствии с инструкциями изготовителя или при помощи другого подходящего способа окрашивания, т.е. рубинового или кумасси SYPRO красителей. В одном варианте воплощения изобретения концентрацию векторных геномов AAV (vg) во фракциях колонки можно измерить с помощью количественной ПЦР в реальном времени (Q-ПЦР). Образцы разбавляют и расщепляют ДНКазой I (или другой подходящей нуклеазой) для удаления экзогенной ДНК. После инактивации нуклеазы образцы дополнительно разбавляют и амплифицируют, используя праймеры и флуорогенный зонд TaqMan™, специфичный для последовательности ДНК между праймерами. Количество циклов, необходимое для достижения определенного уровня флуоресценции (пороговый цикл, Ct), измеряют для каждого образца в системе обнаружения последовательностей Applied Biosystems Prism 7700. Плазмидную ДНК, содержащую последовательности, идентичные тем, которые содержатся в векторе AAV, используют для получения стандартной кривой в реакции Q-ПЦР. Пороговые значения циклов (Ct), полученные из образцов, используют для определения титра векторного генома путем его нормализации

до значения C_t стандартной кривой плазмиды. Можно также использовать анализы конечных точек на основе цифровой ПЦР.

В одном аспекте используется оптимизированный способ qПЦР, в котором используется сериновая протеаза широкого спектра действия, например протеиназа К (например, коммерчески доступная от Qiagen). Более конкретно, оптимизированный анализ титра генома qПЦР аналогичен стандартному анализу, за исключением того, что после расщепления ДНКазой I образцы разбавляют буфером протеиназы К и обрабатывают протеиназой К с последующей тепловой инактивацией. Подходящие образцы разбавляют буфером протеиназы К в количестве, равном размеру образца. Буфер протеиназы К может быть сконцентрирован в 2 раза или более. Обычно обработка протеиназой К составляет приблизительно 0,2 мг/мл, но может варьироваться от 0,1 до примерно 1 мг/мл. Стадия обработки обычно проводится при температуре приблизительно 55 °C в течение приблизительно 15 минут, но может выполняться при более низкой температуре (например, от приблизительно 37° C до приблизительно 50 °C) в течение более длительного периода времени (например, от приблизительно 20 минут до приблизительно 30 минут) или более высокой температуре (например, до приблизительно 60 °C) в течение более короткого периода времени (например, приблизительно от 5 до 10 минут).

Аналогично, инактивация нагреванием обычно происходит при температуре приблизительно 95 ° C в течение приблизительно 15 минут, но температура может быть снижена (например, от приблизительно 70 до приблизительно 90 ° C), а время может быть увеличено (например, от приблизительно 20 минут до приблизительно 30 минут). Затем образцы разбавляют (например, в 1000 раз) и подвергают анализу TaqMan, как описано в стандартном анализе.

Дополнительно или в качестве альтернативы может использоваться капельная цифровая ПЦР (ddПЦР). Например, были описаны способы определения титров одноцепочечных и самокомплементарных векторных геномов AAV с помощью ddПЦР. См., например, M Lock et al, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

Также доступны способы Vamseedhar Rayaprolu et al, Comparative Analysis of Adeno- Associated Virus Capsid Stability and Dynamics, J Virol. 2013 Dec; 87(24): 13150-13160; Buller RM, Rose JA. 1978. Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. J. Virol. 25:331-338; и Rose JA, Maizel JV, Inman JK, Shatkin AJ. 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. J. Virol. 8:766-770.

В контексте данного документа, термин „лечение“ относится к композиции (ям) и/или способу(ам) для улучшения одного или более симптомов MPS IIIБ, восстановления желаемой функции NAGLU или улучшения биомаркера заболевания. В некоторых вариантах воплощения изобретения термин „лечение“ определяется как охватывающий введение субъекту одной или более композиций, описанных в данной заявке, для целей, указанных в данной заявке.

Таким образом, термин „лечение“ может включать одно или более из следующего: уменьшение возникновения или прогрессирования MPS IIIВ, предотвращение заболевания, уменьшение тяжести симптомов заболевания, замедление их прогрессирования, устранение симптомов заболевания, задержку прогрессирования заболевания или повышение эффективности терапии у данного субъекта.

Следует понимать, что композиции в rAAV, описанные в данной заявке, предназначены для применения с другими композициями, режимами, аспектами, вариантами воплощения изобретения и способами, описанным в разделе Описание.

5. Фармацевтическая композиция

В одном аспекте в данной заявке предлагается фармацевтическая композиция, содержащая вектор, согласно настоящему описанию, в буферной смеси. В одном варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция подходит для совместного введения с функциональным белком hNAGLU или белком, содержащим функциональный hNAGLU. В одном варианте воплощения изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая rAAV, согласно настоящему описанию, в буферной смеси. В одном варианте воплощения изобретения, rAAV составлен в композицию в количестве от приблизительно 1×10^9 геномных копий (ГК)/мл до приблизительно 1×10^{14} ГК/мл. В дополнительном варианте воплощения изобретения rAAV составлен в композицию в количестве от приблизительно 3×10^9 ГК/мл до приблизительно 3×10^{13} ГК/мл. В еще одном дополнительном варианте воплощения изобретения rAAV составлен в композицию в количестве от приблизительно 1×10^9 ГК/мл до приблизительно 1×10^{13} ГК/мл. В одном варианте воплощения изобретения rAAV составлен в композицию в количестве по меньшей мере приблизительно 1×10^{11} ГК/мл.

В одном варианте воплощения изобретения композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, консервант, наполнители и/или буфер, растворенные в водной суспендирующей жидкости. В одном варианте воплощения изобретения буфер представляет собой фосфатно-буферный солевой раствор (PBS). В другом варианте воплощения изобретения буфер представляет собой искусственную спинномозговую жидкость (aCSF), например буфер для приготовления препарата Элиотта; или перфузионную жидкость аппарата Harvard (искусственная CSF с конечной концентрацией ионов (в mM): Na 150; K 3,0; Ca 1,4; Mg 0,8; P 1,0; Cl 155). Известны различные подходящие растворы, включая те, которые включают один или более из: буферного солевого раствора, поверхностно-активного вещества и физиологически совместимой соли или смеси солей, доведенных до ионной силы, эквивалентной от приблизительно 100 mM хлорида натрия (NaCl) до приблизительно 250 mM хлорида натрия или физиологически совместимой соли, доведенной до эквивалентной ионной концентрации.

Соответственно, композицию доводят до физиологически приемлемого pH, например, в диапазоне pH от 6 до 8, или от 6,5 до 7,5, от 7,0 до 7,7 или от 7,2 до 7,8. Поскольку pH спинномозговой жидкости составляет от приблизительно 7,28 до приблизительно 7,32, для интратекальной доставки может быть желательно значение pH в

этом диапазоне; тогда как для внутривенной доставки может быть желательно pH от 6,8 до приблизительно 7,2. Однако другие значения pH в самых широких пределах и эти поддиапазоны могут быть выбраны для другого маршрута доставки.

Подходящее поверхностно-активное вещество или комбинация поверхностно-активных веществ могут быть выбраны из неионных поверхностно-активных веществ, которые являются нетоксичными. В одном варианте воплощения изобретения выбирают поверхностно-активное вещество на основе дифункционального блок-сополимера, с концевыми первичными гидроксильными группами, например, такое как Pluronic® F68 [BASF], также известное как Полоксамер 188, которое имеет нейтральный pH и среднюю молекулярную массу 8400. Могут быть выбраны другие поверхностно-активные вещества и другие полоксамеры, т.е. неионогенные триблок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (полипропиленоксида), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (полиэтиленоксида), SOLUTOL HS 15 (Macrogol-15 гидроксистеарат), LABRASOL (полиоксиакриловый глицерид), полиокси 10 олеиловый эфир, TWEEN (сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот), этанол и полиэтиленгликоль. В одном варианте воплощения изобретения композиция содержит полоксамер. Эти сополимеры обычно обозначают буквой „P“ (для полоксамера), за которой следуют три цифры: первые две цифры, умноженные на 100, дают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового ядра, а последняя цифра, умноженная на 10, обозначает процентное содержание полиоксиэтилена. В одном варианте воплощения изобретения выбран Полоксамер 188. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в количестве от приблизительно 0,0005% до приблизительно 0,001% от суспензии.

В одном примере композиция может содержать, например, буферный солевой раствор, содержащий одно 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 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), двухосновного фосфата натрия и их смеси, в воде. Соответственно, для интратекальной доставки осмолярность находится в диапазоне, совместимом с спинномозговой жидкостью (например, от приблизительно 275 до приблизительно 290); см., например, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview. Необязательно, для интратекальной доставки можно использовать коммерчески доступный разбавитель в качестве суспендирующего агента или в комбинации с другим суспендирующим агентом и другими необязательными наполнителями. См., например, раствор Elliotts B® [Lukare Medical].

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

Дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая

фармацевтически приемлемый носитель и вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный NAGLU, согласно настоящему описанию. В контексте данного документа, термин „носитель“ включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, основы, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и тому подобное. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции. Средства доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и тому подобное, могут использоваться для введения композиций в соответствии с данным изобретением в подходящие клетки-хозяева. В частности, вектор rAAV может быть составлен для доставки инкапсулированным в липидную частицу, липосому, везикулу, наносферу, либо наночастицу или тому подобное. В одном варианте воплощения изобретения терапевтически эффективное количество указанного вектора включено в фармацевтическую композицию.

Выбор носителя не является ограничением настоящего изобретения. Другие общепринятые фармацевтически приемлемые носители представляют собой консерванты или химические стабилизаторы. Подходящие типичные консерванты включают хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновую кислоту, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол и параклорфенол. Подходящие химические стабилизаторы включают желатин и альбумин.

Фраза „фармацевтически приемлемый“ относится к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают аллергическую или подобную неблагоприятную реакцию при введении хозяину.

В контексте данного документа, термин „дозировка“ или „количество“ может относиться к общей дозировке или количеству, доставляемому субъекту в ходе лечения, или дозировке или количеству, доставляемому за одно введение (или многократной дозе или дробной дозе).

Дополнительно, композиции вирусов с дефектом репликации могут быть составлены в композиции в единицах дозировок, чтобы содержать количество вируса с дефектом репликации, которое находится в диапазоне от приблизительно $1,0 \times 10^9$ ГК до приблизительно $1,0 \times 10^{16}$ ГК (для лечения среднего субъекта (70 кг массы тела), включая все целые или дробные количества в пределах диапазона, и предпочтительно от $1,0 \times 10^{12}$ ГК до $1,0 \times 10^{14}$ ГК для человеческого пациента. В одном варианте воплощения изобретения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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 ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте воплощения изобретения композиции составлены так, чтобы они содержали 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

$\times 10^{10}$ ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте воплощения изобретения композиции составлены так, чтобы они содержали по меньшей мере 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , и, 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} или 9×10^{11} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона.

В другом варианте воплощения изобретения композиции составлены так, чтобы они содержали 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} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона.

В другом варианте воплощения изобретения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона.

В другом варианте воплощения изобретения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте воплощения изобретения композиции составлены так, чтобы они содержали 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} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона.

В одном варианте воплощения изобретения для применения на человеке доза может составлять от 1×10^{10} до приблизительно 1×10^{12} ГК на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона.

В одном варианте воплощения изобретения фармацевтическую композицию, содержащую гAAV, согласно настоящему описанию, вводят в дозе от приблизительно 1×10^9 ГК на грамм массы мозга до приблизительно 1×10^{14} ГК на грамм массы мозга.

Описанные в данной заявке водные суспензии или фармацевтические композиции предназначены для доставки субъектам, нуждающимся в этом, любым подходящим маршрутом или комбинацией различных маршрутов. В одном варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция составлена для доставки посредством интрацеребровентрикулярной (ICV), интратекальной (IT) или интракостеральной инъекции. В одном варианте воплощения изобретения композиции, описанные в данной заявке, предназначены для доставки субъектам, нуждающимся в этом, путем внутривенной инъекции. Альтернативно, могут быть выбраны другие пути введения (например, пероральный, ингаляционный, интраназальный, интратрахеальный, внутриартериальный, внутриглазной, внутримышечный и другие парентеральные маршруты).

В контексте данного документа, термины „интратекальная доставка“ или „интратекальное введение“ относятся к пути введения лекарств через инъекцию в позвоночный канал, более конкретно в субарахноидальное пространство, так что

лекарство достигает спинномозговой жидкости (CSF). Интратекальная доставка может включать в себя люмбальную пункцию, внутрижелудочковую, 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 быть в *cisterna magna*. Интрацистермальная доставка может увеличить диффузию вектора и/или уменьшить токсичность и воспаление, вызванное введением. См., например, Christian Hinderer et al, Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the *cisterna magna*, *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2014; 1: 14051. Опубликовано online 2014 Dec 10. doi: 10.1038/mtm.2014.51

В контексте данного документа, термины „интрацистермальная доставка“ или „интрацистермальное введение“ относятся к способу введения лекарственных средств непосредственно в спинномозговую жидкость желудочков головного мозга или в *cisterna magna cerebellomedullaris*, более конкретно, через субокципитальную пункцию или путем прямой инъекции в *cisterna magna* или через постоянно установленную трубку. На Фиг. 6 представлена иллюстрация того, как следует делать интрацистермальную инъекцию. Следует понимать, что композиции в фармацевтической композиции, описанной в данной заявке, предназначены для применения с другими композициями, режимами, аспектами, вариантами воплощения изобретения и способами, описанными в разделе Описание.

6. Способ лечения

В одном аспекте в данной заявке предложен способ лечения человеческого субъекта, у которого диагностирован MPS IIIB. В настоящее время, когда есть клиническое подозрение на MPS III, первым шагом является запрос количественного теста для выявления присутствия GAG в моче при помощи спектрофотометрических способов с использованием диметилметиленового синего (DMB). Тест DMB основан на соединении GAG с диметилметиленовым синим и количественном определении комплекса GAG-DMB с помощью спектрофотометра. Чувствительность этого теста составляет 100%, а специфичность составляет 75-100%. Негативный результат при обнаружении GAG в моче не исключает наличия MPS III в связи с тем, что у некоторых пациентов с ослабленными формами заболевания уровни экскреции GAG со здоровыми контролями могут перекрываться и повышенную экскрецию гепарансульфата в MPS III можно игнорировать. В настоящее время золотым стандартом диагностики является определение активности фермента в культивированных фибробластах кожи, лейкоцитах, плазме или сыворотке. Конкретный диагноз MPS IIIB подтверждается показом уменьшения или отсутствия одной из ферментативных активностей NAGLU, связанных с деградацией гепарансульфата в лейкоцитах или фибробластах пациента; снижение должно быть менее 10% по сравнению с активностью у здоровых людей, с нормой в отношении других сульфатаз.

Поскольку заболевание, связанное с дефицитом множественных сульфатаз, также показывает снижение активности гепаран-N-сульфатазы, N-ацетилглюкозамин-6-

сульфатазы и других сульфатаз, для подтверждения диагноза MPS III необходим биохимический анализ по меньшей мере другой сульфатазы, чтобы, таким образом исключить дефицит множественных сульфатаз. Однако способ диагностики не является ограничением настоящего изобретения, и могут быть выбраны другие подходящие способы.

Способ включает введение субъекту суспензии вектора, согласно настоящему описанию. В одном варианте воплощения изобретения способ включает введение субъекту суспензии gAAV, согласно настоящему описанию, в буфере для препарата в дозе от приблизительно 1×10^9 ГК на грамм массы мозга до приблизительно 1×10^{14} ГК на грамм массы мозга.

Композиция(и) и способ(ы) обеспечивают эффективность при лечении субъекта с MPS IIIB, нуждающегося в лечении. Эффективность этого способа у субъекта может быть показана путем оценки (а) увеличения ферментативной активности NAGLU; (б) облегчение симптома MPS IIIB; (в) улучшения связанных с MPS IIIB биомаркеров, например уровней GAG в полиамине (например, спермине) в спинномозговой жидкости (CSF), сыворотке, моче и/или других биологических образцах; или (г) усиления любого лечения MPS IIIB. В определенных вариантах воплощения изобретения эффективность может быть определена путем мониторинга улучшения когнитивных функций и/или коррекции тревожности, улучшения походки и/или подвижности, снижения частоты и/или тяжести тремора, уменьшения захвата/спазмов, улучшения осанки, улучшения непрозрачности роговицы. Примеры подходящих балльных систем настоящим включены в данный раздел. Дополнительно или альтернативно, эффективность способа может быть предсказана на основе модели на животных. Один пример подходящей мышинной модели описан в Примере 1.

В другом варианте воплощения изобретения была разработана многопараметрическая шкала баллов (см. Фиг. 5, включенную в данную заявку в качестве ссылки), чтобы оценить коррекцию заболевания и реакцию на векторную терапию MPSIIIA, описанную в данной заявке на модели животного. Животным присваивается балл на основании оценки комбинации тремора, осанки, качества меха, захвата, помутнения роговицы и походки/подвижности. В определенных вариантах воплощения изобретения любая комбинация одного или более из этих факторов может использоваться для демонстрации эффективности, отдельно или в комбинации с другими факторами. См. Burkholder et al. Curr Protoc Mouse Biol. June 2012, 2: 145-65; Tumpey et al. J Virol. May 1998, 3705-10; and Guyenet et al. J Vis Exp, May 2010, 39; 1787). Улучшение когнитивных функций и коррекцию тревожности у пролеченных животных оценивают путем оценки движения в открытом поле (т.е. измерения прерывания луча, как описано, например, в Tatem et al. J Vis Exp, 2014, (91):51785) или оценкой с использованием приподнятого крестообразного лабиринта (как описано, например, в Waif and Frye, Nat Protoc, 2007, 2(2): 322-328).

В контексте данного документа, термин „ускорение любого лечения для MPS IIIB“

или любого его грамматического варианта относится к уменьшенной дозировке или более низкой частоте лечения MPS IIIB для субъекта, отличного от композиции(ий) или способа(ов), впервые раскрытых в изобретении, по сравнению со стандартным лечением без введения описанной композиции(ий) и без использования описанного способа(ов).

Примеры подходящего лечения, ускоряемого композицией (ями) или способом (ами), описанными в данной заявке, могут включать, но не ограничиваться, следующим:

(а) лекарства, используемые для облегчения симптомов (таких как судороги и нарушения сна) и улучшения качества жизни;

(б) трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, такая как трансплантация костного мозга или трансплантация пуповинной крови (см., например, Vellodi A, Young E, New M, Pot-Mees C, Hugh-Jones K. Bone marrow transplantation for Sanfilippo disease type B. *J Inher Metab Dis*. 1992;15: 911-8; Garbuzova-Davis, S, Willing, AE, Desjarlais, T, et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells benefits an animal model of Sanfilippo syndrome type B. *Stem Cells Dev*. 2005; 14:384-394; and Garbuzova-Davis, S, Klasko, SK, and Sanberg, PR. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in an animal model of MPS III B. *J Comp Neurol*. 2009; 515:93-101.);

(в) энзимозаместительная терапия (ERT) (например, посредством внутривенного введения или внутрицеребровентрикулярной инфузии, см., например, Aoyagi-Scharber M et al, Clearance of Heparan Sulfate and Attenuation of CNS Pathology by Intracerebroventricular BMN 250 (NAGLU-IGF2) in Sanfilippo Type B Mice, *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017 Jun 6;6:43-53. doi: 10.1016/j.omtm.2017.05.009. eCollection 2017 Sep 15; and Alexion Pharmaceuticals. Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics/Efficacy of SBC-103 in MPS IIIB. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine (US). 2000, доступно от: clinicaltrials.gov/show/NCT02324049. NLM identifier: NCT02324049.);

(г) субстрат-редуцирующую терапию (например, лечение генистеином). Delgadillo V et al. Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J Inher Metab Dis*. 2011 Oct;34(5): 1039-44. doi: 10.1007/sl0545-011-9342-4. Epub 2011 May 10; Piotrowska E et al, Two-year follow-up of Sanfilippo Disease patients treated with a genistein-rich isoflavone extract: assessment of effects on cognitive functions and general status of patients. *Med Sci Monit*. 2011 Apr; 17(4):CR196-202; and Piotrowska, E et al, Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for sanfilippo syndrome: an openlabel, pilot study in 10 pediatric patients. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp*. 2008;69: 166-179);

(д) шапероновая терапия (см. IGF2 in Kan SH, Troitskaya LA, Sinow CS,

Haitz K, Todd AK, Di Stefano A, et al. Insulin-like growth factor II peptide fusion enables uptake and lysosomal delivery of alpha-N-acetylglucosaminidase to mucopolysaccharidosis type IIIB fibroblasts. *Biochem J*. 2014;458:281-9; HIRMAb in Boado RJ, Lu JZ, Hui EK, Lin H, Pardridge WM. Insulin Receptor Antibody alpha-N-Acetylglucosaminidase Fusion Protein Penetrates the Primate Blood-Brain Barrier and Reduces Glycosaminoglycans in Sanfilippo Type B Fibroblasts. *Mol Pharm*. 2016; 13: 1385-92; CpGH89 inhibitor in Ficko-Blean, E, Stubbs, KA, Nemirovsky, O, et al. Structural and

mechanistic insight into the basis of mucopolysaccharidosis IIIB. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105:6560- 6565; and Zhao, KW and Neufeld, EF. Purification and characterization of recombinant human alpha-N- acetylglucosaminidase secreted by Chinese hamster ovary cells. Protein Expr Purif. 2000; 19:202-211); а также

(е) любая их комбинация. В одном варианте воплощения изобретения описанный способ приводит к тому, что субъект демонстрирует улучшение биомаркеров, связанных с MPS IIIB.

„Увеличение ферментативной активности NAGLU“ используется взаимозаменяемо с термином „увеличение желаемой функции NAGLU“ и относится к активности NAGLU по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или приблизительно 100% от диапазона ферментов NAGLU для здорового пациента. Ферментативная активность NAGLU может быть измерена с помощью анализа, согласно настоящему описанию. В одном варианте воплощения изобретения ферментативная активность NAGLU может быть измерена в сыворотке, плазме, крови, моче, CSF или другом биологическом образце. В одном варианте воплощения изобретения введение композиции, согласно настоящему описанию, или применение способа, согласно настоящему описанию, приводят к увеличению ферментативной активности NAGLU в сыворотке, плазме, слюне, моче или других биологических образцах. Альтернативно, уровни CSF GAG и другие биомаркеры CSF, такие как уровни спермина, могут быть измерены для определения терапевтического эффекта. См., например, WO 2017/136533.

Нейрокогнитивность можно определить обычными способами, см. например, WO2017/136500 A1. Профилактика нейрокогнитивного снижения относится к замедлению нейрокогнитивного снижения у субъекта, которому вводили композицию, описанную в данной заявке, или которого лечили при помощи способа, описанного в данной заявке по меньшей мере приблизительно на 5% по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% или приблизительно на 100% по сравнению с пациентом с MPS IIIB.

В контексте данного документа, термины „биомаркер“ или „связанный с MPS IIIB биомаркер“ относятся к наличию, концентрации, уровню экспрессии или активности биологической или химической молекулы в биологическом образце субъекта, который коррелирует с прогрессированием или развитием MPS IIIB в позитивном или негативном

аспекте. В одном варианте воплощения изобретения биомаркером являются уровни GAG в спинномозговой жидкости (CSF), сыворотке, моче, фибробластах кожи, лейкоцитах, плазме или любых других биологических образцах. В другом варианте воплощения изобретения биомаркер оценивается с использованием клинической химии. В еще одном варианте воплощения изобретения биомаркер представляет собой объем печени или селезенки. В одном варианте воплощения изобретения биомаркером является активность гепаран-N-сульфатазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазы и других сульфатаз. В другом варианте воплощения изобретения биомаркером является уровень спермина в CSF, сыворотке или другом биологическом образце. В еще одном варианте воплощения изобретения биомаркером является активность лизосомального фермента в сыворотке, CSF или другом биологическом образце. В одном варианте воплощения изобретения биомаркер оценивают с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга.

В другом варианте воплощения изобретения биомаркер представляет собой нейрокогнитивную оценку, измеренную с помощью нейрокогнитивного теста развития. Используемая в данной заявке фраза „улучшение биомаркера“ означает уменьшение биомаркера, положительно коррелирующего с прогрессированием заболевания, или увеличение биомаркера, негативно коррелирующего с прогрессированием заболевания, где уменьшение или увеличение составляет по меньшей мере приблизительно 5% по меньшей мере приблизительно 20% по меньшей мере приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или приблизительно 100% по сравнению с таковым перед введением композиции, согласно настоящему описанию, или использованием способа, согласно настоящему описанию.

В одном варианте воплощения изобретения способ дополнительно включает обнаружение или мониторинг биомаркеров, связанных с MPS IIIB, у субъекта до начала терапии с помощью терапии, предложенной в данной заявке. В одном аспекте способ включает обнаружение биомаркера, который представляет собой полиамин (такой как спермин), в образце, взятом у субъекта (см. WO/2017/136533, которая включена в данную заявку посредством ссылки). Таким образом, в одном варианте воплощения изобретения способ включает обнаружение спермина в образце пациента для целей диагностики пациента с MPSIIIB. В другом варианте воплощения изобретения уровни концентрации спермина в образце пациента обнаруживают для мониторинга эффективности лечения MPSIIIB с использованием вектора, согласно настоящему описанию. В настоящее время пациенты с MPSIIIB не считаются кандидатами на трансплантацию костного мозга (BMT), субстрат-редуцирующую терапию (SRT) или фермент-заместительную терапию (ERT).

Однако в определенных вариантах воплощения изобретения пациент генной

терапии, пролеченный вектором, экспрессирующим NAGLU, описанным в данной заявке, имеет, как минимум, достаточные уровни экспрессии фермента, чтобы любые уровни фермента ниже нормального диапазона можно было лечить с помощью ERT или SRT. Такая ERT может представлять собой совместную терапию, при которой дозу ERT контролируют и модулируют в течение месяцев или лет после введения вектора. Дополнительно или альтернативно, SRT может представлять собой совместную терапию, в которой дозу SRT контролируют и модулируют в течение месяцев или лет после введения вектора. Дополнительно или альтернативно, шапероновая терапия может представлять собой совместную терапию, в которой дозу шапероновой терапии контролируют и модулируют в течение месяцев или лет после введения вектора.

Таким образом, в одном варианте воплощения изобретения суспензия подходит для совместного введения с функциональным белком hNAGLU или рекомбинантным белком, содержащим функциональный NAGLU. В одном варианте воплощения изобретения рекомбинантный белок представляет собой NAGLU, слитый с инсулиноподобным фактором роста 2 (IGF2).

В одном варианте воплощения изобретения суспензия доставляется нуждающемуся субъекту интрацеребровентрикулярно, интратекально, интрацистернально или внутривенно. В одном варианте воплощения суспензия имеет pH от приблизительно 7,28 до приблизительно 7,32.

В контексте данного документа, фермент-заместительная терапия (ERT) представляет собой медицинское лечение, которое состоит в замене фермента у пациентов, у которых определенный фермент является дефицитным или отсутствует. Фермент обычно производится в виде рекомбинантного белка и вводится пациенту.

В одном варианте воплощения изобретения фермент представляет собой функциональный NAGLU. В другом варианте воплощения изобретения фермент представляет собой рекомбинантный белок, включающий функциональный NAGLU. В одном варианте воплощения изобретения фермент представляет собой рекомбинантный белок, содержащий функциональный NAGLU и инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF2). Aoyagi-Scharber M et al, Clearance of Heparan Sulfate and Attenuation of CNS Pathology by Intracerebroventricular BMN 250 in Sanfilippo Type B Mice, *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017 Jun 6;6:43-53. doi: 10.1016/j.omtm.2017.05.009. eCollection 2017 Sep 15; и WO2017132675A1. Системная, интратекальная, интрацеребровентрикулярная или интрацистернальная доставка может использоваться для совместной терапии ERT или SRT.

В контексте данного документа, термин „субстрат-редуцирующая терапия“ (SRT) относится к терапии с использованием низкомолекулярного лекарственного средства для частичного ингибирования биосинтеза соединений, которые накапливаются в отсутствие NAGLU. В одном варианте воплощения изобретения SRT представляет собой терапию посредством генистеина. См., например, Ritva Tikkanen et al, Less Is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul; 17(7): 1065.

Published online 2016 Jul 4. doi: 10.3390/ijms17071065; Delgadillo V et al, Epub 2011 May 10; and de Ruijter J et al, Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. *Ann Neurol.* 2012 Jan;71(1): 110-20. doi: 10.1002/ana.22643. Naglu.

В контексте данного документа, термин „шапероновая терапия“ относится к терапии с использованием низкомолекулярного лекарственного средства для облегчения свертывания и/или секреции NAGLUE. В одном варианте воплощения изобретения шапероновая терапия представляет собой терапию посредством IGF2. См., например, Kan SH, Troitskaya LA, Sinow CS, Haitz K, Todd AK, Di Stefano A, et al. Insulin-like growth factor II peptide fusion enables uptake and lysosomal delivery of alpha-N-acetylglucosaminidase to mucopolysaccharidosis type IIIB fibroblasts. *Biochem J.* 2014;458:281-9; и HIRMAb in Boado RJ, Lu JZ, Hui EK, Lin H, Pardridge WM. Insulin Receptor Antibody alpha-N-Acetylglucosaminidase Fusion Protein Penetrates the Primate Blood-Brain Barrier and Reduces Glycosaminoglycans in Sanfilippo Type B Fibroblasts. *Mol Pharm.* 2016;13: 1385-92. В другом варианте воплощения изобретения шапероновая терапия представляет собой терапию с помощью ингибитора CpGH89. См., например, Ficko-Blean, E, Stubbs, KA, Nemirovsky, O, et al. Structural and mechanistic insight into the basis of mucopolysaccharidosis IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:6560- 6565.

В еще одном варианте воплощения изобретения шапероновая терапия представляет собой терапию, раскрытую в Zhao, KW and Neufeld, EF. Purification and characterization of recombinant human alpha-N-acetylglucosaminidase secreted by Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif.* 2000; 19:202-211.

Подходящие объемы для доставки этих доз и концентраций могут быть определены специалистом в данной области техники. Например, могут быть выбраны объемы приблизительно от 1 до 150 мл, причем более высокие объемы выбирают для взрослых. Как правило, для новорожденных младенцев подходящий объем составляет от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 10 мл, для более старших детей может быть выбран от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 15 мл. Для малышей может быть выбран объем от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 20 мл. Для детей могут быть выбраны объемы до приблизительно 30 мл. Для детей до 10-12 лет и подростков могут быть выбраны объемы до приблизительно 50 мл. В других вариантах воплощения изобретения пациент может получать интратекальное введение в объеме от приблизительно 5 мл до приблизительно 15 мл или от приблизительно 7,5 мл до приблизительно 10 мл. Другие подходящие объемы и дозы могут быть определены. Дозировка будет подбираться таким образом, чтобы сбалансировать терапевтическую пользу с любыми побочными эффектами, и такие дозировки могут варьироваться в зависимости от терапевтического применения, для которого используется рекомбинантный вектор.

В одном варианте воплощения изобретения гAAV, согласно настоящему описанию, вводят в дозе от приблизительно 1×10^9 ГК на грамм массы мозга до приблизительно 1×10^{14} ГК на грамм массы мозга. В некоторых вариантах воплощения изобретения гAAV

вводят системно совместно в дозе от приблизительно 1×10^9 ГК на кг массы тела до приблизительно 1×10^{13} ГК на кг массы тела.

В одном варианте воплощения изобретения субъекту доставляется терапевтически эффективное количество векторов, описанных в данной заявке. В контексте данного документа, термин „терапевтически эффективное количество“ относится к количеству композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный NAGLU, который доставляет и экспрессирует в клетках-мишенях количество фермента, достаточное для достижения эффективности. В одном варианте воплощения изобретения дозировка вектора составляет от приблизительно 1×10^9 ГК на грамм массы мозга до приблизительно 1×10^{13} геномных копий (ГК) на грамм (г) массы мозга, включая все целые или дробные суммы в пределах диапазона и конечных критериев. В другом варианте воплощения изобретения, дозировка составляет от 1×10^{10} ГК на грамм массы мозга до приблизительно 1×10^{13} ГК на грамм массы мозга. В конкретных вариантах воплощения изобретения доза вектора, вводимого пациенту, составляет по меньшей мере приблизительно $1,0 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $1,5 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $2,0 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $2,5 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $3,0 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $3,5 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $4,0 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $4,5 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $5,0 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $5,5 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $6,0 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $6,5 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $7,0 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $7,5 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $8,0 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $8,5 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $9,0 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $9,5 \times 10^9$ ГК/г, приблизительно $1,0 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $1,5 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $2,0 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $2,5 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $3,0 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $3,5 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $4,0 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $4,5 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $5,0 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $5,5 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $6,0 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $6,5 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $7,0 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $7,5 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $8,0 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $8,5 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $9,0 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $9,5 \times 10^{10}$ ГК/г, приблизительно $1,0 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $1,5 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $2,0 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $2,5 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $3,0 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $3,5 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $4,0 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $4,5 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $5,0 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $5,5 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $6,0 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $6,5 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $7,0 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $7,5 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $8,0 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $8,5 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $9,0 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $9,5 \times 10^{11}$ ГК/г, приблизительно $1,0 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $1,5 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $2,0 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $2,5 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $3,0 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $3,5 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $4,0 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $4,5 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $5,0 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $5,5 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $6,0 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $6,5 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $7,0 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $7,5 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $8,0 \times 10^{12}$ ГК/г,

приблизительно $8,5 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $9,0 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $9,5 \times 10^{12}$ ГК/г, приблизительно $1,0 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $1,5 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $2,0 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $2,5 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $3,0 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $4,0 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $4,5 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $5,0 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $5,5 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $6,0 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $6,5 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $7,5 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $8,0 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $8,5 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $9,0 \times 10^{13}$ ГК/г, приблизительно $9,5 \times 10^{13}$ ГК/г или приблизительно $1,0 \times 10^{14}$ ГК/г массы мозга.

В одном варианте воплощения изобретения способ дополнительно включает получение субъектом иммуносупрессивной совместной терапии. Иммуносупрессанты для такой совместной терапии включают, но не ограничиваются приведенным, глюкокортикоид, стероиды, антиметаболиты, ингибиторы Т-клеток, макролид (например, рапамицин или рапалог) и цитостатики, включая алкилирующий агент, антиметаболит, цитотоксический антибиотик, антитело или агент, активный на иммунофиллине. Иммуносупрессанты могут включать хлорметин, нитрозомочевину, соединение платины, метотрексат, азатиоприн, меркаптопурин, фторурацил, дактиномицин, антрациклин, митомицин С, блеомицин, митрамицин, IL-2 рецептор- (CD25-) или CD3-направленные антитела, анти IL-2 антитела, циклоспорин, такролимус, сиролимус, IFN-бета, IFN-гамма, опиоид или агент связывания TNF-альфа (альфа-фактор некроза опухоли).

В некоторых вариантах воплощения изобретения иммуносупрессивная терапия может быть начата за 0, 1, 2, 7 или более дней до введения генной терапии. Такая терапия может включать совместное введение двух или более лекарственных средств (например, преднизона, микрофенолата мофетила (MMF) и/или сиролимуса (то есть рапамицина)) в один и тот же день. Один или более из этих препаратов могут быть продолжены после введения генной терапии, в той же дозе или скорректированной дозе. Такая терапия может продолжаться приблизительно 1 неделю (7 дней), приблизительно 60 дней или дольше, если это необходимо. В определенных вариантах воплощения изобретения выбран режим без такролимуса.

В определенном варианте воплощения изобретения способ включает измерение сывороточных анти-hNAGLU антител. Подходящие анализы измерения антител против hNAGLU доступны, см., например, Пример 1.

В одном варианте воплощения изобретения gAAV, согласно настоящему описанию, вводят один раз нуждающемуся субъекту. В другом варианте воплощения изобретения gAAV вводится более одного раза нуждающемуся субъекту.

Следует понимать, что композиции в способе, описанном в данной заявке, предназначены для применения с другими композициями, режимами, аспектами, вариантами воплощения изобретения и способами, описанными в разделе Описание.

7. Набор

В некоторых вариантах воплощения изобретения предложен набор, который

включает концентрированный вектор, суспендированный в препарате (необязательно замороженный), необязательный буфер для разведения, а также устройства и компоненты, необходимые для интратекального, интрацеребровентрикулярного или интрацистернального введения.

В другом варианте воплощения изобретения набор может дополнительно или альтернативно включать компоненты для внутривенной доставки. В одном варианте воплощения изобретения набор обеспечивает достаточное количество буфера для инъекции. Такой буфер может обеспечить разбавление концентрированного вектора от примерно 1: 1 до 1: 5 или более. В других вариантах воплощения изобретения включены более высокие или более низкие количества буфера или стерильной воды, чтобы обеспечить возможность титрования дозы и других корректировок лечащим врачом. В других вариантах воплощения изобретения один или более компонентов устройства включены в набор. Доступен подходящий буфер для разбавления, такой как физиологический раствор, фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) или глицерин/PBS.

Следует понимать, что композиции в наборе, описанном в данной заявке, предназначены для применения с другими композициями, режимами, аспектами, вариантами воплощения изобретения и способами, описанными в разделе Описание.

8. Устройство

В одном аспекте векторы, предложенные в данной заявке, могут вводиться интратекально с помощью способа и/или устройства, описанного, например, в WO 2017/136500, которая включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

В качестве альтернативы могут быть выбраны другие устройства и способы. Кратко, данный способ включает этапы продвижения иглы для спинномозговой пункции в cisterna magna пациента, соединяя длину гибкой трубки с проксимальной втулкой иглы для спинномозговой пункции и выходное отверстие клапана с проксимальным концом гибкой трубки, и после указанных этапов продвижения и соединения и после того, как трубку оставляют для самовсасывания со спинномозговой жидкостью пациента, подсоединяется первый сосуд, содержащий количество изотонического раствора, к промывочному входному отверстию клапана, и затем к векторному входному отверстию клапана присоединяется второй сосуд, содержащий количество фармацевтической композиции. После подсоединения первого и второго сосудов к клапану открывается путь для потока жидкости между векторным входным отверстием и выходным отверстием клапана, и фармацевтическая композиция вводится пациенту через иглу для спинномозговой пункции и после введения фармацевтической композиции канал для потока жидкости открывается через впускной порт для промывки и выходной порт клапана, и изотонический раствор вводится в иглу для спинномозговой пункции для промывания фармацевтической композиции в организм пациента. Каждый из данного способа и данного устройства, необязательно, можно использовать для интратекальной доставки композиций, предложенных в данной заявке.

Альтернативно, для такой интратекальной доставки могут использоваться другие способы и устройства.

Следует понимать, что композиции в устройстве, описанном в данной заявке, предназначены для применения с другими композициями, режимами, аспектами, вариантами воплощения изобретения и способами, описанными в разделе Описание.

Примеры

Данное изобретение теперь описано со ссылкой на приведенные ниже примеры. Данные примеры приведены только с целью иллюстрации, и изобретение никоим образом не следует истолковывать как ограниченное этими примерами, а скорее следует истолковывать так, чтобы оно охватывало любые и все варианты, которые становятся очевидными в результате доктрины, предложенной в данной заявке.

Пример 1: Способы

А. Вектор - AAV9.CB7.CI. hNAGLUco.rBG

Кодон-оптимизированная последовательность hNAGLU, как показано в SEQ ID NO: 1, была клонирована в конструкт экспрессии, содержащий промотор CB7 (гибрид немедленно-раннего цитомегаловирусного энхансера и промотора куриного бета-актина), интрон куриного бета-актина (CI) и последовательность полиаденилирования кроличьего бета-глобина (rBG). Конструкт экспрессии был фланкирован инвертированными концевыми повторами AAV2, и для инкапсидирования использовали транс-плазмиду AAV9. Векторы AAV были изготовлены Penn Vector Core при помощи способа иодиксанольного градиента. См. Lock, M., et al, Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale. *Human Gene Therapy*, 2010. 21(10): p. 1259-1271. Очищенные векторы титровали классической qПЦР для MPS ПВ с помощью Penn Vector Core.

Фосфорно-буферный солевой раствор Дюльбекко (dPBS) без кальция и магния использовали в качестве контрольного продукта (контроль основы) и разбавителя для вектора. Тестируемый препарат разбавляли стерильным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) до соответствующей концентрации для каждой группы дозировок. Разбавленный вектор хранили на влажном льду и вводили животным в течение 4 часов после разбавления.

В. Процедуры с животными

Все протоколы для животных были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Университета Пенсильвании (Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Pennsylvania). Мыши, нокаутированные NAGLU, содержались в виварии Gene Therapy Program в Университете Пенсильвании. Все потомки были генотипированы с помощью ПЦР-анализа отрезания хвоста ДНК с использованием автоматизированной системы (Transnetyx Inc, 8110 Cordova Road Suite 119 Cordova, TN 38016). Мыши были сгруппированы по их генотипу после отлучения от груди и после этого их не смешивали, чтобы предотвратить конфликты; все животные в данной клетке получали одинаковое лечение.

Животных содержали в стандартной клетке по 1-5 животных на клетку при 12 часовом цикле свет/темнота, управляемом автоматическим таймером, при влажности 30-70%. Температура поддерживалась в диапазоне 64-79 °F (18-26 °C). Автоклавируемый корм для грызунов был предоставлен *ad libitum*. Вода была доступна всем животным *ad libitum* через отдельно размещенные бутылки с водой в каждой клетке. Как минимум, бутылки с водой заменяли один раз в неделю во время еженедельных изменений в клетке. Водоснабжение было взято из города Филадельфии и очищено с использованием водоочистителя Geringe. ULAR (University Laboratory Animal Resources) ежедневно проверяет качество воды на содержание хлора и ежеквартально на pH и жесткость. Материалы подстилок (Nestlet ®) были обеспечены в каждой клетке после каждого изменения. Ежедневно за животными наблюдали сотрудники GTP и ветеринарный персонал ULAR.

С. Введение векторов и основ

Векторные дозы для мышей MPS IIIВ составляли 3×10^8 , 3×10^9 или 3×10^{10} ГК на мышь в среднем возрасте 18 недель. Отмечено, что ddПЦР (Lock, M., et al., Absolute Determination of Single-Stranded and Self-Complementary Adeno-Associated Viral Vector Genome Titers by Droplet Digital PCR. *Human Gene Therapy Methods*, 2014. 25(2): p. 115-125) дает титры, которые приблизительно в 3 раза выше, чем классический способ qПЦР. Мышей анестезировали изофлураном. Каждую анестезированную мышь плотно захватывали за рыхлую кожу за головой и вводили рукой спереди и сбоку от брегмы с помощью шприца Гамильтона, снабженного иглой 27-го калибра, которая была отрегулирована для введения на глубину 3 мм.

Д. Нейроповеденческая оценка

Тест качающегося вращающегося стержня был выполнен для оценки координации и баланса 2 месячных р1 (MPS IIIВ). Мышей приучали к вращающемуся стержню во время 2 тестов с постоянной низкой скоростью (5 об/мин) в течение 120 секунд. После двухминутного отдыха мышей помещали обратно на вращающийся стержень и подвергали воздействию качания, когда стержень вращается с постоянной скоростью 10 об/мин с изменением направления вращения при каждом втором вращении. Было выполнено 3 теста с 2-х минутным отдыхом между тестами. Результаты выражали в виде средней задержки падения со стержня; чем дольше задержка, тем лучше координация.

Е. гистология

Через 3 месяца после инъекции мышей подвергали эвтаназии путем обескровливания пункцией сердца под наркозом кетамин/ксилазин. Ткани быстро собирали, половину мгновенно замораживали на сухом льду (ферментная активность), а половину фиксировали погружением в 10% нейтральный формалин и заливали в парафин для гистологии. Собранные ткани представляли собой ткани мозга, спинного мозга, печени и сердца.

Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) проводили в соответствии со стандартными протоколами на парафиновых срезах. Гистопатология была оценена в

головном и спинном мозге сертифицированным Министерством здравоохранения ветеринарным патологоанатомом в слепом режиме до лечения. Оценка мозга представляла собой кумулятивную сумму баллов по 4-степенной шкале тяжести наличия вакуолей глиальных клеток в головном мозге, нейрональной вакуолизации в коре головного мозга, нейрональной вакуолизации в стволе головного мозга и задней части головного мозга, периваскулярной инфильтрации мононуклеарных клеток, инфильтрации мононуклеарных клеток (максимальный балл 20).

Кумулятивные баллы были проанализированы с помощью одностороннего теста Ановы Краскелла Уоллиса с апостериорным многократным сравнительным тестом Данна, альфа 0,05.

Накопление лизосом оценивали с помощью иммуноокрашивания LIMP2 и количественного определения. Иммуноокрашивание LIMP2 проводили на срезах по 6 мкм фиксированной формалином мозговой ткани, залитой в парафин. Срезы депарафинизировали с помощью серий этанола и ксилола, кипятили в микроволновой печи в течение 6 минут в 10 ммоль/л цитратном буфере (pH 6,0) для извлечения антигена и блокировали 1% ослиной сывороткой в PBS+0,2% Triton в течение 15 минут, с последующей последовательной инкубацией с первичными (1 час) и мечеными вторичными (45 минут) антителами, разведенными в блокирующем буфере. Первичное антитело было кроличьим анти-LIMP2 (Novus Biologicals, Littleton, CO, 1:200), а вторичное антитело было меченым FITC или TRITC ослиным анти-кроличьим антителом (Jackson ImmunoResearch). Количество клеток, окрашенных позитивно для LIMP2, обученный основной персонал GTP Morphology определял количественно в 2-4 срезах головного мозга от каждого животного (вскрытие на 90-й день).

Ф. Ферментативная активность и накопление гликозаминогликана

Для анализа активности ферментов и содержания GAG белки экстрагировали механической гомогенизацией (Qiagen TissueLizer) в растворе для кислотного лизиса (0,2% triton, 0,9% NaCl, доведенный до pH 4). Образцы замораживали и оттаивали и очищали центрифугированием. Белок определяли количественно с помощью анализа BCA (метод с бидинхониновой кислотой).

Активность NAGLU измеряли путем инкубации 10 пкл образца с 20 пкл 2 mM 4-MU-2-ацетамидо-2-дезоксид-альфа-D-глюкопиранозида (Toronto Research Chemicals), растворенного в ацетате натрия 0,1 M, pH 3,58; NaCl 150 mM; Triton X100 0,05%. После инкубации в течение 2 ч при 37°C смесь разбавляли в глициновом NaOH-буфере, pH 10,6, и высвобожденный 4-MU определяли количественно по флуоресценции (возбуждение 365 нм, излучение 450 нм) по сравнению со стандартными разведениями несвязанного 4-MU и нормализовали по содержанию белка.

Содержание GAG в тканевом экстракте измеряют с использованием способа связывания красителя при помощи коммерческого набора, используемого в соответствии с рекомендациями производителя (набор Blyscan Biocolor GAGs).

Г. Анти-трансгенные антитела

Кровь для измерения сывороточных анти-hNAGLU антител собирали через несколько временных промежутков *in vivo* через поднижнечелюстное кровотечение, а также при терминальном вскрытии путем пункции сердца. Сыворотку отделяли и замораживали на сухом льду и хранили при минус 80 °C до проведения анализа. Полистирольные планшеты покрывали в течение ночи рекомбинантным человеческим NAGLU (R & D Systems), 5 пг/мл в PBS, титровали до pH 5,8. Планшеты промывали и блокировали в течение 1 часа в 2% бычьим сывороточным альбумине (BSA) в нейтральном PBS. Затем планшеты инкубировали с образцами сыворотки, разведенными 1:1000 в PBS. Связанное антитело определяли с помощью козьего антимышиного антитела (Abeam), конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP), разведенного 1: 10000 в PBS с 2% BSA.

Анализ был разработан с использованием тетраметилбензидинового субстрата и остановлен 2N серной кислотой перед измерением поглощения при 450 нм.

Пример 2: Определение минимальной эффективной дозы (MED) на мышинной модели MPSIIIb

Эксперименты проводились для оценки экспрессии, биологической активности и минимальной эффективной дозы (MED) однократного внутрицеребровентрикулярного (ICV) введения AAV9.CB7.CI.hNAGLUco.rBG, вектора AAV9, экспрессирующего человеческую N-ацетил-альфа-D-глюкозаминидазу (NAGLU), в мышинной модели MPSIIIb.

AAV9.CB7.CI.hNAGLUco.rBG вводили ICV маршрутом мышам MPS IIIb, средний возраст 4 месяца (n=10 на группу) в дозах 3×10^8 ГК или 3×10^9 ГК или 3×10^{10} ГК (определено путем титрования вектора qПЦР) в день 0 с 3-месячным периодом наблюдения после инъекции (pi). Обработанные носителем MPS IIIb и гетерозиготные однопометники служили в качестве контроля (n=10 на группу).

Биоактивность оценивали путем измерения активности NAGLU через 3 месяца pi в головном мозге, спинном мозге, печени, сыворотке и сердце. Эффективность и MED определяли путем измерения производительности на качающемся вращающемся стержне через 2 месяца pi, а также накопления лизосом в головном и спинном мозге и гистопатологии через 3 месяца pi.

ICV введение AAV9.CB7.CI.hNAGLUco.rBG мышам MPS IIIb при концентрации до 3×10^{10} ГК было хорошо переносимым без клинических признаков или смертности, связанных с лечением, и приводило к экспрессии NAGLU во всей ЦНС (в головном и спинном мозге), а также в периферических тканях (печень, сердце и сыворотка).

Наблюдалось дозозависимое увеличение активности NAGLU в головном мозге, спинном мозге, сердце и печени через 3 месяца pi (Фиг. 1) с ферментативной активностью 50% от гетерозиготного уровня при средней дозе в головном мозге и аналогичной или выше гетерозиготного уровня при высокой дозе во всех органах, которые были оценены. Наблюдалась дозозависимая нормализация лизосомального компартмента, о чем свидетельствует уменьшение окрашивания LIMP2 в головном мозге при высокой дозе 3

мес. рі (Фиг.2А и 2В). В окрашенных Н&Е срезах головного мозга при средних и высоких дозах наблюдали дозозависимое снижение количества и частоты глиальной и нейрональной вакуолизации, показателей накопления лизосом (Фиг.3А и 3В). Накопление нейронов и аксонопатия белого вещества были скорректированы в спинном мозге только в высокой дозе (не показано). В соответствии с изменениями в лизосомном содержании ЦНС и улучшением связанной с заболеванием морфологии на окрашенных срезах Н&Е, наблюдалось улучшение баланса и координации, оцененное с помощью анализа с качающимся вращающимся стержнем при 2-месячном рі только при высокой дозе, однако статистическая значимость была не достигнута ввиду индивидуальной изменчивости (Фиг.4).

Тестирование препарата и процедура введения были хорошо переносимы. У мышей не было отмечено клинических отклонений, кроме признаков, связанных с фенотипом MPS IIIb. Все мыши выжили до запланированной эвтаназии. Отсутствовали доказательства токсичности, связанной с тестируемым препаратом, в головном мозге при гистопатологии, хотя у некоторых мышей наблюдались изменения, связанные с самой процедурой ICV введения (очаговые гемосидрофаги и инфильтраты мононуклеарных клеток в перивентрикулярной паренхиме и мозговых оболочках).

В заключение AAV9.CB7.CI.hNAGLUco.rBG хорошо переносился мышами MPS IIIb при всех уровнях дозировок и приводил к дозозависимому увеличению уровней NAGLU (экспрессия и ферментативная активность), которые были связаны с улучшением как ЦНС, так и периферических параметров MPS IIIb с улучшением нейроповеденческого фенотипа в высокой дозе. Введенная высокая доза, 3×10^{10} ГК, была минимальной эффективной дозой (MED) в этом исследовании (для нейро-поведенческой экстренной терапии), а средняя доза, 3×10^9 ГК, представляла собой MED, если мы рассмотрим ферментативную и патологическую экстренную терапию головного мозга. Лечение назначалось относительно поздно (4 месяца), когда накопление и нейровоспаление уже хорошо развиты, что, вероятно, объясняет очевидную неэффективность средней дозы, несмотря на частичную ферментативную экстренную терапию в головном мозге. Ожидается, что средняя доза обеспечит поведенческую экстренную терапию, если вводить раньше.

Пример 3. Фармакологическое/токсикологическое исследование у макак-резус.

Эксперименты проводятся для оценки безопасности интратекального введения трех доз AAV9.CB7.CI.hNAGLUco.rBG.

Контрольный препарат вводят с помощью подзатылочной пункции 3 макакам (оба пола) в Группе 1. Вектор AAV9.CB7.CI.hNAGLUco.rBG вводят путем подзатылочной пункции 9 макакам-резусам, рандомизированным в Группы 2-4. Макаки в Группе 3 получают тестируемый препарат в высокой дозе (N=3); макаки в Группе 3 получают среднюю дозу тестируемого препарата (N=3); макаки в Группе 4 получают тестируемый препарат в низкой дозе (N=3). Кровь и спинномозговая жидкость собирают как часть

общей панели безопасности. Мононуклеарные клетки сыворотки и периферической крови (PBMC) собирают для исследования гуморального и клеточного иммунного ответа на капсид и трансген.

После завершения жизненного этапа этих исследований, через 90 ± 3 дня после введения вектора, макакам вскрывают ткани, собранные для всестороннего гистопатологического исследования. Лимфоциты собирают из селезенки и костного мозга, чтобы исследовать наличие CTL в этих органах во время вскрытия.

Пример 3: Долгосрочные последствия введения AAV.hNAGLU

Эксперименты проводят для изучения долгосрочных эффектов AAV.hNAGLU на мышах MPS IIIb. Двадцати мышам MPS IIIb вводят высокую дозу AAV9.CB7.CI.hNAGLU.rBG (9×10^{10} ГК, ICV) в возрасте 2 месяцев. Еще двадцать мышей MPS IIIa и двадцать мышей дикого типа получают контрольные инъекции PBS. Мышей контролируют в течение 7 месяцев после инъекции, в течение которых им присваивают клинические оценки еженедельно и проводят поведенческое и когнитивное тестирование.

Многопараметрическая шкала оценок была разработана для оценки коррекции заболевания и реакции на лечение на протяжении всего исследования. Оценка присваивается отдельным мышам на основании оценки комбинации тремора, осанки, качества меха, захвата, помутнения роговицы и походки/подвижности (Фиг. 5). Система клинических оценок была адаптирована на основе ранее описанных способов (см., например, Burkholder et al. Curr Protoc Mouse Biol. June 2012, 2: 145-65; Tumpey et al. J Virol. May 1998, 3705-10; and Guyenet et al. J Vis Exp, May 2010, 39; 1787).

(Свободный текст перечня последовательностей)

Последующая информация приведена для перечня последовательностей, содержащих свободный текст с числовым идентификатором <223>

SEQ ID NO: содержащих свободный текст	Свободный текст с числовым идентификатором <223>
1	<223> Геномная последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует функциональный белок NAGLU
4	<223> Геном вектора rAAV AAV.CB7.CI.hNAGLUco.rBG <220> <221> область повтора <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> промотор <222> (198)..(579)

SEQ ID NO: содержащих свободный текст	Свободный текст с числовым идентификатором <223>
	<223> CMV IE Промотор <220> <221> промотор <222> (582)..(863) <223> СВ промотор <220> <221> ТАТА сигнал <222> (836)..(839) <220> <221> Интрон <222> (956)..(1928) <223> интрон куриного бета-актина <220> <221> polyA_сигнал <222> (4235)..(4361) <223> Глобин кролика polyA (rBG или RBG) <220> <221> CDS <222> (1940)..(4168) <223> Геномная последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок NAGLU человека <220> <221> область повтора <222> (4450)..(4579) <223> 3' ITR
5	<223> Синтетический конструктор
6	<223> Белок капсида VP1 аденоассоциированного вируса 9
7	<223> Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок капсида VP1 аденоассоциированного вируса 9

Все публикации, процитированные в данном описании, полностью включены в

данную заявку посредством ссылки, как и предварительная заявка на патент США № 62/593090, поданная 30 ноября 2017 г. Аналогично, последовательности SEQ ID NO, на которые имеются ссылки в данной заявке и которые содержатся в прилагаемом Перечне последовательностей, включены в качестве ссылки. Хотя данное изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты воплощения изобретения, следует понимать, что модификации могут быть выполнены без отклонения от сущности изобретения. Такие модификации предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный AAV (гAAV), содержащий капсид AAV и упакованный в него геном вектора, содержащий 5' инвертированный концевой повтор AAV (ITR), полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональную человеческую N-ацетил-альфа-глюкозаминидазу (hNAGLU), регуляторную последовательность, которая направляет экспрессию hNAGLU в клетке-мишени, и AAV 3' ITR, при этом кодирующая последовательность hNAGLU по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

2. Рекомбинантный гAAV по п. 1, отличающийся тем, что кодирующая последовательность hNAGLU является SEQ ID NO: 1.

3. Рекомбинантный гAAV по п. 1 или 2, отличающийся тем, что регуляторная последовательность содержит промотор.

4. Рекомбинантный гAAV по любому из п.п.1-3, отличающийся тем, что регуляторная последовательность дополнительно содержит энхансер.

5. Рекомбинантный гAAV по любому из п.п.1-4, отличающийся тем, что регуляторная последовательность дополнительно содержит интрон.

6. Рекомбинантный гAAV по любому из п.п.1-5, отличающийся тем, что регуляторная последовательность дополнительно содержит poly A.

7. Рекомбинантный гAAV по любому из п.п.1-6, отличающийся тем, что геном вектора AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 4 (AAV.CB7.CI.hNAGLUco.RBG).

8. Рекомбинантный гAAV по любому из п.п.1-7, отличающийся тем, что капсид AAV является капсидом AAV9.

9. Рекомбинантный гAAV по любому из п.п.1-8, предназначенный для использования при лечении мукополисахаридоза IIIB (MPS IIIB) и/или улучшения походки или подвижности, уменьшения тремора, уменьшения судорог, улучшения осанки или уменьшения прогрессирования потери зрения у субъекта, нуждающегося в этом.

походки или подвижности, уменьшения тремора, уменьшения судорог, улучшения осанки или уменьшения прогрессирования потери зрения (misprint in the source)

10. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный гAAV по любому из п.п.1-9 в буферной смеси.

11. Фармацевтическая композиция по п. 10, отличающаяся тем, что она подходит для совместного введения с функциональным белком hNAGLU.

12. Фармацевтическая композиция по п.п. 10 или 11, отличающаяся тем, что она составлена для доставки посредством интрацеребровентрикулярной (ICV), интратекальной (IT), интрацистеральной или внутривенной (IV) инъекции.

13. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.10-12, отличающаяся тем, что она вводится в дозе от 1×10^9 ГК на грамм массы мозга до приблизительно 1×10^{13} ГК на грамм массы мозга.

14. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.10-13, отличающаяся тем, что

составлена таким образом, чтобы иметь pH от приблизительно 7,28 до приблизительно 7,32.

15. Способ лечения человеческого субъекта с диагнозом MPS IIIВ и/или улучшения походки или подвижности, уменьшения тремора, уменьшения спазмов, улучшения осанки или уменьшения прогрессирования потери зрения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту суспензии рекомбинантного гAAV по п. 1 в буферной смеси в дозе от 1×10^9 ГК на грамм массы мозга до приблизительно 1×10^{13} ГК на грамм массы мозга.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанный способ приводит к активности NAGLU в сыворотке, которая составляет по меньшей мере приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или приблизительно 100% от здорового контроля.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что суспензия имеет по меньшей мере 1×10^{11} геномных копий (ГК)/мл рекомбинантного гAAV.

18. Способ по п. 15, отличающийся тем, что суспензия подходит для совместного введения с функциональным белком hNAGLU.

19. Способ по п.15, отличающийся тем, что суспензию доставляют нуждающемуся субъекту интрацеребровентрикулярно, интратекально или внутривенно.

20. Способ по п.15, отличающийся тем, что pH суспензии составляет от приблизительно 7,28 до приблизительно 7,32.

21. Способ по п.15, отличающийся тем, что

(а) субъект получает заместительную ферментную терапию в уменьшенной дозе или с меньшей частотой по сравнению со стандартным лечением только посредством заместительной ферментной терапии; и/или

(б) субъект демонстрирует улучшение биомаркеров, связанных с MPS IIIВ.

22. Способ по п.15, отличающийся тем, что рекомбинантный гAAV вводят нуждающемуся субъекту один раз.

23. Способ по п.15, отличающийся тем, что рекомбинантный гAAV вводят нуждающемуся субъекту более одного раза.

24. Вектор, содержащий полученную способом генной инженерии последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный hNAGLU, и регуляторную последовательность, которая направляет его экспрессию в клетке-мишени, где кодирующая последовательность hNAGLU по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1.

25. Вектор по п.24, отличающийся тем, что кодирующая последовательность hNAGLU представляет собой SEQ ID NO: 1.

26. Вектор по п.п. 24 или 25, отличающийся тем, что представляет собой

рекомбинантный вирус, плазмиду, липоплексы, полимерсому, полиплексы, дендример, конъюгат с проникающим в клетки пептидом (СРР), магнитную частицу или наночастицу.

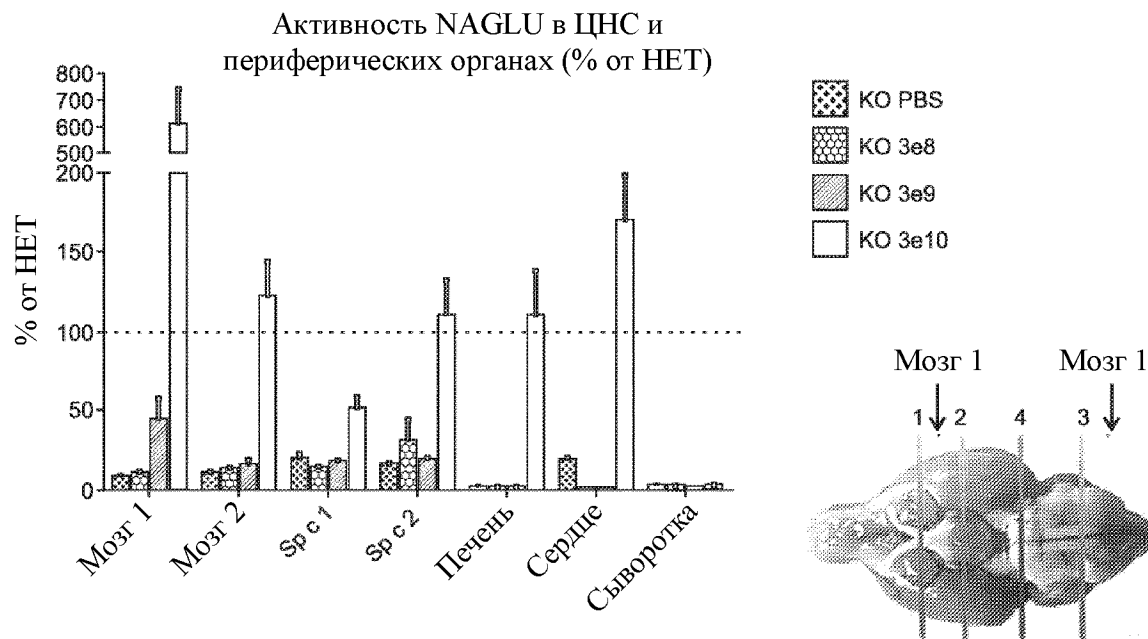
27. Вектор по любому из п.п. 24-26, отличающийся тем, что представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV), аденовирус, бокавирус, гибридный AAV/бокавирус, вирус простого герпеса или лентивирус.

28. Вектор по любому из пп. 24-27., отличающийся тем, что клетка-мишень представляет собой изолированную клетку, культивируемую клетку, клеточную линию, клетку *Escherichia coli*, дрожжевую клетку, человеческую клетку, нечеловеческую клетку, клетку млекопитающего, клетку не млекопитающего, клетку насекомого, клетку НЕК-293, клетку печени, клетку почек, клетку центральной нервной системы, нейрон, глиальную клетку или стволовую клетку.

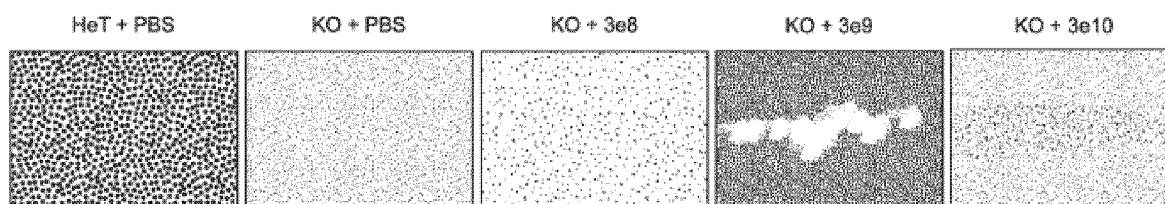
29. Рекомбинантный гAAV по любому из п.п. 1-9 или вектор по любому из п.п. 24-28 для использования в способе лечения MPS IIIВ и/или улучшения походки или подвижности, уменьшения тремора, уменьшения судорог, улучшения осанки или уменьшения прогрессирования потери зрения у субъекта, нуждающегося в этом.

30. Использование рекомбинантного гAAV по любому из п.п.1-9 или вектора по любому из п.п.24-28 для производства лекарственного средства для лечения MPS IIIВ и/или улучшения походки или подвижности, уменьшения тремора, уменьшения спазмов, улучшения осанки или уменьшения прогрессирования потери зрения у субъекта, нуждающегося в этом.

По доверенности

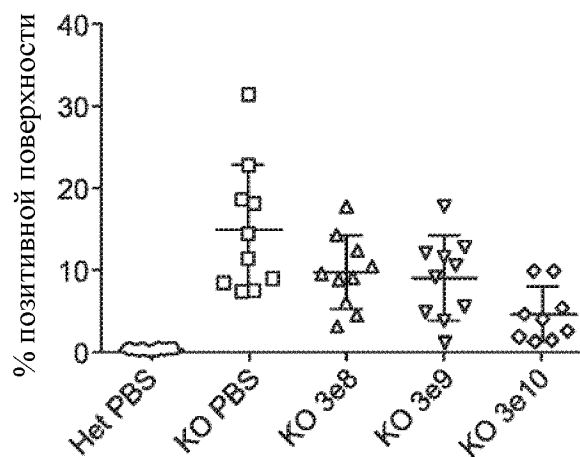


ФИГ. 1

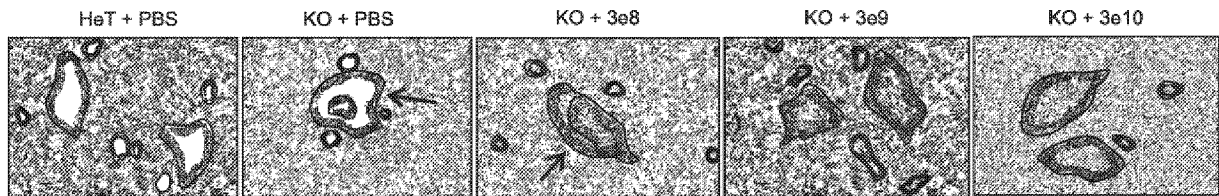


ФИГ. 2А

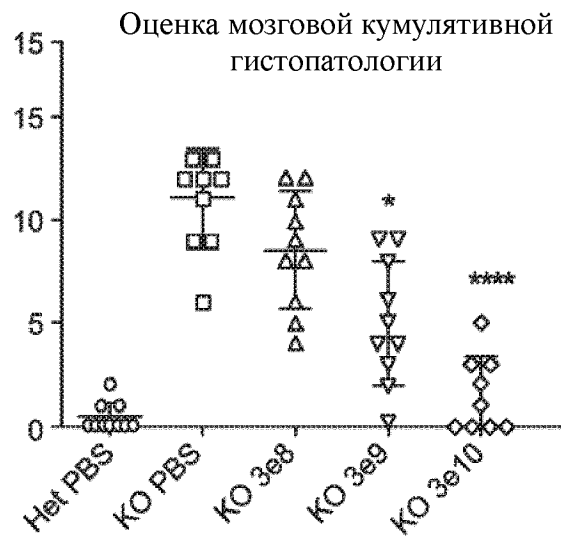
Мозговой LIMP2 (% позитивной поверхности)



ФИГ. 2В

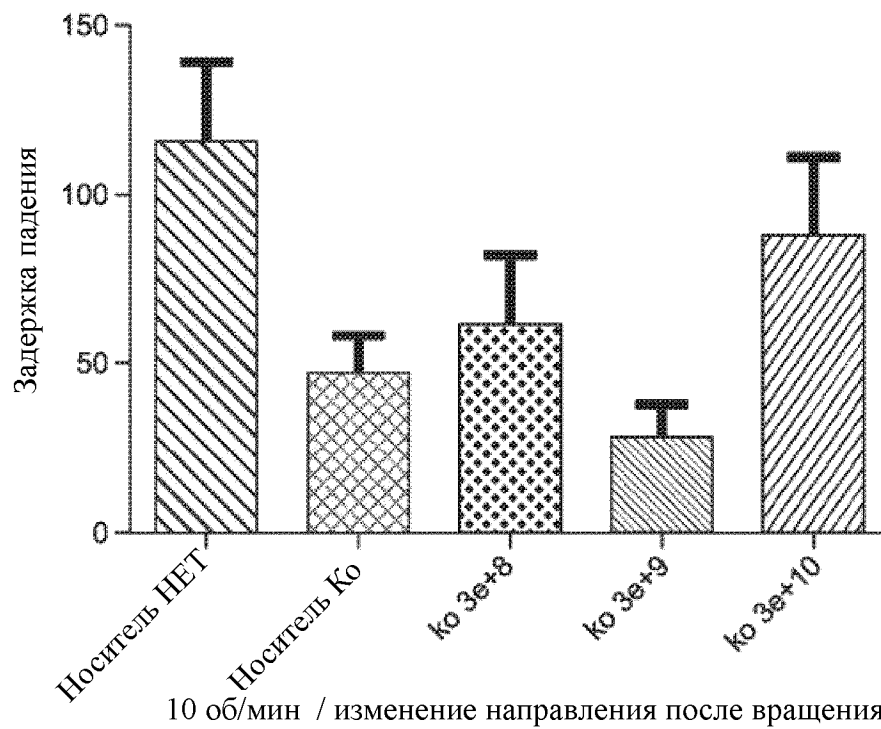


ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

Качающийся вращающийся стержень, 180 сек



ФИГ. 4

Качество меха	
0	Лоснящаяся кожа, гладкая шерсть, холеный, чистая кожа
1	Не холеный, слегка маслянистая или лохматая шерсть
2	Всклокоченный подшерсток + подшерсток маслянистый, грязный, взъерошенный
3	Очень всклокоченный подшерсток, обезвоживание
Походка/Подвижность	
0	Активная, энергичная
1	Может бежать, но вяло
2	Двигается неохотно, но может реагировать, если подгонять
3	Двигается только, если подгонять вручную, и только минимально
Тремор	
0	Признаки тремора отсутствуют
1	Очень слабый, непродолжительный
2	Слабо выраженный, видимый по сравнению с диким типом
3	Умеренный, очевидный без сравнений
4	Тяжелый, влияет на подвижность
Захват	
0	Ноги выворачиваются наружу при поднимании
1	1 нога вздергивается, не постоянно
2	1 нога постоянно ИЛИ обе ноги непродолжительное время вздергиваются по направлению внутрь
3	1 нога постоянно и 1 нога непродолжительное время вздергиваются по направлению внутрь
4	Обе ноги вздергиваются, постоянно
Осанка	
0	Нормальная, без уклона
1	Кратковременная сутулость, очевидная только при опирании или подъеме за хвост
2	Опирается вертикально при сутулой спине, спина остается сутулой во время движения
3	Почти постоянная сутулость
Помутнение роговицы	
0	Роговица прозрачная
1	Легкое затуманивание роговицы
2	Умеренное помутнение роговицы
3	Сильное помутнение роговицы – радужная оболочка видима
	Сильное помутнение роговицы – радужная оболочка не видима