



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.03

(51) Int. Cl. C12N 15/864 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.05

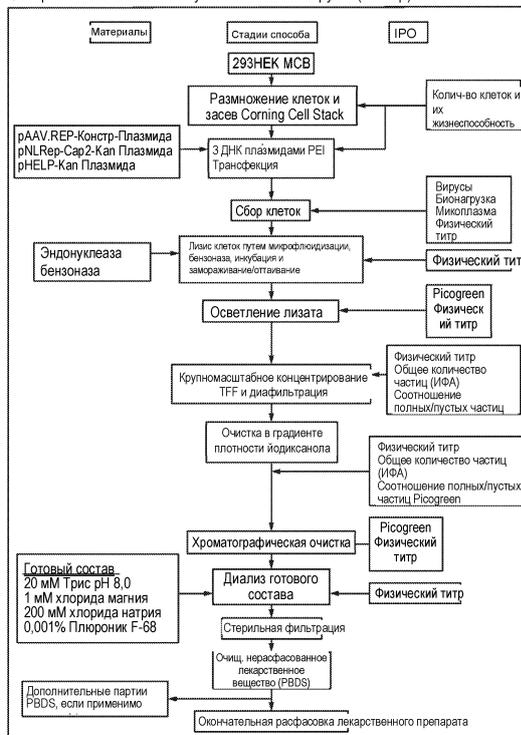
(54) КОМПОЗИЦИИ ААV, СПОСОБЫ ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/653,139; 62/746,980; 62/773,975
(32) 2018.04.05; 2018.10.17; 2018.11.30
(33) US
(86) PCT/US2019/026064
(87) WO 2019/195729 2019.10.10
(71) Заявитель:
НАЙТСТАРКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Труран Ричард, Онг Туйен (GB),
Жиран Валери (US)
(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены способы очистки частицы рекомбинантного ААV (гААV - англ.: recombinant adeno-associated virus) из культуры клеток-хозяев млекопитающих. В настоящем изобретении также предложены фармацевтическая композиция, полученная способами по изобретению, фармацевтические композиции и способ применения описанных в данном документе фармацевтических композиций для лечения заболевания.

Обзор типовой способа получения ААV2-конструкта (Констр)



202092071 A1

202092071 A1

КОМПОЗИЦИИ AAV, СПОСОБЫ ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[01] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки US № 62/653139, поданной 5 апреля 2018 г., US № 62/746980, поданной 17 октября 2018 г., и US № 62/773975, поданной 30 ноября 2018 г., содержание каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылок.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[02] Содержимое текстового файла с названием «NIGH-013/001WO_SeqList.txt», который был создан 4 апреля 2019 г. и имеет размер 60 КБ, полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[03] Данное изобретение относится к области терапии человека, биологических лекарственных продуктов, доставки последовательностей ДНК человека с помощью вирусов и способов их производства.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[04] Существует давно назревшая и неудовлетворенная потребность в векторах доставки на основе AAV и в улучшенных способах производства таких векторов доставки на основе AAV.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[05] В данном изобретении предложен способ очистки частицы AAV (AAV) из культуры клеток-хозяев млекопитающих, включающий стадии: (а) культивирования множества клеток-хозяев млекопитающих в культуральной среде в условиях, подходящих для образования множества частиц AAV, при этом множество клеток-хозяев млекопитающих трансфицировали плазмидным вектором, содержащим экзогенную последовательность, вспомогательным плазмидным вектором и плазмидным вектором, содержащим последовательность, кодирующую вирусный белок Rep и вирусный белок Cap, для получения множества трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих; (б) сбора культуральной среды, содержащей множество трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих; (с) сбора множества

частиц AAV из множества трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих; (d) концентрирования множества частиц AAV с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для получения концентрированного множества частиц AAV; (e) обогащения концентрированного множества частиц AAV до полных частиц AAV с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности для получения обогащенного множества полных частиц AAV; (f) очистки обогащенного множества полных частиц AAV с помощью анионообменной (AEX, англ.: anion exchange) хроматографии или аффинной хроматографии для получения элюата, содержащего очищенное и обогащенное множество полных частиц AAV; а также (g) диафильтрации и концентрирования элюата со стадии (f) в буфере для состава путем тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для получения конечной композиции, содержащей очищенное и обогащенное множество полных частиц AAV и буфер для состава. В некоторых вариантах осуществления полный AAV содержит экзогенную последовательность под контролем промотора, способного экспрессировать экзогенную последовательность в клетке млекопитающего или человека.

[06] В данном изобретении предложен способ очистки частицы рекомбинантного AAV (rAAV) из культуры клеток-хозяев млекопитающих, включающий стадии: (a) культивирования множества клеток-хозяев млекопитающих в культуральной среде в условиях, подходящих для образования множества частиц rAAV, при этом множество клеток-хозяев млекопитающих трансфицировали плазмидным вектором, содержащим экзогенную последовательность, вспомогательным плазмидным вектором и плазмидным вектором, содержащим последовательность, кодирующую вирусный белок Rep и вирусный белок Cap, для получения множества трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих; (b) сбора культуральной среды, содержащей множество трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих; (c) сбора множества частиц rAAV из множества трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих; (d) концентрирования множества частиц rAAV с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для получения концентрированного множества частиц rAAV; (e) обогащения концентрированного множества частиц rAAV до полных частиц rAAV с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности для получения обогащенного множества полных частиц rAAV; (f) очистки обогащенного множества полных частиц rAAV с помощью анионообменной (AEX) хроматографии или аффинной хроматографии для получения элюата, содержащего очищенное и обогащенное множество полных частиц rAAV; а также (g) диафильтрации и

концентрирования элюата со стадии (f) в буфере для состава путем тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для получения конечной композиции, содержащей очищенное и обогащенное множество полных частиц гAAV и буфер для состава. В некоторых вариантах осуществления полный гAAV содержит экзогенную последовательность под контролем промотора, способного экспрессировать экзогенную последовательность в клетке млекопитающего или человека.

[07] В данном изобретении предложен способ очистки частицы рекомбинантного AAV (гAAV) из культуры клеток-хозяев млекопитающих, включающий стадии: (a) культивирования множества клеток-хозяев млекопитающих в культуральной среде в условиях, подходящих для образования множества частиц гAAV-REP1, при этом множество клеток-хозяев млекопитающих трансфицировали плазмидным вектором, содержащим экзогенную последовательность, где экзогенная последовательность содержит последовательность, кодирующую Rab-сопровождающий белок 1 (REP1) человека, вспомогательным плазмидным вектором и плазмидным вектором, содержащим последовательность, кодирующую вирусный белок Rep и вирусный белок Cap, для получения множества трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих; (b) сбора культуральной среды, содержащей множество трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих; (c) сбора множества частиц гAAV из множества трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих; (d) концентрирования множества частиц гAAV с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для получения концентрированного множества частиц гAAV; (e) обогащения концентрированного множества частиц гAAV до полных частиц гAAV с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности для получения обогащенного множества полных частиц гAAV; (f) очистки обогащенного множества полных частиц гAAV с помощью анионообменной (AEX) хроматографии или аффинной хроматографии для получения элюата, содержащего очищенное и обогащенное множество полных частиц гAAV; а также (g) диафильтрации и концентрирования элюата со стадии (f) в буфере для состава путем тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для получения конечной композиции, содержащей очищенное и обогащенное множество полных частиц гAAV и буфер для состава.

[08] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию последовательность, кодирующая белок REP1 человека, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 gatatcgaat tcctgcagcc cggcggcacc atggcggata ctctcccttc ggagtttgat
```

```

61  gtgatcgtaa tagggacggg tttgcctgaa tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt
121 ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga agctactatg gaggaaactg ggccagtttt
181 agcttttcag gactattgtc ctggctaaag gaataccagg aaaacagtga cattgtaagt
241 gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg
301 aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta ttttgttatg ccagtcagga tttgcatgaa
361 gatgtcgaag aagctggtgc actgcagaaa aatcatgctc ttgtgacatc tgcaaactcc
421 acagaagctg cagattctgc cttcctgcct acggaggatg agtcattaag cactatgagc
481 tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc agcgatccag agaatgcgct agaagtaaat
541 ggtgctgaag tgacagggga aaaagaaaac cattgtgatg ataaaacttg tgtgccatca
601 acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg cctatagcag aagataccac agagcaacca
661 aagaaaaaca gaattactta ctcaaaaatt attaaagaag gcaggagatt taatattgat
721 ttagtatcaa agctgctgta ttctcgagga ttactaattg atcttctaata caaatctaata
781 gttagtcgat atgcagagtt taaaaatatt accaggattc ttgcatttcg agaaggacga
841 gtggaacagg ttccgtgttc cagagcagat gtctttaata gcaaacaact tactatggta
901 gaaaagcгаа tgctaатгаа атттctтaca тттtgтatgg аататgагаа ататcctgat
961 gaatataaag gatatgaaga gatcacattt tatgaatatt taaagactca aaaattaacc
1021 cccaacctcc aatatattgt catgcattca attgcaatga catcagagac agccagcagc
1081 accatagatg gtctcaaagc taccaaaaac tttcttcaact gtcttgggcg gtatggcaac
1141 actccattht tgthtcttht атatggccaa ggagaactcc cccagtgttt ctgcaggatg
1201 tgtgctgtgt ttggtggaat ttattgtctt cgccattcag tacagtgcct tgtagtggac
1261 aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata gatcagtttg gtcagagaaat аатctctgag
1321 catttctctg tggaggacag ttactttctt gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg
1381 cagatctcca gggcagtgct gattacagat agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa
1441 cagatttcca ttttgacagt gccagcagag gaaccaggaa cttttgctgt tccgggtcatt
1501 gagttatgth cttcaacgat gacatgcatg aaaggcacct аттtgthtca тttgacttcg
1561 acatcttcta aaacagcaag agaagattta gaatcagttg tgcaaaaact gttgttcca
1621 tatactgaaa tggagataga ааатgааcaа gtagaaaagc caagaattct tggggctctt
1681 tacttcaata tgagagattc gtcagacatc agcaggagct gttataatga tttaccatcc
1741 aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag
1801 gctgaaacac ttttccagga аатctgcccc аатgаagatt tctgtcccc tccaccaaat
1861 cctgaagaca ttatccttga tggagacagt ttacagccag aggcttcaga атccagtgcc
1921 ataccagagg ctaactcgga gactttcaag gaaagcacia accttgaaa cctagaggag
1981 tcctctgaat aa (SEQ ID NO: 1),

```

в которой консенсусная последовательность Kozac обозначена подчеркиванием, а стартовый кодон выделен жирным шрифтом.

[09] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию белок REP1 человека содержит или состоит из аминокислотной последовательности

```

1  MADTLPSEFD VIVIGTGLPE SIIAAACSRG GRRVLHVDSR SYYGGNWASF SFSGLLSWLK
61  EYQENSIVS DSPVWQDQIL ENEEAIALSR KDKTIQHVEV FCYASQDLHE DVEEAGALQK
121 NHALVTSANS TEAADSFLP TEDESLSMTS CEMLTEQTPS SDPENALEVN GAEVTGEKEN
181 HCDDKTCVPS TSAEDMSENV PIAEDTTEQP KKNRITYSQI IKEGRRFNID LVSKLLYSRG
241 LLIDLLIKSN VSRYAEFKNI TRILAFREGR VEQVPCSRAD VFNSKQLTMV EKRMLMKFLT
301 FCMYEYKYPD EYKGYEETIF YEYLKTKQKLT PNLQYIVMHS IAMTSETASS TIDGLKATKN
361 FLHCLGRYGN TPFLFPLYGQ GELPQCFCRM CAVFGGIYCL RHSVQCLVVD KESRKCKAII
421 DQFGQRIISE HFLVEDSYFP ENMCSRQYR QISRVLITD RSVLKTDSQ QISILTVPAE
481 EPGTFVRVI ELCSSTMTCM KGTYLVLHLC TSSKTAREDL ESVVQKLFVP YTEMEIENEQ
541 VEKPRILWAL YFNMRDSSDI SRSCYNDLPS NVYVCSGPDC GLGNDNAVQK AETLFQEICP
601 NEDFCPPPPN PEDIILDGDS LQPEASESSA IPEANSETFK ESTNLGNLEE SSE (SEQ ID NO:
2)

```

[010] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию культуральная среда содержит пониженное количество фетальной бычьей

сыворотки. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда не содержит пониженного количества фетальной бычьей сыворотки.

[011] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию культуральная среда включает среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM).

[012] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию культуральная среда содержит глицин, L-аргинин гидрохлорид, L-цистин дигидрохлорид, L-глутамин, L-гистидин гидрохлорид- H_2O , L-изолейцин, L-лейцин, L-лизина гидрохлорид, L-метионин, L-фенилаланин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, дегидрат динатриевой соли L-тирозина, L-валин, холин хлорид, D-пантотенат кальция, фолиевую кислоту, ниацинамид, пиридоксин гидрохлорид, рибофлавин, тиамин гидрохлорид, i-инозитол, хлорид кальция ($CaCl_2$) (ангид.), нитрат железа ($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$), сульфат магния ($MgSO_4$) (ангид.), хлористый калий (KCl), бикарбонат натрия ($NaHCO_3$), хлорид натрия (NaCl), одноосновный фосфат натрия ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) и D-глюкозу (декстрозу).

[013] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию культуральная среда содержит бессывороточную среду. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда состоит из бессывороточной среды.

[014] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию культуральная среда содержит осветленную среду. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда состоит из осветленной среды. В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию сбор среды включает безбелковую среду. В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию сбор среды состоит из безбелковой среды.

[015] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию клетки млекопитающих трансфецировали композицией, содержащей реагент трансдукции PEI.

[016] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию плазмидный вектор, содержащий экзогенную последовательность, дополнительно содержит последовательность, кодирующую 5' инвертированный концевой повтор (ITR), и последовательность, кодирующую 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, получена из последовательности, кодирующей 5' ITR AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, содержит

последовательность, которая идентична последовательности, кодирующей 5' ITR AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, содержит последовательность, которая не идентична последовательности, кодирующей 5' ITR AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 3' ITR, получена из последовательности, кодирующей 3' ITR AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 3' ITR, содержит последовательность, которая идентична последовательности, кодирующей 3' ITR AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 3' ITR, содержит последовательность, которая не идентична последовательности, кодирующей 3' ITR AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, или последовательность, кодирующая 3' ITR, содержит 145 пар оснований (п.о.).

[017] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию плазмидный вектор, содержащий экзогенную последовательность, вспомогательный плазмидный вектор или плазмидный вектор, содержащий последовательность, кодирующую вирусный белок Rep и вирусный белок Cap, дополнительно содержит последовательность, кодирующую маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления плазмидный вектор, содержащий экзогенную последовательность, дополнительно содержит последовательность, кодирующую маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный плазмидный вектор дополнительно содержит последовательность, кодирующую маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления плазмидный вектор, содержащий последовательность, кодирующую вирусный белок Rep и вирусный белок Cap, дополнительно содержит последовательность, кодирующую маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая маркер селекции, передает устойчивость к канамицину.

[018] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию стадия сбора (с) включает механическое разрушение множества трансфицированных клеток млекопитающих для высвобождения частиц рекомбинантного AAV (rAAV), продуцируемых множеством трансфицированных клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления механическое разрушение включает микрофлюидизацию.

[019] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию стадия концентрирования дополнительно включает (1) осветление концентрированного множества частиц гAAV посредством глубинной фильтрации для получения концентрированного и осветленного множества частиц гAAV.

[020] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию стадия концентрирования дополнительно включает (2) замораживание концентрированного и осветленного множества частиц гAAV при -80°C для получения промежуточного продукта способа.

[021] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию стадия обогащения (e) включает ультрацентрифугирование в градиенте плотности йодиксанола для получения обогащенного множества частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления градиент плотности представляет собой прерывистый градиент плотности. В некоторых вариантах осуществления градиент плотности йодиксанола включает одну или более композиций йодиксанола, имеющих концентрацию 15%, 25%, 40% и 57% соответственно. В некоторых вариантах осуществления обогащенное множество частиц гAAV выделяют из градиента плотности йодиксанола. В некоторых вариантах осуществления обогащенное множество частиц гAAV выделено с границы раздела композиции йодиксанола с концентрацией 40% и композиции йодиксанола с концентрацией 57%. В некоторых вариантах осуществления концентрированное и осветленное множество частиц гAAV вносят в градиент плотности согласно настоящему описанию и затем подвергают стадии ультрацентрифугирования. В некоторых вариантах осуществления после стадии ультрацентрифугирования обогащенное множество частиц гAAV или полных гAAV-частиц выделяют из градиента плотности.

[022] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию аффинная хроматография на стадии очистки (f) включает матрицу AVB-сефарозы.

[023] В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему описанию буфер для состава содержит Трис, MgCl_2 и NaCl . В некоторых вариантах осуществления буфер для состава содержит 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl_2 и 200 мМ NaCl при pH 8. В некоторых вариантах осуществления буфер для состава содержит 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl_2 и 200 мМ NaCl при pH 8 с полоксамером 188 при 0,001%.

[024] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию анионообменная хроматография включает использование хроматографии

UnoSphere Q или Poros AEX. В некоторых вариантах осуществления анионообменная хроматография дополнительно включает стадии создания анионообменной хроматограммы и выбора пика на анионообменной хроматограмме, содержащего полные частицы гAAV.

[025] В некоторых вариантах осуществления способов очистки частицы рекомбинантного AAV (гAAV) по настоящему описанию способ дополнительно включает стадию разведения перед стадией (g), при этом стадия разведения включает (1) разведение первого очищенного множества частиц гAAV со стадии (d) в 20 раз перед стадией (e), когда хроматография включает контактирование первого очищенного множества частиц гAAV с UnoQ или (2) разведение первого очищенного множества частиц гAAV со стадии (d) в 6 раз до стадии (e), когда хроматография включает контактирование первого очищенного множества гAAV частицы с AVB. В некоторых вариантах осуществления стадия разведения включает добавление буфера для разведения к первому очищенному множеству частиц гAAV, при этом хроматография включает контактирование первого очищенного множества частиц гAAV с UnoQ, при этом буфер для разведения содержит 10 мМ Трис при pH 9. В некоторых вариантах осуществления стадия разведения включает добавление буфера для разведения к первому очищенному множеству частиц гAAV, при этом хроматография включает контактирование первого очищенного множества частиц гAAV с AVB, и при этом буфер для разведения содержит 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂ и 200 мМ NaCl при pH 8. В некоторых вариантах осуществления на стадии (e) получают композицию, содержащую второе очищенное множество частиц гAAV и элюирующий буфер. В некоторых вариантах осуществления хроматография включает UnoQ, и при этом элюирующий буфер содержит 10 мМ Трис, 650 мМ NaCl при pH 9. В некоторых вариантах осуществления хроматография включает AVB, и при этом элюирующий буфер содержит 10,8 мМ NaHPO₄, 44,6 мМ лимонной кислоты, 400 мМ NaCl при pH 2,6. В некоторых вариантах осуществления элюирующий буфер элюируется буфером для нейтрализации. В некоторых вариантах осуществления буфер для нейтрализации содержит 1М Трис при pH 8,8.

[026] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию TFF на стадии (d) или на стадии (g) выполняется с использованием фильтра с полыми волокнами 100 кДа (HFF). В некоторых вариантах осуществления TFF на стадии (d) или на стадии (g) выполняется с использованием HFF 70 кДа. В некоторых вариантах осуществления TFF на стадии (d) или на стадии (g) выполняется с

использованием HFF 50 кДа. В некоторых вариантах осуществления стадия (g) способа дополнительно включает вторую TFF, причем TFF на стадии (d) и первая TFF на стадии (g) выполняются с использованием HFF 100 кДа, а вторая TFF на стадии (g) выполняется с использованием HFF 50 кДа или 70 кДа.

[027] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию клетка-хозяин выделена или получена из культивируемой клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293

[028] В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию клетка-хозяин выделена или получена из первичной клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой иммортализованную клетку или стволовую клетку.

[029] В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая множество частиц gAAV, полученных способом по изобретению.

[030] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию фармацевтическая композиция содержит (a) от 0,5 до $2,5 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV); (b) меньше 50% пустых капсидов; (c) меньше 4 нг/мл остаточного белка клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл; и (d) меньше 7×10^{-3} пг/мл остаточной ДНК клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл.

[031] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций по настоящему описанию фармацевтическая композиция дополнительно содержит (e) множество функциональных гв/мл, причем каждый из функциональных геномов вектора способен экспрессировать экзогенную последовательность в клетке после трансдукции.

[032] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций по настоящему описанию после трансдукции клетки фармацевтической композицией множество функциональных гв/мл экспрессируют в 2 раза больше экзогенной последовательности по сравнению с уровнем экспрессии соответствующей эндогенной последовательности в нетрансдуцированной клетке. В некоторых вариантах осуществления после трансдукции клетки фармацевтической композицией множество функциональных гв/мл экспрессируют экзогенную последовательность в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 раз больше, или в любое другое значение между указанными, по сравнению с уровнем экспрессии соответствующей эндогенной

последовательности в нетрансдуцированной клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность идентичны. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность не идентичны. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность не идентичны, но соответствующий полипептид идентичен. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность имеют по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии у млекопитающего или человека по сравнению с соответствующей эндогенной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, включая те, в которых экзогенная последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии у млекопитающего или человека по сравнению с соответствующей эндогенной последовательностью, экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность имеют по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, гомологии.

[033] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций по настоящему описанию после трансдукции клетки фармацевтической композицией по настоящему описанию экзогенная последовательность кодирует белок. В некоторых вариантах осуществления белок, кодируемый экзогенной последовательностью, имеет уровень активности, равный или превышающий уровень активности белка, кодируемого соответствующей последовательностью нетрансдуцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность идентичны. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность не идентичны. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность не идентичны, но соответствующий полипептид идентичен. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность имеют по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности. В некоторых вариантах

осуществления, включая те, в которых экзогенная последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии у млекопитающего или человека по сравнению с соответствующей эндогенной последовательностью, экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность имеют по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, гомологии. В некоторых вариантах осуществления активность включает связывание с, активацию и/или перенос одной или более функциональных групп на лиганд или субстрат. В некоторых вариантах осуществления белок включает белок REP-1, и активность включает пренилирование субстрата REP-1.

[034] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций по настоящему описанию фармацевтическая композиция содержит (а) от $1,0$ до $2,0 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (а) примерно $1,0 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (а) $1,0 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV).

[035] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций по настоящему описанию фармацевтическая композиция содержит (b) меньше 50% пустых капсидов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций по настоящему описанию фармацевтическая композиция содержит (b) меньше 30% пустых капсидов.

[036] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию дефектный по репликации и рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) содержит последовательность, выделенную или полученную из AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления последовательность, выделенная или полученная из AAV2, содержит последовательность, кодирующую инвертированный концевой повтор (ITR). В некоторых вариантах осуществления дефектный по репликации и рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) содержит последовательность, кодирующую 5' ITR, и последовательность, кодирующую 3' ITR. В некоторых вариантах

осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, содержат последовательность ITR AAV2 дикого типа.

[037] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию клетка-хозяин выделена или получена из культивируемой клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293

[038] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию клетка-хозяин выделена или получена из первичной клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой иммортализованную клетку или стволовую клетку.

[039] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций по настоящему описанию каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5' до 3': (a) последовательность, кодирующую 5' ITR AAV2, (b) последовательность, кодирующую ранний энхансерный элемент, (c) последовательность, кодирующую промотор, (d) последовательность, кодирующую экзон и интрон, (e) последовательность, кодирующую сайт акцептора сплайсинга, (f) последовательность, кодирующую Rab-сопровождающий белок 1 (REP1), (g) последовательность, кодирующую посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE), (h) последовательность, кодирующую сайт полиаденилирования (полиА) и (i) последовательность, кодирующую 3' ITR AAV2. (см. также патент США № 9834788, содержание которого включено в настоящий документ в полном объеме).

[040] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5' до 3' элементы от (a) до (i), ранний энхансерный элемент содержит последовательность, выделенную или полученную из цитомегаловируса (CMV). В некоторых вариантах осуществления ранний энхансерный элемент содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1  ATTGACGT  CAATAATGAC  GATGTTCCC  ATAGTAACGC  CAATAGGGAC  TTTCCATTGA
61  CGTCAATGGG  TGGAGTATTT  ACGGTAAACT  GCCCACTTGG  CAGTACATCA  AGTGATCAT
121  ATGCCAAGTA  CGCCCCSTAT  TGACGTCAAT  GACGGTAAAT  GGCCCCCCTG  GCATTATGCC
181  CAGTACATGA  CCTTATGGGA  STTTCCTACT  TGGCAGTACA  TCTACGTATT  AGTCATCGCT
```

241 АТТАССАТGG (SEQ ID NO: 3) . В некоторых вариантах осуществления ранний энхансерный элемент содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 ССАТТGACGT СААТААТGAC GТAТGТТССС АТАGТААССG СААТАGГGAC ТТССАТТGA
61 СGTСААТGGG TGGAGTATTT АСGGТАААСТ GСССАСТТGG САGТАСАТСА AGTGTATCAT
121 АТGССАAGTA СGСССССТАТ TGAСGTСААТ GACGGТАААТ GGСССGССТG GСАТТАТGСС
181 САGТАСАТGA ССТТАТGGGA СТТТССТАСТ TGGCAGTACA ТСТАСGTATТ AGTCAТСGCT
241 АТТАССАТGG (SEQ ID NO: 4) .

[041] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5' до 3' элементы от (a) до (i), последовательность, кодирующая промотор, содержит или состоит из последовательности, выделенной или полученной из последовательности, кодирующей ген куриного бета-актина (СВА). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая промотор, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 TCGAGGTGAG CCCCACGTTT TGCTTCACTC TCCCCATCTC CCCCCCTCC CCACCCCCAA
61 TTTTGTATTT ATTTATTTTT ТААТТАТТТТ GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG GGGGGGGGGG
121 GGC CGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGCGGGG CGGGGCGAGG CGGAGAGGTG
181 CGGCGGCAGC СААТСАGAGC GGCGCGCTCC GAAAGTTTCC ТТТТАТGGCG AGGCGGCGGC
241 GGC GGCGCC СТАТААААAG СGAAGCGCGC GGCGGGCGGG AGTCGCTGCG CGCTGCCTTC
301 GСССCGTGCС СGGCTCCGCC GCCGCCTCGC GCCGCCCGCC CCGGCTCTGA CTGACC CGCT
361 ТАСТСССАСА GGTGAGCGGG СGGGACGGCC СТТСТССТСС GGGCTGTAAT TAGCGCTTGG
421 ТТТААТGACG GCTTGTТТСТ ТТТСТGTGGC TGCGTGAAAG ССТTGAGGGG СТССGGGAGG
481 GCCSTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGG (SEQ ID NO: 5) .

[042] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5' до 3' элементы от (a) до (i), последовательность, кодирующая экзон и интрон, содержит или состоит из последовательности, выделенной или полученной из последовательности, кодирующей ген куриного бета-актина курицы (СВА). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая экзон и интрон, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 TCGAGGTGAG CCCCACGTTT TGCTTCACTC TCCCCATCTC CCCCCCTCC CCACCCCCAA
61 TTTTGTATTT ATTTATTTTT ТААТТАТТТТ GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG GGGGGGGGGG
121 GGC CGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGCGGGG CGGGGCGAGG CGGAGAGGTG
181 CGGCGGCAGC СААТСАGAGC GGCGCGCTCC GAAAGTTTCC ТТТТАТGGCG AGGCGGCGGC
241 GGC GGCGCC СТАТААААAG СGAAGCGCGC GGCGGGCGGG AGTCGCTGCG CGCTGCCTTC
301 GСССCGTGCС СGGCTCCGCC GCCGCCTCGC GCCGCCCGCC CCGGCTCTGA CTGACC CGCT

361 TACTCCCACA GGTGAGCGGG CGGGACGGCC CTTCTCCTCC GGGCTGTAAT TAGCGCTTGG
421 TTТААТGACG GCTTGTTTCT TTTCTGTGGC TGCGTGAAAG CCTTGAGGGG CTCCGGGAGG
481 GCCSTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGG (SEQ ID NO: 5).

[043] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5 'до 3' элементы от (a) до (i), последовательность, кодирующая сайт акцептора сплайсинга, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности, кодирующей сайт акцептора сплайсинга бета-глобина *Oryctolagus cuniculus*. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая сайт акцептора сплайсинга бета-глобина *Oryctolagus cuniculus*, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 CTCTGCT AACCATGTTT ATGCSTTCTT CTTTTTCTTA CAGCTCCTGG GCAACGTGCT
61 GGTТАТТGTG CTGTCTCATC АТТТТGGCAA АГААТТ (SEQ ID NO: 6).

[044] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5 'до 3' элементы от (a) до (i), последовательность, содержащая ранний энхансерный элемент, последовательность, содержащая промотор, последовательность, содержащая интрон и экзон, и последовательность, содержащая сайт акцептора сплайсинга, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 TCGAGGTGAG CCCCACGTTT TGCTTCACTC TCCCCATCTC CCCCCCTCC CCACCCCCAA
61 TTTTGTATTT АТТТАТТТТТ ТААТТАТТТТ GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG GGGGGGGGGG
121 GGCGCGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGGCGGGG CGGGGCGAGG CGGAGAGGTG
181 CGGCGGCAGC СААТСАGAGC GGCGCGCTCC GAAAGTTTCC TTTTATGGCG AGGCGGCGGC
241 GGCGGCGGCC СТАТАААААG CGAAGCGCGC GCGGGGCGGG AGTCGCTGCG CGCTGCCTTC
301 GCCCCGTGCC CCGCTCCGCC GCCGCCTCGC GCCGCCCGCC CCGGCTCTGA CTGACCGCGT
361 TACTCCCACA GGTGAGCGGG CGGGACGGCC CTTCTCCTCC GGGCTGTAAT TAGCGCTTGG
421 TTТААТGACG GCTTGTTTCT TTTCTGTGGC TGCGTGAAAG CCTTGAGGGG CTCCGGGAGG
481 GCCSTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGG TGTCGCGGG GGGACGGCTG CCTTCGGGGG
541 GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG GCGGCTCTAG AGCCTCTGCT
601 AACCATGTTT ATGCSTTCTT CTTTTTCTTA CAGCTCCTGG GCAACGTGCT GGTТАТТGTG
661 CTGTCTCATC АТТТТGGCAA АГААТТGGAT C (SEQ ID NO: 7).

[045] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5 'до 3' элементы от (a) до

(i), последовательность, содержащая ранний энхансерный элемент, последовательность, содержащая промотор, последовательность, содержащая интрон и экзон, и последовательность, содержащая сайт акцептора сплайсинга, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1  CCATTGACGT  CAATAATGAC  GTATGTTCCC  ATAGTAACGC  CAATAGGGAC  TTTCCATTGA
61  CGTCAATGGG  TGGAGTATTT  ACGGTAACCT  GCCCACTTGG  CAGTACATCA  AGTGTATCAT
121  ATGCCAAGTA  CGCCCCSTAT  TGACGTCAAT  GACGGTAAAT  GGCCCGCCTG  GCATTATGCC
181  CAGTACATGA  CCTTATGGGA  STTTCCTACT  TGGCAGTACA  TCTACGTATT  AGTCATCGCT
241  ATTACCATGG  TCGAGGTGAG  CCCCACGTTT  TGCTTCACTC  TCCCCATCTC  CCCCCCTCC
301  CCACCCCCAA  TTTTGTATTT  ATTTATTTTT  TAATTATTTT  GTGCAGCGAT  GGGGGCGGGG
361  GGGGGGGGGG  GGC GCGCGCC  AGGCGGGGCG  GGGCGGGGCG  AGGGGCGGGG  CGGGGCGAGG
421  CGGAGAGGTG  CGGCGGCAGC  CAATCAGAGC  GGC GCGCTCC  GAAAGTTTCC  TTTTATGGCG
481  AGGCGGCGGC  GGC GGC GGC  CTATAAAAAG  CGAAGCGCGC  GGC GGC GGC  AGTCGCTGCG
541  CGCTGCCTTC  GCCCCGTGCC  CCGCTCCGCC  GCCGCTCGC  GCCGCCGCC  CCGGCTCTGA
601  CTGACCGCGT  TACTCCACA  GGTGAGCGGG  CGGGACGGCC  CTTCTCTCC  GGGCTGTAAT
661  TAGCGCTTGG  TTTAATGACG  GCTTGTCTCT  TTTCTGTGGC  TCGGTGAAAG  CCTTGAGGGG
721  CTCCGGGAGG  GCCCTTTGTG  CGGGGGGAGC  GGCTCGGGC  TGTCCGCGGG  GGGACGGCTG
781  CTTTCGGGGG  GGACGGGGCA  GGGCGGGGTT  CGGCTTCTGG  CGTGTGACCG  GCGGCTCTAG
841  AGCCTCTGCT  AACCATGTTT  ATGCCTTCTT  STTTTTCCTA  CAGCTCCTGG  GCAACGTGCT
901  GGTATTGTG  CTGTCTCATC  ATTTTGGCAA  AGAATTGGAT  C (SEQ ID NO: 8).
```

[046] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5' до 3' элементы от (a) до (i), последовательность, кодирующая белок REP1, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности REP1 млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления последовательность REP1 млекопитающего выделена или получена от мыши, крысы, кролика, не являющегося человеком примата или человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность REP1 млекопитающего выделена или получена от человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая белок REP1 человека, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1  gatatcgaat  tcctgcagcc  cggcggcacc  atggcggata  ctctcccttc  ggagtttgat
61  gtgatcgtaa  tagggacggg  tttgcctgaa  tccatcattg  cagctgcatg  ttcaagaagt
121  ggccggagag  ttctgcatgt  tgattcaaga  agctactatg  gaggaactg  ggccagtttt
181  agcttttcag  gactattgtc  ctggctaaag  gaataccagg  aaaacagtga  cattgtaagt
241  gacagtccag  tgtggcaaga  ccagatcctt  gaaaatgaag  aagccattgc  tcttagcagg
301  aaggacaaaa  ctattcaaca  tgtggaagta  ttttgttatg  ccagtcagga  tttgcatgaa
361  gatgtcgaag  aagctggtgc  actgcagaaa  aatcatgctc  ttgtgacatc  tgcaaactcc
421  acagaagctg  cagattctgc  cttcctgcct  acggaggatg  agtcattaag  cactatgagc
481  tgtgaaatgc  tcacagaaca  aactccaagc  agcgatccag  agaatgctgc  agaagtaaat
541  ggtgctgaag  tgacagggga  aaaagaaaac  cattgtgatg  ataaaacttg  tgtgccatca
601  acttcagcag  aagacatgag  tgaaaatgtg  cctatagcag  aagataccac  agagcaacca
661  aagaaaaaca  gaattactta  ctcaaaaatt  attaaagaag  gcaggagatt  taatattgat
721  ttagtatcaa  agctgctgta  ttctcgagga  ttactaattg  atcttctaata  caaatctaata
781  gttagtcgat  atgcagagtt  taaaaatatt  accaggattc  ttgcatttcg  agaaggacga
841  gtggaacagg  ttccgtgttc  cagagcagat  gtctttaata  gcaaaacaact  tactatggta
```

```

901 gaaaagcgaa tgctaataa atttcttaca ttttgtatgg aatatgagaa atatcctgat
961 gaatataaag gatataaaga gatcacattt tatgaatatt taaagactca aaaattaacc
1021 cccaacctcc aatatattgt catgcattca attgcaatga catcagagac agccagcagc
1081 accatagatg gtctcaaagc taccaaaaaac tttcttctact gtcttgggcg gtatggcaac
1141 actccatttt tgtttctctt atatggccaa ggagaactcc cccagtgttt ctgcaggatg
1201 tgtgctgtgt ttggtggaat ttattgtctt cgccattcag tacagtgcct tgtagtggac
1261 aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata gatcagtttg gtcagagaat aatctctgag
1321 caatttctcg tggaggacag ttactttctt gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg
1381 cagatctcca gggcagtgtt gattacagat agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa
1441 cagatttcca ttttgacagt gccagcagag gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt
1501 gagttatgtt cttcaacgat gacatgcatg aaaggcacct atttggttca tttgacttgc
1561 acatcttcta aaacagcaag agaagattta gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca
1621 tatactgaaa tggagataga aaatgaacaa gtagaaaagc caagaattct gtgggctctt
1681 tacttcaata tgagagattc gtcagacatc agcaggagct gttataatga tttaccatcc
1741 aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag
1801 gctgaaacac ttttccagga aatctgcccc aatgaagatt tctgtcccc tccaccaaat
1861 cctgaagaca ttatccttga tggagacagt ttacagccag aggcttcaga atccagtgcc
1921 ataccagagg ctaactcgga gactttcaag gaaagcacia accttggaac cctagaggag
1981 tcctctgaat aa (SEQ ID NO: 9).

```

В некоторых вариантах осуществления белок REP1 человека содержит или состоит из аминокислотной последовательности

```

1 MADTLPSEFD VIVIGTGLPE SIIAAACSRG GRRVLHVDNR SYGGNWASF SFSGLLSWLK
61 EYQENSIVS DSPVWQDQIL ENEEAIASLR KDKTIQHVEV FCYASQDLHE DVEEAGALQK
121 NHALVTSANS TEAADSFLP TEDESLSLMS CEMLTEQTPS SDPENALEVN GAEVTGEKEN
181 HCDDKTCVPS TSAEDMSENV PIAEDTTEQP KKNRITYSQI IKEGRRFNID LVSKLLYSRG
241 LLIDLLIKSN VSRYAEFKNI TRILAFREGR VEQVPCSRAD VFNSKQLTMV EKRMLMKFLT
301 FCMEYEKYPD EYKGYEETIF YEYLKTQKLT PNLQYIVMHS IAMTSETASS TIDGLKATKN
361 FLHCLGRYGN TPFLFPLYGQ GELPQCFCRM CAVFGGIYCL RHSVQCLVVD KESRKCKAII
421 DQFGQRIISE HFLVEDSYFP ENMCSRQYR QISRVLITD RSVLKTDSQ QISILVPAE
481 EPGTFAVRVI ELCSSMTMCM KGTYLVHLTC TSSKTAREDL ESVVQKLFVP YTEMEIENEQ
541 VEKPRILWAL YFNMRDSSDI SRSCYNLPS NVYVCSGPDC GLGNDNAVKQ AETLFQEICP
601 NEDFCPPPN PEDIILDGDS LQPEASESSA IPEANSETFK ESTNLGNLEE SSE (SEQ ID NO:
10) .

```

[047] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гААV из множества полных гААV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5 'до 3' элементы от (а) до (i), последовательность, кодирующая PRE, содержит последовательность, выделенную или полученную из вируса гепатита сурка (WPRE). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая WPRE, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```

1 atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc
61 cttttacgct atgtggatac gctgctttaa tgcccttgta tcatgctatt gcttcccgta
121 tggctttcat tttctctctc ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagtgtt
181 ggcccgttgt caggcaacgt ggcgtggtgt gcaactgtgt tgcctgacgca acccccactg
241 gttggggcat tgccaccacc tgcagctccc tttccgggac tttcgtttc cccctcccta
301 ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg gctcggctgt
361 tgggcaactga caattccgtg gtgttgcggg ggaatcatc gtcctttcct tggctgctcg
421 cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tggccctca
481 atccagcggc ccttctctcc cgcggcctgc tgcggctct ggcgcctctt ccgcgtctt
541 gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc tttgggccc cccccgc (SEQ ID NO: 11) .

```

[048] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5 'до 3' элементы от (а) до (i), последовательность, кодирующая сайт полиаденилирования (полиА), содержит последовательность, выделенную или полученную из гена млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая сайт полиаденилирования (полиА), содержит последовательность, выделенную или полученную из гена гормона роста крупного рогатого скота (BGH). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая сайт полиА, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1 tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctggtgttt gccctcccc
61 cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga
121 aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga
181 cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgctg tgggctctat
241 ggcttctgag gcggaagaa ccagctgggg (SEQ ID NO: 12).
```

[049] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5 'до 3' элементы от (а) до (i), последовательность, кодирующая 5' ITR AAV2, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1 ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggctgctg ggcgacctt
61 ggtcgcccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact
121 aggggttctc tgtagttaat gatt (SEQ ID NO: 13).
```

[050] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5 'до 3' элементы от (а) до (i), последовательность, кодирующая 3' ITR AAV2, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1 AGGAACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG CTCCTGAGG
61 CCGGGCGACC AAAGGTGCGC CGACGCCCGG GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAGA
121 G (SEQ ID NO: 14).
```

[051] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из

множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит:
последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5 'до 3' элементы от (a) до (i), нуклеиновая кислота, содержащая от 5 'до 3' элементы от (a) до (i), содержит или состоит из последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, содержащая от 5 'до 3' элементы от (a) до (i), содержит или состоит из одноцепочечной последовательности ДНК.

[052] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит:
последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5 'до 3' элементы от (a) до (i), каждый гAAV из множества полных гAAV конечной композиции содержит капсидный белок, выделенный или полученный из AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV2 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью

```
1 MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKCLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD
61 KGEFVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAV FQ
121 AKKRVLEPLG LVEE PVKTAP GK KRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFQQTGDAD
181 SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI
241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDENRFHCH FSPRDWQRLI
301 NNNWGFPRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG
361 CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF
421 HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG
481 PCYRQQRVSK TSADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL
541 IFGKQGS EKT NVDIEKVMIT DEEEI RTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV
601 LPGMVWQDRD VYLQGP I WAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT
661 FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY
721 SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO: 15).
```

В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV2 содержит аминокислотную последовательность

```
1 MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKCLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD
61 KGEFVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAV FQ
121 AKKRVLEPLG LVEE PVKTAP GK KRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFQQTGDAD
181 SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI
241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDENRFHCH FSPRDWQRLI
301 NNNWGFPRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG
361 CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF
421 HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG
481 PCYRQQRVSK TSADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL
541 IFGKQGS EKT NVDIEKVMIT DEEEI RTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV
601 LPGMVWQDRD VYLQGP I WAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT
661 FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY
721 SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO: 15).
```

[053] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из

множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит:
последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5' до 3' элементы от (a) до (i), фармацевтическая композиция дополнительно содержит буфер для состава. В некоторых вариантах осуществления буфер для состава содержит Трис, MgCl₂ и NaCl. В некоторых вариантах осуществления буфер для состава содержит 20 mM Трис, 1 mM MgCl₂ и 200 mM NaCl при pH 8. В некоторых вариантах осуществления буфер для состава содержит 20 mM Трис, 1 mM MgCl₂ и 200 mM NaCl при pH 8 с полоксамером 188 при 0,001%.

[054] В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно настоящему описанию, включая те, в которых каждый полный гAAV из множества полных гAAV конечной композиции дополнительно содержит:
последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5' до 3' элементы от (a) до (i), множество полных гAAV находятся в концентрации от 1×10^8 геномных частиц (гч)/мл до 1×10^{14} гч/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления множество полных гAAV находятся в концентрации от $0,5 \times 10^{10}$ гч/мл до $2,5 \times 10^{12}$ гч/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления множество полных гAAV находятся в концентрации от 1×10^{11} гч/мл до 5×10^{13} гч/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления множество полных гAAV находятся в концентрации от 1×10^{11} гч/мл до 2×10^{12} гч/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления множество полных гAAV находятся в концентрации 1×10^{12} гч/мл. В некоторых вариантах осуществления множество полных гAAV находятся в концентрации 1×10^{11} гч/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрацию множества полных гAAV измеряют с помощью количественной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления в количественной ПЦР используется суперспирализованный плазмидный вектор в качестве стандарта. В некоторых вариантах осуществления в количественной ПЦР используется линейаризованный плазмидный вектор в качестве стандарта.

[055] В настоящем описании предлагается устройство для доставки, содержащее фармацевтическую композицию по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления устройство для доставки содержит один или более из шприца, катетера и иглы. В некоторых вариантах осуществления устройство для доставки подходит для введения фармацевтической композиции путем инъекции. В некоторых вариантах осуществления устройство для доставки подходит для введения фармацевтической композиции путем инфузии. В некоторых вариантах осуществления устройство для

доставки подходит для введения фармацевтической композиции субретинальным путем. В некоторых вариантах осуществления устройство для доставки подходит для введения фармацевтической композиции супрахориоидальным путем.

[056] В настоящем описании предлагается способ лечения болезни или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением.

[057] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство сетчатки. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой хороидеремию.

[058] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию терапевтически эффективное количество включает количество от минимально эффективного количества до максимально переносимого количества фармацевтической композиции.

[059] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию минимально эффективное количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для трансдукции по меньшей мере одного нейрона сетчатки или ее целевой части. В некоторых вариантах осуществления минимально эффективное количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для трансдукции по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или любого другого процентного значения между указанными, нейронов сетчатки или ее целевой части. В некоторых вариантах осуществления минимально эффективное количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для улучшения остроты зрения субъекта. В некоторых вариантах осуществления минимально эффективное количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для уменьшения признака или симптома заболевания сетчатки. В некоторых вариантах осуществления заболевание сетчатки представляет собой хороидеремию.

[060] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию максимально переносимое количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для того, чтобы вызвать нежелательные явления. В некоторых вариантах осуществления

нежелательное явление включает иммунный ответ на фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ включает воспаление. В некоторых вариантах осуществления воспаление является системным. В некоторых вариантах осуществления воспаление является локальным. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление является серьезным. В некоторых вариантах осуществления нежелательные явления нельзя предотвратить, уменьшить или контролировать, назначая субъекту вторичное лечение. В некоторых вариантах осуществления вторичное медикаментозное лечение включает подавление иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления супрессор включает противовоспалительный агент. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительный агент включает кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид включает преднизон или преднизолон.

[061] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции включает количество, имеющее показатель множественности заражения (MOI) от 10^4 до 10^7 , включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции включает количество, имеющее показатель множественности заражения (MOI) от 1×10^6 до 9×10^6 , включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции включает количество, имеющее показатель множественности заражения (MOI) от 10^4 до 10^5 , включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции включает количество, имеющее показатель множественности заражения (MOI) 10^5 .

[062] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию терапевтически эффективное количество содержит от 1×10^8 гч до 1×10^{13} гч, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит от 6×10^9 гч/мл до 1×10^{13} гч/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит от 6×10^9 гч/мл до 7×10^{12} гч/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит от 6×10^9 гч/мл до 5×10^{12} гч/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество

содержит от 1×10^{10} гч/мл до 1×10^{12} гч/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит или состоит из 1×10^{10} гч. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит или состоит из 1×10^{11} гч. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит или состоит из 1×10^{12} гч.

[063] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию терапевтически эффективное количество содержит или состоит из объема от 10 до 200 мкл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит или состоит из объема от 10 мкл до 50 мкл, от 50 мкл до 100 мкл, от 100 мкл до 150 мкл или от 150 до 200 мкл, включая конечные точки для каждого диапазона. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит или состоит из объема от 70 мкл до 120 мкл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит или состоит из объема 100 мкл.

[064] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию терапевтически эффективное количество содержит или состоит из по меньшей мере одной инъекции объемом от 10 до 200 мкл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит или состоит из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 инъекций объемом от 10 мкл до 200 мкл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления две или более инъекции вводят в субретинальное пространство во время одной и той же медицинской процедуры на одном и том же глазу. В некоторых вариантах осуществления две или более инъекции вводят в два или более различных субретинальных пространства во время одной и той же медицинской процедуры на одном и том же глазу. В некоторых вариантах осуществления площадь субретинального пространства, с которой контактирует терапевтически эффективное количество вектора, составляет от 5 до 20 мм². В некоторых вариантах осуществления площадь субретинального пространства, с которой контактирует терапевтически эффективное количество вектора, составляет 10 мм². В некоторых вариантах осуществления одну или более инъекций вводят по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 отдельных участков сетчатки глаза. В некоторых вариантах осуществления одну или более инъекций вводят по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10

отдельных участков сетчатки глаза во время одной процедуры. В некоторых вариантах осуществления одну или более инъекций вводят по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 отдельных участков сетчатки глаза в течение двух или более процедур.

[065] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию терапевтически эффективное количество содержит или состоит из по меньшей мере одной инъекции объемом от 10 до 200 мкл, включая конечные точки, вводимой тем же устройством. В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию терапевтически эффективное количество доставляется тем же устройством, что и разделенная доза, разделенная между одной или более инъекциями. Разделенная доза может быть введена в одно и то же субретинальное пространство или в два или более различных субретинальных пространства в одном глазу.

[066] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию стадия введения включает инъекцию или инфузию. В некоторых вариантах осуществления стадия введения включает субретинальный, супрахориоидальный или интравитреальный путь введения. В некоторых вариантах осуществления стадия введения включает субретинальную инъекцию или инфузию. В некоторых вариантах осуществления субретинальная инъекция или инфузия включает двухэтапную субретинальную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления стадия введения включает супрахориоидальную инъекцию или инфузию.

[067] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию субъектом является мужчина. В некоторых вариантах осуществления субъекту по меньшей мере 18 лет. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется генетически подтвержденный диагноз хороидеремии. В некоторых вариантах осуществления у субъекта идентифицирована мутация в гене *REP1*. В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляются клинические признаки хороидеремии в макуле по меньшей мере одного глаза. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет показатель остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA) 34-73 буквы по меньшей мере для одного глаза. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется легкая хороидеремия или хороидеремия ранней стадии. В некоторых вариантах осуществления у субъекта прогрессирующая или тяжелая хороидеремия.

[068] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию способ включает лечение 10 мм² сетчатки хотя бы одного глаза. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение от 5 мм² до 10 мм², включая конечные точки, сетчатки по меньшей мере одного глаза. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение от 2 мм² до 15 мм², включая конечные точки, сетчатки по меньшей мере одного глаза.

[069] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию фармацевтическую композицию вводят в один глаз субъекта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в оба глаза субъекта. В некоторых вариантах осуществления глаза пациента лечат одновременно. В некоторых вариантах осуществления оба глаза субъекта лечат последовательно. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один глаз субъекта лечили от хороидеремии до введения фармацевтической композиции субъекту.

[070] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию способ включает введение от 1 до 12 доз на глаз, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение по меньшей мере одной дозы, по меньшей мере один раз в день, один раз в неделю, один раз в месяц, один раз каждые три месяца, один раз каждые 6 месяцев или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение нескольких доз, причем каждая доза содержит одинаковое количество фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение нескольких доз, причем каждая доза не содержит одинаковое количество фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение нескольких доз, причем каждая последующая доза содержит большее количество полных гAAV, чем предыдущая доза. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение нескольких доз, причем каждая последующая доза содержит меньшее количество полных гAAV, чем предыдущая доза.

[071] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию способ включает введение от 1 до 12 доз на глаз, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления дозы вводятся после периода восстановления. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60

минут, или любое другое количество минут между указанными значениями. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет не менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 1, 2, 3 или 4 недели. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет не менее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 лет.

[072] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию, включая те, в которых способ включает введение от 1 до 12 доз на глаз, включая конечные точки, у субъекта возникло нежелательное явление после введения терапевтически эффективной дозы, а последующая доза содержит меньшее количество полных гAAV, чем предыдущая доза, которая вызвала нежелательное явление. В некоторых вариантах осуществления у субъекта исчезает нежелательное явление и субъекту вводят следующую дозу фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза, вызвавшая нежелательное явление, и последующая доза содержат равное количество полных гAAV. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза, вызвавшая нежелательное явление, и последующая доза не содержат равное количество полных гAAV.

[073] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию способ дополнительно включает введение субъекту определенного количества множества плацебо гAAV перед введением терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, причем каждый плацебо гAAV представляет собой пустой гAAV. В некоторых вариантах осуществления пустой гAAV не содержит промотора для экспрессии экзогенной последовательности или экзогенной последовательности. В некоторых вариантах осуществления введение определенного количества множества плацебо гAAV является системным. В некоторых вариантах осуществления введение определенного количества множества плацебо гAAV является локальным. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает (а) определение того, индуцировало ли множество плацебо гAAV иммунный ответ у субъекта, и/или (b) определение того, развилась ли у субъекта иммунная толерантность ко множеству плацебо гAAV, тем

самым указывая, что введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции не должно вызывать у субъекта иммуноопосредованных нежелательных явлений.

[074] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию способ дополнительно включает введение субъекту супрессора иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления супрессор включает противовоспалительный агент. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительный агент включает кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид включает преднизон или преднизолон. В некоторых вариантах осуществления введение супрессора иммунного ответа является системным. В некоторых вариантах осуществления супрессор иммунного ответа вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления введение супрессора иммунного ответа является локальным. В некоторых вариантах осуществления супрессор иммунного ответа вводят в глаз, который подвергался лечению, с фармацевтической композицией. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию и супрессор иммунного ответа вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию и супрессор иммунного ответа вводят в один и тот же день. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию и супрессор иммунного ответа вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления введение супрессора предшествует введению фармацевтической композиции по меньшей мере на один день. В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции предшествует введению супрессора по меньшей мере на один день.

[075] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию, способ дополнительно включает определение исходной тяжести опосредованного хороидеремией повреждения по меньшей мере одного глаза субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение последующей тяжести опосредованного хороидеремией повреждения по меньшей мере одного глаза субъекта после введения фармацевтической композиции по меньшей мере в один глаз. В некоторых вариантах осуществления начальную или последующую тяжесть опосредованного хороидеремией повреждения определяют путем определения показателя теста остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA), измерения площади или объема жизнеспособной ткани сетчатки, измерения сохраненной зоны эллипсоида, измерения

чувствительности сетчатки, измерения контрастной чувствительности, измерения цветового зрения, измерения остроты зрения при низкой освещенности, измерения скорости чтения или любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления в тесте BCVA используется таблица ETDRS (Изучение раннего лечения диабетической ретинопатии). В некоторых вариантах осуществления тест BCVA включает оценку одного или более из подсчета пальцев, движения руки, восприятия света и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления измерение жизнеспособной ткани сетчатки включает аутофлуоресценцию глазного дна, причем измерение жизнеспособной ткани сетчатки включает определение уровня или паттерна аутофлуоресценции глазного дна. В некоторых вариантах осуществления измерение сохраненной зоны эллипсоида включает спектральную оптическую когерентную томографию (SD-OCT). В некоторых вариантах осуществления измерение чувствительности сетчатки включает микропериметрию.

[076] В некоторых вариантах осуществления способов лечения заболевания или расстройства по настоящему описанию введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции ингибирует или снижает прогрессирование признака или симптома хороидеремии. В некоторых вариантах осуществления введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции уменьшает признак или симптом хороидеремии. В некоторых вариантах осуществления признак или симптом хороидеремии включает потерю фоторецепторных клеток, потерю клеток ПЭС, снижение остроты зрения, снижение остроты зрения при низкой освещенности, общую площадь сохраненной аутофлуоресценции (AF), низкий показатель по тесту BCVA, уменьшение площади сохраненной зоны эллипсоида, снижение чувствительности сетчатки, снижение контрастной чувствительности, снижение или ухудшение цветового зрения, снижение скорости чтения или любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления тяжесть признака или симптома хороидеремии определяют относительно здоровой сетчатки. В некоторых вариантах осуществления здоровая сетчатка принадлежит контрольному субъекту соответствующего возраста.

[077] В настоящем описании предложен способ определения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящему описанию, включающий: (a) измерение площади сетчатки у субъекта, подлежащего лечению, (b) определение того, находится ли площадь (a) в центральной фовеальной зоне, равной $0,5 \text{ мм}^2$, или в макуле, (c) вычисление количества палочек, колбочек и клеток

пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) на площади (a), и (d) умножение общего количества клеток на показатель множественности заражения (МОИ), равный 1×10^5 , для вычисления количества геномных частиц (гч), которые должны быть включены в терапевтически эффективное количество, при этом максимальная площадь сетчатки, подлежащей лечению, составляет 10 мм^2 , при этом плотность клеток ПЭС в сетчатке составляет 5000 клеток на мм^2 , при этом плотность палочек в сетчатке составляет 75000 палочек на мм^2 без учета центральной фовеальной зоны, равной $0,5 \text{ мм}^2$, при этом плотность колбочек в сетчатке составляет 150000 колбочек на мм^2 в центральной фовеальной зоне, равной $0,5 \text{ мм}^2$, плотность колбочек в сетчатке 25000 на мм^2 в макуле за пределами центральной фовеальной зоны, равной $0,5 \text{ мм}^2$.

[078] В настоящем описании предлагается фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением для использования при лечении заболевания или расстройства у субъекта, который в этом нуждается.

[079] В настоящем описании предлагается вектор в соответствии с настоящим изобретением для использования при лечении заболевания или расстройства у субъекта, который в этом нуждается.

[080] В настоящем описании предлагается AAV или гAAV в соответствии с настоящим изобретением для использования при лечении заболевания или расстройства у субъекта, который в этом нуждается.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

- [081] На ФИГ. 1 показан обзор типового способа производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта (процесс 2).
- [082] На ФИГ. 2 показана блок-схема, соответствующая обзору, представленному на ФИГ. 1.
- [083] На ФИГ. 3 показана схема, изображающая структурную организацию типового AAV2-конструкта.
- [084] На ФИГ. 4 показан обзор производства МСВ НЕК293.
- [085] На ФИГ. 5 показан обзор способа производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта (исходный процесс).
- [086] На ФИГ. 6 показана блок-схема, соответствующая обзору, представленному на ФИГ. 5.
- [087] На ФИГ. 7 показана блок-схема, изображающая способ производства лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта (исходный процесс).
- [088] На ФИГ. 8 показана пара блок-схем, изображающих сравнение исходного и усовершенствованного способов - фазы культивирования клеток.
- [089] На ФИГ. 9 показан график, изображающий сравнение исходного и усовершенствованного способов - фазы культивирования клеток.
- [090] На ФИГ. 10 показан график, изображающий сравнение исходного и усовершенствованного способов - фазы культивирования клеток.
- [091] На ФИГ. 11 показана блок-схема, изображающая процесс выделения и очистки продукта, перенесенный от исходного к усовершенствованному процессу.
- [092] На ФИГ. 12 показан график, изображающий сравнение анализа среднего выхода DRP/см² для плазмид AmpR (левый столбец) и KanR (правый столбец).
- [093] На ФИГ. 13 показан график, изображающий среднюю интенсивность флуоресценции детектируемой метки, объясняющую экспрессию конструкта из каждой клетки после трансдукции AAV2-конструктом.
- [094] На ФИГ. 14 показан график, изображающий процент GFP-положительных клеток, определенный с помощью проточной цитометрии, указывающий на процент клеток, экспрессирующих белок конструкта, после трансдукции AAV2-конструктом.
- [095] На ФИГ. 15 показан график, показывающий результаты среднего выхода анализа выхода AAV2-конструкта.

[096] На ФИГ. 16 показана фотография гель-электрофореза, показывающая данные по очистке для композиции AAV2-конструкта (не-GMP) (из усовершенствованного процесса).

[097] На ФИГ. 17 показана фотография гель-электрофореза, показывающая экспрессию и активность конструкта после трансдукции *in vitro* клеток НЕК293 эквивалентным МОИ вектора AAV2-конструкта из (не-GMP) композиций, полученных исходным и усовершенствованным процессами.

[098] На ФИГ. 18 показана карта плазмиды pAAV-REP1-Kan.

[099] На ФИГ. 19 показана полная последовательность вектора pBC-hREP1 (SEQ ID NO: 24).

[0100] На ФИГ. 20 показан график, показывающий остроту зрения глаз, которые подвергались и не подвергались лечению, через 2 года после генной терапии (Пример 13). Острота зрения, измеренная с помощью таблицы изучения раннего лечения диабетической ретинопатии (ETDRS) через 2 года у 12 пациентов с хориоидеремией, которые получали субретинальную генную терапию без осложнений (горизонтальная линия показывает медианное значение, прямоугольники показывают межквартильный размах, а «усы» показывают пределы). Глаза, которые подвергались лечению, показаны синим цветом, а глаза, которые не подвергались лечению, - зеленым (левый столбец и правый столбец, соответственно, в каждый момент времени). Также показаны промежуточные данные за 1 год. Через 2 года после генной терапии наблюдалось улучшение остроты зрения глаз, которые подвергались лечению, ($p = 0,020$). Состояние глаз, которые подвергались лечению, улучшилось по сравнению с глазами, которые не подвергались лечению, за этот период ($p = 0,003$).

[0101] На ФИГ. 21 показан график, показывающий функцию макулы в глазах, которые подвергались и не подвергались лечению, через 2 года после генной терапии. Чувствительность сетчатки, измеренная с помощью микропериметрии, включает точки по всей макуле и увеличивается с улучшением функции сетчатки. Было отмечено снижение чувствительности сетчатки в глазах, которые не подвергались лечению, по сравнению с исходным уровнем через 2 года ($p = 0,004$), но не было значительных изменений в глазах, которые подвергались лечению, за этот период. Также показаны промежуточные данные за 1 год. Глаза, которые подвергались лечению, показаны голубым, а которые не подвергались лечению - зеленым (левый столбец и правый столбец, соответственно, в каждый момент времени) – планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего.

[0102] На ФИГ. 22 показано схематическое изображение, показывающее схему исследования GEMINI, описанного в Примере 14.

[0103] На ФИГ. 23А-В показано схематическое изображение, показывающее витрэктомию (А) и субретинальную инъекцию (В) вектора AAV2. (А) Стандартная витрэктомия с использованием операционной системы BIOM для удаления геля стекловидного тела сопровождается (В) двухэтапной процедурой: 1) отслоение сетчатки инъекцией BSS; 2) введение 0,1 мл суспензии вектора через канюлю 41-го калибра в субретинальное пространство.

[0104] На ФИГ. 24 показано схематическое изображение, показывающее схему исследования STAR, описанного в Примере 15.

[0105] На ФИГ. 25 показан график, показывающий титр AAV, определенный с помощью ПЦР. На оси X отмечены образцы с начальным титром 1×10^{12} устойчивых к ДНКазе частиц (DRP)/мл, 1×10^{11} DRP/мл и 1×10^{11} DRP/мл в сбалансированном физиологическом растворе (BSS). На оси Y отмечен титр, измеренный после обработки образцов, как описано справа от графика.

[0106] На ФИГ. 26 показана серия из 3-х фотографий вестерн-блоттинга, показывающих активность пренилирования гAAV2.REP-1 в исследовании совместимости с использованием вектора AAV2.REP1.ENG1014-A при высокой дозе 1×10^{12} DRP/мл и MOI равным 10000. Сверху вниз показаны: hREP1 (83 кДа), актин (42 кДа) и биотинилированный Rab6a (24 кДа). Размеры белков указаны слева сверху вниз как 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17 и 11 кДа. Образцы, слева направо, в трех экземплярах: нетрансдуцированный контроль, клетки, трансдуцированные исходным вектором, вектором, выдержанным 6 часов при 4° C, вектором, выдержанным 6 часов при 4° C и инъецированным через 180 минут, вектором, выдержанным 6 часов при 4° C и 180 минут в шприце, и REP1 рыбы в качестве положительного контроля (единичный образец).

[0107] На ФИГ. 27 показана серия из 3-х фотографий вестерн-блоттинга, показывающих активность пренилирования гAAV2.REP-1 в исследовании совместимости с использованием вектора AAV2.REP1.ENG1014-A при низкой дозе 1×10^{11} DRP/мл и MOI равным 10000. Сверху вниз показаны: hREP1 (83 кДа), актин (42 кДа) и биотинилированный Rab6a (24 кДа). Размеры белков указаны слева сверху вниз как 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17 и 11 кДа. Образцы, слева направо, в трех экземплярах: нетрансдуцированный контроль, клетки, трансдуцированные исходным вектором, вектором, выдержанным 6 часов при 4° C, вектором, выдержанным 6 часов

при 4° С и инъецированным через 180 минут, вектором, выдержанным 6 часов при 4° С и 180 минут в шприце, и REP1 рыбы в качестве положительного контроля (единичный образец).

[0108] На ФИГ. 28А-В показана пара графиков, показывающих полуколичественное определение вестерн-блоттингом активности пренилирования гAAV2.REP-1 в исследовании совместимости с использованием вектора AAV2.REP1.ENG1014-А. (А) Показывает нормализованный REP1. Значения плотности бэнда (у.е., условные единицы) указаны на оси Y, а AAV2-REP1 при высокой дозе 1×10^{12} DRP/мл и низкой дозе 1×10^{11} DRP/мл указаны на оси X. (В) Показывает нормализованный биотинилированный Rab6а. Значения плотности бэнда (у.е., условные единицы) указаны на оси Y, а AAV2-REP1 при высокой дозе 1×10^{12} DRP/мл и низкой дозе 1×10^{11} DRP/мл указаны на оси X. В (А) и (В) столбцы для каждой дозы слева направо обозначают нетрансдуцированные клетки, клетки, трансдуцированные исходным вектором, вектором, выдержанным 6 часов при 4° С, вектором, выдержанным 6 часов при 4° С и инъецированным через 180 минут при 20° С, вектором, выдержанным 6 часов при 4° С и 180 минут в шприце при 20° С.

[0109] На ФИГ. 29 показан типовой конструкт по настоящему описанию, содержащий или состоящий из нуклеотидной последовательности, содержащей от 5' до 3', последовательности, кодирующей 5' инвертированный концевой повтор (ITR), последовательности, кодирующей промотор СAG, последовательности, кодирующей белок REP1 человека, последовательности, кодирующей мутированный сигнал WPRE, последовательности, кодирующей сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота, и последовательности, кодирующей 3' ITR.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0114] В данном изобретении предложены способы очистки частицы рекомбинантного AAV (гAAV) по настоящему описанию. В данном изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие частицы гAAV, полученные способами по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие частицы гAAV, полученные способами по настоящему описанию, содержат (а) от 0,5 до $2,5 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV); (b) меньше 50% пустых капсидов; (с) меньше 4 нг/мл остаточного белка клетки-хозяина на $1,0 \times$

10^{12} гв/мл; и (d) меньше 7×10^{-3} пг/мл остаточной ДНК клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл.

[0115] В настоящем описании предлагается способ лечения болезни или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство сетчатки. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой хороидеремию.

[0116] В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая (a) от 0,5 до $2,5 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV); (b) меньше 50% пустых капсидов; (c) меньше 4 нг/мл остаточного белка клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл; и (d) меньше 7×10^{-3} пг/мл остаточной ДНК клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл.

[0117] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (a) от 0,5 до $2,5 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV); (b) меньше 50% пустых капсидов; (c) меньше 4 нг/мл остаточного белка клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл; (d) меньше 7×10^{-3} пг/мл остаточной ДНК клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл и (e) множество функциональных гв/мл, причем каждый из функциональных геномов вектора способен экспрессировать экзогенную последовательность в клетке после трансдукции. В некоторых вариантах осуществления после трансдукции клетки фармацевтической композицией по настоящему описанию множество функциональных гв/мл экспрессируют в 2 раза больше экзогенной последовательности по сравнению с уровнем экспрессии соответствующей эндогенной последовательности в нетрансдуцированной клетке. В некоторых вариантах осуществления после трансдукции клетки фармацевтической композицией по настоящему описанию множество функциональных гв/мл экспрессируют экзогенную последовательность в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 раз больше, или в любое другое значение между указанными, по сравнению с уровнем экспрессии соответствующей эндогенной последовательности в нетрансдуцированной клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность идентичны. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность не идентичны. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и

соответствующая эндогенная последовательность имеют по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности.

[0118] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (a) от 0,5 до $2,5 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV); (b) меньше 50% пустых капсидов; (c) меньше 4 нг/мл остаточного белка клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл; (d) меньше 7×10^{-3} пг/мл остаточной ДНК клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл и (e) множество функциональных гв/мл, причем каждый из функциональных геномов вектора способен экспрессировать экзогенную последовательность в клетке после трансдукции. В некоторых вариантах осуществления после трансдукции клетки фармацевтической композицией по настоящему описанию экзогенная последовательность кодирует белок. В некоторых вариантах осуществления белок, кодируемый экзогенной последовательностью, имеет уровень активности, равный или превышающий уровень активности белка, кодируемого соответствующей последовательностью нетрансдуцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность идентичны. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность не идентичны. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность имеют по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности. В некоторых вариантах осуществления активность включает связывание с, активацию и/или перенос одной или более функциональных групп на лиганд или субстрат. В некоторых вариантах осуществления белок включает белок REP-1, и активность включает пренилирование субстрата REP-1.

Композиции AAV

[0119] Композиции согласно настоящему описанию содержат терапевтический конструкт, подходящий для системного или локального введения млекопитающему и, предпочтительно, человеку. Иллюстративные конструкты по настоящему описанию содержат последовательность, кодирующую ген или его часть. Предпочтительно конструкты по настоящему описанию содержат последовательность, кодирующую ген человека или его часть. Иллюстративные конструкты по настоящему описанию могут дополнительно содержать одну или более последовательностей, кодирующих

регуляторные элементы, чтобы сделать возможным или усилить экспрессию гена или его части. Иллюстративные регуляторные элементы включают промоторы, интроны, энхансерные элементы, элементы ответа (включая посттранскрипционные элементы ответа или посттранскрипционные регуляторные элементы), последовательности полиаденозина (полиА) и фрагмент гена, способствующий эффективной терминации транскрипции (включая фрагмент гена β -глобина и фрагмент гена β -глобина кролика), но не ограничиваются ими.

[0120] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию конструкт содержит ген человека или его часть, соответствующие Rab-сопровождающему белку типа 1 (REP-1) человека или его части. В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию конструкт содержит ген человека или его часть, содержащие кодон-оптимизированную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии у млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии у человека.

[0121] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию, где конструкт содержит белок REP-1 человека или его часть, конструкт обозначается как «AAV2-REP1 или AAV2.REP1», а Международное непатентованное название (INN) представляет собой тимрепиген эмпарвовек (англ. timrepigene emparvovect). В некоторых вариантах осуществления конструкт содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

```
1  CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTGC GGCGACSTTT
   61  GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA STCCATCACT
  121  AGGGGTTCC TGTAGTTAAT GATTAACCCG CCATGCTACT TATCTACGTA GCCATGCTCT
  181  AGGTACCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
  241  ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA STTGGCAGTA CATCAAGTGT
  301  ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
  361  ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
  421  TCGСТАТТАС САТGGТCGAG GTGAGCCCCA CGTTCTGCTT CACTCTCCCC ATCTCCCCCC
  481  CCTCCCCACC CCCAATTTTG TATTTATTTA TTTTTTAATT ATTTTGTGCA GCGATGGGGG
  541  CGGGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG CGGGGCGGGG
  601  CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC GCTCCGAAAG TTTCTTTTТА
  661  TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG
  721  CTGCGCGCTG CCTTCGCCCC GTGCCCGCT CCGCCGCGCG CTCGCGCCGC CCGCCCCGGC
  781  TCTGACTGAC CGCGTТАCTC CCACAGGTGA GCGGGCGGGA CGGCCCTTCT CCTCCGGGCT
  841  GTAATTAGCG STTGGTTТАА TGACGGCTTG TTTCTTTTCT GTGGCTGCGT GAAAGCCTTG
  901  AGGGGCTCCG GGAGGGCCCT TTGTGCGGGG GGAGCGGCTC GGGGCTGTCC GCGGGGGGAC
  961  GGCTGCSTTC GGGGGGGACG GGGCAGGGCG GGGTTTCGGCT TCTGGCGTGT GACCGGCGGC
 1021 TCTAGAGCCT CTGCTAACCA TGTTCA TGCC TTCTTCTTTT TCCTACAGCT CCTGGGCAAC
 1081 GTGCTGGTTA TTGTGCTGTC TCATCATTTT GGCAAAGAAT TGGATCCTAG STTGATATCG
 1141 AATTCSTGCA GCCCGGCGGC ACCATGGCGG АТАCTCTCCC TTCGGAGTTT GATGTGATCG
 1201 TAATAGGGAC GGGTTTGCTT GAATCCATCA TTGCAGCTGC ATGTTCAAGA AGTGGCCGGA
```

1261 GAGTTCTGCA TGTTGATTCA AGAAGCTACT ATGGAGGAAA CTGGGCCAGT TTTAGCTTTT
 1321 CAGGACTATT GTCCTGGCTA AAGGAATACC AGGAAAACAG TGACATTGTA AGTGACAGTC
 1381 CAGTGTGGCA AGACCAGATC CTTGAAAATG AAGAAGCCAT TGCTCTTAGC AGGAAAGGACA
 1441 AAACATTTCA ACATGTGGAA GTATTTTGTG ATGCCAGTCA GGATTTGCAT GAAGATGTCG
 1501 AAGAAGCTGG TGCACAGCAG AAAAATCATG CTCTTGTGAC ATCTGCAAAAC TCCACAGAAG
 1561 CTGCAGATTC TGCCTTCCTG CCTACGGAGG ATGAGTCATT AAGCACTATG AGCTGTGAAA
 1621 TGCTCACAGA ACAAACCTCA AGCAGCGATC CAGAGAATGC GCTAGAAGTA AATGGTGTCTG
 1681 AAGTGACAGG GGAAAAAGAA AACCATTTGTG ATGATAAAAC TTGTGTGCCA TCAACTTCAG
 1741 CAGAAGACAT GAGTGAAAAT GTGCCTATAG CAGAAGATAC CACAGAGCAA CCAAAGAAAA
 1801 ACAGAATTAC TTAATCACAA ATTATTAAG AAGGCAGGAG ATTTAATATT GATTTAGTAT
 1861 CAAAGCTGCT GTATTCTCGA GGATTACTAA TTGATCTTCT AATCAAATCT AATGTTAGTC
 1921 GATATGCAGA GTTTAAAAAT ATTACCAGGA TTCTTGCATT TCGAGAAGGA CGAGTGGAAC
 1981 AGGTTCCGTG TTCCAGAGCA GATGTCTTTA ATAGCAAACA ACTTACTATG GTAGAAAAGC
 2041 GAATGCTAAT GAAATTTCTT ACATTTTGTG TGGAAATATGA GAAATATCCT GATGAATATA
 2101 AAGGATATGA AGAGATCACA TTTTATGAAT ATTTAAAGAC TCAAAAATTA ACCCCCAACC
 2161 TCCAATATAT TGTCATGCAT TCAATTGCAA TGACATCAGA GACAGCCAGC AGCACCATAG
 2221 ATGGTCTCAA AGCTACAAA AACTTTCTTC ACTGTCTTGG GCGGTATGGC AACACTCCAT
 2281 TTTTGTTCCT TTTATATGGC CAAGGAGAAC TCCCCCAGTG TTTCTGCAGG ATGTGTGCTG
 2341 TGTTTGGTGG AATTTATTGT CTTGCGCCAT CAGTACAGTG CCTTGTAGTG GACAAAAGAA
 2401 CCAGAAAATG TAAAGCAATT ATAGATCAGT TTGGTCAGAG AATAATCTCT GAGCATTTCC
 2461 TCGTGGAGGA CAGTTACTTT CCTGAGAACA TGTGCTCACG TGTGCAATAC AGGCAGATCT
 2521 CCAGGGCAGT GCTGATTACA GATAGATCTG TCCTAAAAAC AGATTCAGAT CAACAGATTT
 2581 CCATTTTGAC AGTGCCAGCA GAGGAACCAG GAACTTTTGC TGTTCCGGGT ATTGAGTTAT
 2641 GTTCTTCAAC GATGACATGC ATGAAAGGCA CCTATTTGGT TCATTTGACT TGCACATCTT
 2701 STAAAAAGC AAGAGAAGAT TTAGAATCAG TTGTGCAGAA ATTTTGTGTT CCATATACTG
 2761 AAATGGAGAT AGAAAATGAA CAAGTAGAAA AGCCAAGAAT TCTGTGGGCT CTTTACTTCA
 2821 ATATGAGAGA TTCGTCAGAC ATCAGCAGGA GCTGTTATAA TGATTTACCA TCCAACGTTT
 2881 ATGTCTGCTC TGGCCCAGAT TGTGGTTTAG GAAATGATAA TGCAGTCAAA CAGGCTGAAA
 2941 CACTTTTCCA GGAAATCTGC CCCAATGAAG ATTTCTGTCC CCTCCACCA AATCCTGAAG
 3001 ACATTATCCT TGATGGAGAC AGTTTACAGC CAGAGGCTTC AGAATCCAGT GCCATACCAG
 3061 AGGCTAACTC GGAGACTTTC AAGGAAAGCA CAAACCTTGG AAACCTAGAG GAGTCTCTG
 3121 AATAATCTAG TCGATTCGAA TTCGATATCA AGCTTATCGA TAATCAACCT CTGGATTACA
 3181 AAATTTGTGA AAGATTGACT GGTATTCTTA ACTATGTTGC TCCTTTTACG CTATGTGGAT
 3241 ACGCTGCTTT AATGCCTTTG TATCATGCTA TTGCTTCCCG TATGGCTTTC ATTTCTCCT
 3301 CTTGTATAA ATCCTGGTTG CTGTCTCTTT ATGAGGAGTT GTGGCCCGTT GTCAGGCAAC
 3361 GTGGCGTGGT GTGCACTGTG TTTGCTGACG CAACCCCCAC TGGTTGGGGC ATTGCCACCA
 3421 CCTGTCAGCT CCTTTCCGGG ACTTTGCTT TCCCCCTCCC TATTGCCACG GCGGAACTCA
 3481 TCGCCGCCTG CCTTGCCCGC TGCTGGACAG GGGCTCGGCT GTTGGGCACT GACAATTCG
 3541 TGGTGTGTG GGGGAAATCA TCGTCCTTTC CTTGGCTGCT CGCCTGTGTT GCCACCTGGA
 3601 TTCTGCGCGG GACGTCCTTC TGCTACGTTT CTTCCGGCCCT CAATCCAGCG GACCTTCTT
 3661 CCCGCGGCTT GCTGCGGCTT CTGCGGCTC TTCCGCGTCT TCGCCTTCGC CCTCAGACGA
 3721 GTCGGATCTC CCTTTGGGCC GCCTCCCCGC ATCGATACCG TCGCCTTCGC CCTCAGACGA
 3781 GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TTGTTGCCCC TCCCCGTCG TTTCTTTCG
 3841 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTTC STAATAAAAT GAGGAAATG CATCGCATTG
 3901 TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA
 3961 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TCGGGTGGGC TCTATGGCTT CTGAGGCGGA
 4021 AAGAACCAGC TGGGGCTCGA CTAGAGCATG GCTACGTAGA TAAGTAGCAT GCGGGGTTAA
 4081 TCATTAAC TAAGGAACCC CTAGTGATGG AGTTGGCCAC TCCCTCTCTG CGCGCTCGCT
 4141 CGCTCACTGA GGCCGGGCGA CCAAAGGTCG CCCGACGCC GGGCGGCTC AGTGAGCGAG

4201 CGAGCGCGCA GAG (SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления
 конструктор содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере
 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, или любое другое
 процентное значение между указанными, идентичности с последовательностью:

1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCTG GGCGACCTTT
 61 GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA STCCATCACT
 121 AGGGGTTCTT TGTAATTAAT GATTAACCCG CCATGCTACT TATCTACGTA GCCATGCTCT
 181 AGGTACCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
 241 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAACGTGCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT

301 ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
361 ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC TACTTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
421 TCGCTATTAC CATGGTCGAG GTGAGCCCCA CGTTCTGCTT CACTCTCCCC ATCTCCCCCC
481 CCTCCCCACC CCCAATTTTG TATTTATTTA TTTTTTAATT ATTTTGTGCA GCGATGGGGG
541 CGGGGGGGGG GGGGGGGGCG GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG CGGGGCGGGG
601 CGAGGCGGAG AGGTGCGGGC GCAGCCAATC AGAGCGGGCG GCTCCGAAAAG TTTCTTTTAA
661 TGGCGAGGCG GCGGCGGGCG CGGCCCTATA AAAAGCGAAG CGCGCGGGCG CCGCCCCGGC
721 CTGCGCGCTG CCTTCGCCCC GTGCCCCGCT CCGCCGCGCG CTCGCGCCCG CCGCCCCGGC
781 TCTGACTGAC CGCGTTACTC CCACAGGTGA GCGGGCGGGA CGGCCCTTCT CCTCCGGGCT
841 GTAATTAGCG CTTGGTTTTAA TGACGGCTTG TTTCTTTTCT GTGGCTGCGT GAAAAGCCTTG
901 AGGGGCTCCG GGAGGGCCCT TTGTGCGGGG GGAGCGGCTC GGGGCTGTCC GCGGGGGGAC
961 GGCTGCCTTC GGGGGGGACG GGGCAGGGCG GGGTTCGGCT TCTGGCGTGT GACC GGCGGC
1021 TCTAGAGCCT CTGCTAACCA TGTTTCATGCC TTCTTCTTTT TCCTACAGCT CCTGGGCAAC
1081 GTGCTGGTTA TTGTGCTGTC TCATCATTTT GGCAAAGAAT TGGATCCTAG CTTGATATCG
1141 AATTCCTGCA GCCCGGCGGC ACCATGGCGG ATACTCTCCC TTCGGAGTTT GATGTGATCG
1201 TAATAGGGAC GGGTTTGCCT GAATCCATCA TTGCAGCTGC ATGTTCAAGA AGTGGCCGGA
1261 GAGTTCTGCA TGTTGATTCA AGAAGCTACT ATGGAGGAAA CTGGGCCAGT TTTAGCTTTT
1321 CAGGACTATT GTCCTGGCTA AAGGAATACC AGGAAAACAG TGACATTGTA AGTGACAGTC
1381 CAGTGTGGCA AGACCAGATC CTTGAAAATG AAGAAGCCAT TGCTCTTAGC AGGAAGGACA
1441 AAATATTCA ACATGTGGAA GTATTTTGTG ATGCCAGTCA GGATTTGCAT GAAGATGTGCG
1501 AAGAAGCTGG TGCACTGCAG AAAAATCATG CTCTTGTGAC ATCTGCAAAAC TCCACAGAAG
1561 CTGCAGATTC TGCCTTCCTG CCTACGGAGG ATGAGTCATT AAGCACTATG AGCTGTGAAA
1621 TGCTCACAGA ACAAACTCCA AGCAGCGATC CAGAGAATGC GCTAGAAGTA AATGGTGTCTG
1681 AAGTACAGG GGA AAAAGAA AACCATTGTG ATGATAAAAC TTGTGTGCCA TCAACTTCAG
1741 CAGAAGACAT GAGTAAAAT GTGCCATATAG CAGAAGATAC CACAGAGCAA CCAAAGAAAA
1801 ACAGAATTAC TTA CTACAA ATTATTAAG AAGGCAGGAG ATTTAATATT GATTTAGTAT
1861 CAAAGCTGCT GTATTCTCGA GGATTACTAA TTGATCTTCT AATCAAATCT AATGTTAGTC
1921 GATATGCAGA GTTTAAAAAT ATTACCAGGA TTCTTGCATT TCGAGAAGGA CGAGTGGAAC
1981 AGGTTCCGTG TTCCAGAGCA GATGTCTTTA ATAGCAAACA ACTTACTATG GTAGAAAAGC
2041 GAATGCTAAT GAAATTTCTT ACATTTTGTG TGGAATATGA GAAATATCCT GATGAATATA
2101 AAGGATATGA AGAGATCACA TTTTATGAAT ATTTAAAGAC TCAAAAATTA ACCCCCAACC
2161 TCCAATATAT TGTCATGCAT TCAATTGCAA TGACATCAGA GACAGCCAGC AGCACCATAG
2221 ATGGTCTCAA AGCTACCAA AACTTTCTTC ACTGTCTTGG GCGGTATGGC AACACTCCAT
2281 TTTTGTTCCT TTTATATGGC CAAGGAGAAC TCCCCCAGTG TTTCTGCAGG ATGTGTGCTG
2341 TGTTTGGTGG AATTTATTGT CTTTCGCCATT CAGTACAGTG CCTTGTAGTG GACAAAAGAT
2401 CCAGAAAATG TAAAGCAATT ATAGATCAGT TTGGTCAGAG AATAATCTCT GAGCATTTCC
2461 TCGTGGAGGA CAGTTACTTT CCTGAGAAACA TGTGCTCACG TGTGCAATAC AGGCAGATCT
2521 CCAGGGCAGT GCTGATTACA GATAGATCTG TCCTAAAAAC AGATTCAGAT CAACAGATTT
2581 CCATTTTGAC AGTGCCAGCA GAGGAACCAG GAACTTTTGC TGTTCGGGTC ATTTAGTTAT
2641 GTTCTTCAAC GATGACATGC ATGAAAGGCA CCTATTTGGT TCATTTGACT TGCACATCTT
2701 CTAAAACAGC AAGAGAAGAT TTAGAATCAG TTGTGCAGAA ATTTGTTGTT CCATATACTG
2761 AAATGGAGAT AGAAAATGAA CAAGTAGAAA AGCCAAGAAT TCTGTGGGCT TTTACTTCA
2821 ATATGAGAGA TTCGTACAGC ATCAGCAGGA GCTGTTATAA TGATTTACCA TCCAACGTTT
2881 ATGTCTGCTC TGGCCCAGAT TGTGGTTTAG GAAATGATAA TGCAGTCAAA CAGGCTGAAA
2941 CACTTTTCCA GGAAATCTGC CCCAATGAAG ATTTCTGTCC CCTCCACCA AATCCTGAAG
3001 ACATTATCCT TGATGGAGAC AGTTTACAGC CAGAGGCTTC AGAATCCAGT GCCATACCAG
3061 AGGCTAACTC GGAGACTTTC AAGGAAAGCA CAAACCTTGG AAACCTAGAG GAGTCTCTG
3121 AATAATCTAG TCGATTGCAA TTCGATATCA AGCTTATCGA TAATCAACCT CTGGATTACA
3181 AAATTTGTGA AAGATTGACT GGTATTCTTA ACTATGTTGC TCCTTTTACG CTATGTGGAT
3241 ACGCTGCTTT AATGCCTTTG TATCATGCTA TTGCTTCCCG TATGGCTTTC ATTTTCTCCT
3301 CTTGTATAA ATCCTGGTTG CTGTCTCTTT ATGAGGAGTT GTGGCCCGTT GTCAGGCAAC
3361 GTGGCGTGGT GTGCACTGTG TTTGCTGACG CAACCCCCAC TGGTTGGGGC ATTGCCACCA
3421 CCTGTACAGT CCTTTCCGGG ACTTTTCGCTT TCCCCCTCCC TATTGCCACG GCGGAACTCA
3481 TCGCCGCCTG CCTTGCCCCG TGCTGGACAG GGGCTCGGCT GTTGGGCACT GACAATTCG
3541 TGGTGTGTGTC GGGGAAATCA TCGTCCTTTC CTTGGCTGCT CGCCTGTGTT GCCACCTGGA
3601 TTCTGCGCGG GACGTCCTTC TGCTACGTCC CTTGGGCCCT CAATCCAGCG GACCTTCTTT
3661 CCCGCGGCCT GCTGCCGGCT CTGCGGCCTC TTCCGCGTCT TCGCTTCGC CCTCAGACGA
3721 GTCGGATCTC CCTTTGGGCC GCCTCCCCG ATCGATAACCG TCGATCTGCT GATCAGCTC
3781 GACTGTCCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCT TCCCCGTGC CTCTCTGAC
3841 CCTGGAAGGT CCACTCCCA CTGTCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATG CATCGATTG
3901 TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA

3961 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCTT CTGAGGCGGA
4021 AAGAACCAGC TGGGGCTCGA CTAGAGCATG GCTACGTAGA TAAGTAGCAT GGCGGGTTAA
4081 TCATTAAC TA CAAGGAACCC CTAGTGATGG AGTTGGCCAC TCCCTCTCTG CGCGCTCGCT
4141 CGCTCACTGA GGCCGGGCGA CCAAAGGTCG CCCGACGCC GGGCGGCCTC AGTGAGCGAG
4201 CGAGCGCGCA GAG (SEQ ID NO: 16).

[0122] В некоторых вариантах осуществления конструкт содержит или состоит из последовательности, кодирующей последовательность REP1 человека, имеющую последовательность

1 ATGGCGGATA CTCTCCCTTC GGAGTTTGAT GTGATCGTAA TAGGGACGGG TTTGCCTGAA
61 TCCATCATTG CAGCTGCATG TTCAAGAAGT GGCCGGAGAG TTCTGCATGT TGATTCAAGA
121 AGCTACTATG GAGGAACTG GGCCAGTTTT AGCTTTTCAG GACTATTGTC CTGGCTAAAG
181 GAATACCAGG AAAACAGTGA CATTGTAAGT GACAGTCCAG TGTGGCAAGA CCAGATCCTT
241 GAAAATGAAG AAGCCATTGC TCTTAGCAGG AAGGACAAAA CTATTCAACA TGTGGAAGTA
301 TTTTGTATG CCAGTCAGGA TTTGCATGAA GATGTCGAAG AAGCTGGTGC ACTGCAGAAA
361 AATCATGCTC TTGTGACATC TGCAAACCTC ACAGAAGCTG CAGATTCTGC CTTCTGCCT
421 ACGGAGGATG AGTCATTAAG CACTATGAGC TGTGAAATGC TCACAGAACA AACTCCAAGC
481 AGCGATCCAG AGAATGCGCT AGAAGTAAAT GGTGCTGAAG TGACAGGGGA AAAAGAAAAC
541 CATTGTGATG ATAAAACCTG TGTGCCATCA ACTTCAGCAG AAGACATGAG TGAAAATGTG
601 CCTATAGCAG AAGATACCAC AGAGCAACCA AAGAAAAACA GAATTACTTA CTCACAAAT
661 ATTAAGAAG GCAGGAGATT TAATATTGAT TTAGTATCAA AGCTGCTGTA TTCTCGAGGA
721 TTAATAATTG ATCTTCTAAT CAAATCTAAT GTTAGTCGAT ATGCAGAGTT TAAAAATATT
781 ACCAGGATTC TTGCATTTTC AGAAGGACGA GTGGAACAGG TTCCGTGTTC CAGAGCAGAT
841 GTCTTTAATA GCAAACAAC TACTATGGTA GAAAAGCGAA TGCTAATGAA ATTTCTTACA
901 TTTTGTATGG AATATGAGAA ATATCCTGAT GAATATAAAG GATATGAAGA GATCACATTT
961 TATGAATATT TAAAGACTCA AAAATTAACC CCCAACCTCC AATATATTGT CATGCATTTCA
1021 ATTGCAATGA CATCAGAGAC AGCCAGCAGC ACCATAGATG GTCTCAAAGC TACCAAAAAC
1081 TTTCTTCACT GTCTTGGGCG GTATGGCAAC ACTCCATTTT TGTTTCTTT ATATGGCCAA
1141 GGAGAATCC CCCAGTGTTC CTGCAGGATG TGTGCTGTGT TTGGTGGAA TATTGTCTT
1201 CGCCATTCCAG TACAGTGCCT TGTAGTGGAC AAAGAATCCA GAAAATGTA AGCAATPATA
1261 GTCAGTTTTG GTCAGAGAAT AATCTCTGAG CATTTCCTCG TGGAGGACAG TACTTTCTT
1321 GAGAACATGT GCTCACGTGT GCAATACAGG CAGATCTCCA GGGCAGTGT GATTACAGAT
1381 AGATCTGTCC TAAAAACAGA TTCAGATCAA CAGATTTCCA TTTTGACAGT GCCAGCAGAG
1441 GAACCAGGAA CTTTTGCTGT TCGGGTCATT GAGTTATGTT CTTCAACGAT GACATGCATG
1501 AAAGGCACCT ATTTGGTTCA TTTGACTTGC ACATCTTCTA AAACAGCAAG AGAAGATTTA
1561 GAATCAGTTG TGCAGAAAT GTTTGTTCCA TATACTGAAA TGGAGATAGA AAATGAACAA
1621 GTAGAAAAGC CAAGAATTCT GTGGGCTCTT TACTTCAATA TGAGAGATTG GTCAGACATC
1681 AGCAGGAGCT GTTATAATGA TTTACCATCC AACGTTTATG TCTGCTCTGG CCCAGATTGT
1741 GGTTTAGGAA ATGATAATGC AGTCAAACAG GCTGAAACAC TTTTCCAGGA AATCTGCCCC
1801 AATGAAGATT TCTGTCCCC TCCACCAAAT CCTGAAGACA TTATCCTTGA TGGAGACAGT
1861 TTACAGCCAG AGGCTTCAGA ATCCAGTGCC ATACCAGAGG CTAACCTCGA GACTTTCAAG
1921 GAAAGCACAA ACSTTGAAA CCTAGAGGAG TCCTCTGAAT AA (SEQ ID NO: 17)

или последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности с последовательностью

1 ATGGCGGATA CTCTCCCTTC GGAGTTTGAT GTGATCGTAA TAGGGACGGG TTTGCCTGAA
61 TCCATCATTG CAGCTGCATG TTCAAGAAGT GGCCGGAGAG TTCTGCATGT TGATTCAAGA
121 AGCTACTATG GAGGAACTG GGCCAGTTTT AGCTTTTCAG GACTATTGTC CTGGCTAAAG
181 GAATACCAGG AAAACAGTGA CATTGTAAGT GACAGTCCAG TGTGGCAAGA CCAGATCCTT
241 GAAAATGAAG AAGCCATTGC TCTTAGCAGG AAGGACAAAA CTATTCAACA TGTGGAAGTA
301 TTTTGTATG CCAGTCAGGA TTTGCATGAA GATGTCGAAG AAGCTGGTGC ACTGCAGAAA
361 AATCATGCTC TTGTGACATC TGCAAACCTC ACAGAAGCTG CAGATTCTGC CTTCTGCCT
421 ACGGAGGATG AGTCATTAAG CACTATGAGC TGTGAAATGC TCACAGAACA AACTCCAAGC
481 AGCGATCCAG AGAATGCGCT AGAAGTAAAT GGTGCTGAAG TGACAGGGGA AAAAGAAAAC
541 CATTGTGATG ATAAAACCTG TGTGCCATCA ACTTCAGCAG AAGACATGAG TGAAAATGTG
601 CCTATAGCAG AAGATACCAC AGAGCAACCA AAGAAAAACA GAATTACTTA CTCACAAAT

```

661 ATTAAAGAAG GCAGGAGATT TAATATTGAT TTAGTATCAA AGCTGCTGTA TTCTCGAGGA
721 TТАСТААТТГ АТСТТСТААТ САААТСТААТ GTTAGTCGAT ATGCAGAGTT TAAAAATATT
781 ACCAGGATTC TTGCATTTTCG АГААГГАСГА GTGGAACAGG TTCCGTGTTT CAGAGCAGAT
841 GTCTTTAATA GCAAACAAC TACTATGGTA GAAAAGCGAA TGCTAATGAA ATTTCTTACA
901 TTTTGTATGG AATATGAGAA ATATCCTGAT GAATATAAAG GATATGAAGA GATCACATTT
961 TATGAATATT TAAAGACTCA AAAATTAACC CCCAACCTCC AATATATTGT CATGCATTCA
1021 АТТГСААТГА САТСАГАГАС АГССАГСАС АССАТАГАТГ GTCTCAAAGC TACCАААААС
1081 TTTCTTCACT GTCTTGGGCG GTATGGCAAC ACTCCATTTT TGTTTCCTTT ATATGGCCAA
1141 GGAGAACTCC CCCAGTGTTT CTGCAGGATG TGTGCTGTGT TTGGTGGAAT TTATTGTCTT
1201 CGCCATTCAG TACAGTGCCT TGТАГТГГАС АААГААТССА GAAAAATGTAA AGCAATTATA
1261 GATCAGTTTG GTCAGAGAAT AATCTCTGAG CATTTCTCTG TGGAGGACAG TТАСТТТСТ
1321 GAGAACATGT GCTCACGTGT GCAATACAGG CAGATCTCCA GGGCAGTGCT GATTACAGAT
1381 AGATCTGTCC TAAAAACAGA TTCAGATCAA CAGATTTCCA TTTTGACAGT GCCAGCAGAG
1441 GAACCAGGAA CTTTTGCTGT TCGGGTCATT GAGTTATGTT CTTCAACGAT GACATGCATG
1501 AAAGGCACCT ATTTGGTTCA TTTGACTTGC ACATCTTCTA AAACAGCAAG АГААГАТТТА
1561 GAATCAGTTG TGCAGAAATT GTTTGTTCCA TATACTGAAA TGGAGATAGA AAATGAACAA
1621 GTAGAAAAGC CAAGAATTCT GTGGGCTCTT TACTTCAATA TGAGAGATTС GTСAGACATC
1681 AGCAGGAGCT GTTATAATGA TTTACCATCC AACGTTTATG TCTGCTCTGG CCCAGATTGT
1741 GGTTTAGGAA ATGATAATGC AGTCAAACAG GCTGAAACAC TTTTCCAGGA AATCTGCCCC
1801 AATGAAGATT TCTGTCCCCC TCCACCAAT CCTGAAGACA TTATCCTTGA TGGAGACAGT
1861 TTACAGCCAG AGGCTTCAGA ATCCAGTGCC ATACCAGAGG CТААСТСГГА GACTTTCAAG
1921 GAAAGCACAA ACSTTGAAA CCTAGAGGAG TCCTCTGAAT AA (SEQ ID NO: 17).

```

[0123] В некоторых вариантах осуществления конструктор содержит или состоит из последовательности, кодирующей промотор CAG, имеющий последовательность

```

1 CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA
61 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGATCAT
121 ATGCCAAGTA CGCCCCSTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCCCTG GCATTATGCC
181 CAGTACATGA CTTATGGGA CTTTCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
241 АТТАСАТГГ ТСГАГТГАС ССССАСТТС ТГСТТАСТС ТСССАТСТС ССССССТС
301 ССАСССССА ТТТТГАТТТ АТТТАТТТТ ТААТТАТТТ GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG
361 GGGGGGGGGG GGCAGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGGCGGGG CGGGGCGAGG
421 CGGAGAGGTG CGGCGGCAGC CAATCAGAGC GGCAGCTCC GAAAGTTTCC TTTTATGGCG
481 AGGCGGCGGC GGCAGCGGCC CTATAAAAAG CGAAGCGCGC GGCAGCGCG AGTCGTGCG
541 CGCTGCCTTC GCCCCGTGCC CCGCTCCGCC GCCGCTCGC GCCGCCCGCC CCGGCTCTGA
601 CTGACCGCGT TACTCCACA GGTGAGCGGG CGGGACGGCC CTTCTCTCC GGGCTGTAAT
661 TAGCGCTTGG TTTAATGACG GCTTGTCTT TTTCTGTGGC TGCGTGAAAAG CCTTGAGGGG
721 CTCCGGGAGG GCCCTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGG TGTCCGCGGG GGGACGGCTG
781 CTTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG GCGGCTCTAG
841 AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCTA CAGCTCCTGG GCAACGTGCT
901 GGTTATTGTG CTGTCTCATC ATTTTGGCAA АГААТТГГАТ СС (SEQ ID NO: 18)

```

или последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности с последовательностью

```

1 CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA
61 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGATCAT
121 ATGCCAAGTA CGCCCCSTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCCCTG GCATTATGCC
181 CAGTACATGA CTTATGGGA CTTTCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
241 АТТАСАТГГ ТСГАГТГАС ССССАСТТС ТГСТТАСТС ТСССАТСТС ССССССТС
301 ССАСССССА ТТТТГАТТТ АТТТАТТТТ ТААТТАТТТ GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG
361 GGGGGGGGGG GGCAGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGGCGGGG CGGGGCGAGG
421 CGGAGAGGTG CGGCGGCAGC CAATCAGAGC GGCAGCTCC GAAAGTTTCC TTTTATGGCG
481 AGGCGGCGGC GGCAGCGGCC CTATAAAAAG CGAAGCGCGC GGCAGCGCG AGTCGTGCG
541 CGCTGCCTTC GCCCCGTGCC CCGCTCCGCC GCCGCTCGC GCCGCCCGCC CCGGCTCTGA
601 CTGACCGCGT TACTCCACA GGTGAGCGGG CGGGACGGCC CTTCTCTCC GGGCTGTAAT
661 TAGCGCTTGG TTTAATGACG GCTTGTCTT TTTCTGTGGC TGCGTGAAAAG CCTTGAGGGG
721 CTCCGGGAGG GCCCTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGG TGTCCGCGGG GGGACGGCTG

```

781 CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG GCGGCTCTAG
841 AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCTTA CAGCTCCTGG GCAACGTGCT
901 GGTTATTGTG CTGTCTCATC ATTTTGGCAA AGAATTGGAT CC (SEQ ID NO: 18).

[0124] В некоторых вариантах осуществления конструкт содержит или состоит из последовательности, кодирующей мутированный сигнал WPRE, имеющий последовательность

1 ATCGATAATC AACCTCTGGA TTACAAAATT TGTGAAAGAT TGA CTGGTAT TCTTAACTAT
61 GTTGCTCCTT TTACGSTATG TGGATACGCT GCTTTAATGC CTTTGTATCA TGCTATTGCT
121 TCCCGTATGG CTTTCATTTT CTCCTCCTTG TATAAATCCT GGTTGCTGTC TCTTTATGAG
181 GAGTTGTGGC CCGTTGTCAG GCAACGTGGC GTGGTGTGCA CTGTGTTTGC TGACGCAACC
241 CCCACTGGTT GGGGCATTGC CACCACCTGT CAGCTCCTTT CCGGGACTTT CGCTTTCCCC
301 CTCCTATTG CCACGGCGGA ACTCATCGCC GCCTGCCTTG CCCGCTGCTG GACAGGGGCT
361 CGGCTGTTGG GCACTGACAA TTCCGTGGTG TTGTCGGGGA AATCATCGTC CTTTCCTTGG
421 CTGCTCGCCT GTGTTGCCAC CTGGATTCTG CGCGGGACGT CTTTCTGCTA CGTCCCTTCG
481 GCCCTCAATC CAGCGGACCT TCCTTCCCGC GGCCTGCTGC CGGCTCTGCG GCCTCTTCCG
541 CGTCTTCGCC TTCGCCCTCA GACGAGTCGG ATCTCCCTTT GGGCCGCCTC CCC (SEQ

ID NO: 19) или последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности с последовательностью

1 ATCGATAATC AACCTCTGGA TTACAAAATT TGTGAAAGAT TGA CTGGTAT TCTTAACTAT
61 GTTGCTCCTT TTACGSTATG TGGATACGCT GCTTTAATGC CTTTGTATCA TGCTATTGCT
121 TCCCGTATGG CTTTCATTTT CTCCTCCTTG TATAAATCCT GGTTGCTGTC TCTTTATGAG
181 GAGTTGTGGC CCGTTGTCAG GCAACGTGGC GTGGTGTGCA CTGTGTTTGC TGACGCAACC
241 CCCACTGGTT GGGGCATTGC CACCACCTGT CAGCTCCTTT CCGGGACTTT CGCTTTCCCC
301 CTCCTATTG CCACGGCGGA ACTCATCGCC GCCTGCCTTG CCCGCTGCTG GACAGGGGCT
361 CGGCTGTTGG GCACTGACAA TTCCGTGGTG TTGTCGGGGA AATCATCGTC CTTTCCTTGG
421 CTGCTCGCCT GTGTTGCCAC CTGGATTCTG CGCGGGACGT CTTTCTGCTA CGTCCCTTCG
481 GCCCTCAATC CAGCGGACCT TCCTTCCCGC GGCCTGCTGC CGGCTCTGCG GCCTCTTCCG
541 CGTCTTCGCC TTCGCCCTCA GACGAGTCGG ATCTCCCTTT GGGCCGCCTC CCC (SEQ

ID NO: 19)

[0125] В некоторых вариантах осуществления конструкт содержит или состоит из последовательности, кодирующей сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота, имеющий последовательность

1 CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTGG CCCCTCCCC
61 GTGCCTTCCT TGACCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCSTAATA AAATGAGGAA
121 ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
181 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
241 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGG (SEQ ID NO: 20) или

последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности с последовательностью

1 CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTGG CCCCTCCCC
61 GTGCCTTCCT TGACCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCSTAATA AAATGAGGAA
121 ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
181 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
241 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGG (SEQ ID NO: 20).

[0126] В некоторых вариантах осуществления конструктор содержит или состоит из последовательности, кодирующей 5' ITR, имеющий последовательность

```
1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTTCG GGCGACSTTT
61 GGTCGCCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA STCCATCACT
121 AGGGGTTCTT (SEQ ID NO: 21) или последовательность, имеющую по
```

меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности с последовательностью

```
1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTTCG GGCGACSTTT
61 GGTCGCCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA STCCATCACT
121 AGGGGTTCTT (SEQ ID NO: 21).
```

[0127] В некоторых вариантах осуществления конструктор содержит или состоит из последовательности, кодирующей 3' ITR, имеющий последовательность

```
1 AGGAACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG STCACTGAGG
61 CCGGGCGACC AAAGGTCGCC CGACGCCCGG GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAGA
121 G (SEQ ID NO: 22) или последовательность, имеющую по меньшей мере
```

50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, или любое другое процентное значение между указанными, идентичности с последовательностью

```
1 AGGAACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG STCACTGAGG
61 CCGGGCGACC AAAGGTCGCC CGACGCCCGG GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAGA
121 G (SEQ ID NO: 22).
```

[0128] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию, где конструктор содержит белок REP-1 человека или его часть, конструктор обозначается как «AAV2-REP1 или AAV2.REP1», а Международное непатентованное название (INN) представляет собой тимрепиген эмпарвовек (англ. timrepigene emparvovect). В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию, где конструктор содержит белок REP-1 человека или его часть, продукт AAV2-REP1 состоит из очищенного рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 2 (rAAV), кодирующего кДНК Rab-сопровождающего белка типа 1 (REP-1) человека. В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК длиной 4173 п.о. (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: 5' инвертированный концевой повтор (ITR) длиной 177 п.о., гибридный промотор энхансера цитомегаловируса/куриного бета-актина (СВА) длиной 934 п.о., кДНК REP1 человека длиной 1962 п.о., посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) длиной 589 п.о., последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-полиА) длиной 242 п.о. и 3' ITR длиной 165 п.о. В некоторых вариантах осуществления плазида рAAV.REP-1-Кап, используемая для создания вектора AAV2-REP1, показана на Фиг. 18. В некоторых вариантах

осуществления κДНК REP1 человека длиной 1962 п.о. содержит последовательность нуклеиновой кислоты:

```
1 atggcggata ctctcccttc ggagtttgat gtgatcgtaa tagggacggg tttgcctgaa
61 tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga
121 agctactatg gaggaaactg ggccagtttt agcttttcag gactattgtc ctggctaaag
181 gaataaccagg aaaacagtga cattgtaagt gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt
241 gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta
301 ttttgttatg ccagtcagga tttgcatgaa gatgtcgaag aagctgggtgc actgcagaaa
361 aatcatgctc ttgtgacatc tgcaaaactcc acagaagctg cagattctgc cttcctgcct
421 acggaggatg agtcattaag cactatgagc tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc
481 agcgatccag agaatgcgct agaagtaaag ggtgctgaag tgacagggga aaaagaaaaa
541 cattgtgatg ataaaaacttg tgtgccatca acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg
601 cctatagcag aagataccac agagcaacca aagaaaaaca gaattactta ctacaaaatt
661 attaaagaag gcaggagatt taatattgat ttagtatcaa agctgctgta ttctcgagga
721 ttactaattg atcttcta atcaaatctaat gttagtcgat atgcagagtt taaaaatatt
781 accaggattc ttgcatttcg agaaggacga gtggaacagg ttccgtgttc cagagcagat
841 gtctttaata gcaacaact tactatggta gaaaagcga tgctaataaa atttcttaca
901 ttttgatagg aatatgagaa atatcctgat gaatataaag gatatgaaga gatcacattt
961 tatgaatatt taaagactca aaaattaacc cccaacctcc aatatattgt catgcattca
1021 attgcaatga catcagagac agccagcagc accatagatg gtctcaaaagc taccaaaaaa 1081
tttcttcaact gtcttgggcg gtatggcaac actccatttt tgtttccttt atatggccaa 1141
ggagaactcc cccagtggtt ctgcaggatg tgtgctgtgt ttggtggaat ttattgtctt 1201
cgccattcag tacagtgctt tgtagtggac aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata 1261
gatcagtttg gtcagagaaat aatctctgag ctttctctcg tggaggacag ttacttttct 1321
gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg cagatctcca gggcagtgct gattacagat 1381
agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa cagatttcca ttttgacagt gccagcagag 1441
gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt gagttatggt cttcaacgat gacatgcatg 1501
aaaggcacct atttggttca tttgacttgc acatcttcta aaacagcaag agaagattta 1561
gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca tatactgaaa tggagataga aaatgaacaa 1621
gtagaaaagc caagaattct gtgggctctt tacttcaata tgagagattc gtcagacatc 1681
agcaggagct gttataatga tttaccatcc aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt 1741
ggttttaggaa atgataatgc agtcaaacag gctgaaacac ttttccagga aatctgcccc 1801
aatgaagatt tctgtcccc tccaccaaat cctgaagaca ttatccttga tggagacagat 1861
ttacagccag aggccttcaga atccagtgcc ataccagagg ctaactcggg gactttcaag 1921
gaaagcacia accttggaac ctagaggag tcctctgaat aa (SEQ ID NO: 23).
```

[0129] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию конструктор дополнительно содержит последовательность, соответствующую 5' инвертированному концевому повтору (ITR), и последовательность, соответствующую 3' инвертированному концевому повтору (ITR). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, идентичны. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, не идентичны. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, выделены или получены из аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, содержат последовательность дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и

последовательность, кодирующая 3' ITR, содержат усеченную последовательность AAV2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, содержат вариацию по сравнению с последовательностью дикого типа того же серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления вариация включает замену, вставку, делецию, инверсию или транспозицию. В некоторых вариантах осуществления вариация включает усечение или удлинение последовательности дикого типа или варианта.

[0130] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию AAV содержит последовательность, соответствующую 5' инвертированному концевому повтору (ITR), и последовательность, соответствующую 3' инвертированному концевому повтору (ITR). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, идентичны. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, не идентичны. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, выделены или получены из аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, содержат последовательность дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, содержат усеченную последовательность AAV2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, содержат вариацию по сравнению с последовательностью дикого типа того же серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления вариация включает замену, вставку, делецию, инверсию или транспозицию. В некоторых вариантах осуществления вариация включает усечение или удлинение последовательности дикого типа или варианта.

[0131] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию AAV содержит вирусную последовательность, необходимую для образования дефицитного по репликации AAV. В некоторых вариантах осуществления вирусная последовательность выделена или получена из AAV того же серотипа, что и одна или обе последовательности, кодирующие 5' ITR, или последовательности, кодирующие 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусная последовательность, последовательность, кодирующая 5' ITR, или последовательность, кодирующая 3' ITR,

выделены или получены из AAV2. В некоторых вариантах осуществления вирусная последовательность, последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, выделены или получены из AAV2.

[0132] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию AAV содержит вирусную последовательность, необходимую для образования дефицитного по репликации AAV, последовательность, кодирующую 5' ITR, и последовательность, кодирующую 3' ITR, но не содержит какой-либо другой последовательности, выделенной или полученной из AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой рекомбинантный AAV (rAAV), содержащий вирусную последовательность, необходимую для образования дефицитного по репликации AAV, последовательность, кодирующую 5' ITR, последовательность, кодирующую 3' ITR, и последовательность, кодирующую конструкт по настоящему описанию.

[0133] В некоторых вариантах осуществления плазмидная ДНК, используемая для создания rAAV в клетке-хозяине, содержит маркер селекции. Иллюстративные маркеры селекции включают гены устойчивости к антибиотикам, но не ограничиваются ими. Иллюстративные гены устойчивости к антибиотикам включают ампициллин и канамицин, но не ограничиваются ими. Иллюстративные маркеры селекции включают гены устойчивости к лекарственному продукту или низкомолекулярному соединению, но не ограничиваются ими. Иллюстративные маркеры селекции включают *darD* и репрессируемый оператор, но не ограничиваясь ими, включая конструкт *lacO/P*, регулирующий или подавляющую экспрессию *darD*, при этом селекция плазмиды осуществляется путем введения или контактирования трансформированной клетки с плазмидой, пригодной к титрованию оператора репрессором (ORT), но не ограничиваются ими. Иллюстративные маркеры селекции включают ген селекции *ccd*, но не ограничиваются им. В некоторых вариантах осуществления ген селекции *ccd* содержит последовательность, кодирующую ген селекции *ccdA*, который устраняет линию клеток-хозяев, сконструированных для экспрессии токсичного гена *ccdB*. Иллюстративные маркеры селекции включают *sacB*, где РНК вводится или контактирует с клеткой-хозяином для подавления экспрессии гена *sacB* на сахарозной среде, но не ограничиваются им. Иллюстративные маркеры селекции включают механизм сегрегационного уничтожения, такой как локус *ragAB+*, состоящий из *Hok* (ген уничтожения хозяина) и *Sok* (подавление уничтожения), но не ограничиваются им.

Структура AAV-конструкта

[0134] Продукт на основе AAV2-конструкта состоит из очищенного рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 2 (rAAV), кодирующего кДНК, кодирующую терапевтический конструкт. Иллюстративная схема показана на Фиг. 3.

[0135] В некоторых вариантах осуществления AAV2-конструкт содержит одну или более последовательностей, кодирующих 5' ITR, последовательность, кодирующую 3' ITR, и последовательность, кодирующую капсидный белок, который выделен и/или получен из аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 2 (AAV2). В

некоторых вариантах осуществления AAV2-конструкт содержит последовательность, кодирующую 5' ITR, последовательность, кодирующую 3' ITR, и последовательность, кодирующую капсидный белок, который выделен и/или получен из аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления AAV2-конструкт содержит усеченную последовательность, кодирующую 5' ITR, и последовательность, кодирующую 3' ITR, которая выделена и/или получена из аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления AAV2-конструкт содержит ITR AAV2 дикого типа (5' ITR дикого типа и 3' ITR дикого типа).

[0136] В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: (a) 5' инвертированный концевой повтор (ITR), (b) промотор, пригодный для экспрессии в клетках млекопитающих, (c) кДНК, кодирующую терапевтический конструкт, и (d) 3' ITR.

[0137] В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: (a) 5' инвертированный концевой повтор (ITR) длиной 145 п.о., (b) промотор, пригодный для экспрессии в клетках млекопитающих, (c) кДНК, кодирующую терапевтический конструкт, и (d) 3' ITR длиной 145 п.о. В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: (a) 5' инвертированный концевой повтор (ITR), (b) промотор, пригодный для экспрессии в клетках млекопитающих, (c) кДНК, кодирующую терапевтический конструкт, и (d) 3' ITR, где 5' ITR или 3' ITR содержит или состоит из 134, 135, 136 или 137 п.о.

[0138] В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: (a) 5' инвертированный концевой повтор (ITR) длиной 145 п.о., (b) промотор, пригодный для экспрессии в клетках млекопитающих, (c) кДНК, кодирующую терапевтический конструкт, (e) последовательность полиаденилирования (полиА) и (f) 3' ITR длиной 145 п.о. В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: (a) 5' инвертированный концевой повтор (ITR), (b) промотор, пригодный для экспрессии в клетках млекопитающих, (c) кДНК, кодирующую терапевтический конструкт, (e) последовательность полиаденилирования (полиА) и (f) 3' ITR, где 5' ITR или 3' ITR содержит или состоит из 134, 135, 136 или 137 п.о.

[0139] В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: (a) 5' инвертированный концевой повтор (ITR) длиной 145 п.о., (b) промотор, пригодный для экспрессии в клетках млекопитающих, (c) кДНК, кодирующую терапевтический конструкт, (d) посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE), (e) последовательность полиаденилирования (полиА) и (f) 3' ITR длиной 145 п.о. В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: (a) 5' инвертированный концевой повтор (ITR), (b) промотор, пригодный для экспрессии в клетках млекопитающих, (c) кДНК, кодирующую терапевтический конструкт, (d) посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE), (e) последовательность полиаденилирования (полиА) и (f) 3' ITR, где 5' ITR или 3' ITR содержат или состоят из 134, 135, 136 или 137 п.о.

[0140] В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: (a) 5' инвертированный концевой повтор (ITR) длиной 145 п.о., (b) промотор, необязательно, гибридный промотор энхансера цитомегаловируса/куриного бета-актина (СВА) длиной 934 п.о., (c) кДНК, кодирующую терапевтический конструкт, (d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) длиной 589 п.о., (e)

последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-полиА) длиной 242 п.о. и (f) 3' ITR длиной 145 п.о. В некоторых вариантах осуществления каждый вирион AAV длиной 20 нм содержит последовательность вставки одноцепочечной ДНК (плюс короткие сайты клонирования, фланкирующие каждый элемент), содержащую: (a) 5' инвертированный концевой повтор (ITR), (b) промотор, необязательно, гибридный промотор энхансера цитомегаловируса/куриного бета-актина (CBA) длиной 934 п.о., (c) кДНК, кодирующую терапевтический конструкт, (d) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) длиной 589 п.о., (e) последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-полиА) длиной 242 п.о. и (f) 3' ITR, где 5' ITR или 3' ITR содержат или состоят из 134, 135, 136 или 137 п.о.

[0141] AAV или конструкт по настоящему описанию могут содержать последовательность, кодирующую промотор, пригодный для экспрессии в клетке млекопитающего. Предпочтительно, AAV или конструкт по настоящему описанию могут содержать последовательность, кодирующую промотор, пригодный для экспрессии в клетке человека. Иллюстративные промоторы по настоящему описанию включают конститутивно активные промоторы, специфические для соответствующих типов клеток промоторы, вирусные промоторы, промоторы млекопитающих и гибридные или рекомбинантные промоторы, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию терапевтический конструкт AAV2-конструкта находится под контролем промотора куриного бета-актина (CBA). В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему изобретению промотор CBA содержит последовательность, кодирующую энхансер цитомегаловируса (CMV), и последовательность, кодирующую промотор куриного бета-актина (называемый по-разному CBA или CAG).

[0142] AAV или конструкт по настоящему описанию может содержать последовательность, кодирующую посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE). Иллюстративные PRE по настоящему описанию включают посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), но не ограничиваются им. В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему изобретению AAV содержит WPRE длиной 589 п.о., происходящий из 3' области вирусного S-транскрипта, непосредственно после кДНК, кодирующей терапевтический конструкт по настоящему описанию. Этот WPRE важен для высокого уровня экспрессии нативных транскриптов мРНК, повышая процессинг

мРНК и транспорт безинтронных генов. В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию WPRE модифицирован для предотвращения экспрессии вирусного X-антигена путем абляции сайта инициации трансляции. Это было достигнуто путем удаления промотора/энхансера We2 и мутации промотора We1.

[0143] AAV или конструктор по настоящему описанию может содержать последовательность полиаденозина (полиА). Иллюстративные последовательности полиА по настоящему описанию включают последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-polyA), но не ограничиваются им. Последовательность BGH-polyA используется для усиления экспрессии гена, и было показано, что она дает в три раза более высокие уровни экспрессии, чем другие последовательности полиА, такие как SV40 и полиА человеческого коллагена. Эта повышенная экспрессия в значительной степени не зависит от типа промотора или трансгена, находящегося выше по рамке считывания. Повышение уровней экспрессии с использованием последовательностей BGH-полиА и WPRE позволяет вводить более низкую общую дозу AAV или плазмидного вектора, что с меньшей вероятностью вызывает иммунный ответ хозяина.

[0110] В одном иллюстративном варианте осуществления вектор pBC-hREP1 содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, представленной SEQ ID NO: 24.

[0111] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию композиция содержит лекарственное вещество. Используемый в данном документе термин «лекарственное вещество» включает гAAV по настоящему описанию, содержащий конструктор по настоящему описанию.

[0144] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию композиция содержит лекарственный продукт. В данном контексте лекарственный продукт включает лекарственное вещество, составленное для введения субъекту для лечения или предотвращения заболевания или расстройства.

[0145] Компоненты иллюстративного лекарственного продукта по настоящему описанию, их функции и характеристики перечислены в Таблице 1.

[0146] Таблица 1: Состав лекарственного продукта на основе AAV2-конструктора

Название ингредиента	Функция	Степень	Количество/концентрация
AAV2-конструктор	Активное вещество	GMP	1,0 x 10 ¹² DRP/мл
Трис, pH 8,0	Буфер	EP, BP, USP, JPC	20 мМ

MgCl ₂	Повышение стабильности вектора	EP, BP, USP, JPC, FCC	1 мМ
NaCl	Повышение стабильности вектора и предотвращение агрегации векторов	EP, BP, USP, JP	200 мМ
Полоксамер 188		EP, USP	0,001%
Вода для инъекций	Разбавитель	EP, USP	QS до 125 мл

Лекарственная форма

[0147] Композиции по настоящему описанию могут быть составлены для системного или локального введения.

[0148] Композиции по настоящему описанию могут быть составлены в виде суспензии для инъекции или инфузии.

[0149] Композиции по настоящему описанию могут быть составлены для инъекции или инфузии любым путем, включая интравитреальную инъекцию или инфузию, субретинальную инъекцию или инфузию или супрахориоидальную инъекцию или инфузию, но не ограничиваясь ими.

[0150] Композиции по настоящему описанию могут быть составлены в концентрации от $1,0 \times 10^{10}$ DRP/мл до $1,0 \times 10^{14}$ DRP/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут быть составлены в концентрации около $1,0 \times 10^{12}$ DRP/мл. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут быть составлены в концентрации $1,0 \times 10^{12}$ DRP/мл. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут быть составлены в концентрации от $0,1 \times 10^{12}$ DRP/мл до $10,0 \times 10^{12}$ DRP/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут быть составлены в концентрации от $0,1 \times 10^{12}$ DRP/мл до $5,0 \times 10^{12}$ DRP/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут быть составлены в концентрации от $0,1 \times 10^{12}$ DRP/мл до $2,0 \times 10^{12}$ DRP/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут быть составлены в концентрации от $0,5 \times 10^{12}$ DRP/мл до $1,5 \times 10^{12}$ DRP/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут быть составлены в концентрации от $0,7 \times 10^{12}$ DRP/мл до $1,3 \times 10^{12}$ DRP/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут быть составлены в концентрации от $0,8 \times 10^{12}$ DRP/мл до $1,2 \times 10^{12}$ DRP/мл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут быть

составлены в концентрации от $0,9 \times 10^{12}$ DRP/мл до $1,1 \times 10^{12}$ DRP/мл, включая конечные точки.

[0151] Композиции по настоящему описанию могут быть разбавлены перед введением с использованием разбавителя по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления разбавитель идентичен буферу для состава, используемому для приготовления лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта. В некоторых вариантах осуществления разбавитель не идентичен буферу для состава, используемому для приготовления лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта.

[0152] Композиции по настоящему описанию, включая лекарственный продукт на основе AAV2-конструкта, описанный в Таблице 1, могут быть составлены в виде суспензии для инъекций, содержащей $1,0 \times 10^{12}$ DRP/мл. Если требуется протоколом, лекарственный продукт на основе AAV2-конструкта может быть разбавлен в клинике (то есть медицинским работником) перед введением с использованием разбавителя по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления такой разбавитель представляет собой тот же буфер для состава, используемый для приготовления лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта.

Фармацевтические составы

[0153] Композиции по настоящему описанию могут содержать лекарственное вещество. В некоторых вариантах осуществления лекарственное вещество включает или состоит из AAV2-конструкта. В некоторых вариантах осуществления лекарственное вещество включает или состоит из AAV2-конструкта и буфера для состава. В некоторых вариантах осуществления буфер для состава содержит 20 мМ Трис, 1 мМ $MgCl_2$ и 200 мМ NaCl при pH 8. В некоторых вариантах осуществления буфер для состава содержит 20 мМ Трис, 1 мМ $MgCl_2$ и 200 мМ NaCl при pH 8 с полоксамером 188 при 0,001%.

Вспомогательные вещества

Композиции по настоящему описанию могут содержать лекарственный продукт. В некоторых вариантах осуществления лекарственный продукт включает или состоит из лекарственного вещества и буфера для состава. В некоторых вариантах осуществления лекарственный продукт включает или состоит из лекарственного вещества, разбавленного в буфере для состава. В некоторых вариантах осуществления лекарственный продукт содержит или состоит из лекарственного вещества на основе

AAV2-конструкта, разбавленного до конечной концентрации генома вектора (гв) лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта в буфере для состава.

Офтальмологические составы

[0154] Композиции по настоящему описанию могут быть составлены таким образом, чтобы они содержали, состояли по сути из или состояли из лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта в оптимальной концентрации для инъекции или инфузии в глаз.

[0155] Композиции по настоящему описанию могут содержать один или более буферов, которые увеличивают или улучшают стабильность AAV по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут содержать один или более буферов, которые обеспечивают или повышают стабильность AAV2 по настоящему описанию. Альтернативно или дополнительно, композиции по настоящему описанию могут содержать один или более буферов, которые предотвращают, уменьшают или минимизируют агрегацию частиц AAV. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию могут содержать один или более буферов, которые предотвращают, уменьшают или минимизируют агрегацию частиц AAV2.

[0156] Композиции по настоящему описанию могут содержать один или более компонентов, которые индуцируют или поддерживают нейтральный или слегка щелочной pH. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию содержат один или более компонентов, которые индуцируют или поддерживают нейтральный или слегка щелочной pH в диапазоне от 7 до 9, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию содержат один или более компонентов, которые индуцируют или поддерживают pH около 8. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию содержат один или более компонентов, которые индуцируют или поддерживают pH в диапазоне от 7,5 до 8,5. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию содержат один или более компонентов, которые индуцируют или поддерживают pH в диапазоне от 7,7 до 8,3. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию содержат один или более компонентов, которые индуцируют или поддерживают pH в диапазоне от 7,9 до 8,1. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию содержат один или более компонентов, которые индуцируют или поддерживают pH 8.

[0157] После контакта композиции по настоящему описанию и клетки, AAV2-конструкт экспрессирует ген или его часть, что приводит к продукции продукта, кодируемого геном или его частью. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой клетку сетчатки. В некоторых вариантах осуществления клетка сетчатки представляет собой нейрон. В некоторых вариантах осуществления нейрон представляет собой фоторецептор. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* или *in situ*. В некоторых вариантах осуществления, включая те, в которых клетка находится *in vivo*, контактирование происходит после введения композиции субъекту. В некоторых вариантах осуществления AAV2-конструкт экспрессирует ген или его часть, что приводит к продукции продукта, кодируемого геном или его частью, на терапевтически эффективном уровне экспрессии продукта гена. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой белок.

Партии составов

[0158] Композиции по настоящему описанию могут быть произведены в масштабе от 1 до 1000 флаконов на партию, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию композиция, лекарственное вещество или лекарственный продукт могут быть произведены в масштабе от 50 до 500 флаконов на партию, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию композиция, лекарственное вещество или лекарственный продукт могут быть произведены в масштабе от 100 до 415 флаконов на партию, включая конечные точки.

[0159] Иллюстративные партии по настоящему описанию могут включать от 0,01 мл до 5 мл, включая конечные точки, композиции, лекарственного вещества или лекарственного продукта по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления партия по настоящему описанию может включать от 0,01 мл до 1 мл, включая конечные точки, композиции, лекарственного вещества или лекарственного продукта по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления партия по настоящему описанию может включать от 0,1 мл до 1 мл, включая конечные точки, композиции, лекарственного вещества или лекарственного продукта по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления партия по настоящему описанию может включать от 0,1 мл до 5 мл, включая конечные точки, композиции, лекарственного вещества или лекарственного продукта по настоящему описанию. В

некоторых вариантах осуществления партия по настоящему описанию может включать от 0,25 мл до 0,35 мл, включая конечные точки, композиции, лекарственного вещества или лекарственного продукта по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления партия по настоящему описанию может включать около 0,3 мл композиции, лекарственного вещества или лекарственного продукта по настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления партия по настоящему описанию может включать 0,3 мл композиции, лекарственного вещества или лекарственного продукта по настоящему описанию.

[0160] Таблица 2: Иллюстративный состав партии для флакона с лекарственным продуктом на основе AAV2-конструкта

Компонент	Количество	Привязка к стандарту
AAV2-конструкт	$1,25 \times 10^{14}$ DRP	Собственное производство, GMP
Трис, pH 8,0	20 мМ	EP, BP, USP, JPC
MgCl ₂ (безводный)	1 мМ	EP, BP, USP, JPC, FCC
NaCl	200 мМ	EP, BP, USP, JP
Полоксамер 188	0,001%	EP, USP
Вода для инъекций	QS до 125 мл	EP, USP

[0161] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему описанию для приготовления лекарственного продукта лекарственное вещество размораживают при $+35 \pm 2^\circ \text{C}$ и разбавляют при необходимости в стерильном буфере для состава до целевой концентрации ($1,0 \times 10^{12}$ DRP/мл).

[0162] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию целевой конечный титр DRP лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта составляет 1×10^{12} DRP/мл, минимальный и максимальный приемлемый титр составляет $0,8 \times 10^{12}$ DRP/мл и $1,5 \times 10^{12}$ DRP/мл, соответственно. Лекарственный продукт на основе AAV2-конструкта стерильно фильтруют и разливают в стеклянные флаконы 2R типа I объемом 3 мл с пробками из бромбутилкаучука в объеме 0,3 мл на флакон. Затем флаконы замораживают и хранят при температуре $\leq -60^\circ \text{C}$. Для маркировки и хранения перед одобрением уполномоченным по качеству и распространением на месте лекарственный продукт передается квалифицированному клиническому дистрибьютору. Лекарственный продукт хранят при температуре $\leq -60^\circ \text{C}$ в морозильной камере с контролируемой температурой перед одобрением уполномоченным по качеству и распространением.

Хранение композиций

[0163] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию, включая те, в которых композиция содержит лекарственный продукт, и композиция поставляется в стерильном флаконе, композиция может храниться при температуре ниже нуля (° C). В некоторых вариантах осуществления композиции можно размораживать и замораживать без потери эффективности лекарственного продукта или целостности стерильной упаковки. В некоторых вариантах осуществления композиции могут подвергаться многократным циклам оттаивания и замораживания без потери эффективности лекарственного продукта или целостности стерильной упаковки.

[0164] В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию, включая те, в которых композиция содержит лекарственный продукт, и композиция поставляется в стерильном флаконе, композиция может храниться при комнатной температуре.

Органические материалы

[0165] Исходные материалы, используемые для приготовления буферов и сред по настоящему описанию, сертифицированы как не содержащие материалы животного происхождения.

Компендиальные материалы: см. Таблицу 3.

[0166] Таблица 3:

Компонент	Иллюстративный поставщик/номер по каталогу	Степень очистки
Соляная кислота, концентрированная	Merck/ 1370072500	NF
Хлорид магния, гексагидрат	Merck/ 1058321000	USP
Хлористый калий	Merck/ 1049355000	USP
Хлорид натрия	Merck/ 1162245000	USP
Гидроксид натрия, пеллеты	Merck/ 1064821000	NF
Трис-основание	Merck/ 1083861000	USP
Этанол, абсолютный	Merck/ 1009862500	USP
Вода для инъекций		EP, USP
Лимонная кислота, моногидрат	Merck/ 137003	EP, USP
H ₃ PO ₄	Merck/ 100563	EP, USP
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck/106580	EP, USP
Полоксамер 188	Merck/ 137065	EP, USP

NF = Национальный формуляр; USP = Фармакопея США; EP = Европейская фармакопея

Некомпендиальные материалы: см. Таблицу 4.

[0167] Таблица 4.

Компонент	Иллюстративный	Тестирование
-----------	----------------	--------------

	поставщик/номер по каталогу	производителей/описание
FBS IRR (30-45 кГр)	Hyclone/ SH30406.03IR	Сертификат и CEP
FBS IRR (30-45 кГр)	Hyclone/ SH30406.02IR	Сертификат и CEP
FBS, облученный	Life technologies / 10101	Сертификат и CEP
ГруппLE TM Select	Gibco/ 12563-029	pH 7,0 - 7,4, Идентичность: HPLC
PBS без Ca & Mg	Gibco/ 10010-031	pH 7,3 - 7,5
HBSS без Ca & Mg без RP	Gibco/ 14170-138	pH 6,7 - 7,8, стерильный
Бензоназа	Merck/ 1060950001	Чистота $\geq 99,0\%$, эндотоксин $< 0,25$ ЕЭ/1000 Е, идентичность: пройдена
DMEM глутамакс BTL	Gibco/ 61965-026	pH 6,8 - 7,2, стерильный
DMEM глутамакс РСН	Gibco/ 10566-016	Стерильный
PEI pro	PolyPlus/ PPLU115-375	Стерильный, эндотоксин $< 0,5$ ЕЭ/мл
ДНК плазмиды pAAV.конструкт-Kan	под заказ	Сертификат анализа
ДНК плазмиды pNLRep-Cap2-Kan	под заказ	Сертификат анализа
ДНК плазмиды pHELP-Kan	под заказ	Сертификат анализа
Главный банк клеток HEK293	Cobra Biologics	
Осветляющий фильтр, 0,65 мкм	Sartorius/ 5551305P1 - SS	Стерилизованный в Novasep перед использованием
Осветляющий фильтр, 0,2 мкм	Sartorius / 5445307H9 - FF — A	Стерильный - автоклавированный, эндотоксины $< 0,18$ ЕЭ/мл, соответствует пластмассам класса VI USP
Фильтр UFDF, 100 кДа	Spectrum labs/ N02-E100-05-N или аналогичный фильтр с более низкой эффективной площадью фильтрации (EFA)	Продезинфицированный перед использованием, LAL-тест проводится после уравнивания
Пробирки для ультрацентрифуги	Beckman/ 342414	Соответствует Кодексу федеральных правил FDA, раздел 21 §177.1520 (с) 3.1a и 3.2a, а также критериям Фармакопеи США для пластмасс класса VI.
Фильтр стерильной фильтрации, 0,2 мкм	Sartorius / 5445307HS - FF или аналогичный фильтр с более низкой эффективной площадью фильтрации (EFA)	Эндотоксины $< 0,18$ ЕЭ/мл, соответствует пластмассам класса VI USP
Ионообменная среда	Biorad/ 156-0101	Продезинфицированный 0,5 М NaOH, LAL-тест проводится после

		уравновешивания
Колонка	Merck Millipore/ 96100250	Продезинфицирована 0,5 М NaOH, эндотоксин при последней промывке WFI <0,25 ЕЭ/мл).
Колонка	Колонка Merck Vantage-L VL22x250	Перед использованием продезинфицировали 0,17 М НЗРО ₄ , 1 М NaCl и кондиционировали. pH и проводимость проверены после уравновешивания
UFDF/диализный фильтр, 100 кДа	Spectrum labs / S02-E100-05-N или аналогичный фильтр с более низкой EFA	Продезинфицированный перед использованием, LAL-тест проводится после уравновешивания
Смола UnoQ	Bio-Rad	Продезинфицирована 0,5 М NaOH, эндотоксин при последней промывке WFI <0,25 ЕЭ/мл)
Смола AVB-сефароза	GE Healthcare	Перед использованием продезинфицировали 0,17 М НЗРО ₄ , 1 М NaCl и кондиционировали. pH и проводимость проверены после уравновешивания

CER = Сертификат соответствия

Сырье животного происхождения

[0168] Фетальная бычья сыворотка имеет животное происхождение. Источник, производитель и использование этого сырья приведены в Таблице 5.

[0169] Таблица 5.

Компонент	Источник	Производитель	Использование	CER	Первичная документация
Фетальная бычья сыворотка, облученная	Крупный рогатый скот	HyClone Новая Зеландия	Культура клеток НЕК293, производство клинической партии	R1-CER 2000-211-Rev01	Сертификат и CER, получены из Новой Зеландии
Фетальная бычья сыворотка, облученная	Крупный рогатый скот	Life Technologies	Получение МСВ НЕК293	R1-CER 2001-024-Rev02	Сертификат и CER, получены из Австралии

Фильтры и хроматографические матрицы

[0170] Фильтры, используемые для фильтрации лекарственного вещества и лекарственного продукта, представляют собой фильтры Sartopore 0,45 мкм и 0,2 мкм. При покупке фильтры являются нестерильными и стерилизуются в автоклаве заводом-

изготовителем. Они проверены на целостность путем определения точки кипения при 3,2 бар.

[0171] Перед использованием на все хроматографические материалы выдается Сертификат качества. Колонки приобретаются предварительно упакованными и дезинфицируются перед использованием.

Способы производства лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта «Исходный процесс» (Процесс 1)

[0172] Обзор типового способа производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта показан на Фиг. 8. Блок-схемы, соответствующие этому способу, представлены на Фиг. 9 и 10. Способ производства, описанный на Фиг. 8, 9 и 10, может упоминаться в данном документе как «Процесс 1».

[0173] Иллюстративные изменения в Процессе 1 представлены в Таблице 6 ниже. Некоторые варианты осуществления Процесса 2 могут включать изменения, описанные в Таблице 6.

[0174] Таблица 6.

Стадии способа/материалы	Процесс 1	Процесс 2	Примечание
Категория производства	Чистые помещения GMP	Лаборатории, не отвечающие требованиям GMP	
Клетки HEK293	Исходный процесс 1	Производный банк клеток ATCC CRL-1573	Для оценки изменений источника клеток
Плазмиды	Плазмиды ампициллина	Плазмиды канамицина	Для оценки изменений плазмидного каркаса (переключение с гена AmpR на ген KanR)
Сырье	Чистота класса GMP	Высокая чистота	
Время от повторной загрузки (после плазмидной трансдукции) до сбора	22-24 ч	72-73 ч	Сбор до 96 ч после трансдукции не оказывает отрицательного влияния на выход клетки + среда по сравнению с более ранним сбором.

Оптимизация Процесса 1 (подготовительный процесс)

[0175] Исходный материал для Процесса 1 был взят из одного флакона с клетками HEK293 из производного банка клеток (DCB). Этот DCB получали с использованием одного флакона с клетками ATCC HEK293. Для культивирования клеток HEK293 использовали CS10, но масштаб этой культуры был увеличен с 12 CS10 до 24 CS10 для получения дополнительного материала для последующего производного процесса,

который выполнялся одновременно. Процедура продолжалась с использованием 2 x 12 CS10 до точки трансдукции, когда 24 CS10 обрабатывались в рамках одной операции.

[0176] Емкости для клеточных культур и сырье: в Таблице 7 выделены основные различия между сырьем, используемым для двух различных производственных процессах, и приведены примечания относительно значимости изменений.

[0177] Таблица 7:

Сырье	Разработка нового процесса (включая изменения в Процессах 1 и 2)	Исходный процесс (соответствует Процессу 1)	Примечание
Сыворотка	ФБС Hyclone – SH30406.03IR	Сыворотка Cosmic Calf Hyclone – SH30087- 04IR	Сыворотка Cosmic Calf не подходит для производства на поздних стадиях клинической фазы. Изменение в сыворотке может повлиять на рост клеток/профиль примесей, но ее необходимо изменить для производства GMP. ФБС обычно используется в усовершенствованном процессе.
Реагент для диссоциации клеток	HyQtase Hyclone – № SV30030.01	Lonza – Trypzean	В клинической партии использовали HyQtase (исходный процесс).
Добавка для среды	L-глутамин 200 мМ Life technology – № 25030	SG-200 Стабильный дипептид L-аланил L-глутамин (200 мМ) Hyclone – № SH30590	Предпочтительный поставщик для усовершенствованного процесса.
Хлорохин	Sigma Aldrich - № C6628	Spectrum chemical – C1448	Предпочтительный поставщик для усовершенствованного процесса.
Декстроза	Roquette – № 361409	Sigma Aldrich - № D9434	Предпочтительный поставщик для усовершенствованного процесса.
Плазмиды	pAAV.конструкт	pAAV.конструкт	Все произведенные плазмиды секвенированы в полном объеме для гарантии гомологии. Хотя номера партий могут измениться, последовательности остаются идентичными для исходного и усовершенствованного процессов.
	pHELP (Kan)	pHELP (Kan)	
	pNLRep-Cap2 (Kan)	pNLRep-Cap2 (Kan)	

[0178] Культура клеток: Источником клеток, используемых для усовершенствованного процесса, был единственный флакон с клетками DCB HEK293. Поскольку для производства партии исходного процесса использовался другой банк, хотя и тот же

исходный источник клеток ATCC, масштаб культивирования был увеличен (с 12 CS10 до 24 CS10), и для поддержания роста клеток во время амплификации клеток использовался другой источник сыворотки, эту стадию адаптировали соответствующим образом. Рост клеток до культивирования в усовершенствованном процессе включал 8 пассажей по сравнению с 10 пассажами в партии, полученной в исходном процессе. Кроме того, плотность клеток после пассажа варьировалась в соответствии с исходным процессом, но фиксировалась в соответствии с усовершенствованным процессом. На Фиг. 8 показано сравнение обоих сайтов для фазы культивирования клеток процесса.

[0179] Рост клеток оценивали в исходном и усовершенствованном способах с использованием измерений плотности клеток. Результаты показали, что клетки, полученные с помощью усовершенствованных процессов, росли быстрее. Это может быть потенциально связано с другим источником сыворотки и/или схемой пассажей клеток, основанной на фиксированных плотностях посева усовершенствованных процессов. Для обоих процессов время удвоения популяции составило 20-30 часов после стабилизации роста клеток (Фиг. 10).

[0180] В некоторых вариантах осуществления Процесса 2, включая те, которые используют исходные материалы, перечисленные в Таблице 7 (за исключением сыворотки), среда для культивирования клеток и/или клеточного роста содержит или состоит из бессывороточной среды.

[0181] Трансдукция: Трансдукция как часть усовершенствованного процесса была выполнена с использованием того же способа, что в исходном процессе.

[0182] Сбор клеток: В соответствии с усовершенствованным процессом сбор был разделен на 2 сбора по 12 CS10, чтобы соответствовать исходному процессу (1x12 CS10). После сбора клетки разрушали с использованием устройства PANDA и определяли титр вектора. Устройство PANDA, используемое во время усовершенствованного процесса, было другого производителя по сравнению с устройством для разрушения клеток, используемым в исходном процессе (см. Таблицу 8 ниже), но оно способно выполнять лизис клеток при том же давлении, что и устройство для разрушения клеток в исходном процессе (80 бар).

[0183] Таблица 8: Сравнение оборудования для разрушения клеток, использованного в оригинальном и усовершенствованном процессах.

Процесс	Используемое оборудование для разрушения клеток
Исходный процесс	Микрофлюидизатор Microfluidics International HC-8000 с керамическим модулем Z-канала 200 мкм

Усовершенствованный процесс	Гомогенизатор PANDA 2K GEA/NiroSoavi
-----------------------------	--------------------------------------

[0184] Титр вектора после подготовительной обработки: титр материала вектора подготовительного процесса на уровне $1 \times 12 \text{ CS10}$ ($6,4 \times 10^{15}$ DRP/партия) (в соответствии с усовершенствованным процессом) был сравним с титром, полученным в том же масштабе подготовительного процесса ($1,44 \times 10^{15}$ DRP/партия) (в соответствии с исходным процессом).

Оптимизация Процесса 1 (последующий процесс)

[0185] Последующий процесс, который был перенесен из исходного в усовершенствованный процесс, показан на Фиг. 11.

[0186] Экспериментальные материалы и сырье: там, где это возможно, для использования в последующем «усовершенствованном» процессе были выбраны то же оборудование, сырье и поставщики, что и в исходном процессе.

[0187] Выполнение последующего процесса: наблюдения на отдельных стадиях процесса приведены ниже.

[0188] Таблица 9: Разрушение клеток/лизис

	Исходный процесс	Усовершенствованный процесс	Примечание
Внешний вид продукта на входе	Красный; частицы	Красный; частицы	Без существенных изменений
Продолжительность (мин)	60	65	
Внешний вид продукта на выходе	Красный; частицы	Красный; частицы	

[0189] Таблица 10: Стадия замораживания/оттаивания

	Исходный процесс	Усовершенствованный процесс	Примечание
Внешний вид продукта на входе	Красный и частицы	Красный и частицы	Без существенных изменений
Инкубация	37°C	37°C	
Продолжительность	19	19	
Замораживание	-20°C	-20°C	
Продолжительность оттаивания	4 ч	4,5 ч	
Внешний вид продукта на выходе	Красный и частицы	Красный и частицы	

[0190] Таблица 11: Осветление

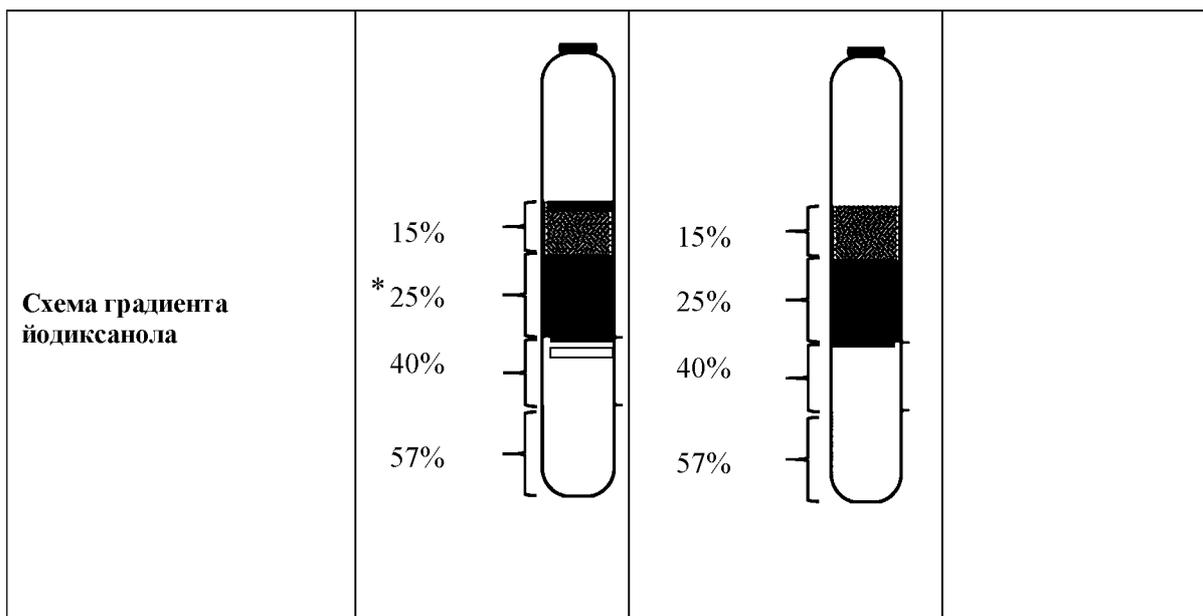
	Исходный процесс	Усовершенствованный процесс	Примечание
Внешний вид продукта на входе	Красный и частицы	Красный и частицы	Без существенных изменений
Скорость потока (мл/мин)	750	750	Без существенных изменений
Продолжительность (мин)	20	2	
Максимальное давление на входе (фунт/кв. дюйм)	0,9	1,7	Критерием приемлемости было давление ниже 10 фунт/кв. дюйм.
Внешний вид продукта на выходе	Красный	Красный	Без существенных изменений

[0191] Таблица 12: Концентрирование и диафильтрация

	Исходный процесс	Усовершенствованный процесс	Примечание
Внешний вид продукта на входе	Красный	Красный	Без существенных изменений
% (об./об.) Объем добавления SSS	10	10	
Скорость рециркуляционного потока (л/мин)	2,76	2,76	
Продолжительность	1 ч 30 мин	1 ч 25 мин	
Скорость диафильтрации	4	4	
TMP (фунт/кв. дюйм)	6 - 7	5,4 - 6,0	Диапазон от 3 до 6 фунт/кв. дюйм для TMP также использовался в Процессе 2 и может быть использован в производственном процессе по настоящему описанию.
Внешний вид продукта на выходе	Розовый	Розовый мутный	Без существенных изменений
Объем (мл)	230	220	Без существенных изменений

[0192] Таблица 13: Градиент йодиксанола

	Исходный процесс	Усовершенствованный процесс	Примечание
Внешний вид продукта на входе	Розовый	Розовый мутный	Без существенных изменений
Внешний вид продукта на выходе	Прозрачный, бесцветный	Прозрачный, бесцветный	Без существенных изменений



* Во время исходного процесса полосы примесей можно было наблюдать на глаз во фракциях 15%, 25% и 40% (множественные полосы). Однако этот профиль не наблюдался во время усовершенствованного процесса, и только одна полоса была видна во фракции 40%. Дополнительные полосы могут быть связаны с более высоким содержанием примесей.

[0193] Стадии гепаринового диализа, диафильтрации и фильтрации: продукт был прозрачным и бесцветным от стадии градиента йодиксанола до конечного продукта. На этих этапах не было обнаружено никаких неожиданных наблюдений.

«Усовершенствованный процесс» (Процесс 2)

[0194] Партию продукта готовят в рамках единой производственной кампании, состоящей из 24 10-слойных емкостей Corning, содержащих клетки НЕК293, трансфицированные плазмидной ДНК, которые продуцируют биологический продукт на основе AAV2-конструкта. Клеточную массу и среду для культивирования клеток собирают и объединяют из 24 10-слойных емкостей Corning, после чего следует единый процесс очистки. Ожидается, что из партии продукта, приготовленной в рамках одной кампании, будет произведено $\geq 5 \times 10^{13}$ вирусных частиц (вч; также называемые в данном документе векторными частицами) лекарственного вещества.

[0195] Обзор типового способа производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта проиллюстрирован на Фиг. 1. Блок-схема, соответствующая этому способу, представлена на Фиг. 2. Производственный процесс, описанный в этом примере, может упоминаться в данном документе как «Процесс 2».

[0196] В некоторых вариантах осуществления Процесса 2 среда для культивирования клеток, собранная и объединенная из 24 10-слойных емкостей Corning, содержит бессывороточную среду. В некоторых вариантах осуществления Процесса 2 среда для

культивирования клеток, собранная и объединенная из 24 10-слойных емкостей Corning, состоит из бессывороточной среды.

Размножение клеток и засев Corning Cell Stack

[0197] На Фиг. 2 показана схематическая диаграмма, соответствующая подробному описанию типового производственного процесса, приведенного ниже.

[0198] Стадия 1. Оттаивание и посев клеток, используемых для производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта. Температуру, продолжительность, скорость вращения и объем, указанные ниже, можно отрегулировать для достижения оптимальных результатов в зависимости от используемого типа клеток. Для иллюстративного варианта осуществления, описанного ниже, условия были оптимизированы для использования клеток НЕК293.

[0199] Оттаивание клеток НЕК293 и посев в 1 колбу T75: флакон с МСВ НЕК293 размораживают при $37 \pm 2^\circ \text{C}$. Клетки переносят в пробирку на 15 мл, содержащую 9 мл холодной среды для выращивания (среда DMEM с 5% ФБС). Флакон ополаскивают 1 мл среды для выращивания. Суспензию центрифугируют при 4°C в течение 5 минут при 300 g, супернатант отбрасывают и клетки суспендируют в 10 мл предварительно подогретой среды для выращивания. Определяют плотность клеток, и суспензию клеток переносят в колбу T75 см², содержащую 10,5 мл среды для выращивания, чтобы получить конечный объем 20 мл. Колбу T75 см² переносят в инкубатор при $37 \pm 1^\circ \text{C}$ при влажности 4-6% в атмосфере CO₂. Через 24 ± 4 часа после оттаивания среду для выращивания заменяют 20 мл предварительно подогретой средой для выращивания.

[0200] В некоторых вариантах осуществления стадий оттаивания клеток НЕК293 и посева в 1 колбу T75 клетки переносят в пробирку на 15 мл, содержащую 9 мл холодной среды для выращивания. В некоторых вариантах осуществления среда для выращивания содержит глицин, L-аргинин гидрохлорид, L-цистин дигидрохлорид, L-глутамин, L-гистидин гидрохлорид-H₂O, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизина гидрохлорид, L-метионин, L-фенилаланин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, дегидрат дианатриевой соли L-тирозина, L-валин, холин хлорид, D-пантотенат кальция, фолиевую кислоту, ниацинамид, пиридоксин гидрохлорид, рибофлавин, тиамин гидрохлорид, i-инозитол, хлорид кальция (CaCl₂) (ангид.), нитрат железа (Fe(NO₃)₃·9H₂O), сульфат магния (MgSO₄) (ангид.), хлористый калий (KCl), бикарбонат натрия (NaHCO₃), хлорид натрия (NaCl), одноосновный фосфат натрия (NaH₂PO₄·H₂O) и D-глюкозу (декстрозу). В некоторых вариантах осуществления среда

для выращивания содержит или состоит из бессывороточной среды. В некоторых вариантах осуществления среда для выращивания содержит или состоит из осветленной среды.

[0201] Стадия 2. Размножение клеток, используемых для производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта. Температуру, продолжительность и объем, указанные ниже, можно отрегулировать для достижения оптимальных результатов в зависимости от используемого типа клеток. Для иллюстративного варианта осуществления, описанного ниже, условия были оптимизированы для использования клеток НЕК293.

[0202] Размножение 1-й колбы T75 до 1 x T175CB или 3 колб T75: Среда отбрасывают, а клетки промывают предварительно нагретым ФБС. Клетки разрыхляют с помощью реагента диссоциации клеток TrypLE. Т-колбы или Cell Stack инкубируют от 5 до 10 минут в инкубаторе при $37 \pm 1^\circ \text{C}$, и клетки полностью удаляют, осторожно постукивая по емкости. Среда для выращивания добавляется для ингибирования TrypLE. Объемы среды для выращивания, ФБС и TrypLE, использованные для различных носителей, представлены в Таблице 14. Затем все клеточные суспензии объединяют.

[0203] Таблица 14: Объем среды и растворов

Носители	Поверхность	ФБС	TrypLE	Ингибирование (Среда для выращивания)	Рабочий объем культуры
T75	75 см ²	5 мл	2 мл	6 мл	20 мл
T175CB	175 см ²	10 мл	4 мл	12 мл	50 мл
CS2 CB	1260 см ²	100 мл	40 мл	120 мл	400 мл
CS10 CB	6320 см ²	400 мл	140 мл	420 мл	2 л

[0204] Определяют количество клеток и жизнеспособность клеток, клетки высевают, инкубируют и пассируют в соответствии с Таблицей 15.

[0205] Таблица 15: Параметры процесса для пассажей

Пассаж		Плотность посева/соотношение	Время инкубации
P1	1T75 → xT175CB Или 1T75 → 3T75	20000 клеток/см ²	5 дней
P2	xT1T75 → 4T175CB Или 3T75 → 4T175CB	20000 клеток/см ²	4 дней
P3	4T175CB → 8T175CB	20000 клеток/см ²	4 дней
P4	6T175CB → 3CS2CB	Соотношение 1/4	3 дней
P5	2CS2CB → 3CS10CB	Соотношение 1/8	4 дней
P6	2CS10CB → 8CS10CB	Соотношение 1/4	3 дней
P7	8CS10CB → 24CS10CB	20000 клеток/см ²	3 дней

[0206] Внутрипроизводственный контроль (IPC): количество клеток и их жизнеспособность

[0207] Стадия 3: Размножение 1 T175CB до 4 T175CB или 3 колб T75 до 4 T175CB: см. стадию 2.

[0208] IPC: количество клеток и их жизнеспособность.

[0209] Стадия 4: Размножение 4 T175CB до 8 T175CB: см. стадию 2.

[0210] IPC: количество клеток и их жизнеспособность.

[0211] Стадия 5: Размножение 6 T175CB до 3 CS2CB: см. стадию 2.

[0212] IPC: количество клеток и их жизнеспособность.

[0213] Стадия 6: Размножение 2 CS2CB до 3 CS10CB: см. стадию 2.

[0214] IPC: количество клеток и их жизнеспособность.

[0215] Стадия 7: Размножение 2 CS10CB до 8 CS10CB: см. стадию 2.

[0216] IPC: количество клеток и их жизнеспособность.

[0217] Стадия 8: Размножение 8 CS10CB до 24 CS10CB. См. стадию 2.

[0218] IPC: количество клеток и их жизнеспособность

Трансфекция плазмидной ДНК

[0219] Стадия 9. Трансфекцию клеток, используемых для производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта. Температуру, продолжительность, скорость вращения и объем, указанные ниже, можно отрегулировать для достижения оптимальных результатов в зависимости от используемого типа клеток. Для иллюстративного варианта осуществления, описанного ниже, условия были оптимизированы для использования клеток НЕК293.

[0220] Клетки НЕК293 трансфецируют тремя плазмидами с использованием полиэтиленимина (PEI).

[0221] Три плазмиды (pAAV.конструкт-Kan, pHELP-Kan и pNLRep-Cap2-Kan) добавляют последовательно в определенном соотношении.

[0222] **Таблица 16:** Условия трансфекции

Условия трансдукции	
Рабочий объем	2125 мл/CS10 CB
ДНК + среда для выращивания (раствор 1)	40 мл/CS10 CB
Общее количество ДНК	1,02 мг/CS10 CB
Соотношение ДНК	pAAV.конструкт-Kan 1 pHELP-Kan 2 pNLRep-Cap2-Kan 1.5
PEI + среда для выращивания (раствор 2)	40 мл/CS10 CB
PEI: Соотношение ДНК	2:1

[0223] Плазмиды и PEI готовят на среде для выращивания.

[0224] Требуемое количество плазмидной ДНК представлено в Таблице 17.

[0225] **Таблица 17:** Количество плазмидной ДНК

Плазмида	Соотношение	Количество (мг) для 1СВ10 СВ	Общее количество (мг) для 24СВ10 СВ
pAAV.конструкт-Кап	1	0,427 мг	10,248 мг
pHELP-Кап	2	0,854 мг	20,496 мг
pNLRep-Сар-Кап	1,5	0,640 мг	15,360 мг

[0226] Требуемое количество смеси PEI переносят в смесь ДНК для образования комплекса PEI-ДНК, встряхивают в течение 10 секунд и инкубируют при комнатной температуре. Комплекс PEI-ДНК переносят в среду для выращивания объемом 8,2 л. Смесь среды для выращивания и комплекса PEI-ДНК гомогенизируют, бутылку с комплексом PEI-ДНК ополаскивают и смесь среды для выращивания и комплекса PEI-ДНК снова гомогенизируют. Среду сливают из СВ10СВ и 2 л смеси среды для выращивания с комплексом PEI-ДНК переносят в СВ10СВ. трансфецированный СВ10СВ переносят в инкубатор, установленный на $37 \pm 1^\circ \text{C}$ при влажности 4-6% в атмосфере CO_2 .

[0227] Смесь для трансфекции оставляют на клетках на 24 ± 1 час, а затем среду заменяют на DMEM GlutaMax.

[0228] ИРС: количество клеток и их жизнеспособность.

[0229] Стадия 10. Сбор клеток, используемых для производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта. Температуру, продолжительность, скорость вращения и объем, указанные ниже, можно отрегулировать для достижения оптимальных результатов в зависимости от используемого типа клеток. Для иллюстративного варианта осуществления, описанного ниже, условия были оптимизированы для использования клеток HEK293.

[0230] Сбор производят через 60 ± 13 часов после трансфекции.

[0231] Сбор продукта осуществляется на следующих стадиях:

- Первая половина среды переносится в мешок для сбора.
- СВ10СВ встряхивают, а оставшуюся среду и клетки собирают.
- 200 мл HBSS-EDTA переносят в СВ10СВ и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут.
- По окончании инкубационного периода буфер сливается в мешок для сбора.

[0232] Этот процесс сбора повторяется для всех емкостей.

[0233] После сбора, добавляют 1М MgCl₂ до конечной концентрации 5 мМ и добавляют бенсоназу до конечной концентрации 90 Ед/мл.

[0234] IPC: Придаточные вирусы, бионагрузка, микоплазма, физический титр.

[0235] Стадия 11: Лизис микрофлюидизацией.

[0236] Устройством для разрушения PANDA уравнивается минимум 3 л буфера 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl при pH 8. Мешок, содержащий сбор, обработанный бенсоназой, соединяют со сбором лизиса. Продукт загружается в систему PANDA под давлением 80 ± 10 бар и собирается в новый мешок. После загрузки продукта систему промывают 2 раза по 200 мл буфера 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl при pH 8. Оба промывания объединяют с лизированным продуктом.

[0237] IPC: физический титр

[0238] Стадия 12: Инкубация с бенсоназой:

[0239] Микрофлюидизированные клетки инкубируют в течение ночи при комнатной температуре в течение максимальной продолжительности, составляющей 18 часов, для активности бенсоназной эндонуклеазы.

[0240] Стадия 13: Замораживание/оттаивание:

[0241] Заключительный этап лизиса представляет собой замораживание при температуре от -15 до -25° С с последующим оттаиванием в течение ночи при комнатной температуре для ускорения агрегации клеточного дебриса и облегчения стадии осветления.

Очистка

[0242] Стадия 14: Осветление микрофлюидизированного лизата.

[0243] В процессе фильтрации используется предварительный фильтр (Sartopure GF 0,65 мкм 0,4 м²), за которым следует фильтр для уменьшения бионагрузки (Sartopore 2, 0,2 мкм, 0,2 м²) и буфер для промывки 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl при pH 8.

[0244] IPC: Picogreen, физический титр

[0245] Стадия 15: Крупномасштабное концентрирование TFF и диафильтрация.

[0246] В этом процессе достигается уменьшение объема и начальная очистка с использованием принципа тангенциальной поточной фильтрации (TFF). Уменьшение объема может достигать 100 раз. Раствор соли и ПАВ (SSS, 4,14 М NaCl + неионогенное ПАВ) добавляют к осветленному лизату в количестве 1/10 веса лизата. Очистка достигается диафильтрацией (100 кДа) концентрата с 20 мМ Трис pH 8,0, 1

мМ MgCl₂, 500 мМ NaCl, 0,1% неионогенного ПАВ для «вымывания» примесей с меньшей молекулярной массой из образца. Эта часть необходима для достижения высоких уровней концентрации без осаждения частиц белок/AAV.

[0247] ИРС: физический титр, общее количество частиц (ИФА), соотношение полных/пустых частиц.

[0248] Стадия 16: Очистка йодиксанолом.

[0249] Этот процесс разработан для очистки гAAV с использованием четырехслойного прерывистого градиента йодиксанола (15%, 25%, 40%, 57%). Эта стадия ортогональной очистки значительно обогащает препарат ДНК, содержащей частицы гAAV, при этом удаляется основная масса частиц гAAV, которые лишены ДНК (пустые частицы), на основании разницы плавучей плотности этих частиц в среде градиента йодиксанола после ультрацентрифугирования. Плотность ДНК, содержащей гAAV, приводит к миграции гAAV в слой 40% йодиксанола, в то время как большинство загрязняющих клеточных белков мигрируют к границе раздела 25%/40%. Агрегация гAAV с белками и ДНК может изменять плавучую плотность частиц, поэтому включение 1М NaCl в 15% йодиксанольный слой сводит к минимуму эту агрегацию.

[0250] Разделение достигается прерывистым градиентом йодиксанола (57% раствор Optiprep), который подвергается воздействию высоких сил перегрузки в ультрацентрифуге. Фракция 40% собирается до достижения полосы примесей (~ 3 мл).

[0251] Собранные фракции объединяют и хранят при +2/+8° С до последующих стадий очистки.

[0252] Стадия 17: Разведение:

[0253] Фракцию, полученную в конце стадии очистки, разбавляют в 20 раз буфером 10 мМ Трис с рН 9,0 для очистки партии GMP G214/REP1/FC001 с помощью анионообменной хроматографии. Для очистки по аффинности AVB объединенную фракцию в конце стадии очистки (градиент плотности) разбавляют в 6 раз в буфере 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂ и 200 мМ NaCl с рН 8.

[0254] ИРС: физический титр, общее количество частиц (ИФА), соотношение полных/пустых частиц, Picogreen

[0255] Стадия 18: анионообменная хроматография.

[0256] Анионообменная хроматография выполняется при комнатной температуре с использованием среды Unosphere Q (UnoQ) (BioRad), заполненной при скорости потока 14 мл/мин 10 мМ Трис, 200 мМ NaCl с рН 9, в колонке Vantage VL 11 x 250

(заполненный объем ~ 9,5 мл). Колонку кондиционируют сначала с помощью буфера 10 мМ Трис, 1 М NaCl с pH 9, а затем с помощью буфера 10 мМ Трис с pH 9 для получения pH, равного $pH\ 9,0 \pm 0,2$, и проводимости, равной проводимости Трис 10 мМ с $pH\ 9,0 \pm 10\%$.

[0257] Разбавленный продукт фильтруют через фильтр Sartoscale 0,2 мкм 17 см².

[0258] Его загружают в колонку, и колонку промывают уравнивающим буфером. После второй промывки буфером 10 мМ Трис, 45 мМ NaCl с pH 9, продукт элюируют минимум 30 колоночными объемами буфера 10 мМ Трис, 650 мМ NaCl с pH 9.

[0259] Элюированный продукт хранят при + 2/+ 8° С до следующей стадии.

[0260] ИРС: Picogreen, физический титр

[0261] Стадия 18 с помощью аффинной хроматографии на AVB-сефарозе.

[0262] Аффинную хроматографию проводят при комнатной температуре с использованием AVB-сефарозы HP (GE Healthcare), упакованной в колонку Vantage-L VL22x250 (высота слоя 8 ± 1 см), заполненной и промытой буфером 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl, pH 8, а затем продезинфицированной 0,17М H₃PO₄, 1М NaCl в течение 30 минут. После дезинфекции колонку уравнивают буфером 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl с pH 8 перед загрузкой продукта (объединенные фракции со стадии 16), разбавленного 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl с pH 8.

Разбавленный продукт фильтруют через фильтр Sartoscale 0,2 мкм 17 см² перед загрузкой на колонку. После загрузки колонку промывают приблизительно 35 колоночными объемами буфера 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl с pH 8, а затем элюируют приблизительно 20 колоночными объемами буфера 10,8 мМ Na₂HPO₄, 44,6 мМ лимонной кислоты, 400 мМ NaCl с pH 2,6. Сразу после элюирования элюат нейтрализуют приблизительно 4 колоночными объемами буфера 1 М Трис pH8.

[0263] Элюированный продукт хранят при + 2/+ 8° С до следующей стадии.

[0264] ИРС: Picogreen, физический титр

[0265] Стадия 19: диализ и конечный состав.

[0266] В этом процессе используется диализ для превращения продукта AAV в желаемый буфер для конечного состава (20 мМ Трис, pH 8, 1 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl, необязательно с полоксамером в концентрации 0,001%).

[0267] Тангенциальную поточную фильтрацию продукта элюирования проводят с использованием картриджа из полых волокон с отсечкой по молекулярной массе 100 кДа (Spectrum). Картридж и систему уравнивают буфером 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl с pH 8 для получения $pH\ 8,0 \pm 0,2$ в пермеате.

[0268] Продукт концентрируют до минимального объема перед диафильтрацией в непрерывном режиме против минимум 6 объемов буфера для состава. Концентрат собирается. Система промывается буфером для состава. Этот промывание собирается в другую емкость.

[0269] ИРС: физический титр.

[0270] Стадия 20: Субмикронная фильтрация очищенного нерасфасованного лекарственного вещества.

[0271] Если требуется более длительное хранение (> 60 дней), продукт подвергается субмикронной фильтрации с использованием фильтра 0,2 мкм. После того, как лекарственное вещество полностью отфильтровано, фильтр промывают буфером для конечного состава.

[0272] После отбора проб для контроля качества очищенное нерасфасованное лекарственное вещество хранят при температуре <-60° С.

Способ изготовления лекарственного продукта из лекарственного вещества

[0273] В настоящем описании представлены несколько примерных процессов/способов получения лекарственного продукта из лекарственного вещества (в качестве исходного материала). Двумя из этих иллюстративных способов являются Процесс 1 (исходный процесс) и Процесс 2 (усовершенствованный процесс). Как описано в данном документе, Процесс 2 включает изменения и/или усовершенствования, внесенные в Процесс 1.

[0274] Как в Процессе 1, так и в Процессе 2 лекарственное вещество оттаивают, разбавляют, стерильно фильтруют и заполняют в контейнеры первичной упаковки. Однако усовершенствованный процесс (Процесс 2) внес следующие изменения в исходную процедуру (внутрипроизводственный контроль остался без изменений):

- Изменение температуры оттаивания от комнатной до $+35 \pm 2^\circ \text{C}$
- Замена первичной упаковки полипропиленовых криопробирок объемом 0,5 мл на стеклянные флаконы типа I объемом 3 мл и пробки из бромбутилкаучука
- Изменение размера содержащего одного флакона с 0,1 мл/флакон до 0,3 мл/флакон

[0275] Композиции по настоящему описанию могут поставляться в виде жидкостей. В некоторых вариантах осуществления композиций по настоящему описанию, включая те, в которых композиция содержит лекарственный продукт, лекарственный продукт поставляется в стерильных стеклянных флаконах. В некоторых вариантах осуществления стерильные стеклянные флаконы представляют собой стерильные прозрачные стеклянные флаконы. В некоторых вариантах осуществления стерильные

стеклянные флаконы закрываются пробками. В некоторых вариантах осуществления пробки пластиковые. В некоторых вариантах осуществления стерильные стеклянные флаконы закрывают крышками и дополнительно закрывают колпачками.

Оптимизация производственного процесса

[0276] После анализа исходного производственного процесса (Процесс 1) возможности для улучшения качества будущего клинического и коммерческого продукта и/или для создания более надежного процесса были определены и реализованы как Процесс 2. Предпринимаемые действия по разработке процесса делятся на две категории: (1) Изменения в процессе; (2) Оптимизация процесса. Краткое изложение стратегии развития процесса и ее обоснование представлено в Таблице 18, и каждая категория обсуждается более подробно ниже.

[0277] Таблица 18: Краткое описание изменений в Процессе 1

Предмет	Намеченное изменение	Обоснование
<i>Изменения в процессе</i>		
Главный банк клеток НЕК293	Источник клеток, из которых получают МСВ	Улучшенная отслеживаемость клеток для повышения уверенности в качестве и безопасности продукции
Плазмидные векторы	Замена гена устойчивости к ампициллину геном устойчивости к канамицину	Устранение теоретического риска передачи гена устойчивости к ампициллину/ампициллину пациентам
Аффинная хроматография на гепарине	Замена матрицы животного происхождения матрицей неживотного происхождения	Снижение рисков биобезопасности, связанных с материалами животного происхождения
Контейнер для конечного продукта и крышку контейнера	Замена стеклянных флаконов с завинчивающимися крышками из полипропилена на стеклянные флаконы с пробками	Улучшенная целостность конечного лекарственного вещества
Масштабирование стадий подготовительного процесса	Увеличение масштаба фазы культивирования клеток	Увеличение выхода конечного продукта
Трансфекция клеток НЕК293	Переход с фосфата кальция на PEI	Повышенная надежность, устранение необходимости в хлорохине (реагент эндосомного высвобождения)
<i>Оптимизация процесса</i>		
Размножение и культивирование клеток НЕК293	Оптимизация плотности посева и производительности клеточной культуры.	Улучшенный контроль и воспроизводимость процесса для обеспечения согласованности и надежности процесса
Тройная трансфекция плазмидами и сбор	Исследования по разработке для оптимизации трансдукции	
Микрофлюидизация для разрушения клеток	Оптимизация условий работы с оборудованием (усовершенствованный процесс)	
Ультрацентрифугирование в градиенте плотности	Повышение надежности стадии процесса очистки	

Предмет	Намеченное изменение	Обоснование
Ультрафильтрация/диафильтрация	Оптимизация стадий замены буфера	Обеспечение согласованности и надежности процесса, а также пригодности материалов, контактирующих с продуктом

МСВ = Главный банк клеток

[0278] Таким образом, для создания Процесса 2 были внесены изменения в источник клеток, из которых получают МСВ, ген выбора антибиотика из трех плазмид, масштаб стадии подготовительного процесса, реагент трансдукции, стадию аффинной хроматографии и контейнер и крышку для конечного продукта.

[0279] Главный банк клеток НЕК293

[0280] *Процесс 1:* МСВ, использованный для производства первой клинической партии, был получен из клеток, оптимизированных для производства AAV2.

Существует ограниченная отслеживаемость истории этой клеточной линии как с точки зрения того, как клетки были оптимизированы, так и с точки зрения воздействия материалов животного происхождения.

[0281] *Изменение в Процессе 1:* Исходный флакон с клетками НЕК293, депонированными в АТСС (предшественник банка клеток, которые использовали в Процессе 1), использовали для начала производства нового МСВ GMP. Этот МСВ, в настоящее время охарактеризованный и испытанный, используется для поддержки производства клинических векторов AAV и может использоваться для коммерческого производства. Полная отслеживаемость количества пассажей клеток, используемых материалов, применяемых методов и проведенных исследований характеристик банков клеток обеспечивает повышенную уверенность в качестве, отслеживаемости и безопасности продукта. Рабочий банк клеток впоследствии был создан из одного флакона МСВ GMP в условиях надлежащей производственной практики (GMP) для получения WCB GMP. Этот WCB, в настоящее время охарактеризованный и испытанный, может быть использован для коммерческого производства. Полная отслеживаемость количества пассажей клеток, используемых материалов, применяемых методов и проведенных исследований характеристик банков клеток обеспечивает повышенную уверенность в качестве, отслеживаемости и безопасности продукта.

[0282] Клетки НЕК293, полученные из АТСС, оценивали на сопоставимость в соответствии с определенным протоколом, в соответствии с которым продуцирование

вектора, оцениваемое по титру генома, напрямую сравнивали с таковым исходными клетками Stratagene. Титр вектора оценивали в трех повторностях и одновременно у клеток с сопоставимыми количеством пассажей, включая как низкое, так и высокое количество пассажей. Клетки также оценивали на кинетику роста и жизнеспособность. Кроме того, клетки обрабатывали вектором экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) для оценки эффективности трансдукции.

[0283] Клетки, полученные из АТСС, также оценивали как часть полномасштабного не GMP технологического прогона в сочетании с изменениями плазмид (см. ниже) в соответствии с тем же протоколом производства партии, что и исходная клиническая партия. Эта партия была испытана на всю панель тестов внутрипроизводственного контроля, собранный материал, тесты на лекарственные вещества и лекарственные продукты (за исключением тестов на бионагрузку, эндотоксин, стерильность и побочные агенты) и сравнена с теми же результатами тестов, которые были ранее получены для клинической партии (исходный процесс).

[0284] После того, как была установлена приемлемость клеток АТСС НЕК293, был подготовлен МСВ GMP и полностью протестирован на наличие посторонних агентов, идентичность, чистоту и безопасность. МСВ GMP был разрешен QA для последующего производства GMP.

[0285] Плазмидные векторы

[0286] *Процесс 1:* Три плазмидных конструкта, используемые для получения вектора AAV2-конструкта, содержащих ген, кодирующий устойчивость к ампициллину, использовали для отбора во время получения плазмиды. Хотя ампициллин, β -лактамы антибиотик, не используется в процессе производства вектора AAV2-конструкта, удаление AmpR является предпочтительным для избежания возможности переноса остаточного ампициллина из процесса производства плазмиды в процесса производства AAV2-конструкта, а также исключения возможности присутствия гена, кодирующего устойчивость к ампициллину, в конечном упакованном продукте.

[0287] *Изменение в процессе 1:* Каждую плазмиду модифицировали для замены гена устойчивости к ампициллину геном, кодирующим устойчивость к канамицину. Остальная часть плазмидного каркаса не изменилась. Во время производства плазмиды ампициллин, используемый для отбора плазмид, может быть перенесен в процесс производства AAV2-конструкта и представляет потенциальный риск для пациентов с чувствительностью к β -лактамам антибиотикам. Кроме того, присутствие гена устойчивости к ампициллину из плазмидного материала могло бы

привести к упаковыванию в конечный векторный продукт и теоретически придать или передать реципиентам устойчивость к антибиотикам. Хотя вероятность любого из этих рисков считается низкой, следует понимать, что там, где это возможно, следует избегать использования β -лактамных антибиотиков. Таким образом, профиль безопасности продукта был улучшен за счет замены AmpR на KanR.

[0288] Новые плазмиды были полностью секвенированы, и это секвенирование подтвердило, что изменился только ген устойчивости.

[0289] Исследование сопоставимости для оценки получения AAV2-конструкта с использованием новых плазмид было проведено в соответствии с определенным протоколом. Плазмиды AmpR (старая) и KanR (новая) использовали для одновременной трансфекции клеток HEK293 и сравнения продуцирования вектора путем оценки титра генома. Было проведено тестирование в трех повторностях и дано сравнение титров вектора.

[0290] После демонстрации приемлемого титра модифицированные плазмиды также оценивались как часть полномасштабного производственного цикла не GMP в сочетании с клеточными изменениями (подробно описанными выше) в соответствии с тем же протоколом производства партии, что и исходная клиническая партия. Партия была испытана на всю панель тестов собранного материала, тесты на лекарственные вещества и лекарственные продукты (за исключением тестов на бионагрузку, эндотоксин, стерильность и побочные агенты) и сравнена с теми же результатами тестов, полученными для клинической партии (исходный процесс). После того, как данные этого технологического прогона были получены и признаны приемлемыми, было осуществлено производство плазмиды, подходящей для использования в производстве продуктов GMP.

[0291] Гепариновая хроматография

[0292] *Процесс 1:* Колонку для аффинной хроматографии использовали для селективной очистки AAV2-конструкта. Матрица животного происхождения, используемая в колонке (например, гепарин), может поставляться в виде материала GMP, подходящего для использования в производстве терапевтических продуктов для человека. Хотя источник, производство и поставка матрицы животного происхождения аккредитованы с точки зрения GMP и использования человеком, риск вирусной безопасности при использовании любого сырья животного происхождения остается.

[0293] *Изменение в процессе 1:* Альтернативные хроматографические матрицы неживотного происхождения были исследованы в качестве замены текущей аффинной колонки, заполненной матрицей животного происхождения (например, гепарином). Смолу для ионообменной хроматографии первоначально использовали для замены матрицы животного происхождения для первой партии GMP в соответствии с усовершенствованным процессом, а затем ввели смолу для аффинной хроматографии неживотного происхождения. Это изменение было внесено для снижения рисков биобезопасности, связанных с сырьем животного происхождения.

[0294] Были оценены различные хроматографические матрицы, и их пригодность была основана на профиле чистота/примеси, титре и активности конечного продукта.

[0295] Контейнер для конечного продукта и крышку контейнера

[0296] *Исходный процесс:* Лекарственным продуктом заполняли 0,5 мл стерильные полипропиленовые флаконы с завинчивающейся крышкой и герметичными пробками в объеме 0,1 мл на флакон.

[0297] *Изменение в процессе 1:* Заполнение 0,3 мл лекарственного продукта флаконов для инъекций из боросиликатного стекла типа 1 с бромбутиловой пробкой и гофрированной (с контролем вскрытия) крышкой для герметизации флакона. Это изменение было реализовано для достижения улучшенной целостности конечного лекарственного продукта, улучшения герметичности во время использования, улучшения фармацевтической приемлемости материалов, контактирующих с первичной упаковкой продукта, простоты визуального осмотра и безопасности (безопасность обеспечивается за счет защиты от вскрытия).

[0298] Оценку совместимости лекарственного продукта в стеклянных флаконах проводили путем восстановления продукта и стабильности продукта.

[0299] *Масштабирование стадий подготовительного процесса*

[0300] *Процесс 1:* Размножение и масштабирование одного флакона с МСВ НЕК293 посредством серийного пассирования до 12 десятислойных Cell Stacks.

[0301] *Изменение в процессе 1:* Размножение и масштабирование одного флакона с МСВ НЕК293 посредством серийного пассирования до 24 десятислойных Cell Stacks. Это изменение было реализовано для увеличения масштабов подготовительного процесса, чтобы обеспечить дополнительный материал для тестирования и контроля в процессе производства, а также увеличить объем лекарственного вещества для тестирования и завершения заполнения. Кроме того, это изменение было внесено для повышения доступности лекарственных продуктов.

[0302] Анализ жизнеспособности клеток, скорости роста и выхода клеток оценивали для определения оптимальной и стабильной производительности.

[0303] *Оптимизация процесса*

[0304] Ряд стадий исходного производственного процесса остался неизменным с точки зрения физико-химического определения; тем не менее, они были дополнительно оценены с целью улучшения понимания и описания процесса, а также для обеспечения оптимальной производительности процесса с точки зрения его согласованности и надежности.

[0305] *Размножение и культивирование клеток НЕК293*

[0306] *Процесс 1:* Размножение и масштабирование одного флакона с МСВ НЕК293 посредством серийного пассирования до 12 десятислойных Cell factory.

[0307] *Оптимизация процесса:* Одновременно с изменением масштаба культуры клеток с 12 CS10 на 24 CS10 были проведены исследования по оптимизации плотности посева и оценке кинетики роста для оптимальной производительности культуры клеток. Операционные (не связанные с процессом) изменения были оптимизированы для улучшения контроля и воспроизводимости стадий процесса, чтобы обеспечить согласованность и надежность процесса. В частности, этот аспект процесса был оптимизирован для увеличения с 12 CS10 до 24 CS10 для повышения выхода.

[0308] Анализ жизнеспособности клеток, скорости роста и выхода клеток был проведен для определения оптимальной и стабильной производительности.

[0309] *Тройная трансфекция плазмидами и сбор*

[0310] *Процесс 1:* Трансфекцию клеток НЕК293 тремя плазмидами выполняли путем преципитации ДНК фосфатом кальция после предварительной обработки клеток хлорохином.

[0311] *Оптимизация процесса:* Оптимизировать трансфекцию, включая условия посева клеток, сравнение фосфата кальция и полиэтиленимина. Оптимизировать концентрацию/соотношение плазмид. Определить оптимальный день после трансфекции для замены среды и сбора. Операционные (не связанные с процессом) изменения были оптимизированы для улучшения контроля и воспроизводимости стадий процесса, чтобы обеспечить согласованность и надежность процесса. Хлорохин был исключен из процесса для повышения безопасности.

[0312] Дальнейшие оптимизации были выполнены в небольшом масштабе, включая плотность посева клеток, среду для роста клеток, концентрацию ФБС и соотношение ДНК:PEI. После того, как был установлен оптимизированный процесс трансфекции,

процесс выполняли в полном объеме с использованием PEI и сравнивали с тем же процессом с использованием фосфата кальция, чтобы продемонстрировать сопоставимость.

[0313] Микрофлюидизация для разрушения клеток

[0314] Процесс 1: В этом процессе используется механический лизис клеток для высвобождения внутриклеточного вируса с помощью микрофлюидизатора.

[0315] Оптимизация процесса: Никаких изменений на этой стадии процесса не производилось. Исследования по разработке были направлены на оптимизацию и определение условий работы с использованием санитарного микрофлюидизатора, подходящего для производства и герметизации по GMP. Операционные (не связанные с процессом) изменения были внедрены для улучшения контроля и воспроизводимости стадий процесса, а также для улучшения понимания и описания процесса для обеспечения согласованности и надежности процесса. Была определена последовательность тестов внутрипроизводственного контроля для чистоты продукта и титра вектора.

[0316] Ультрацентрифугирование в градиенте плотности

[0317] Процесс 1: Очистка в градиенте плотности для уменьшения количества примесей в процессе.

[0318] Оптимизация процесса: Поскольку текущий метод градиентной очистки является ручным, не исключено, что он может способствовать изменчивости процесса. Хотя принципы метода очистки остаются неизменными, были оценены возможности сделать эту стадию процесса более надежной и полуавтоматической. Операционные (не связанные с процессом) изменения были внедрены для улучшения контроля и воспроизводимости стадий процесса, а также для улучшения понимания и описания процесса для обеспечения согласованности и надежности процесса. Была определена последовательность тестов для чистоты продукта и титра вектора.

[0319] Ультрафильтрация (УФ)/диафильтрация (ДФ)

[0320] Процесс 1: Замена буфера через УФ/ДФ и диализ.

[0321] Оптимизация процесса: Каждая стадия процесса, включающая замену буфера через УФ/ДФ и диализ, была оптимизирована для определения критических параметров процесса, а также обеспечения приемлемости контактных материалов для качества продукта. Это изменение было реализовано для обеспечения согласованности и надежности процесса, улучшения понимания и описания процесса, а также для

обеспечения пригодности материалов, контактирующих с продуктом. Оценивали выход вируса и профиль примесей.

Переключение закодированной в плазмиде устойчивости к антибиотикам

[0322] Клинический вектор AAV2-конструкта, экспрессирующий терапевтический конструкт, получают с помощью платформы временной трансдукции с использованием трех плазмид; плазмиды вектора, содержащей терапевтический конструкт/трансген и промотор с последовательности инвертированного концевой повтора, вспомогательной плазмиды AAV, которая содержит последовательности AAV2-Rep и Cap, и, наконец, вспомогательной плазмиды, которая кодирует основные гены аденовируса E2A, E4 и VA. Все три плазмиды, использованные для получения клинического вектора AAV2-конструкта, полученного в соответствии с исходным способом, содержали селективный маркер ампициллина (Amp). Чтобы избежать опасений по поводу чувствительности пациента к остаточному ампициллину и теоретического переноса гена Amp^R в конечный вектор, плазмиды были модернизированы для замены последовательности селективного маркера Amp на последовательность устойчивости к канамицину (Kan). Было выполнено полное секвенирование, чтобы подтвердить, что остальная часть плазмидного каркаса остается одинаковой для всех трех плазмид. Эти плазмиды оценивали на предмет их эффективности при продуцировании гAAV в небольшом масштабе *in vitro*, чтобы установить их пригодность для использования в производстве cGMP. Этот экспериментальный анализ плазмид проводился путем прямого сравнения выхода с контролем, состоящим из плазмид, ранее использовавшихся для получения клинического вектора AAV2-конструкта, и описан ниже. После определения пригодности плазмиды в небольшом масштабе *in vitro* плазмиды Kan^R оценивали в полномасштабном процессе не GMP.

Изменение клеточной линии главного банка клеток

[0323] Для производства клинического вектора AAV2-конструкта по исходному процессу использовалась клеточная линия HEK293, которая была получена, протестирована и помещена в банк GMP (исходный процесс 1) из клеточной линии HEK293, коммерчески доступной через Stratagene. Этот банк клеток был полностью протестирован и охарактеризован, но полной документированной истории банка клеток не было. Чтобы обеспечить полную отслеживаемость клеток HEK293, новые клетки были получены от ATCC, оценены на предмет сопоставимости с исходными клетками процесса 1 и использованы для производства MCB GMP. Три клеточные

линии (две клеточные линии НЕК293 и одна клеточная линия 293Т) были подвергнуты скринингу путем прямого сравнения следующих параметров для определения оптимальной клеточной линии для производства вектора AAV2-конструкта: 1) Общей эффективности трансдукции посредством средней интенсивности флуоресценции GFP и процента GFP с использованием плазмиды eGFP на основе AAV, 2) Удельной эффективности трансдукции для продукта AAV2-конструкта, оценивая выход AAV2-конструкта с помощью анализа DRP (Устойчивые к ДНКазе частицы), 3) Кинетики роста по количеству клеток и проценту жизнеспособных клеток, и 4) Дальнейших пассажей и повторного теста на выход и эффективность трансдукции для сравнения эффективности трансдукции с клетками более позднего пассажа.

Повышенная надежность хроматографической очистки AAV2

[0324] Стадия с аффинной колонкой животного происхождения (например, гепарин) в исходном производственном процессе Фазы 1/2 была заменена ионообменной колонкой неживотного происхождения (AEX), UnoQ, чтобы решить потенциальные проблемы безопасности (потенциальные случайные контаминанты из матрицы животного происхождения). На Фиг. 2 показана блок-схема процесса, на которой выделены ключевые стадии процесса и заключительная стадия колоночной хроматографии (стадия 18). Перед заключительной стадией очистки UnoQ стадия разведения с низким содержанием соли снижает проводимость и поддерживает эффективное связывание AAV2-конструкта с колонкой. Было продемонстрировано, что допустимый диапазон концентрации соли (проводимости) для успешного выполнения этой стадии очень узкий. Если проводимость была слишком высокой, продукт не связывался с колонкой AEX и терялся в элюате. Если проводимость была слишком низкой, могла произойти агрегация продукта, что привело к потере продукта во время очистки. Это повлияло на выход продукта и концентрацию и, как результат, на положительный результат партии - партия с низким выходом не была бы жизнеспособной с точки зрения материала, необходимого для поддержки клинических исследований. Однако стадия UnoQ не оказала отрицательного влияния на эффективность или безопасность продукта, что продемонстрировано успешным производством доклинической партии AAV2-конструкта и партии GMP с использованием этого усовершенствованного процесса.

[0325] Для решения проблемы узкого диапазона солей, необходимого перед AEX, была проведена оценка альтернативной колонки для аффинной хроматографии неживотного происхождения, AVB-сефарозы от GE Healthcare. После фазы

комплексной разработки для обеспечения сопоставимости продуктов, как описано ниже, аффинная колонка (с матрицей животного происхождения) была заменена на AVB для производства последующих партий GMP.

[0326] AVB-сефароза представляет собой аффинную среду со сродством к аденоассоциированным вирусам, используемую при очистке AAV2 для обеспечения производства высокой чистоты и выхода. Аффинный лиганд представляет собой фрагмент 14 кДа из одноцепочечного антитела, экспрессируемого в дрожжах. Колонка AVB обеспечивает хорошее связывание и элюирование AAV2-конструкта и может быть использована при более высоком содержании соли (проводимости). Таким образом, колонка AVB представляет собой надежную стадию процесса, который сводит к минимуму потери продукта. AVB имеет неживотное происхождение, поэтому его использование не представляет опасности для безопасности от случайных загрязнителей.

Контроль за раскрытием информации о лекарственных веществах

[0327] Типовые лекарственные вещества охарактеризованы тестами, перечисленными в Таблице 19.

[0328] Таблица 19:

Тест	Метод испытания	Критерии приемлемости
<i>Характеристика вектора</i>		
Физический титр	Анализ устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на основе кПЦР	$> 0,7 \times 10^{12}$
Титр инфекционных единиц (ИЕ)	Заражение клеток RC32 с последующим обнаружением AAV2 методом кПЦР	$> 1,24 \times 10^8$ ИЕ/мл
Соотношение DRP:ИЕ– Подсчет	н/д	$< 5645:1$
Общее количество частиц	Коммерческий ИФА на частицы AAV2	$> 0,49 \times 10^{12}$ * частиц/мл
Соотношений пустых и полных частиц	Трансмиссионная электронная микроскопия	$< 55\%$ пустых частиц
<i>Идентичность</i>		
Идентичность вектора (ДНК)	Очистка вирусной ДНК с секвенированием обеих цепей ДНК	Соответствует ожидаемой последовательности за исключением регионов ITR
<i>Чистота и примеси</i>		
Общее количество белка	Количественное определение белка Micro-BCA	> 5 мкг/мл
Чистота	Анализ SDS-PAGE с примесями, оцененными с помощью анализа интенсивности	Чистота $> 90\%$ без единой примеси $> 2\%$. Должны быть явными три бэнда, соответствующие VP1, VP2 и VP3 AAV2.

Репликационно-компетентный AAV	Аамплификация и количественная ПЦР на основе клеток HEK293	<LOD анализа
Белок клетки-хозяина HEK293	Коммерческий набор для ИФА	<80 нг/мл
Общее количество ДНК	Анализ с Picogreen	Отчетный результат
ДНК клетки-хозяина HEK293	анализ кПЦР Метод с resDNASEQ человека (набор Life Technologies)	<2,66 x 10 ⁷ пг/мл
Остаточный BSA	Коммерческий набор для ИФА	<126 нг/мл
Остаточная бензоназа	Коммерческий набор для ИФА	<5 нг/мл
Остаточный AVB	Коммерческий набор для ИФА	Отчетный результат
Тест	Метод испытания	Критерии приемлемости
<i>Безопасность</i>		
Анализ биоагрузки	Мембранная фильтрация	<1 КОЕ/1% PB
Анализ эндотоксина	Количественный кинетико-хромогенный метод.	<5 ЕЭ/мл

н/п: не применимо

[0329] Аналитические процедуры

[0330] Физический титр: Титр генома определяют с помощью количественной ПЦР.

Этот метод позволяет количественно определить количество копий генома. Образцы исходного вектора разбавляют в буфере. Образцы обрабатывают ДНКазой, а вирусные капсиды лизируют протеиназой К для высвобождения геномной ДНК. Затем проводится серия разведений. Повторности каждого образца подвергают кПЦР с использованием набора праймеров/зондов на основе Taqman, специфичного для последовательности СAG. Стандартная кривая строится путем взятия среднего значения для каждой точки в линейном диапазоне серий стандартных разведений плазмиды и построения графика логарифмического числа копий относительно среднего значения С_T для каждой точки. Титр вектора гAAV можно рассчитать по стандартной кривой и выразить как количество устойчивых к ДНКазе частиц (DRP)/мл.

[0331] Титр инфекционных единиц (ИЕ): Этот анализ количественно определяет количество инфекционных частиц AAV. Количественную оценку проводят путем инфицирования клеток RC32 (HeLa, экспрессирующих AAV2 Rep/Cap) серийными разведениями образца вектора и однородными концентрациями аденовируса дикого типа для обеспечения хелперной функции. Через несколько дней после заражения клетки лизируют, разбавляют для уменьшения количества ингибиторов ПЦР и анализируют с помощью кПЦР таким же образом, как описано в анализе физических титров выше, за исключением того, что расщепление ДНКазой и протеиназой К пропускают и проводят только часть кПЦР. Отдельные лунки оценивают как

положительные или отрицательные по амплификации AAV. Оцененные лунки используются для определения TCID₅₀ в ИЕ/мл с использованием метода Карбера.

[0332] Общее количество частиц: В анализе используется метод ИФА (набор ИФА для титрования AAV2). Моноклональные антитела, специфичные к конформационному эпитопу на собранных капсидах AAV2, наносят на микротитровальные стрипы и используют для захвата частиц AAV2 из образца. Захваченные частицы AAV обнаруживаются в два этапа. Сначала с иммунным комплексом связывается биотин-конъюгированное моноклональное антитело к AAV2. На втором этапе конъюгат стрептавидинпероксидазы вступает в реакцию с молекулами биотина. Добавление раствора субстрата приводит к цветной реакции, которая пропорциональна количеству специфически связанных вирусных частиц. Оптическую плотность измеряли фотометрически при 450 нм.

[0333] Соотношений пустых и полных частиц (Трансмиссионная электронная микроскопия): Соотношений пустых и полных частиц AAV2 может быть определено с помощью просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастированием (ПЭМ). Зафиксированные образцы наносят на сетку. Образцы визуализируют с помощью просвечивающего электронного микроскопа, и выполняется подсчет полных (т.е. содержащих ДНК) и пустых капсидных частиц AAV2 на основе их морфологии. Соотношение полных и пустых частиц рассчитывается на основе количества частиц.

[0334] Соотношений пустых и полных частиц (аналитическое ультрацентрифугирование): Соотношений пустых и полных частиц AAV2 может быть определено с помощью аналитического ультрацентрифугирования (AUC). AUC имеет преимущество перед другими методами, так как является неразрушающим, что означает, что образцы могут быть восстановлены после AUC для дополнительного тестирования. Образцы, содержащие пустые и полные частицы AAV2, вносят в жидкую композицию, через которую AAV2 движется во время ультрацентрифугирования. Измерение скорости седиментации одной или более частиц AAV2 предоставляет гидродинамическую информацию о размере и форме частиц AAV. Измерение седиментационного равновесия предоставляет термодинамическую информацию о молярных массах раствора, стехиометрии, константах ассоциации и неидеальности раствора частиц AAV2. Иллюстративные измерения, полученные во время AUC, представляют собой радиальные распределения концентрации или «сканирование». В некоторых вариантах осуществления

сканирование проводится с интервалами в диапазоне от минут (для скоростной седиментации) до часов (для равновесной седиментации). Сканирование способов по настоящему описанию может содержать оптические измерения (например, светопоглощение, интерференцию и/или флуоресценцию). Скорость ультрацентрифугирования может составлять от 10 000 оборотов в минуту (об/мин) до 75 000 об/мин, включая конечные точки. Поскольку полные частицы AAV2 и пустые частицы AAV2 демонстрируют различные измерения с помощью АУС, соотношение пустых и полных частиц в образце можно определить с помощью этого метода.

[0335] Идентификационные данные вектора (ДНК): Этот анализ обеспечивает подтверждение последовательности вирусной ДНК. Анализ выполняется путем расщепления вирусного капсида и очистки вирусной ДНК. ДНК секвенируют как минимум с 2-кратным секвенированием, как в прямом, так и в обратном направлении, где это возможно (некоторые области, например ITR, секвенировать проблематично). Контиг секвенирования ДНК сравнивается с ожидаемыми последовательностями для подтверждения идентичности.

[0336] Общее количество белка: Этот анализ количественно определяет общее количество белка, присутствующего в исследуемом препарате, с использованием набора Micro-BCA. Для устранения матричных эффектов композиции образцы в буфере осаждают ацетоном, а осажденный белок повторно суспендируют в равном объеме воды перед анализом. Определение концентрации белка выполняется путем смешивания исследуемого препарата или разбавленного исследуемого препарата реагентом Micro-BCA, входящим в комплект. То же самое выполняют с использованием разведений стандарта бычьего сывороточного альбумина (BSA). Смеси инкубируют при 60° С и измеряют оптическую плотность при 562 нм. Стандартную кривую получают по стандартной абсорбции и известных концентраций с использованием метода линейной регрессии. Неизвестные образцы количественно оцениваются в соответствии с линейной регрессией.

[0337] Чистота: Этот анализ обеспечивает полуколичественное определение чистоты AAV. На основании результатов ИФА капсидных частиц AAV2 образцы концентрируют с помощью SpeedVac и загружают либо 4×10^{10} , либо 1×10^{11} частиц, а и капсидные белки разделяют на геле SDS-PAGE. Денситометрический анализ гелей, окрашенных SYPRO Orange, позволяет рассчитать приблизительные уровни примесей по отношению к капсидным белкам (Vp1, Vp2 и Vp3).

[0338] Репликационно-компетентный AAV: Исследуемый препарат используется для трансдукции клеток НЕК293 в присутствии или в отсутствие аденовируса дикого типа. Будут проведены три последовательных цикла амплификации клеток, и на каждом этапе амплификации будет извлечена общая геномная ДНК.

[0339] гсAAV2 обнаруживают с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Две последовательности представляют собой изолированную геномную ДНК; одна специфична для гена Rep AAV2, а другая специфична для эндогенного гена клеток НЕК293 (альбумин человека). Определяют относительное количество копий гена Rep на клетку. Положительным контролем является вирус AAV дикого типа серотипа 2, испытанный отдельно или в присутствии препарата вектора гAAV.

[0340] Предел обнаружения в тесте определяется для каждой тестируемой партии. Предел обнаружения составляет 10 гсAAV на 1×10^8 или 1×10^{10} копии генома тестового образца. Если тестовый образец отрицателен для последовательности Rep, результат для этого образца будет представлен как: НЕТ РЕПЛИКАЦИИ, < 10 гсAAV на 1×10^8 (или 1×10^{10}) копии генома тестового образца. Если тестовый образец положителен для последовательности Rep, результат для этого образца будет представлен как: РЕПЛИКАЦИЯ.

[0341] Белок клетки-хозяина НЕК293: Анализ белка клетки-хозяина (НСР) НЕК293 представляет собой иммуноферментный анализ. Образцы очищенного вируса реагируют на микротитровальных стрипах, покрытых аффинно очищенным захватывающим антителом. Вторичный фермент, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), вступает в реакцию одновременно, что приводит к образованию сэндвич-комплекса твердофазное антитело-НСР-меченное ферментом антитело.

Микротитровальные стрипы промывают для удаления любых несвязанных реагентов.

Количество НСР НЕК293 определяется добавлением 3,3',5,5'

тетраметилбензидинпероксидазы, субстрата HRP, в каждую лунку. Количество гидролизованного субстрата считывается на планшет-ридере и является прямо пропорциональным концентрации присутствующих НСР НЕК293.

[0342] Общее количество ДНК: Реагент Пикогрин представляет собой сверхчувствительный флуоресцентный краситель нуклеиновой кислоты, который связывает двухцепочечную ДНК и образует высоколюминесцентный комплекс (λ -возбуждение = 480 нм - λ -излучение = 520 нм). Эта интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству дцДНК в растворе. Используя стандартную кривую ДНК

с известными концентрациями, содержание ДНК в исследуемых образцах получают путем преобразования измеренной флуоресценции.

[0343] ДНК клетки-хозяина HEK293: В исходном процессе измеряли размер и количество 3 разных ампликонов, тогда как в усовершенствованном процессе измеряли общую гкДНК (англ. hemicatenated DNA), включая ДНК с высокой молекулярной массой и ДНК, фрагментированную в результате гидродинамического сдвига. Данные оценки качества усовершенствованного процесса демонстрируют, что анализ является специфическим и достаточно чувствительным, чтобы соответствовать требованиям оценки гкДНК на дозу <10 нг/дозу (Комитет экспертов ВОЗ по биологической стандартизации, 2013 г.).

[0344] Остаточный BSA: Остаточный BSA определяется количественно с использованием имеющегося в продаже набора для ИФА, производимого и продаваемого Bethyl. Научный метод для набора ИФА очень похож на тот, который указан для ИФА белка клетки-хозяина.

[0345] Остаточная бензоаза: В этом анализе используются очищенные поликлональные антитела, специфичные к эндонуклеазе бензоазы, для обнаружения остаточной бензоазы в тестируемом образце с помощью сэндвич-ИФА. Точное измерение достигается путем сравнения сигнала образца со стандартами эндонуклеазы бензоазы, анализируемыми одновременно.

[0346] Анализ бионагрузки: Эта процедура используется для количественного определения (при обнаружении) количества бионагрузки, присутствующей в образце. Используемый метод включает мембранную фильтрацию половины образца на каждой из двух мембран. Мембраны помещают на отдельные чашки с агаровой средой, которые инкубируют в аэробных и анаэробных условиях последовательно при 20-25° С и 30-35° С. По завершении инкубации; количество аэробов, анаэробов и грибов выражается в КОЕ/мл образца.

[0347] Анализ эндотоксина: Этот анализ используется для определения наличия бактериальных эндотоксинов в исследуемом препарате. Количественная процедура проводится кинетико-хромогенным методом. Известные количества эндотоксина тестируются параллельно с исследуемым препаратом для точного определения уровня бактериального эндотоксина. Потенциал вмешательства со стороны исследуемого препарата исследуется путем обработки исследуемого препарата и реагента LAL заданными уровнями эндотоксина. После теста на ингибирование/усиление определяется содержание эндотоксина в исследуемом препарате.

[0348] Остаточный AVB: Анализ остаточного AVB выполняется с использованием коммерческого набора для ИФА, CaptureSelect™ AVB Sepharose HP Ligand Leakage ELISA, производимого Life Technologies. Принцип сэндвич-ИФА включает покрытие микротитровальных планшетов поликлональными козьими антителами с антиаффинным лигандом для захвата AVB, присутствующего в образце. Обнаружение осуществляется с помощью биотинилированных аффинно-очищенных поликлональных козьих антител против лиганда AVB и конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. Концентрация остаточных AVB в образце определяется путем измерения по стандартной кривой.

Стабильность композиций AAV

[0349] Композиции по настоящему описанию сохраняют долгосрочную стабильность при хранении при температуре $<-60^{\circ}\text{C}$. Например, композиции по настоящему описанию сохраняют долгосрочную стабильность при хранении при температуре от -80°C до 40°C (приблизительно температура человеческого тела), включая конечные точки. Например, композиции по настоящему описанию сохраняют долгосрочную стабильность при хранении при температуре от -80°C до 5°C , включая конечные точки. Например, композиции по настоящему описанию сохраняют долгосрочную стабильность при хранении при -80°C , -20°C или 5°C . В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию составлены в виде жидкостей или суспензий, разделены на аликвоты в один или более контейнеров (например, флаконы) и хранятся при температуре $<-60^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию составлены в виде жидкостей или суспензий, разделены на аликвоты в один или более контейнеров (например, флаконы) и хранятся при температуре -80°C , -20°C или 5°C .

[0350] Композиции по настоящему описанию могут быть предоставлены в контейнере с оптимальным соотношением площади поверхности к объему для поддержания долгосрочной стабильности при хранении при температуре $<-60^{\circ}\text{C}$. Композиции по настоящему описанию могут быть предоставлены в контейнере с оптимальным соотношением площади поверхности к объему для поддержания долгосрочной стабильности при хранении при температуре -80°C , -20°C или 5°C . В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему описанию составлены в виде жидкостей или суспензий, разделены на аликвоты в один или более контейнеров (например, флаконы) и хранятся в одном или более контейнерах с максимально

возможным отношением площади поверхности к объему, если учтены все требования к хранению.

[0351] Композиции по настоящему описанию сохраняют долгосрочную стабильность при хранении при относительной влажности окружающей среды.

Схема клинической дозы

[0352] Хоридеремия (СНМ) - это наследственная X-сцепленная дистрофия сетчатки, впервые описанная в 19 веке. Делеция или мутация гена СНМ, кодирующего REP1, приводит к дегенерации сосудистой оболочки, ПЭС и сетчатки. Хоридеремия характеризуется прогрессирующей хориоретинальной дегенерацией у пораженных мужчин и более легкими признаками у женщин-носителей. Симптомы у пораженных мужчин могут развиваться от куриной слепоты до потери периферического поля зрения, при этом центральное зрение сохраняется до позднего возраста. Хотя женщины-носители обычно не проявляют симптомов, при тщательном осмотре глазного дна можно наблюдать признаки хориоретинальной дегенерации. Эти признаки становятся более очевидными после второго десятилетия.

[0353] СНМ вызывается мутациями в гене СНМ (Xq21), который кодирует компонент A Rab геранилгеранилтрансферазы, называемый REP1. REP1 необходим для внутриклеточной миграции и, следовательно, необходим для нормальной функции сетчатки. Когда REP1 недостаточен, как в случае с СНМ, происходит постепенная потеря функции и атрофия пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторов и сосудистой оболочки, что в конечном итоге приводит к слепоте. До разработки фармацевтических композиций по настоящему описанию лечения СНМ не было.

[0354] Дозирование ретинальной генной терапии с использованием вектора аденоассоциированного вируса (AAV) включает расчет разовой дозы, которая может дать пожизненный эффект. При традиционном системном дозировании лекарств период полувыведения лекарства измеряется в крови, и это определяет частоту повторных доз, вводимых в течение дня, так что пиковые уровни нетоксичны, а минимальные уровни достаточны для поддержания фармакодинамической активности. При использовании традиционных режимов дозирования можно использовать здоровых добровольцев для определения клиренса лекарственного средства и, следовательно, для расчета периода полувыведения лекарственного средства и, таким образом, для оценки необходимых уровней в плазме для расчета дозы и частоты введения. Можно внести коррективы - например, можно уменьшить дозировку лекарств, метаболизируемых печенью, в случае печеночной недостаточности. В

педиатрических случаях дозировку можно регулировать в соответствии с весом, который учитывает меньший объем крови и органы-мишени. Эти традиционные способы активного титрования дозировки представляют проблемы с введением офтальмологической генной терапии, поскольку в предпочтительных вариантах осуществления способов лечения и применения фармацевтических композиций по настоящему описанию цель лечения состоит в том, чтобы вводить только одну дозу, которая обеспечит терапевтические эффекты на протяжении всей жизни.

[0355] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему описанию фармацевтическую композицию вводят в глаз посредством субретинальной инъекции для нацеливания на слои ПЭС и фоторецепторных клеток. Как часть хирургической процедуры субретинальной инъекции перед субретинальным отторжением проводится витрэктомия глаза, подлежащего лечению. Эта витрэктомия сопровождается субретинальной инфузией сбалансированного солевого раствора, чтобы сформировать полусферический пузырь. В некоторых вариантах осуществления полусферический пузырь имеет площадь приблизительно 10 мм^2 или полусферический пузырь имеет площадь 10 мм^2 . В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию по настоящему описанию составляют в конечном объеме равном 0,1 мл и вводят в предварительно сформированный пузырь, позволяя фармацевтической композиции равномерно распределяться по поверхности сетчатки (например, по 10 мм^2 поверхности сетчатки). Таким образом, в тех вариантах осуществления, сформированный полусферический пузырь, в который можно вводить в фармацевтическую композицию, способствует равномерному распределению полных гAAV из композиций по слою клеток ПЭС сетчатки. После инъекции фармацевтической композиции пузырь рассасывается в течение нескольких часов после операции.

[0356] Потенциальным осложнением витрэктомии/субретинального хирургического вмешательства является снижение остроты зрения (ОЗ) сразу после операции. Еще одно потенциальное и долгосрочное осложнение - это образование катаракты. Оба этих фактора влияют на зрение при выполнении теста VA, и, следовательно, эти факторы учитываются при определении результата ранжирования дозы, особенно когда VA является единственным прогностическим фактором определения эффективной дозы.

[0357] Выбор подходящей дозы в исследованиях генной терапии отличается от традиционных способов оценки диапазона доз. Цель состоит в том, чтобы ввести максимально возможную эффективную дозу, которая считается безопасной. Причины

этого в первую очередь вызваны тем фактом, что множественность заражения (МОИ) для фоторецепторов сетчатки очень высока и составляет порядка 10^5 геномных частиц (гч) на клетку сетчатки. Учитывая, что в некоторых вариантах осуществления и в зависимости от биологических особенностей отдельного субъекта, подвергаемого лечению, максимальная площадь сетчатки, которую можно лечить, составляет приблизительно 10 мм^2 , и что область сетчатки, которая поддается лечению, находится вокруг макулы, общее количество палочек, колбочек и клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) в этой области составляет примерно 1×10^6 клеток, когорта с низкой дозой (10^{10} гч) в исследовании (описанном в Примере 13) обеспечивает МОИ, равный только 1×10^4 гч, тогда как когорта с высокой дозой (10^{11} гч) в том же исследовании обеспечивает МОИ, равный 1×10^5 гч.

[0358] Данные фазы I/II представлены в Примере 13. Было показано, что высокая доза этого исследования (10^{11} гч) безопасна и эффективна. В некоторых вариантах осуществления схему введения стероидной терапии можно использовать для устранения любого иммунного ответа субъекта на AAV в фармацевтической композиции. Как описано в Примере 13, доза фармацевтической композиции по настоящему описанию, равная 10^{11} гч обеспечивает МОИ в предпочтительном диапазоне, равном 10^5 гч.

Оценка терапевтической дозы при хороидермии

[0359] Один из параметров, который нужно измерить, - это улучшение зрительной функции. Это предполагает, что на параметр зрительной функции отрицательно влияет генетический дефект и, следовательно, он может быть в некоторой степени обратимым, поэтому улучшение можно измерить после успешного переноса гена. В некоторых вариантах осуществления способов лечения СНМ измеряются параметры зрительной функции, включая, помимо прочего, остроту зрения (VA), чувствительность сетчатки и измерения адаптированного к темноте зрения. Однако для некоторых пациентов, в зависимости от серьезности дефекта и стадии дегенерации, некоторые из вышеуказанных параметров зрительной функции могут считаться нормальными. В вариантах осуществления способов лечения по настоящему описанию параметр зрительной функции субъекта улучшается после лечения, и улучшение приводит к измерениям параметров зрительной функции, которые равны тем измерениям, которые получены у здорового субъекта (у которого нет СНМ), и который не получал лечение. В некоторых вариантах осуществления здоровый субъект представляет собой индивидуума соответствующего возраста, например, для учета

естественного возрастного ухудшения зрения, которое не зависит от СНМ. Кроме того, поскольку мужчины и женщины могут различаться по остроте цветового зрения, в некоторых вариантах осуществления здоровым субъектом является человек, имеющий такой же состав хромосомы ХУ. В некоторых вариантах осуществления способов лечения по настоящему описанию, включая те варианты осуществления, в которых субъект уже испытал значительное повреждение сетчатки (потеря нейронов) или в которых непораженные области сетчатки являются небольшими и/или прерывистыми, нельзя ожидать полного восстановления функции зрения. В тех вариантах осуществления, в которых возможно только частичное восстановление, улучшение зрительной функции может быть очевидным, когда улучшение сравнивается с исходной функцией субъекта (функция оценивалась у этого субъекта и в глазу, который подвергся лечению, до введения фармацевтической композиции). Даже в вариантах осуществления, в которых возможно только частичное восстановление, лечение повышает исходную функцию глаза и функцию зрения субъекта, так что СНМ и/или возрастная дегенерация сетчатки откладываются или уменьшаются, тем самым продлевая срок полезного зрения у субъекта.

Анатомическая плотность клеток сетчатки в целевой зоне

[0360] Чтобы рассчитать МОИ для клинического лечения *in vivo*, определяют общее количество векторных частиц и количество клеток-мишеней в области, которая подвергается лечению. Это количество зависит от площади сетчатки, подверженной воздействию вектора, и плотности каждого из различных типов клеток в этой области.

[0361] Фармацевтические композиции по настоящему описанию вводят пациентам с СНМ посредством субретинальной инъекции после индуцированного отслоения сетчатки. Например, если предположить, что отслоение сетчатки имеет линейные размеры примерно 2–3 диаметра диска, эта область отслоения сетчатки эквивалентна кругу диаметром 3–4 мм или площади примерно 10 мм².

[0362] В настоящем описании представлены примерные плотности клеток для расчетов примерных доз, однако дозы фармацевтических композиций по настоящему описанию не связаны этими примерными расчетами. В центральной части макулы плотность клеток ПЭС у нормальных людей составляет 5000 клеток на мм² (на основе патологоанатомических исследований у пациентов в возрастной группе 40-50 лет). В центральной части макулы плотность палочек у нормальных людей составляет 75000 клеток на мм², не включая центральную фовеальную область размером приibl. 0,5 мм². В центральной части макулы плотность колбочек у нормальных людей составляет

150000 на мм² центральной фовеальной зоне, равной 0,5 мм², (всего 75000) + 25000 на мм² в макуле за пределами фовеальной зоны. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, которые основаны на этих примерных плотностях клеток, общее количество каждого из трех типов клеток, подвергшихся действию гAAV из фармацевтических композиций по настоящему описанию при стандартном отслоении 10 мм², может быть рассчитано на основании приведенного выше как следующее: (а) ПЭС: 5000 клеток на мм² - ВСЕГО = 5 x 10⁴ на 10 мм²; (b) Палочки: 75000 клеток на мм², но без учета центральной фовеальной зоны, равной 0,5 мм² - ВСЕГО = 7,1 x 10⁵ на 10 мм²; и (с) Колбочки: 150000 клеток на мм² в центральной фовеальной зоне, равной 0,5 мм² (75000), но только 25000 на мм² за пределами фовеальной зоны - ВСЕГО = 3,1 x 10⁵ на 10 мм². Плотность ПЭС, палочек и колбочек различается в центральной части 10 мм² макулы и варьируется примерно на одну логарифмическую единицу, при этом самая низкая плотность (и, следовательно, самый высокий MOI) наблюдается по отношению к ПЭС.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

AAV	Аденоассоциированный вирус
AmpR	Устойчивость к ампициллину
ATCC	Американская коллекция типовых культур
Средн.	Среднее значение
BCA	Бицинхониновая кислота
BGH-полиА	Последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста
п.о.	Пар оснований
BSA	Альбумин бычьей сыворотки
BSE	Губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота
BSS	Сбалансированный солевой раствор
°C	Градусы по Цельсию
СВА	Энхансер цитомегаловируса/куриного бета-актина
СЕР	Сертификаты соответствия
<i>c.f.</i>	<i>Conferre</i> (Сравнение)
КОЕ	Колониеобразующие единицы
CI	Доверительный интервал
см	Сантиметр
С _T	Пороговый цикл
CV	Коэффициент вариации
cGMP	действующая надлежащая производственная практика
СНМ	Хориодеремия
CMV	Цитомегаловирус
ЦНС	Центральная нервная система
DCB	Производный банк клеток
DF	Диафильтрация
DLS	Динамическое рассеяние света
DMEM	Среда Игла в модификации Дульбекко
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛП	Лекарственный продукт
DRP	Анализ устойчивых к ДНКазе частиц
дцДНК	Двухцепочечная ДНК
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота
EF	Фактор элонгации
EFS	Короткая форма фактора элонгации 1 альфа
ERA	Эффективная площадь фильтрации
EGFP	Усиленный зеленый флуоресцентный белок
ИФА	Иммуноферментный анализ
EP	Европейская Фармакопея
<i>и др.</i>	<i>et alii</i> (и другие)
EtBr	Этидиум бромид
FACS	Сортировка флуоресцентно-активированных клеток
ФБС	Фетальная бычья сыворотка
FC	Конечный контейнер
FTM	Жидкая тиогликолатная среда
<i>g</i>	<i>x</i> сила тяжести
GAD	Декарбоксилаза глутаминовой кислоты
GGPP	Геранилгеранилпирофосфат
GF	Гель фильтрация
GFP	Зеленый флуоресцентный белок
GLP	Надлежащая лабораторная практика
GMP	Надлежащая производственная практика
гч	Геномные частицы
гч/мл	Количество геномных частиц на мл
час	Час
HBSS	Сбалансированный солевой раствор Хэнкса
HCP	Белок клетки-хозяина
НЕК	Почка эмбриона человека
ИН-ФБС	Инактивированная нагреванием ФБС
HPLC	Высокоэффективная жидкостная хроматография
HRP	Пероксидаза хрена
HSA	Альбумин сыворотки человека
INN	Международное непатентованное название
IPC	Внутрипроизводственный контроль
IST	Исследование, спонсируемое исследователем
ITR	Инвертированный концевой повтор
ИЕ	Инфекционные единицы
KanR	Устойчивость к каномоцину
т.п.н.	Тысяча пар нуклеотидов
кДа	Килодальтон
кг	Килограмм
кГр	Килогрей
л	Литр
LOQ	Предел количественного определения
LAL	Лизат амебоцитов <i>Limulus</i>
LOD	Предел обнаружения
мкл	Микролитры
мкм	Микрометр
м	Метр

М	Молярный
мбар	Миллибары
МСВ	Главный банк клеток
мДа	Мегадальтон
мг	Миллиграммы
МІА (ІМР)	Подтверждение производителя/импортера
мин	Минуты
мл	Миллилитр
мм	Миллиметр
мМ	Миллимолярный
мОсм	Миллиосмоль
MSC	Бокс микробиологической безопасности
Н/д	Не применимо
Н/Д	Не определено
NEAA	Заменимые аминокислоты
нг	Нанogramмы
NF	Национальный формуляр
нм	Нанометр
№	Номер
ОСТ	Оптимальная температура резания
OD	Оптическая плотность
OD ₆₀₀	Оптическая плотность, измеренная при 600 нм
ONL	Внешний ядерный слой
p	Вероятность
Па	Паскали
PAGE	Электрофорез в полиакриламидном геле
PB	Очищенный нерасфасованный препарат
PBDS	Очищенное нерасфасованное лекарственное вещество
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
PDA	Детектор с фотодиодной матрицей
PEI	Полиэтиленимин
ПЭТГ	Полиэтилентерефталатгликоль
бое	Бляшкообразующая единица
пг	Пикограммы
ч./млн.	Частей на миллион
PSG	Генератор чистого пара
фунт/кв. дюйм	Фунты на квадратный дюйм
PTC	Вопросы для рассмотрения
QC	Контроль качества
QP	Квалифицированное лицо
QFPERT	Количественная флуоресцентная усиленная в препарате обратная транскриптаза
кПЦР	Количественная полимеразная цепная реакция
qs	Квантовая достаточность
rAAV	Рекомбинантный AAV
R&D	Исследования и разработки
rcAAV	Репликационно-компетентный AAV
pДНК	Рекомбинантный DNA
REP1	Rab-сопровождающего белка типа 1
RH	Относительная влажность

RO	Обратный осмос
ПЭС	Пигментный эпителий сетчатки
ПЭС65	Белок 65 пигментного эпителия сетчатки
об/мин	Обороты в минуту
сек	Секунда времени
SCDM	Казеин-соевая питательная среда
SDA	Декстрозный агар Сабуро
SDS	Додецилсульфат натрия
SLO	Сканирующая лазерная офтальмоскопия
SOP	Стандартная операционная процедура
SSS	Раствор соли и поверхностно-активного вещества
Ср.кв. отклонение	Среднеквадратичное отклонение
TAMC	Общее количество аэробных микроорганизмов
TBA	Будет назначено
TCID ₅₀	Инфекционная доза культуры ткани 50
TFF	Тангенциальная поточная фильтрация
TSA	Триптиказо-соевый агар
ТТ	Передача технологии
TYMC	Общее количество дрожжей/плесневых грибов
Ед	Единицы
УФ	Ультрафильтрация
USP	Фармакопея США
УФ	Ультрафиолет
гв	Геном вектора
вч	Вирусные частицы
об./об.	Объем к объему
WFI	Вода для инъекций
WPRE	Посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка
ДТ	Дикий тип
мкл	Микролитр
мкм	Микрометр

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Сравнительные аналитические данные тестирования исходного и усовершенствованного процессов

[0363] Образцы из исходного процесса были предоставлены для использования в анализе данных усовершенствованного процесса, чтобы данные могли быть получены из обоих наборов партий с использованием одних и тех же методов (где применимо), чтобы обеспечить прямое относительное сравнение полученных данных, если не указано иное. Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструкт идентичен для всех партий.

[0364] Промежуточные продукты, полученные с помощью усовершенствованного процесса, анализировали в отношении физического титра (кПЦР), общего белка (Micro-BCA), общей ДНК (Picogreen) и чистоты (SDS-PAGE/окрашивание Sypro Orange).

[0365] Данные титра генома для образцов из исходного процесса были взяты из предоставленной документации о тестировании.

[0366] Данные по общему белку и общему количеству ДНК из промежуточных образцов исходного процесса производства, представленных в данном документе, были получены в соответствии с усовершенствованным процессом из исходного материала, полученного в исходном процессе.

[0367] Анализ электронной микроскопии (ЭМ), использованный для определения соотношения полных и пустых частиц, не был полностью установившимся в то время, когда процесс был переведен с исходного на усовершенствованный процесс.

Исходный процесс не предполагал каких-либо тестирований во время производства для определения соотношения полных и пустых частиц в клинической партии ни для оценки стадии очистки (градиента плотности), ни для измерения конечного лекарственного продукта, поэтому не было доступных данных для сравнения стадии очистки (градиента плотности) усовершенствованного процесса со стадией исходного процесса. Таким образом, соотношение полных и пустых частиц не использовалось для оценки сопоставимости. Вместо этого определение физического титра (или геномных частиц), измеренного с помощью кПЦР, считалось подходящим определением успешного переноса всего процесса и успешного переноса отдельных стадий процесса, поскольку они являются специфичными для векторного препарата и, следовательно, представляют полные капсиды. Однако для исходного процесса способ, основанный на аналитическом ультрацентрифугировании (AUC),

использовался для оценки соотношения полных/пустых частиц только для информации. Результат этого теста представлен в Таблице 33.

[0368] ЭМ является предпочтительным способом, и она применялась для всех полученных на сегодняшний день партий. Кроме того, ЭМ-анализ был использован ретроспективно для тестирования обеих партий полученная исходным процессом, чтобы дать представление о соотношении полных и пустых частиц. Это тестирование продемонстрировало, что усовершенствованный процесс способен генерировать сопоставимое соотношение полных и пустых капсулов, как показано в Таблице 20.

[0369] Таблица 20: Электронно-микроскопический анализ

Партия	Пустые капсулы по оценке ЭМ
(Исходный процесс) Лекарственный продукт*	11%
(Исходный процесс) Лекарственное вещество	11%
(Усовершенствованный процесс) Лекарственное вещество - партия 1	15%
(Усовершенствованный процесс) Лекарственное вещество - партия 2	24%
(Усовершенствованный процесс) Лекарственное вещество - партия 3	51%**

* Нет доступных лекарственном веществе (ЛВ) для тестирования. Тестирование проводится на лекарственном продукте (ЛП) только для информации, однако существуют лишь небольшие производственные различия между лекарственным веществом и лекарственным продуктом, поэтому мы полагаем, что это будет репрезентативным для результата лекарственного вещества.

** Обратите внимание, что это значение немного выше ожидаемого. Согласно усовершенствованному процессу более высокое соотношение пустых частиц, наблюдаемое в этой партии, по-видимому, связано с операционными манипуляциями, при которых больший объем материала был удален из центрифужных пробирок во время сбора/отбора фракции полных капсулов. Для решения этой проблемы в будущих партиях были приняты корректирующие меры, и партия 2, которая была произведена после этого исследования, имела ожидаемое меньшее количество пустых капсулов.

[0370] Аналитические результаты для исходного материала и контрольного материала (оба из исходного процесса) приведены в Таблице 21.

[0371] Таблица 21:

	Исходный процесс				Усовершенствованный процесс – партия 2			
	Восстано вление %	Титр (DRP/мл)	ДНК (нг/мл)	Общее количес тво Белка (мкг/мл)	Восстано вление %	Титр (DRP/мл)	ДНК (нг/мл)	Общее количес тво Белка (мкг/мл)
После лизиса	Н/О	2,1 x 10 ⁹	Н/Д	4655	Н/О	1,3 x 10 ¹¹	505	7624
После осветление	Н/О	8,4 x 10 ¹⁰	Н/Д	Н/Д	110%	1,3 x 10 ¹¹	Н/Д	3226
После TFF	118%	7,4 x 10 ¹²	Н/Д	Н/Д	104%	9,5 x 10 ¹²	Н/Д	Н/Д
После очистки	53%	2,3 x 10 ¹³	6	821	28%	1,6 x 10 ¹³	7	1223
После аффинной хроматографии (матрица животного происхождения)	88%	8,5 x 10 ¹²	Н/Д	Н/Д	105%	6,8 x 10 ¹²	Н/Д	Н/Д

Конечный продукт	82%	6,7 x 10 ¹²	7	32	105%	7,1 x 10 ¹²	9	36
Глобальное восстановление %	45%				36%			

[0372] Сбор материала, полученный с помощью усовершенствованного процесса, содержал более высокую концентрацию общего белка, чем сбор материала, полученный исходным процессом. Однако профили чистоты конечного лекарственного вещества были аналогичными между исходным и усовершенствованным процессами, при этом не было обнаружено никаких основных примесей. Восстановление титра между исходным и усовершенствованным процессами также было одинаковым.

[0373] Что касается критериев приемлемости, определенных для успешной передачи технологии процесса, усовершенствованный процесс контролировался, и осуществление отдельных стадий усовершенствованного процесса была аналогична той, которая наблюдалась во время исходного процесса. Восстановление процесса (титр вектора) усовершенствованного процесса было в пределах 20% от значения, полученного в исходном процессе. Чистота конечного продукта (содержание ДНК/белка) усовершенствованного процесса была в пределах 20% от чистоты, полученной в исходном процессе, с аналогичным профилем SDS-PAGE.

Пример 2: Оптимизация производственного процесса

[0374] Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструкт идентичен для всех партий.

[0375] Тройная трансфекция плазмидами и сбор

[0376] Процесс 1: Трансфекцию клеток НЕК293 тремя плазмидами выполняли путем преципитации ДНК фосфатом кальция после предварительной обработки клеток хлорохином.

[0377] Оптимизация процесса: Оптимизировать трансфекцию, включая условия посева клеток, сравнение фосфата кальция и полиэтиленimina. Оптимизировать концентрацию/соотношение плазмид. Определить оптимальный день после трансфекции для замены среды и сбора. Операционные (не связанные с процессом) изменения были оптимизированы для улучшения контроля и воспроизводимости стадий процесса, чтобы обеспечить согласованность и надежность процесса. Хлорохин был исключен из процесса для повышения безопасности.

[0378] Был проведен анализ выхода титра вектора. Реагент для трансфекции полиэтиленимин (PEI) сравнивали с фосфатом кальция (используемым для Процесса 1), чтобы определить, можно ли использовать первый для замены фосфата кальция в качестве более надежного агента трансфекции. Также оценивалась потребность в предварительной обработке хлорохином. Все параметры оценивали путем определения физического титра методом кПЦР с использованием невалидированного метода.

[0379] В Таблице 22 представлены начальные результаты, в которых титр вектора после трансфекции PEI сравнивали непосредственно с титром, полученным с использованием фосфата кальция, как в присутствии, так и в отсутствие хлорохина. Все исследования проводились на среде DMEM, содержащей глутамакс, который является средой, используемой для всех стадий подготовительного процесса.

[0380] Таблица 22: Сравнение реагентов для трансфекции - физический титр

Реагент для трансфекции	Хлорохин Предварительная обработка	Физический титр, измеренный после трансфекции, с использованием кПЦР (DRP/мл)
Фосфат кальция	Да	$1,90 \times 10^8$ DRP/мл
Фосфат кальция	Нет	$6,90 \times 10^7$ DRP/мл
PEI	Да	$1,70 \times 10^6$ DRP/мл
PEI	Нет	$5,60 \times 10^6$ DRP/мл

[0381] Эта работа продемонстрировала успешную трансдукцию с использованием PEI, хотя и с более низкими физическими титрами по сравнению с трансфекцией с использованием фосфата кальция. Эта работа также показала, что когда PEI использовался в качестве реагента для трансфекции, предварительная обработка хлорохином не требовалась и ее можно было исключить из процесса.

[0382] На основе этого результата были выполнены дальнейшие оптимизации в небольшом масштабе, включая плотность посева клеток, среду для роста клеток, концентрацию ФБС и соотношение ДНК:PEI. После того, как был установлен оптимизированный процесс трансфекции, процесс выполняли в полном объеме с использованием PEI и сравнивали с тем же процессом с использованием фосфата кальция, чтобы продемонстрировать сопоставимость.

[0383] В Таблице 23 показаны данные, полученные при полномасштабном производстве, которые демонстрируют пригодность и сопоставимость PEI в качестве реагента для трансфекции. На основании этих данных PEI был выбран в качестве

предпочтительного реагента для трансфекции, чтобы обеспечить более надежную стадию процесса по сравнению с фосфатом кальция.

[0384] Таблица 23: Сравнение реагентов для трансфекции в полномасштабном производстве - физический титр

Реагент для трансфекции	Титр после трансфекции
PEI	$11,9 \times 10^{14}$ DRP/колбу ($5,41 \times 10^{11}$ DRP/мл)
Фосфат кальция	$6,644 \times 10^{14}$ DRP/колбу ($3,02 \times 10^{11}$ DRP/мл)

[0385] Кроме того, общая продуктивность и выход партий, полученных с помощью усовершенствованного процесса, сопоставимы с производственными партиями, полученными с помощью исходного процесса (Таблица 24), что демонстрирует пригодность PEI в качестве реагента для трансфекции.

[0386] Таблица 24: Сравнение общей производительности и выхода процесса - партии исходного и усовершенствованного процессов

Производитель и партия	Исходный процесс -- GMP	Усовершенствованный процесс - не-GMP	Усовершенствованный процесс -- GMP
Полученный вирус	Общее количество DRP $3,4 \times 10^{13}$	Общее количество DRP $6,7 \times 10^{13}$	Общее количество DRP $4,7 \times 10^{13}$
Масштаб производства	12 емкостей Cell factory	24 емкостей Cell factory	22 емкостей Cell factory
Выход вируса/Cell Factory	$2,83 \times 10^{12}$ DRP/емкость	$2,79 \times 10^{12}$ DRP/емкость	$2,14 \times 10^{12}$ DRP/емкость

Пример 3: переключение закодированной в плазмиде устойчивости к антибиотикам - с AmpR на KanR

[0387] Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструкт идентичен для всех партий.

[0388] Материалы и методы исследования

[0389] Плазмиды, содержащие ампициллин, использованные для получения клинической партии, полученной с помощью исходного процесса, служили контролем для анализа выхода вектора AAV2. конструкта в пересчете на количество устойчивых к ДНКе частиц (DRP)/см². Эксперименты проводились на основе одного события оттаивания клеток, и все клетки проходили одинаковую обработку, среду, реагенты и условия роста на протяжении всего эксперимента.

[0390] Протестированные плазмиды: pAAV.конструкт (KAN);_pNLREP-CAP2 (KAN);_pHELP (KAN);_pAAV.конструкт, CN1055CM (исходный процесс; амплиф. версия,

используемая как контроль); pNLREP-CAP2, CN1054CM (исходный процесс; амплиф. версия, используемая как контроль), pHELP, CN2291CM (исходный процесс; амплиф. версия, используемая как контроль).

[0391] Для каждого набора плазмид проводили трехкратное тестирование. Три единичных стека трансфецировали pAAV конструктором (KAN), pNLREP-CAP2 (KAN) и pHELP (KAN). Три единичных стека трансфецировали эквивалентными плазмидами, содержащими AmpR. Клетки повторно загружали среду через 16-26 часов после трансдукции, среду и клетки собирали через 44-52 часа после трансдукции и определяли выход DRP для каждого единичного стека.

[0392] Результаты

[0393] Среднее DRP/см² определяли среди 3-х повторностей, протестированных с помощью кПЦР. Выходы как среды, так и лизата клеток анализировали отдельно, затем добавляли для определения общего выхода вектора на реплику, который затем делили на количество квадратных сантиметров.

[0394] **Таблица 25:** Анализ выхода DRP/см² для плазмид AmpR и KanR

Плазида	Общий выход (среда + лизат)	DRP/см ²	Средний DRP/см ²	Ср.кв. отклонение
Kan 1	3,04 x 10 ¹³	4,79 x 10 ¹⁰	4,61 x 10 ¹⁰	1,57 x 10 ⁹
Kan 2	2,88 x 10 ¹³	4,52 x 10 ¹⁰		
Kan 3	2,87 x 10 ¹³	4,51 x 10 ¹⁰		
Amp 1	2,50 x 10 ¹³	3,93 x 10 ¹⁰	3,78 x 10 ¹⁰	4,68 x 10 ⁹
Amp 2	2,64 x 10 ¹³	4,15 x 10 ¹⁰		
Amp 3	2,07 x 10 ¹³	3,25 x 10 ¹⁰		

[0395] Критерии приемлемости для повторно сконструированных (Kan) плазмид, используемых для производства лекарственного вещества и лекарственного продукта, были определены как составляющие не менее четырехкратного выхода по сравнению с выходом контрольных плазмид. Повторно клонированные Кан-версии плазмид соответствовали критериям приемлемости. На основании аналогичного выхода полученного DRP и подтверждения последовательности плазмиды, содержащие KanR, считаются подходящими для получения клинических партий AAV2-конструкта.

Пример 4: Изменение клеточной линии главного банка клеток на ATCC HEK-293

[0396] Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструктор идентичен для всех партий.

[0397] Материалы и методы исследования

[0398] Клеточная линия исходного процесса 1, использованная для производства партии GMP с помощью исходного процесса, служила контролем эффективности

трансфекции и выхода вектора AAV2-конструкта. Дальнейшие пассажи и повторное тестирование выхода и эффективности трансфекции ранее не оценивались для клеток, использованных в исходном процессе 1, и тестирование предназначено только для информации. Эксперименты касательно эффективности трансфекции, анализа выхода и кинетики роста проводили для одного и того же события (событий) оттаивания клеток, и все клетки проходили одинаковую обработку, среду, реагенты и условия роста на протяжении всего скринингового эксперимента.

[0399] *Протестированные клеточные линии:* ATCC = [HEK-293] (ATCC® CRL-1573TM), Bioreliance = 293 клетки (G95001 2), линия клеток Процесса 1 и 293T = 293T/17 [HEK 293T/17] (ATCC® CRL-1 1268TM). Следует отметить, что клеточная линия 293T была включена в качестве альтернативного источника.

[0400] Для анализа эффективности трансфекции и выхода моносли каждой клеточной линии трансфецировали соответствующими плазмидами и повторно загружали среду через 16-26 часов после трансфекции. Сбор клеток и среды для анализа GFP или DRP AAV2-конструкта проводили через 44-52 часа после трансдукции.

[0401] Кинетику роста оценивали, засеая колбы T175 либо 10^7 , либо $2,5 \times 10^6$ клеток/колбу, и регистрировали состояние клеток, качество монослоя, количество и жизнеспособность клеток на 1, 2, 3, 4 и 7 дни после посева. Это повторяли при количестве пассажей ≥ 15 .

[0402] Результаты

[0403] *Средняя интенсивность флуоресценции:* Среднюю интенсивность флуоресценции анализировали с помощью проточной цитометрии для измерения уровней экспрессии белка GFP в сочетании с количеством трансфецированных клеток в качестве индикатора общей экспрессии гена в корреляции с выходом вируса.

[0404] **Таблица 26:** Результаты средней интенсивности флуоресценции

Клеточная линия	Среднее для GFP/образца			Среднее для GFP
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	
ATCC эксперимент 1	40 935	39 347	35 525	38 602
Bioreliance эксперимент 1	24 934	24 569	23 033	24 179
МСВ контрольный эксперимент 1	34 217	33 151	37 010	34 793
293T	30 508	29 768	33 665	31 314
ATCC эксперимент 2	32 722	36 068	32 656	33 815
Bioreliance эксперимент 2	24 224	23 060	22 072	23 119
МСВ контрольный эксперимент 2	45 604	50 686	44 817	47 036

[0405] *Процент GFP*: Процент GFP-положительных клеток, определенный с помощью проточной цитометрии, показан на Фиг. 13 и 14.

[0406] *Анализ выхода AAV2-конструкта*: Результаты анализа титра DRP были получены для прямого сравнительного анализа выхода AAV2-конструкта в собранных клетках + среде для каждой обработки (единичный стек) на один анализ кПЦР.

[0407] Критерием приемлемости для клеточной линии, пригодной для использования в клиническом производстве, была разница не более чем в четыре раза по сравнению с контролем (клетки исходного процесса 1) на одну обработку. Эксперимент 1 (эксп. 1) проводили на 7-м пассаже клеток, а эксперимент 2 (эксп. 2) - на 15-м пассаже.

[0408] **Таблица 27**: Результаты анализа выхода AAV2-конструкта

Клеточная линия	Выход DRP			Средний выход	Средн. DRP/см ²	Диапазон	Кратность отличия от контроля
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3				
ATCC эксп. 1	1,23 x 10 ¹³	1,17 x 10 ¹³	1,01 x 10 ¹³	1,14 x 10 ¹³	1,79 x 10 ¹⁰	2,28 x 10 ¹²	2,77
Bioreliance эксп. 1	1,70 x 10 ¹²	1,33 x 10 ¹²	1,21 x 10 ¹²	1,41 x 10 ¹²	2,22 x 10 ⁰⁹	4,85 x 10 ¹¹	22,27
МСВ контрольный эксп. 1	2,84 x 10 ¹³	2,60 x 10 ¹³	4,01 x 10 ¹³	3,15 x 10 ¹³	4,95 x 10 ¹⁰	1,41 x 10 ¹³	Н/д
293Т	1,96 x 10 ¹³	2,21 x 10 ¹³	7,29 x 10 ¹²	1,63 x 10 ¹³	2,56 x 10 ¹⁰	1,48 x 10 ¹³	1,93
ATCC эксп. 2	1,50 x 10 ¹³	1,46 x 10 ¹³	1,40 x 10 ¹³	1,45 x 10 ¹³	2,29 x 10 ¹⁰	9,70 x 10 ¹¹	2,16
Bioreliance эксп. 2	1,74 x 10 ¹²	1,98 x 10 ¹²	2,06 x 10 ¹²	1,93 x 10 ¹²	3,03 x 10 ⁹	3,12 x 10 ¹¹	16,30
МСВ контрольный эксп. 2	3,99 x 10 ¹³	1,94 x 10 ¹³	3,49 x 10 ¹³	3,14 x 10 ¹³	4,94 x 10 ¹⁰	2,05 x 10 ¹³	Н/д

[0409] *Кинетика роста*: Кинетику роста оценивали путем регистрации количества клеток и жизнеспособности колб T175, засеянных одновременно при двух плотностях, в 1, 2, 3, 4 и 7 дни после посева. Каждый эксперимент состоял из двух повторов последовательных пассажей. Эксперимент 1 проводили на 7-м пассаже и повторяли на 8-м пассаже после оттаивания. Эксперимент 2 проводили на 15-м пассаже и повторяли на 16-м пассаже после оттаивания. Количество и процент жизнеспособных клеток определяли окрашиванием трипановым синим.

[0410] **Таблица 28**: Результаты кинетики роста

Количество клеток, эксперимент 1, пассаж 7										
Дни после посева	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7

Плотность посева	2,50 x 10 ⁶					1,00 x 10 ⁷				
АТСС	4,20 x 10 ⁵	2,10 x 10 ⁵	1,49 x 10 ⁶	1,90 x 10 ⁶	3,80 x 10 ⁶	1,90 x 10 ⁶	3,30 x 10 ⁶	5,53 x 10 ⁶	1,60 x 10 ⁶	9,20 x 10 ⁶
МСВ	2,70 x 10 ⁵	2,70 x 10 ⁵	2,47 x 10 ⁶	3,08 x 10 ⁶	4,00 x 10 ⁶	3,10 x 10 ⁶	4,80 x 10 ⁶	4,35 x 10 ⁶	3,35 x 10 ⁶	8,70 x 10 ⁶
Bioreliance	1,40 x 10 ⁵	1,10 x 10 ⁵	1,16 x 10 ⁶	2,68 x 10 ⁶	3,70 x 10 ⁶	1,30 x 10 ⁶	1,40 x 10 ⁶	5,40 x 10 ⁶	2,05 x 10 ⁶	6,70 x 10 ⁶
293Т	5,00 x 10 ⁵	2,90 x 10 ⁵	3,52 x 10 ⁶	5,20 x 10 ⁶	6,10 x 10 ⁶	1,80 x 10 ⁶	3,60 x 10 ⁶	6,40 x 10 ⁶	9,70 x 10 ⁶	9,30 x 10 ⁶
Количество клеток, эксперимент 1, пассаж 8										
Дни после посева	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7
Плотность посева	2,50 x 10 ⁶					1,00 x 10 ⁷				
АТСС	9,50 x 10 ⁴	1,60 x 10 ⁵	1,60 x 10 ⁵	4,40 x 10 ⁵	2,10 x 10 ⁶	7,45 x 10 ⁵	4,60 x 10 ⁵	9,30 x 10 ⁵	1,30 x 10 ⁶	2,50 x 10 ⁶
МСВ	3,70 x 10 ⁵	9,30 x 10 ⁵	2,70 x 10 ⁶	4,60 x 10 ⁶	4,10 x 10 ⁶	1,90 x 10 ⁶	2,70 x 10 ⁶	5,10 x 10 ⁶	4,10 x 10 ⁶	4,70 x 10 ⁶
Bioreliance	1,40 x 10 ⁵	1,20 x 10 ⁵	5,90 x 10 ⁵	2,20 x 10 ⁶	5,30 x 10 ⁶	7,60 x 10 ⁶	1,50 x 10 ⁶	3,40 x 10 ⁶	4,90 x 10 ⁶	6,00 x 10 ⁶
293Т	3,60 x 10 ⁵	1,10 x 10 ⁶	3,00 x 10 ⁶	6,00 x 10 ⁶	7,30 x 10 ⁶	1,80 x 10 ⁶	3,40 x 10 ⁶	7,80 x 10 ⁶	1,10 x 10 ⁷	7,10 x 10 ⁶
Количество клеток, эксперимент 2, пассаж 15										
Дни после посева	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7
Плотность посева	2,50 x 10 ⁶					1,00 x 10 ⁷				
АТСС	2,90 x 10 ⁵	3,10 x 10 ⁵	2,10 x 10 ⁵	1,50 x 10 ⁶	4,30 x 10 ⁶	1,20 x 10 ⁶	2,80 x 10 ⁶	3,10 x 10 ⁶	6,50 x 10 ⁶	7,80 x 10 ⁶
МСВ	5,10 x 10 ⁵	7,00 x 10 ⁵	3,20 x 10 ⁶	4,40 x 10 ⁶	4,20 x 10 ⁶	1,70 x 10 ⁶	5,60 x 10 ⁶	3,60 x 10 ⁶	4,40 x 10 ⁶	5,40 x 10 ⁶
Bioreliance	3,80 x 10 ⁵	3,50 x 10 ⁵	1,50 x 10 ⁶	2,10 x 10 ⁶	5,70 x 10 ⁶	1,30 x 10 ⁶	2,90 x 10 ⁶	5,50 x 10 ⁶	6,20 x 10 ⁶	8,20 x 10 ⁶
Количество клеток, эксперимент 2, пассаж 16										
Дни после посева	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7
Плотность посева	2,50 x 10 ⁶					1,00 x 10 ⁷				
АТСС	1,50 x 10 ⁶	1,20 x 10 ⁶	2,20 x 10 ⁶	4,00 x 10 ⁶	7,00 x 10 ⁶	1,10 x 10 ⁶	2,50 x 10 ⁶	5,60 x 10 ⁶	5,40 x 10 ⁶	6,80 x 10 ⁶
МСВ	4,80 x 10 ⁵	2,20 x 10 ⁶	3,40 x 10 ⁶	2,20 x 10 ⁶	4,90 x 10 ⁶	2,70 x 10 ⁶	8,80 x 10 ⁶	4,20 x 10 ⁶	3,30 x 10 ⁶	5,00 x 10 ⁶
Bioreliance	1,40 x 10 ⁵	3,00 x 10 ⁵	2,00 x 10 ⁶	3,40 x 10 ⁶	8,90 x 10 ⁶	1,40 x 10 ⁶	2,80 x 10 ⁶	3,80 x 10 ⁶	7,20 x 10 ⁶	1,10 x 10 ⁷
Процент жизнеспособности, эксперимент 1, пассаж 7										
Дни после посева	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7
Плотность посева	2,50 x 10 ⁶					1,00 x 10 ⁷				

ATCC	94%	100%	98%	100%	99%	87%	99%	98%	99%	99%
CMF/ MSB	96%	95%	99%	89%	99%	97%	100%	97%	86%	100%
Bioreli ance	93%	96%	100%	94%	100%	91%	99%	97%	89%	99%
293T	96%	98%	99%	97%	100%	91%	100%	98%	97%	100%
Процент жизнеспособности, эксперимент 1, пассаж 8										
Дни после посева	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7
Плотность посева	2,50 x 10 ⁶					1,00 x 10 ⁷				
ATCC	95%	94%	100%	95%	94%	99%	97%	95%	93%	94%
CMF/ MSB	100%	98%	92%	96%	96%	100%	100%	96%	92%	94%
Bioreli ance	100%	100%	95%	96%	99%	100%	98%	99%	94%	99%
293T	100%	99%	95%	96%	99%	100%	100%	97%	98%	98%
Процент жизнеспособности, эксперимент 2, пассаж 15										
Дни после посева	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7
Плотность посева	2,50 x 10 ⁶					1,00 x 10 ⁷				
ATCC	95%	98%	73%	91%	87%	98%	98%	67%	89%	85%
CMF/ MSB	96%	100%	90%	86%	82%	93%	96%	55%	83%	90%
Bioreli ance	100%	100%	95%	97%	84%	96%	99%	90%	92%	92%
Процент жизнеспособности, эксперимент 2, пассаж 16										
Дни после посева	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7	День 1	День 2	День 3	День 4	День 7
Плотность посева	2,50 x 10 ⁶					1,00 x 10 ⁷				
ATCC	98%	81%	90%	96%	82%	89%	90%	97%	87%	76%
CMF/ MSB	96%	83%	93%	96%	85%	94%	83%	92%	78%	81%
Bioreli ance	94%	67%	95%	98%	93%	96%	91%	91%	97%	89%

[0411] Все четыре клеточные линии экспрессировали GFP на уровнях, согласующихся с уровнями, ожидаемыми для хорошей эффективности трансдукции, на основании предыдущего опыта относительно корреляционного анализа сбора. Две клеточные линии из ATCC, HEK293 (CRL-1573) и 293T (CRL-11268) показали хороший рост клеток и размножение после оттаивания. Примечательно, что клеточная линия Bioreliance имела более медленный начальный рост и размножение с более низким общим состоянием клеток по сравнению с другими клеточными линиями и контролем. Клеточная линия Bioreliance также не соответствовала критерию приемлемости выхода

в пределах четырехкратного значения контроля для обоих экспериментов, где обе клеточные линии АТСС подпадали в минимальное значение критерия приемлемости.

[0412] Для дальнейшего получения вектора AAV2-конструкта была выбрана клеточная линия АТСС НЕК293 (CRL-1573) на основе результатов, представленных выше для иллюстративных вариантов осуществления производственных процессов по настоящему описанию.

Пример 5: Аналитическая разработка производственных процессов

[0413] Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструктор идентичен для всех партий.

[0414] В рамках стратегии перехода от исходного производственного процесса к усовершенствованному параллельно разрабатывалась аналитическая стратегия. По возможности, способы, разработанные для исходного процесса, были перенесены в усовершенствованный процесс или в процесс следующего поколения.

[0415] Таблица 29: Обзор аналитических методов

Проведенные тесты	Исходный процесс	Усовершенствованный процесс	Краткое описание сопоставимости методов
<i>Общие тесты</i>			
Внешний вид	Цвет, внешний вид и прозрачность. Компендиальный метод EP/USP	Цвет, внешний вид и прозрачность. Компендиальный метод EP/USP	Методы существенно не отличаются
pH	pH-метр. Компендиальный метод EP/USP	pH-метр. Компендиальный метод EP/USP	Методы существенно не отличаются
Осмоляльность	Понижение точки замерзания. Компендиальный метод EP/USP	Понижение точки замерзания. Компендиальный метод EP/USP	Методы существенно не отличаются
<i>Содержание</i>			
Физический титр	кПЦР с использованием суперспирального плазмидного вектора, используемого в качестве стандарта.	кПЦР с использованием суперспирального плазмидного вектора, используемого в качестве стандарта.	Методы существенно не отличаются.
Инфекционный титр	Культура клеток с конечной точкой кПЦР.	Культура клеток с конечной точкой кПЦР.	Методы существенно не отличаются.
Соотношение Физического:инфекционного титров	Н/О	Н/О	Н/О
Общее количество частиц	Н/О	Коммерческий набор для ИФА - Progen, № по кат. PRATV	Н/О - не определено на клиническом материале из исходного процесса

Соотношений пустых и полных частиц	Н/О	Трансмиссионная электронная микроскопия	Н/О - не определено на клиническом материале из исходного процесса
Идентичность			
Идентичность ДНК	Секвенирование ДНК	Секвенирование ДНК	Методы существенно не отличаются.
Активность			
Экспрессия и активность белка конструкта	Н/О	Трансдукция клеток с экспрессией конструкта и активностью субстрата, измеренные с помощью вестерн-блоттинга. ИФА для конструкта и субстрата.	Н/О - не определено на клиническом материале из исходного процесса
Чистота и примеси			
Общее количество белка	Анализ Micro-BCA - все определяется количественно по калибровке BSA в ФБС.	Анализ Micro-BCA - после осаждения белка для удаления матричного эффекта.	Матричный эффект, наблюдаемый в очищенном нерасфасованном буфере и буфере для конечного продукта во время валидации усовершенствованного процесса. Стадия осаждения белка (ацетоном), введена в усовершенствованный анализ для устранения матричного эффекта
Чистота	SDS-PAGE	SDS-PAGE	Методы существенно не отличаются. Гель, содержащий общее количество частиц, измеренный валидированным методом ИФА, вместо общего количества частиц, измеренного невалидированным Micro-BCA, для улучшения количественного определения.
гсAAV	кПЦР	кПЦР	Методы существенно не отличаются.
Белок клетки-хозяина	Коммерческий набор для ИФА - Sygnus, № по кат. F650	Коммерческий набор для ИФА - Sygnus, № по кат. F650	Методы существенно не отличаются.
Общее количество ДНК	Н/д	Анализ с Picogreen	Н/О - не определено на клиническом материале из исходного процесса
ДНК клетки-хозяина	Специальный метод	Набор для анализа Life Technologies	Измеряли размер и количество 3 разных ампликонов, тогда как в усовершенствованном процессе измеряли общую гкДНК, включая ДНК с высокой молекулярной

			массой и ДНК, фрагментированную в результате гидродинамического сдвига. Данные оценки качества усовершенствованного процесса демонстрируют, что анализ специфичен и достаточно чувствителен, чтобы соответствовать требованиям оценки гкДНК на дозу <10 нг/дозу.
Остаточный BSA	Коммерческий набор для ИФА - Bethyl Laboratories, Inc., № по кат. E10-113	Коммерческий набор для ИФА - Alpha Diagnostic, № по кат. 8100	Методы существенно не отличаются. Оба набора обладают соответствующим уровнем чувствительности и специфичности, чтобы соответствовать характеристикам продукта.
Остаточная бензоназа	Коммерческий набор для ИФА - EMD Millipore (Merck), № по кат. 1.01681.0001	Коммерческий набор для ИФА - Merck, № по кат. 1.01681.0001	Методы существенно не отличаются.
Остаточный AVB	Н/О	Коммерческий набор для ИФА, Life Technologies	Добавлен новый ИРС. Н/О - не определено на клиническом материале из исходного процесса
Безопасность			
Стерильность	Компендиальный метод EP/USP	Компендиальный метод EP/USP	Методы существенно не отличаются.
Бионагрузка	Компендиальный метод EP/USP	Компендиальный метод EP/USP	Методы существенно не отличаются.
Эндотоксин	Компендиальный метод EP/USP	Компендиальный метод EP/USP	Методы существенно не отличаются.

Н/п = Не применимо

[0416] Как в исходном, так и в усовершенствованном анализе гсAAV в качестве контроля используются эмбриональные клетки почки человека (НЕК293), инфицированные разведениями AAV2-конструкта или AAV дикого типа (дт). Затем клетки коинфицируют аденовирусом серотипа 5 (Ad5) для обеспечения вспомогательных функций для гсAAV (если он присутствует). При максимальном цитопатическом эффекте (ЦПЭ) клетки лизируются. Это составляет конец пассажа 0 (P0) вектора. В пассаже 1 (амплификация 1) часть лизатов P0 используется для инокуляции клеток НЕК293, коинфицированных Ad5 и без него. Клетки без Ad5 служат для определения уровня входа ДНК в клетки, в то время как клетки с Ad5 позволяют амплифицировать гсAAV2-конструкт или AAV дт в случае контроля. В исходном анализе, когда Ad5-положительные образцы достигают максимального СРЕ

после первой амплификации, клетки анализируют с помощью ПЦР. В усовершенствованном анализе стадия лизиса/амплификации клеток выполняется всего 3 раза перед анализом ПЦР.

[0417] Анализ был утвержден как предельный тест усовершенствованного процесса. Ни исходная клиническая, ни технологическая партия не были проанализированы в рамках этой проверки, поэтому прямое сравнение полученных результатов невозможно. Исходный анализ не прошел валидацию. В заключение два метода дают результаты, которые существенно не отличаются.

[0418] В измерениях гкДНК как в исходном, так и в усовершенствованном процессах используется количественная ПЦР на приборе Taqman. В исходном анализе измеряли три разных ампликона (102, 401 и 765 п.о.) с чувствительностью (LOD) на уровне 20 пг/мл для каждого ампликона. Анализ, используемый в усовершенствованном процессе, имеет один ампликон и чувствительность (LOQ) на уровне 1,3156 нг/мл. Прямое сравнение методов не проводилось, однако метод гкДНК впоследствии был квалифицирован и продемонстрировал свою пригодность для поставленной цели. Таким образом, нет отрицательного влияния на оценку сопоставимости.

[0419] Остаточный BSA измеряли с помощью исходного процесса с использованием коммерчески доступного набора для ИФА от Bethyl Laboratories, № по кат. E10-113. Чувствительность этого набора, использованного в исходном процессе, составляла 12,6 нг/мл. В усовершенствованном процессе используется коммерчески доступный набор для ИФА Alpha Diagnostics № по кат. 8100. Этот набор не прошел валидацию, но чувствительность определяется как самый низкий калибровочный стандарт, т.е. 1 нг/мл. Производители первичных антител, используемых в обоих наборах, утверждают, что первичные антитела специфичны для обнаружения человеческого BSA. Прямое сравнение методов не проводилось; однако все серии, проверенные на соответствие данным, продемонстрировали очень низкие уровни остаточного BSA (ниже чувствительности метода).

[0420] Таким образом, был сделан вывод, что все партии содержат сравнительно низкие уровни остаточного BSA.

[0421] Кроме того, поскольку BSA может вызывать аллергические реакции у людей, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) установила норму 50 нг или менее остаточного BSA на дозу вакцины. Например, для дозы AAV2-конструкта 100 мкл предел концентрации BSA будет 500 нг/мл. Оба набора для ИФА-анализа, используемые в исходном и усовершенствованном процессах, имеют уровни

чувствительности ниже этого необходимого предела и поэтому считаются сопоставимыми при измерении остаточного BSA в допустимых пределах.

[0422] Инфекционный титр

[0423] Анализ инфекционных титров был перенесен из исходного в усовершенствованный процесс. Как часть анализа с культурой клеток, так и ПЦР выполняли как часть этого переноса в соответствии с процедурой, использованной в исходном процессе. AAV2-конструкт (не GMP) (в исходном процессе) был проанализирован в 3-х отборах проб во время переноса анализа, и полученные результаты сравнивались с инфекционным титром, $2,90 \times 10^{10}$ ИЕ/мл. Полученные данные представлены в Таблице 30.

[0424] Таблица 30: Анализ инфекционного титра

Образец	Результат (ИЕ/мл)	Проходит/Не проходит
1-й отбор проб	$4,31 \times 10^{10}$	Проходит
2-й отбор проб	$9,28 \times 10^{10}$	Проходит
3-й отбор проб	$3,56 \times 10^{10}$	Проходит
Среднее	$5,72 \times 10^{10}$	-
Ср.кв. отклонение	$3,11 \times 10^{10}$	-
Точность (% CV)	54,4	-

[0425] Данные, полученные в результате исследования переноса анализа, существенно не отличаются, т.е. находятся в пределах 4-кратного диапазона результата, полученного в исходном процессе.

[0426] AAV-конструкт (не GMP), полученный с помощью исходного процесса, был проанализирован в 3-х отборах проб в соответствии с усовершенствованным процессом, и в Таблице 31 представлены результаты относительно заявленного титра ($4,95 \times 10^{12}$ DRP/мл) (исходный процесс). Данные считались приемлемыми, если они находились в 3-кратном диапазоне результатов, полученных в соответствии с исходным процессом.

[0427] Таблица 31: Анализ физического титра - данные сопоставимости

Образец	Результат (ИЕ/мл)	Проходит/Не проходит
1-й отбор проб	$9,57 \times 10^{12}$	Проходит
2-й отбор проб	$7,99 \times 10^{12}$	Проходит
3-й отбор проб	$7,75 \times 10^{12}$	Проходит
Среднее	$8,44 \times 10^{12}$	-

Ср.кв. отклонение	9,888 x 10 ¹¹	-
Точность (% CV)	10,3	-

[0428] Впоследствии анализ был валидирован, и были получены дополнительные значения в Таблице 32 для материала AAV-конструкта (не GMP) (из исходного процесса) (результаты только для разведений 1000 и 10000).

[0429] **Таблица 32:** Результаты физического титра (валидация после анализа) для AAV-конструкта (не GMP) (исходный процесс)

Анализ валидации	Результат (ИЕ/мл)	Проходит/Не проходит
2a	6,11 x 10 ¹²	Проходит
2b	1,50 x 10 ¹³	Проходит
7	1,72 x 10 ¹²	Проходит
10	6,93 x 10 ¹² 4,60 x 10 ¹² 4,98 x 10 ¹²	Проходит
11	3,57 x 10 ¹² 3,47 x 10 ¹² 3,15 x 10 ¹²	Проходит
12	7,99 x 10 ¹² 8,55 x 10 ¹² 8,66 x 10 ¹²	Проходит
Среднее	6,23 x 10 ¹²	-
Ср.кв. отклонение	3,574 x 10 ¹²	-
Точность (% CV)	57,4	-

[0430] Материал AAV2-конструкта (не отвечающий требованиям GMP) (из исходного процесса) обычно анализируется в анализе образцов ЛВ и ЛП в качестве внутреннего эталонного контроля (первичного эталона) с критериями приемлемости системы, установленными в пределах 3-кратного отличия от номинального титра (4,95 x 10¹² DRP/мл) (определенного исходным процессом), чтобы обеспечить постоянную сопоставимую производительность метода.

Пример 6: Сравнение композиций, полученных с помощью усовершенствованного процесса

[0431] Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструкт идентичен для всех партий.

[0432] Чтобы продемонстрировать, что изменения/оптимизации в изменении процесса (в Процессе 1 для получения Процесса 2) не повлияли на критические показатели

качества производимого векторного материала, была проведена оценка сопоставимости.

[0433] После внесения изменений в процесс в отношении клеток, плазмид, условий трансфекции, колонки для аффинной хроматографии, масштаба и конечной упаковки препарата, и завершения работы по оптимизации в отношении процесса 1, был определен новый процесс производства материала для клинической фазы 3 и полномасштабная «техническая» партия, выполняемая для измерения производительности процесса и эквивалентности лекарственного вещества и лекарственного продукта материалу, произведенному в рамках исходного процесса.

[0434] В приведенном ниже анализе сравниваются данные, полученные из полномасштабной технологической партии и партий GMP из усовершенствованного процесса, с технологической партией и клиническими материалами, созданными в рамках исходного процесса.

[0435] Технологическая партия, полученная с помощью исходного процесса (AAV2-конструкт (не GMP)), для которой было проведено дополнительное тестирование (см. Таблицу 33 ниже), чтобы предоставить информацию для сравнения с технологической партией, полученной с помощью усовершенствованного процесса.

[0436] **Таблица 33:** Сравнение партий AAV2-конструкта (не GMP), произведенных с помощью исходного и усовершенствованного процессов

Проведенные тесты	Усовершенствованный процесс: AAV2-конструкт (не GMP)	Усовершенствованный процесс: номер партии GMP G214/ (AAV2-конструкт) партия 1	Усовершенствованный процесс: номер партии GMP G214/ (AAV2-конструкт) партия 2	Исходный процесс: клиническая партия (AAV2-конструкт)	Исходный процесс: AAV2-конструкт (не GMP)
Бионагрузка	TAMC 0 КОЕ/мл* ТУМС 0 КОЕ/мл*	0 КОЕ /0,410 мл (предварительная фильтрация приготовленного нерасфасованного продукта)	0 КОЕ /0,552 мл (предварительная фильтрация приготовленного нерасфасованного продукта)	TAMC <8,0 КОЕ/мл* ТУМС <8,0 КОЕ/мл*	TAMC <2,01 КОЕ/мл ТУМС <2,01 КОЕ/мл
Эндотоксин	0,79 ЕЭ/мл	< 1 ЕЭ/мл	<1 ЕЭ/мл	<0,054 ЕЭ/мл	<0,050 ЕЭ/мл
Физический титр***	1,86 x 10 ¹¹ DRP/мл [†]	1,06 x 10 ¹² DRP/мл	9,57 x 10 ¹¹ DRP/мл	8,71 x 10 ¹¹ DRP/мл	4,95 x 10 ¹² DRP/мл
Инфекционный титр	2,00 x 10 ⁹ ИЕ/мл	4,3 x 10 ⁹ ИЕ/мл	5,2 x 10 ⁹ ИЕ/мл	2,4 x 10 ¹⁰ ИЕ/мл	2,9 x 10 ¹⁰ ИЕ/мл
Соотношение Физического:инф	93:1	247:1	184:1	36:1	171:1

екционного титров					
Общее количество частиц	2,7 x 10 ¹¹ капсидов/мл	1,9 x 10 ¹² * капсидов/мл	1,9 x 10 ¹² * капсидов/мл	Н/Д	Н/Д
Соотношений пустых и полных частиц	5,7:1*	0,96:1*	8,1:1*	9:1**	25:1 [#]
Общее количество белка	<LOQ	22 мкг/мл*	16 мкг/мл*	28,979 мкг/мл	29,434 мкг/мл
Чистота	Отсутствие обнаруживаемых примесей (в образце присутствуют определенные бэнды белков VP1, VP2 и VP3)	Чистота = 100% Отсутствие обнаруживаемых примесей	Чистота = 100% Отсутствие обнаруживаемых примесей	Чистота = 100% Отсутствие обнаруживаемых примесей	Чистота = 93,238% Примесь 1: 52,33 кДа и 1,656% Примесь 2: 47,05 кДа и 1,805% Примесь 3: 45,01 кДа и < 1% Примесь 4: 35,14 кДа и 1,693%
гсAAV	<10 ИЕ гсAAV2 в 1 x 10 ¹⁰ DRP****	<LOD анализа	<10 ИЕ гсAAV в 1,0 x 10 ¹⁰ DRP	<10 ИЕ гсAAV в 1,0 x 10 ¹¹ DRP	Отсутствие обнаруживаемого гсAAV в 1 x 10 ⁷ DRP с LOD 3,3 ИЕ
Идентичность ДНК	Последовательность кДНК, кодирующей конструкт, соответствует ожидаемой последовательности (полная последовательность недоступна)*	Соответствует ожидаемой последовательности	Последовательность ДНК соответствует правильной последовательности	Доступная последовательность ДНК соответствует правильной последовательности (полная последовательность не получена)	Доступная последовательность ДНК соответствует правильной последовательности (полная последовательность не получена)
Белок клетки-хозяина	<4 нг/мл	<LOD <4 нг/мл	<LOD (<10 нг/мл*)	< 8 нг/мл	< 8 нг/мл
ДНК клетки-хозяина	0,53 нг/мл	< 6,58 x 10 ³ пг/мл*	< 6,58 x 10 ³ пг/мл*	102 п.о.: 4,41 x 10 ⁴ пг/мл 401 п.о.: 3,79 x 10 ⁴ пг/мл 765 п.о.: 2,74 x 10 ⁴ пг/мл	102 п.о.: 1612 пг/1 x 10 ⁹ DRP 401 п.о.: 1204 пг/1 x 10 ⁹ DRP 765 п.о.: 832 пг/1 x 10 ⁹ DRP
ДНК клетки-хозяина (нормализованные единицы к пг/мл)	530 пг/мл	<LOQ (< 6,58 x 10 ³ пг/мл)*	<LOQ (< 6,58 x 10 ³ пг/мл)*	102 п.о.: 4,41 x 10 ⁴ пг/мл 401 п.о.: 3,79 x 10 ⁴ пг/мл	102 п.о.: 7,98 x 10 ⁶ пг/мл 401 п.о.: 5,96 x 10 ⁶ пг/мл

				765 п.о.: 2,74 x 10 ⁴ пг/мл	765 п.о.: 4,12 x 10 ⁶ пг/мл
Остаточный BSA	4 пг/мл	<LOD (<1 нг/мл)*	<LOD (<1 нг/мл)*	<12,6 нг/мл	<12,6 нг/мл
Остаточная бензоназа	<0,2 нг/мл	<LOD (<4 нг/мл)*	<0,4 нг/мл*	<0,5 нг/мл	<0,5 нг/мл
Осмоляльность	408 мОсм/кг H ₂ O [†]	402 мОсм/кг H ₂ O	408 мОсм/кг H ₂ O	400 мОсм/кг H ₂ O	408 мОсм/кг H ₂ O
pH	8,0 [†]	pH 8,0	pH 7,9	pH 7,9	pH 8,0
Внешний вид	Прозрачная бесцветная жидкость без видимых частиц	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость без видимых частиц	Прозрачная бесцветная жидкость без видимых частиц	Прозрачная бесцветная жидкость без видимых частиц
Экспрессия белка конструкта	Обнаружена экспрессия белка конструкта ^{†**}	Обнаружена экспрессия белка конструкта ^{**}	Обнаружена экспрессия белка конструкта ^{**}	Обнаружена экспрессия белка конструкта ^{* *}	Обнаружена экспрессия белка конструкта ^{* *}
Остаточный лиганд AVB	н/д	н/д	<0,088 нг/мл(LOD)*	н/д	н/д

[†]Тестирование проводилось на лекарственном продукте (конечная упаковка препарата)

^{††}Тестирование выполняется аналитическим ультрацентрифугированием, а не электронной микроскопией

*Тестирование проводилось на очищенном нерасфасованном препарате (лекарственное вещество)

** Тестирование выполнено с использованием анализа, не отвечающий требованиям GMP.

***Указанный физический титр был получен в соответствии с исходным процессом

****Анализируется в ходе валидационного исследования в соответствии с усовершенствованным процессом

[0437] Дополнительная аналитическая информация и данные

[0438] *Физический титр*: Целевой физический титр фасованного клинического материала лекарственного продукта (продукт GMP) составлял 1 x 10¹² DRP/мл (произведенный по исходному процессу). Для технологической партии, изготовленной по исходному процессу (продукт не GMP), целевой титр отсутствовал, и AAV2-конструкт (не GMP) представлял лекарственное вещество, которое было бы разбавлено до целевой концентрации заполнения, если бы эта партия была преобразована в лекарственный продукт. Для AAV2-конструкта (не GMP), полученного с помощью усовершенствованного процесса, целевая концентрация составляла 1-2 x 10¹² DRP/мл. Указанный титр 1,87 x 10¹¹ DRP/мл для AAV2-конструкта (не GMP) ниже, чем ожидалось, но это связано с минимальным удерживаемым объемом на заключительной стадии фильтрации в тангенциальном потоке (TFF2), ограничивающим степень до которой может быть сконцентрировано конечное лекарственное вещество. В частности, эта неполная концентрация привела к тому, что партия была в 6 раз менее концентрированной. Если физический и инфекционный титры скорректированы для этого 6-кратного разведения, тогда

физический титр, инфекционный титр и соотношения физического и инфекционного титров одинаковы для разных партий, как показано в Таблице 34. Использование картриджа TFF с более низким удерживаемым объемом (меньшим) было оценено для достижения более высокого коэффициента концентрации.

[0439] Таблица 34: Сравнение физического титра, инфекционного титра и соотношения физического и инфекционного титров

Проведенные тесты	Усовершенствованный процесс: AAV2-конструкт (не GMP)- Партия 2		Усовершенствованный процесс: AAV2-конструкт (не GMP)- Партия 1	Усовершенствованный процесс: номер партии GMP (AAV2-конструкт)	Исходный процесс: клиническая партия (AAV2-конструкт)	Исходный процесс: AAV2-конструкт (не GMP)
	Неисправленный результат	Результат исправлен под 6-кратное разведение				
Физический титр	1,86 x 10 ¹¹ DRP/мл	1,11 x 10 ¹² DRP/мл	1,06 x 10 ¹² DRP/мл	9,57 x 10 ¹¹ DRP/мл	8,71 x 10 ¹¹ DRP/мл	4,95 x 10 ¹² DRP/мл
Инфекционный титр	2,00 x 10 ⁹ ИЕ/мл	1,2 x 10 ¹⁰ ИЕ/мл	4,3 x 10 ⁹ ИЕ/мл	5,2 x 10 ⁹ ИЕ/мл	2,4 x 10 ¹⁰ ИЕ/мл	2,9 x 10 ¹⁰ ИЕ/мл
Соотношение Физического:инфекционного титров	93:1	93:1	247:1	184:1	36:1	171:1

[0440] Чистота: Чистота измеряется с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, окрашенном Sypro Orange, с пониженным содержанием SDS. На Фиг. 16 показан профиль чистоты, созданный для партии AAV2-конструкта (не GMP), полученной с помощью усовершенствованного процесса. Данные показывают присутствие 3 белков вирусного капсида (VP1, VP2 и VP3) без каких-либо дополнительных примесей.

[0441] Экспрессия белка конструкта: Перед введением количественного анализа экспрессии белка конструкта (методом ИФА) был проведен предварительный анализ с использованием качественного анализа не GMP. Этот клеточный анализ *in vitro*, описанный ниже, способен измерять как экспрессию конструкта, так и биологическую активность экспрессированного конструкта в клеточной линии человека. Анализ состоит из 3 компонентов:

- Клеточной культуры и трансдукции вирусным вектором
- Вестерн-блоттинг для определения экспрессии белка конструкта
- Анализ для определения активности белка конструкта

[0442] Культивирование клеток проводят с использованием клеток НЕК293, трансдуцированных известным и сопоставимым физическим титром вектора AAV2-конструкта. Эти клетки экспрессируют белок конструкта на уровне ниже или на пределе уровня, обнаруженного в этом анализе, что позволяет провести сравнительную качественную оценку повышенной экспрессии белка конструкта из-за клеточной трансдукции и экспрессии вектора AAV2-конструкта. После трансдукции и инкубации лизаты клеток собирают и цитозольную фракцию используют в Вестерн-блоттинге и в анализе *in vitro* для определения экспрессии и активности белка конструкта, соответственно. Обнаружение белка выполняется с использованием моноклонального антитела, специфичного к белку конструкта, и уровни экспрессии нормализуются, например, относительно внутриклеточной экспрессии В-актина для обеспечения полуколичественного анализа.

[0443] На Фиг. 17 приведены данные, иллюстрирующие результаты экспрессии конструкта и функциональной активности после трансдукции культивированных клеток НЕК293 технологическими партиями из исходного и усовершенствованного процессов. Окрашивание на наличие белка конструкта является положительным для обеих партий и указывает на повышенные уровни экспрессии белка конструкта по сравнению с исходными уровнями экспрессии белка конструкта, наблюдаемыми в нетрансдуцированных контрольных клетках 293. Обнаружение субстрата белка конструкта также является положительным для обеих партий и указывает на повышенные уровни активности с субстратом по сравнению с исходными уровнями, наблюдаемыми в нетрансдуцированных контрольных клетках 293. Более того, уровни экспрессии конструкта и активности субстрата кажутся сопоставимыми как для исходного, так и для усовершенствованного технологических прогонов, демонстрируя сопоставимую эффективность для этих партий. Данные для партий GMP также показывают увеличение экспрессии и активности конструкта.

[0444] Продукт оптимизированного процесса:

[0445] *Безопасность:* Данные о биоагрузке и эндотоксинах не выявили проблем с безопасностью, связанных с введением новых загрязнителей. В этом отношении партии исходного и усовершенствованного процессов существенно не отличаются.

[0446] *Примеси*: Уровни примесей, связанных с процессом (НСР, остаточная бензоназа, BSA, общий белок), существенно не различались для всех партий.

[0447] Отмечены некоторые различия в уровнях ДНК клетки-хозяина (гкДНК). Разница между AAV2-конструктом (не GMP) и AAV2-конструктом (GMP), оба произведенные по исходному процессу, может быть связана с тем фактом, что AAV2-конструкт (не GMP) был произведен в лабораториях, не отвечающим требованиям GMP, тогда как AAV2-конструкт (GMP) был произведен в чистых помещениях GMP, где есть больший контроль стадий процесса, технологических операций, отбора проб, тестирования и сырья, что позволяет получать лучшие и более воспроизводимые результаты. Кроме того, для получения AAV2-конструкта (не GMP) использовали более длительное время инкубации после плазмидной трансдукции клеток; 72 часа от загрузки среды клеток до сбора по сравнению с 23 часами для клеток, используемых для получения AAV2-конструкта (GMP). Более длительная инкубация может способствовать большему росту клеток и высвобождению большего количества гкДНК этими клетками.

[0448] Эти различия могут объяснить различия, наблюдаемые в уровнях гкДНК между двумя партиями материала, полученными с помощью исходного процесса.

[0449] И наоборот, для AAV2-конструкта (не GMP) и 2 партий GMP, каждая из которых была произведена с помощью усовершенствованного процесса, уровни гкДНК намного ниже (530 пг/мл или <LOD соответственно). В процессе, используемом для производства этих партий, существует стадия хроматографической очистки и доочистки, которая позволяет удалить остаточную ДНК.

[0450] *Характеристика продукта*: Внешний вид, pH и осмоляльность существенно не различались для всех партий.

[0451] *Векторные характеристики*: Партии, не отвечающие и отвечающие требованиям GMP, полученные с помощью усовершенствованного процесса, демонстрируют сопоставимую экспрессию конструкта и биологическую активность при оценке в неколичественном анализе. Эти партии также имели чистоту, сравнимую с партиями, полученными с помощью исходного процесса, без обнаруживаемых примесей.

[0452] Данные о соотношении полных и пустых векторных капсидов аналогичны, а данные экспрессии и активности конструкта, представленные выше, подтверждают, что соотношение полных и пустых векторных капсидов в партии (не соответствующей требованиям GMP), полученной с помощью усовершенствованного процесса,

эквивалентно партии соответствующей требованиям GMP, полученной с помощью исходного процесса, и не оказывает отрицательного воздействия на способность вектора трансдуцировать клетки человека и демонстрировать биологическую активность.

[0453] Данные об идентичности (векторной последовательности) подтверждают гомологию по всей длине последовательности для всех партий без внесенных мутаций. Идентичность также подтверждается способностью обнаруживать экспрессию и биологическую активность конструктора *in vitro*, оба из которых основаны на интактном и функциональном белке конструктора, фланкированном ITR AAV.

[0454] Репликационно-компетентный AAV не обнаружен ни в одной партии. Наличие gcAAV маловероятно из-за природы плазмиды и генетического состава вектора, но будет продолжать оцениваться для любой партии GMP перед выпуском для клинических исследований, чтобы гарантировать безопасность пациента.

[0455] *Выход процесса:*

[0456] В Таблице 35 приведены общие результаты усовершенствованного процесса. Из двойного количества 10-слойных Cell factory (24 c.f. 12 для Исходного процесса) получается двойное количество вирусных частиц (DRP) ($6,7 \times 10^{13}$ c.f. $3,4 \times 10^{13}$ для Исходного процесса). Общий процесс восстановления является более медленным, но отчасти это связано с дополнительными испытаниями и контролем качества в процессе производства, выполненными во время разработки усовершенствованного процесса, которые не были включены в производство исходной партии.

[0457] Таблица 35: Относительные выход процесса и восстановление

Производитель и партия	Исходный процесс: AAV2-конструктор (клинический)	Усовершенствованный процесс: AAV2-конструктор (не клинический)
Произведенный вирус (общий физический титр)*	Общее количество DRP $3,4 \times 10^{13}$	Общее количество DRP $6,7 \times 10^{13}$
Масштаб производства	12 Cell factory	24 Cell factory
Общий выход процесса	Выход 28%	Выход 14%**

*Указанный физический титр был получен в соответствии с исходным процессом

**~10% потерь в образцах (IPC, QC)

[0458] На основании данных, представленных выше, неклиническая партия AAV2-конструктора, полученная с помощью нового оптимизированного процесса, считается сопоставимой с доклиническими и клиническими партиями, полученными с помощью

исходного процесса. Этот процесс использовался для производства первой партии GMP в соответствии с усовершенствованным процессом.

Пример 7: Повышенная надежность хроматографической очистки AAV2

[0459] Все параметры тестирования, относящиеся к качеству и эффективности продукта, были оценены после введения AVB, и не было обнаружено никаких изменений в профиле качества или эффективности продукта, полученного после хроматографии AVB, как подробно описано в Таблицах 36–41.

[0460] Кроме того, был введен новый метод обнаружения остаточного лиганда AVB, который продемонстрировал отсутствие детектируемого лиганда AVB в любом материале, изготовленном с использованием колонки с AVB-сефарозой.

[0461] Выполнено семь технологических прогонов AVB с материалом AAV2-конструкта (Фиг. 2, стадия 13) для оценки предотвращения агрегации и ступенчатого выхода, 5 прогонов в малом масштабе (от 1,5 до 7 л) и 2 прогона в большем масштабе (16 л). Стадия AVB показала хорошие результаты во всех экспериментах с хорошим ступенчатым восстановлением 40-78% (и со средним выходом 64%). Ни в одном эксперименте не было обнаружено значительной агрегации. После хроматографии AVB все уровни потенциальных примесей или технологических загрязнителей были низкими и соответствовали уровням, продемонстрированным ранее, а конечный векторный продукт показал хорошую активность и инфекционные титры. В заключение из сокращенных прогонов со стадией очистки AVB-сефарозой, все результаты анализов (Таблица 36) демонстрируют хорошую сопоставимость с фазой 1/2 исходного процесса (с использованием аффинной хроматографии с заполненной матрицей животного происхождения) и начальным «усовершенствованным» процессом для клинического материала AAV2-конструкта GMP (процесс анионного обмена UnoQ).

[0462] Таблица 36: Стадия очистки AVB-сефарозой - результаты анализа

Эксперимент с AVB ID код	10a	10b	11	12	13	14	15
Физический титр (DRP/мл)	1,4 x 10 ¹²	1,6 x 10 ¹²	1,87 x 10 ¹²	1 x 10 ¹² (2,0 x 10 ¹² в масштабе)*	0,7 x 10 ¹² (1,3 x 10 ¹² в масштабе e)*	0,8 x 10 ¹² (1,6 x 10 ¹² в масштабе)*	2,2 x 10 ¹²
Глобальный процесс	12%	13%	11%	8%	6,5%**	9%	6%

Восстановление (%)							
Титр капсида (кап/мл)	9,7 x 10 ¹¹	1,1 x 10 ¹²	1,4 x 10 ¹²	4,3 x 10 ¹¹	2,8 x 10 ¹¹	3,9 x 10 ¹¹	1,1 x 10 ¹²
Остаточный НСР (нг/мл)	Все результаты ниже предела количественного определения (<LOQ)						
Остаточный лиганд AVB (нг/мл)							
DLS*** (% объема)	98,1	99,2	96,1	99,2	99,2	98,6	99,4

*Эквивалент титра в полном масштабе

**Скорректированный выход с учетом потери одной центрифужной пробирки

*** Метод НИОКР для оценки агрегирования

[0463] Таблица 37: Стадия очистки AVB-сефарозой - результаты анализа

ID код эксперимента AVB	Физический титр (DRP/мл)	Эффективность (кратное увеличение по сравнению с нетрансдуцированными клетками)		Инфекционный титр	Полные капсиды (%)
		Конструкт	Субстрат		
Exp11	1,87 x 10 ¹²	5,0	4,3	2,4 x 10 ¹⁰	82% полных
Exp12	1,0 x 10 ¹²	4,8	16,9	Не испытано	87% полных
Exp13	0,7 x 10 ¹² *	3,4	9,3	Не испытано	78% полных
Exp14	0,8 x 10 ¹²	3,1	11,5	7,7 x 10 ⁹	Нет данных
Exp15	2,2 x 10 ¹²	4,7	15,4	8,4 x 10 ⁹	70% полных
Описание	> 0,7 x 10 ¹²	> 2-кратное увеличение по сравнению с нетрансдуцированными	> 2-кратное увеличение по сравнению с нетрансдуцированными	> 1,4 x 10 ⁸	<55% пустых (> 45% полных капсидов)

* объем образца не позволял концентрировать до конечного титра.

[0464] После демонстрации сопоставимости продуктов и повышения надежности процесса с помощью разработки прогонов небольшого масштаба и увеличения производства с использованием стадии аффинной хроматографии AVB, AAV2-конструкт GMP был изготовлен с использованием процесса AVB. Все результаты аналитических испытаний для этой партии GMP соответствуют требованиям и ожиданиям.

[0465] Предварительные аналитические результаты для лекарственного вещества и лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта GMP (полученных с помощью

усовершенствованного процесса) приведены ниже в Таблице 38 и Таблице 39. Все тесты соответствуют требованиям и ожиданиям.

[0466] Таблица 38: Предварительные результаты тестирования высвобождения для AAV2-конструкта GMP (из усовершенствованного процесса)

Тест(ы)	Требования	Результат	Вывод
ГК ДНК	$< 2,66 \times 10^7$ пг/мл	$< 6,58 \times 10^3$ пг/мл	Проходит
Безопасность, бактериальные эндотоксины	< 5 ИЕ/мл	< 1 ИЕ/мл ($< 0,05$ ИЕ/мл)	Проходит
Физический титр	$> 0,7 \times 10^{12}$ DRP/мл	$4,30 \times 10^{12}$ DRP/мл	Проходит
Инфекционный титр	$> 1,24 \times 10^8$ ИЕ/мл	$1,1 \times 10^{10}$ ИЕ/мл	Проходит
Соотношение DRP:ИЕ - Подсчет	$< 5645:1$	391	Проходит
Чистота по SDS-PAGE	Чистота $> 90\%$ без единой примеси $> 2\%$. Должны быть явными три бэнда, соответствующие VP1, VP2 и VP3 AAV2.	100 %	Проходит
Идентичность ДНК AAV	Соответствует ожидаемой последовательности за исключением регионов ITR	Соответствует ожидаемой последовательности и за исключением регионов ITR	Проходит
гсAAV	$< \text{LOD}$ анализа	$< \text{LOD}$ анализа (< 10 гсAAV на 1×10^{10} гв)	Проходит

[0467] Таблица 39: Результаты предварительных характеристических испытаний для лекарственного вещества AAV2-конструкта GMP из усовершенствованного процесса

Характеристические испытания	
Тест(ы)	Результат
Общее количество белка	16 мкг/мл
НСП	$< \text{LOQ} = < 10$ нг/мл
Остаточный BSA	< 1 нг/мл
Остаточная бензолаза	$< 0,4$ нг/мл
Остаточный лиганд AVB	$< 0,088$ нг/мл (LOD)
Соотношений пустых и полных частиц	89:11
Общее количество частиц	$1,9 \times 10^{12}$ * частиц/мл
Общее количество ДНК	328 нг/мл

[0468] Улучшение процесса очистки привело к получению сопоставимого лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта и улучшенной надежности процесса по сравнению с процессом и продуктом по исходному процессу.

[0469] Во время производства по усовершенствованному процессу соотношение полных и пустых частиц определяется в качестве характеристических испытаний.

[0470] Возможные примеси, связанные с продуктом, приведены в Таблице 40.

[0471] Таблица 40:

Возможные примеси, связанные с продуктом	Контроль
Репликационно-компетентный AAV	Анализ репликационно-компетентного AAV*
Пустая частица AAV	Большинство удалено градиентной очисткой

* Тестирование высвобождения лекарственного вещества.

[0472] Возможные примеси, связанные с процессом, и их контроль приведены в Таблице 41.

[0473] Таблица 41:

Возможные примеси, связанные с	Контроль (тестирование высвобождения)
Бензоназа	ИФА остаточной бензоназы
Эндотоксин	Анализ эндотоксина - кинетический LAL
Альбумин бычьей сыворотки	ИФА остаточного BSA
Белок клетки-хозяина	ИФА белка клетки-хозяина HEK293
ДНК клетки-хозяина	кПЦР ДНК клетки-хозяина HEK293
Общее количество ДНК	Анализ Picogreen остаточной двухцепочечной
AVB-лиганд	ИФА остаточного AVB

Пример 8: Контроль лекарственного вещества

[0474] Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструктор идентичен для всех партий.

[0475] Валидация аналитических процедур: Краткие сведения о результатах валидации метода, если таковые имеются, представлены ниже.

[0476] Физический титр: Этот анализ был утвержден на соответствие следующим критериям (см. Таблицу 42). «Фактическое значение» - это значение для иллюстративного AAV2-конструкта по настоящему описанию.

[0477] Таблица 42:

Тестовый параметр	Критерии приемлемости	Фактическое значение	Проходит или не проходит
Точность	% CV с использованием повторяющихся значений C_T для каждого разбавления калибровочной кривой составляет $\leq 5\%$ для точности как между анализами, так и внутри анализов (подробное значение точности между анализами основано на значениях C_T калибровочного стандарта. Точность, основанная на контроле динамики показателей анализа (AAV2.конструктор GMP), с использованием среднего значения 1 из	$< 3,87\%$	Проходит

	1000 и 1 из 10 000 разведений, составила 57,4% (n = 13 проанализировано в 7 прогонах).		
Специфичность и точность	Исследуемый препарат находится в пределах значений C_T 3,3 (1 log) от соответствующего стандарта	В исследуемом препарате в присутствии 1 мкг ДНК человека не наблюдается ингибирования.	Проходит
Линейность и диапазон	$r^2 \geq 0,98$. Целевой наклон калибровочной кривой для каждого анализа должен составлять от -3,0 до -3,8, что указывает на эффективность кПЦР от 83% до 115%.	r^2 от 0,993 до 0,994 и наклон от -3,21 до -3,48 для анализов 1, 2b и 6 r^2 от 0,988 до 0,997 и наклон от -3,17 до -3,56 для анализов 7, 4 и 5	Проходит
Коллинеарность	Эффективности амплификации суперспирального плазмидного вектора и вирусной ДНК сопоставимы.	Сопоставимы в диапазоне от 5×10^5 копий/2,5 мкл до 5×10^2 копий/2,5 мкл, 100 копий/2,5 мкл и 50 копий/2,5 мкл	Проходит
Предел обнаружения	Отчетный результат	168,2 копий/2,5 мкл	Проходит
Предел количественного определения	Отчетный результат	Валидный в диапазоне от 5×10^6 копий/2,5 мкл до 5×10^2 копий/2,5 мкл, 100 копий/2,5 мкл и 50 копий/2,5 мкл	Проходит
Надежность	%CV с использованием повторяющихся значений C_T для каждой калибровочной кривой разведения составляет $\leq 5\%$.	Реагенты: от 0,24% до 2,78% в зависимости от различий в разных партиях реагента. Оператор: $< 3,06\%$	Проходит
Приготовление реакционной смеси	%CV с использованием повторяющихся значений C_T для каждого разведения составляет $\leq 5\%$ для 2 партий приготовленной реакционной смеси.	$< 1,91\%$	Проходит

[0478] Соотношение DRP:ИЕ - Подсчет: Валидация не требуется. Значение определяется расчетом физического титра и данных анализа титра инфекционных единиц.

[0479] Общее количество частиц: Проведена валидация анализа общего количества частиц. Краткое описание результатов валидации представлено в Таблице 43.

«Фактическое значение» - это значение, измеренное для иллюстративного AAV2-конструкта по настоящему описанию.

[0480] Таблица 43: Краткое описание валидации анализа общего количества частиц

Тестовый параметр	Критерии приемлемости	Фактическое значение	Проходит или не проходит
Точность (Внутри анализа)	$CV \leq 20\%$	$CV \leq 14\%$ (n = 4)	Проходит
Точность (внутрилабораторная)	$CV \leq 30\%$	$CV \leq 28\%$ (n = 4)	Проходит
Точность	Восстановление 70 - 130%	Восстановление между 106% и 115% для результатов, полученных при разведении стандарта в 2-16 раз	Проходит
Требования	Контрольный образец не должен показывать присутствие частиц ($OD \leq 0,3$)	Пустой образец не показывает присутствие частиц ($\leq 0,2 OD$) (n = 20)	Проходит
Диапазон	Отчетный результат	От $1,88 \times 10^8$ капсидов/мл до $14,5 \times 10^8$ капсидов/мл (n = 1)	Проходит
Линейность	$r^2 \geq 0,98$	$r^2 \geq 0,99$ (n = 1)	Проходит
Предел обнаружения	Отчетный результат	LOD соответствует нижнему плато калибровочной кривой. (n = 4)	Проходит
Предел количественного определения	Отчетный результат	$0,7 \times 10^8$ капсидов/мл (n = 4)	Проходит

[0481] Соотношений пустых и полных частиц: Валидация анализа конкретного препарата не проводилась. Подсчет полных и пустых частиц AAV2 на изображениях, полученных с помощью просвечивающего электронного микроскопа, выполняется в установке, соответствующей требованиям GMP.

[0482] Идентификационные данные вектора (ДНК): Валидация анализа конкретного препарата не проводилась. Секвенирование ДНК выполняется с использованием квалифицированного метода и оборудования на установке, соответствующей требованиям GMP.

[0483] Анализ общего белка: Этот анализ подтвержден на соответствие следующим критериям (см. Таблицу 44).

[0484] Таблица 44: Критерии валидации анализа общего количества белка

Тестовый параметр	Критерии приемлемости
Точность	$CV \leq 20\%$

(Внутри анализа)	
Точность (внутрилабораторная)	$CV \leq 30\%$
Точность	Восстановление 70 - 130%
Диапазон	Отчетный результат
Линейность	$r^2 \geq 0,98$
Предел обнаружения	Отчетный результат
Предел количественного определения	Отчетный результат

[0485] Анализ чистоты (SDS-PAGE): анализ чистоты подтвержден. Краткое описание результатов валидации представлено (в Таблице 45). «Фактическое значение» - это значение, измеренное для иллюстративного AAV2-конструкта по настоящему описанию.

[0486] Таблица 45: Краткое описание валидации анализа чистоты

Тестовый параметр	Критерии приемлемости	Фактическое значение	Проходит или не проходит
Точность (Внутри анализа)	$CV \leq 10\%$	$\leq 4\%$	Проходит
Точность (внутрилабораторная)	$CV \leq 15\%$	$\leq 4\%$	Проходит
Линейность	$r^2 \geq 0,98$	$\geq 0,99$	Проходит
Предел количественной оценки и диапазон	Отчетный результат	Предел количественной оценки (экстраполяцией) 1,4%. Диапазон загрузки от 1×10^{10} до 1×10^{11} частиц на полосу.	Проходит
Требования	На полосе, куда будет загружен буфер для состава, не должно быть бэндов.	Бэнды в буфере для состава не обнаруживаются.	Проходит
Надежность	Изменение температуры не влияет на результат	Не влияет на результаты	Проходит

[0487] Репликационно-компетентный AAV: Анализ репликационно-компетентный AAV прошел валидацию на соответствие требованиям валидации, указанным в ICH Q2 (R1) для предельного теста на примеси (см. Таблицу 46). Краткое описание результатов валидации представлено ниже. «Фактическое значение» является мерой для иллюстративного AAV2-конструкта по настоящему описанию.

[0488] Таблица 46: Краткое описание валидации анализа репликационно-компетентного AAV

Тестовый параметр	Критерии приемлемости	Фактическое значение	Проходит или не проходит
Требования	Положительный сигнал получается только при наличии аденовируса и репликативного AAV.	Положительный сигнал, полученный при наличии аденовируса и репликативного AAV	Проходит
Предел обнаружения	≤ 10 гсAAV2 в 1×10^{10} DRP вектора AAV	≤ 10 гсAAV2 в 1×10^{10} DRP	Проходит

[0489] Общее количество ДНК: Проведена валидация анализа общего количества ДНК. Краткое описание результатов валидации представлено (см. Таблицу 47).

Представленное «Фактическое значение» является мерой для иллюстративного AAV2-конструкта по настоящему описанию.

[0490] **Таблица 47**: Краткое описание валидации анализа общего количества ДНК

Тестовый параметр	Критерии приемлемости	Фактическое значение	Проходит или не проходит
Точность (Внутри анализа)	$CV \leq 15\%$	$CV \leq 9,0\%$ (n = 6)	Проходит
Точность (внутрилабораторная)	$CV \leq 20\%$	$CV \leq 12,1\%$ (n = 4)	Проходит
Точность (Истинность)	Степень восстановления в пределах 50-200%	66- 83%(n = 4)	Проходит
Диапазон	Отчетный результат	От 0,1 до 1,0 нг/мл	Проходит
Линейность	$r^2 \geq 0,95$	$r^2 \geq 0,99$ (n = 4)	Проходит
Предел обнаружения	Отчетный результат	0,042 нг/мл (n = 4)	Проходит
Предел количественного определения	Отчетный результат	0,127 нг/мл (n = 4)	Проходит

[0491] ДНК клетки-хозяина НЕК293: Анализ ДНК клетки-хозяина НЕК293 был квалифицирован (см. Таблицу 48). Краткое описание результатов оценки качества представлено ниже. Представленное «Фактическое значение» является мерой для иллюстративного AAV2-конструкта по настоящему описанию.

[0492] **Таблица 48**: Краткое описание оценки качества анализа ДНК клетки-хозяина

Тестовый параметр	Критерии приемлемости	Фактическое значение	Проходит или не проходит
Точность (Внутри анализа)	Отчетный результат	24,81%	Проходит
Точность (внутрилабораторная)	Отчетный результат	27,84%	Проходит
Профиль точности	Диапазон в пределах $\pm 50\%$	Восстановление 77,87 -107,6%	Проходит
Линейность	$r^2 \geq 0,97$	1,00	Проходит
Предел количественной оценки и диапазон	Отчетный результат	0,6578-300,0 пг/мкл	Проходит

Требования	Не обнаружено амплификации <i>E. coli</i> или если разница в значениях $C_T > 5$ раз при той же оценке качества концентрации стандарта	Не обнаружено амплификации <i>E. coli</i>	Проходит
Истинность	Отчетный результат	0,03-300,0 пг/мкл	Проходит

[0493] Анализ бионагрузки: это компендиальный метод, согласованный с требованиями EP 2.6.12 и USP <61>. Оценка качества/валидация проводится согласно соответствующим фармакопейным монографиям.

[0494] Анализ эндотоксина: это компендиальный метод, согласованный с требованиями EP 2.6.14 и USP <85>. Оценка качества/валидация проводится согласно соответствующим фармакопейным монографиям.

Пример 9: Результаты анализа партии композиций, изготовленных с использованием процесса 2

[0495] Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструктор идентичен для всех партий.

[0496] Данные анализа партий для 2 партий, соответствующих GMP, и 2 партий, не соответствующих GMP, представлены ниже в Таблице 50.

[0497] **Таблица 50**: Результаты анализа для контроля качества лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта, произведенного в соответствии с процессом 2

Номер партии			AAV2-конструктор (не GMP) – партия 1	AAV2-конструктор (не GMP) – партия 2	AAV2-конструктор (GMP) – партия 1	AAV2-конструктор (GMP) – партия 2
Использование			Разработка процесса	Стабильность	Клиническое	Клиническое
Тест	Метод испытания	Критерии приемлемости	Результаты			
<i>Характеристика вектора</i>						
Анализ физического титра (DRP)	Анализ устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на основе кПЦР	$> 0,7 \times 10^{12}$ DRP/мл	$4,22 \times 10^{11}$ DRP/мл*с	$1,11 \times 10^{12}$ DRP/мл	$1,82 \times 10^{12}$ DRP/мл	$4,30 \times 10^{12}$ DRP/мл
Определение титра инфекционных единиц (ИЕ)	Заражение клеток RC32 с последующим обнаружением AAV2 методом кПЦР	$> 1,24 \times 10^8$ ИЕ/мл	$6,32 \times 10^9$ ИЕ/мл	Нет результата* ****	$1,70 \times 10^{10}$ ИЕ/мл	$1,1 \times 10^{10}$ ИЕ/мл

Номер партии			AAV2-конструкт (не GMP) – партия 1	AAV2-конструкт (не GMP) – партия 2	AAV2-конструкт (GMP) – партия 1	AAV2-конструкт (GMP) – партия 2
Использование			Разработка процесса	Стабильность	Клиническое	Клиническое
Тест	Метод испытания	Критерии приемлемости	Результаты			
Соотношение DRP:IE – Подсчет	н/д	< 5645:1	67:1	н/д	107:1	391:1
Общее количество частиц	Коммерческий ИФА на частицы AAV2	> 0,49 x 10 ¹² * частиц/мл	2,7 x 10 ¹¹ капсидов/мл***	1,2 x 10 ¹² * частиц/мл	3,2 x 10 ¹² * частиц/мл	1,9 x 10 ¹² * частиц/мл
Соотношение пустых и полных частиц	Трансмиссионная электронная микроскопия	<55% пустых частиц	85:15	76:24	49:51	89:11
<i>Идентичность</i>						
Идентичность вектора (ДНК)	Очистка вирусной ДНК с секвенированием обеих цепей ДНК	Соответствует ожидаемой последовательности за исключением регионов ITR	Последовательность конструкта соответствует ожидаемой последовательности	Не проводили*	Соответствует ожидаемой последовательности за исключением регионов ITR	Соответствует ожидаемой последовательности за исключением регионов ITR
<i>Чистота и примеси</i>						
Общее количество белка	Количественное определение белка Мисго-BCA	> 5 мкг/мл	<LOQ***	14 мкг/мл	22 мкг/мл	16 мкг/мл
Чистота	Анализ SDS-PAGE с примесями, оцененными с помощью анализа интенсивности	Чистота > 90% без единой примеси > 2%. Должны быть явными три бэнды, соответствующие VP1, VP2 и VP3 AAV2.	В образце представлены конкретные бэнды белков VP1, VP2 и VP3.	100%	100%	100%
Репликационная компетентность AAV	Аамплификация и количественная ПЦР на основе клеток HEK293	<LOD анализа	< LOD анализа****	Не проводили*	<LOD анализа	<LOD анализа

Номер партии			AAV2-конструкт (не GMP) – партия 1	AAV2-конструкт (не GMP) – партия 2	AAV2-конструкт (GMP) – партия 1	AAV2-конструкт (GMP) – партия 2
Использование			Разработка процесса	Стабильность	Клиническое	Клиническое
Тест	Метод испытания	Критерии приемлемости	Результаты			
Белок клетки-хозяина HEK293	Коммерческий набор для ИФА	< 80 нг/мл	<4 нг/мл	10,5 нг/мл	< 4 нг/мл	<LOD (<10 нг/мл)
Общее количество ДНК	Анализ с Picogreen	Отчетный результат	130 нг/мл	487 нг/мл	575 нг/мл	328 нг/мл
ДНК клетки-хозяина HEK293 (количество и размер)	Анализ кПЦР, Метод resDNASEQ человека	<2,66 x 10 ⁷ пг/мл	5,30 x 10 ² пг/мл	<6,58 x 10 ³ пг/мл	< 6,58 x 10 ³ пг/мл	< 6,58 x 10 ³ пг/мл
Остаточный BSA	Коммерческий набор для ИФА	<126 нг/мл	4 пг/мл	<1 нг/мл	<1 нг/мл	<1 нг/мл
Остаточная бензолаза	Коммерческий набор для ИФА	<5 нг/мл	<0,2 нг/мл	<0,2 нг/мл	<0,4 нг/мл	<0,4 нг/мл
Безопасность						
Анализ бионагрузки	Мембранная фильтрация	< 1 КОЕ/1% РВ	ТАМС: 0 КОЕ/мл ТУМС: 0 КОЕ/мл	Не проводили	0 КОЕ /0,410 мл (предварительная фильтрация приготовленного нерасфасованного продукта)	0 КОЕ /0,552 мл (предварительная фильтрация приготовленного нерасфасованного продукта)
Анализ эндотоксина	Количественный кинетико-хромогенный метод.	< 5 ЕЭ/мл	0,79 ЕЭ/мл	Не проводили	<1 ЕЭ/мл	<1 ЕЭ/мл

Сноски:

(*) Анализ проводили согласно процессу 1. (**) Не выполняется для сохранения материала для исследований стабильности. (***) Результат не соответствует характеристике; характеристика установлена после получения результатов. (****) Результат получен в рамках валидации анализа. Титр определяют с помощью процесса 2 с использованием плазмидной ДНК в качестве стандарта для анализа (1,87 x 10¹¹ DRP/мл) вместо указанного значения физического титра. (*****) Анализ не соответствует критериям достоверности. Недостаточное количество пробы для повторного анализа.

Пример 10: Результаты анализа партии композиций, изготовленных с использованием процесса 1

[0498] Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструкт идентичен для всех партий.

[0499] Одна клиническая партия GMP была произведена в соответствии с процессом 1. Данные анализа партии этой партии лекарственного вещества представлены в Таблице 51.

[0500] Таблица 51: Результаты тестирования контроля качества

Тест	Критерии приемлемости	Результаты
Анализ физического титра (DRP)	Отчетный результат	1,46 x 10 ¹² DRP/мл (день 1) 1,92 x 10 ¹² DRP/мл (день 2)
Количественное определение белка Micro-BCA	Отчетный результат	35,350 мкг/мл
Определение чистоты AAV электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле	Чистота > 90% без единой примеси > 2%	Чистота = 100% Без обнаруживаемых примесей
Анализ in vitro на вирусные контаминанты ¹	Не обнаружено	Не обнаружено
Анализ биоагрузки	<1 КОЕ/1% PBDS (0,5% в каждой среде)	<8,0 КОЕ/мл общее количество дрожжей и плесневых грибов <8,0 КОЕ/мл общее количество аэробных микроорганизмов
Анализ эндотоксина	< 5 ЕЭ/мл	0,234 ЕЭ/мл
Анализ микоплазмы ¹	Не обнаружено	Отрицательный

¹ Результаты тестирования IPC.

Пример 11: Стабильность композиций AAV

[0501] Аликвоты лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта анализируют на долгосрочную стабильность, чтобы поддерживать условия хранения лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта <-60° С. Это исследование дополняет текущие исследования лекарственного продукта в режиме реального времени и ускоряет исследования стабильности при -80° С, -20° С и 5° С.

[0502] Лекарственное вещество на основе AAV2-конструкта аликвотируется в небольшие контейнеры (бутыли из ПЭТГ объемом 5 мл с завинчивающейся крышкой), представляющие полноразмерные контейнеры для лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта, чтобы обеспечить доступность достаточного количества контейнеров для тестирования стабильности с течением времени. В этих контейнерах используются те же материалы, контактирующие с продуктом, и они выбраны так, чтобы наилучшим образом представлять конечные контейнеры для лекарственных веществ на основе AAV2-конструкта, за исключением отношения площади поверхности к объему. Считается, что меньший объем и большее отношение площади поверхности к объему в аликвотах небольших контейнеров представляют «наихудший вариант» в отношении долговременной стабильности лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта.

[0503] Аликвоты лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта размещают при -80 ± 10° С при относительной влажности окружающей среды.

[0504] Если доступно недостаточное количество аликвот лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта для завершения полного 36-месячного исследования, исследование будет прекращено в более ранний момент времени.

[0505] Было начато сокращенное исследование поддерживающей стабильности с использованием материала из небольшой партии AAV2-конструкта (не GMP). В этом исследовании используются аликвоты по 100 мкл в полипропиленовых криопробирках объемом 2 мл, которые хранятся при температуре <-60° С. Считается, что меньший объем заполнения и большее отношение площади поверхности к объему в аликвотах небольших контейнеров представляют «наихудшего вариант» в отношении долгосрочной стабильности лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта. Исследование будет оценивать стабильность лекарственного вещества через 2, 6 и 12 месяцев. Дополнительные сведения об этом исследовании представлены ниже.

[0506] Требования к тестам

[0507] Анализы были выбраны для протокола исследования начальной стабильности на основании следующих причин (см. Таблицу 52).

[0508] Таблица 52: Тесты, используемые для протокола исследования начальной стабильности лекарственных веществ

Тест	Тип теста	Цель и аргументация/обоснование
Внешний вид	Физико-химический (Визуально)	Сбор данных о внешнем виде во время испытания стабильности. Изменения внешнего вида могут быть результатом изменения продукта, например, осадков.
pH	Физико-химический (измерение электродом)	Сбор данных о pH во время испытания стабильности. Изменения pH могут быть результатом изменения продукта, например, химического разложения.
Чистота по SDS-PAGE	Чистота	Сбор данных о чистоте во время испытания стабильности. Снижение чистоты может указывать на разложение продукта.
Агрегация по DLS	Целостность	Сбор данных о возможной агрегации (профиль размера частиц) во время испытания стабильности.
Физический титр (DRP) по количественной ПЦР	Количественная оценка	Сбор данных о количестве вирусного вектора gAAV во время испытания стабильности.
Экспрессия и активность конструкта	Активность	Измерение и сбор данных об экспрессии конструкта во время испытания стабильности.
Крышка контейнера	Целостность контейнера	Проверить целостность крышки контейнера в конце испытания стабильности.

[0509] Для протокола исследования поддерживающей стабильности были выбраны анализы, включающие физический титр, чистоту, общее количество частиц и активность, как указано в Таблице 53. Эти тесты на стабильность и временные точки (Таблица 54 и Таблица 57) были сочтены наиболее подходящими для количества материала, доступного для проведения исследования. Оценка агрегации векторов не

была включена в это исследование, поскольку метод в настоящее время находится на стадии разработки для векторного материала AAV2. Целостность контейнера также была исключена из исследования, так как это сокращенное исследование поддерживающей стабильности.

[0510] Таблица 53: Тесты, используемые для протокола исследования поддерживающей стабильности лекарственного вещества

Тест	Тип теста	Цель и аргументация/обоснование
Физический титр (DRP) по количественной ПЦР	Количественная оценка	Сбор данных о количестве вирусного вектора gAAV во время испытания стабильности.
Общее количество частиц	Количественная оценка	Сбор данных об общем количестве вирусных векторных частиц во время испытания стабильности.
Чистота по SDS-PAGE	Чистота	Сбор данных о чистоте во время испытания стабильности. Снижение чистоты может указывать на разложение продукта.
Экспрессия и активность конструкта	Активность	Измерение и сбор данных об экспрессии конструкта во время испытания стабильности.
Активность конструкта	Активность	Измерение и сбор данных об активности экспрессированного конструкта во время испытания стабильности.

[0511] Таблица 54: Протокол исследования стабильности и характеристики срока годности для исследования начальной стабильности лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта, хранение при $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$

Тест	Описание	Момент времени (месяцы)							
		T0 - 80°C	T3 - 80°C	T6 - 80°C	T9 - 80°C	T12 - 80°C	T18 - 80°C	T24 - 80°C	T36 - 80°C
Внешний вид	Отчетный результат	X	-	X	-	X	X	X	X
pH	Отчетный результат	X	-	X	-	X	X	X	X
Чистота по SDS-PAGE	Отчетный результат	X	-	X	-	X	X	X	X
Агрегация по DLS	Отчетный результат	X	X	X	X	X	X	X	X
Физический титр (DRP) по количественной ПЦР	Отчетный результат	X	-	X	-	X	X	X	X
Экспрессия и активность конструкта	Отчетный результат	X	X	X	X	X	X	X	X
Крышка контейнера	Соответствует	-	-	-	-	-	-	-	X

[0512] Таблица 55: Протокол исследования стабильности и характеристики срока годности для исследования поддерживающей стабильности лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта, хранение при $< -60^{\circ}\text{C}$

Тест	Описание	Момент времени (месяцы)			
		T0 <- 60°C	T2 <- 60°C	T6 <- 60°C	T12 <- 60°C
Физический титр (DRP) по количественной ПЦР	> 0,7 x 10 ¹² DRP/мл	X	X	X	X
Общее количество частиц	90% без единой примеси > 2%. Должны быть явными три бэнда, соответствующие VP1, VP2 и VP3	X	X	X	X
Чистота по SDS-PAGE	> 0,49 x 10 ¹² * частиц/мл	X	X	X	X
Экспрессия и активность конструктора	≥ 2-кратное увеличение плотности бэнда белка конструктора в трансдуцированных клетках по сравнению с нетрансдуцированными клетками	X	X	X	X
Активность конструктора	≥ 2-кратное увеличение плотности бэнда субстрата конструктора в трансдуцированных клетках по сравнению с нетрансдуцированными клетками	X	X	X	X

[0513] Таблица 56: Данные о стабильности исследования стабильности основного лекарственного вещества на основе AAV2-конструктора, хранение при -80°C ±10°C

Тест	Описание	Момент времени (месяцы)							
		T0 - 80°C	T3 - 80°C	T6 - 80°C	T9 - 80°C	T12 - 80°C	T18 - 80°C	T24 - 80°C	T36 - 80°C
Внешний вид	Отчетный результат	X	-	X	-	X	X	X	X
pH	Отчетный результат	X	-	X	-	X	X	X	X
Чистота по SDS-PAGE	Отчетный результат	X	-	X	-	X	X	X	X
Агрегация по DLS	Отчетный результат	X	X	X	X	X	X	X	X
Физический титр (DRP) по количественной ПЦР	Отчетный результат	X	-	X	-	X	X	X	X
Экспрессия и активность конструктора	Отчетный результат	X	X	X	X	X	X	X	X
Крышка контейнера	Соответствует	-	-	-	-	-	-	-	X

[0514] Таблица 57: Данные о стабильности исследования поддерживающей стабильности лекарственного вещества на основе AAV2-конструктора, хранение при <-60°C

Тест	Описание	Момент времени (месяцы)			
		T0	T2	T6	T12

		<-60°C	<-60°C	<-60°C	<-60°C
Физический титр (DRP) по количественной ПЦР	> 0,7 x 10 ¹² DRP/мл	1,8 x 10 ¹² DRP/мл	1,8 x 10 ¹² DRP/мл	X	X
Общее количество частиц	> 0,49 x 10 ¹² * частиц/мл	1,4 x 10 ¹² капсидов/мл	1,2 x 10 ¹² капсидов/мл	X	X
Чистота по SDS-PAGE	> 90% без единой примеси > 2%. Должны быть явными три бэнда, соответствующие VP1, VP2 и VP3	Чистота 100%. Должны быть явными три бэнда, соответствующие VP1, VP2 и VP3	Чистота 100%. Должны быть явными три бэнда, соответствующие VP1, VP2 и VP3	X	X
Экспрессия и активность конструкта	≥ 2-кратное увеличение плотности бэнда белка конструкта в трансдуцированных клетках по сравнению с нетрансдуцированными клетками	5,0-кратное увеличение плотности бэнда белка конструкта в трансдуцированных клетках по сравнению с нетрансдуцированными клетками	3,1-кратное увеличение плотности бэнда белка конструкта в трансдуцированных клетках по сравнению с нетрансдуцированными клетками	X	X
Активность конструкта	≥ 2-кратное увеличение плотности бэнда субстрата в трансдуцированных клетках по сравнению с нетрансдуцированными клетками	4,3-кратное увеличение плотности бэнда субстрата в трансдуцированных клетках по сравнению с нетрансдуцированными клетками	8,3-кратное увеличение плотности бэнда субстрата в трансдуцированных клетках по сравнению с нетрансдуцированными клетками	X	X

X: обозначает стабильность в будущий момент времени.

Пример 12: Анализ клинического лекарственного продукта

[0515] Для данных, представленных ниже, измерения взяты из одной или более партий AAV2-конструкта, при этом конструкт идентичен для всех партий.

[0516] Аналитические процедуры, которые выполняются для тестирования при выпуске лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта, подробно описаны в Таблице 58 в дополнение к соответствующим характеристикам.

[0517] **Таблица 58:** Характеристики лекарственного продукта

Тестовый параметр	Метод испытания	Критерии приемлемости
<i>Общие тесты</i>		
Внешний вид	Цвет, видимые частицы и прозрачность	От прозрачного до слегка непрозрачного, от бесцветного до бледно-белого раствора
pH	pH метр	8± 0,5
Осмоляльность	Понижение точки замерзания	388– 426 мОсм/кг H ₂ O
<i>Содержание</i>		

Физический титр	Анализ устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на основе кПЦР	$0,8 \times 10^{12} - 1,5 \times 10^{12}$
Титр инфекционных единиц (ИЕ)	Заражение клеток RC32 с последующим обнаружением AAV2 методом кПЦР	$> 1,4 \times 10^8$ ИЕ/мл
Соотношение DRP:ИЕ- Подсчет	н/д	$< 5645:1$
<i>Активность</i>		
Активность	Измерение экспрессии белка конструкции и субстрата после трансдукции <i>in vitro</i> клеток НЕК293	≥ 2 -кратное увеличение плотности бэнда белка конструкта и субстрата в трансдуцированных клетках по сравнению с нетрансдуцированными клетками
<i>Безопасность</i>		
Стерильность	Аэробная и анаэробная культура бактерий и грибов путем погружения в среду	Отсутствие роста
Эндотоксин	Кинетический хромогенный (анализ USP/FDA I/E)	< 5 ЕЭ/мл

[0518] Аналитические процедуры: Ниже приведены методы, используемые для контроля лекарственного продукта.

[0519] Внешний вид (EP 2.2.1, 2.2.2 и 2.9.20 и USP <631>): продукт будет проверен визуально на прозрачность, цвет и отсутствие/присутствие посторонних частиц. Продукт будет проверен на белом и черном фоне.

[0520] pH (EP 2.2.3 и USP <791>): pH продукта будет определяться с помощью с микро pH-электрода с температурной компенсацией.

[0521] Осмоляльность (EP 2.2.35 и USP <785>): осмоляльность определяется методом понижения точки замерзания.

[0522] Физический титр: физическое титрование конечного продукта будет выполняться, как описано в данном документе.

[0523] Анализ титра инфекционных единиц: анализ титра инфекционных единиц конечного продукта будет выполняться, как описано в данном документе.

[0524] Эффективность: этот анализ используется для демонстрации того, что белок конструкта чрезмерно продуцируется и является активным в клетках, трансдуцированных исследуемым препаратом. Клетки НЕК293 экспрессируют эндогенный белок конструкта на очень низком уровне, что позволяет проводить сравнительную оценку повышенной экспрессии белка конструкта за счет трансдукции клетки и экспрессии вектором AAV2-конструкта по сравнению с нетрансдуцированными клетками. После трансдукции клетки лизируют и измеряют концентрацию конструкта в лизатах с помощью вестерн-блоттинга или ИФА. Активность экспрессированного белка конструкта измеряют в клеточных лизатах с

использованием реакции, которая измеряет включение меченого биотином GPP в субстрат, с использованием вестерн-блоттинга или ИФА.

[0525] Тест на стерильность (EP 2.6.1 и USP <71>): эта процедура используется для определения того, свободен ли исследуемый препарат от жизнеспособных бактериальных и грибных загрязнений. Исследуемый препарат в асептических условиях переносят в казеин-соевую питательную среду (SCDM) и жидкую тиогликолевую среду (FTM). Эти бульоны инкубируют в течение 14 дней и проверяют на наличие бактерий и грибов.

[0526] Эндотоксин (EP 2.6.14 и USP <85>): этот анализ используется для определения присутствия бактериальных эндотоксинов в исследуемом препарате. Количественная процедура проводится кинетико-хромогенным методом. Известные количества эндотоксина тестируются параллельно с исследуемым препаратом для точного определения уровня бактериального эндотоксина. Потенциал вмешательства со стороны исследуемого препарата исследуется путем обработки исследуемого препарата и реагента LAL заданными уровнями эндотоксина. После теста на ингибирование/усиление определяется содержание эндотоксина в исследуемом препарате.

[0527] Валидация аналитических процедур: Краткие сведения о результатах валидации метода, если таковые имеются, представлены ниже.

[0528] Внешний вид: это компендиальный метод, согласованный с требованиями EP 2.2.1/2.2.2 и USP <631> . Оценка качества/валидация проводится согласно соответствующим фармакопейным монографиям.

[0529] pH: это компендиальный метод, согласованный с требованиями EP 2.2.3 и USP <791> . Оценка качества/валидация проводится согласно соответствующим фармакопейным монографиям.

[0530] Осмоляльность: это компендиальный метод, согласованный с требованиями EP 2.2.35 и USP <785> . Оценка качества/валидация проводится согласно соответствующим фармакопейным монографиям.

[0531] Стерильность: это компендиальный метод, согласованный с требованиями EP 2.6.1 и USP <71> . Оценка качества/валидация проводится согласно соответствующим фармакопейным монографиям.

Пример 13: Схема клинической дозы

[0532] Хороидеремия - это редкая в настоящее время неизлечимая X-сцепленная рецессивная дегенерация сетчатки, которая проявляется в позднем детстве и приводит к слепоте. В этом примере представлена основная конечная точка нерандомизированного двухлетнего открытого клинического испытания 1-2 фазы по оценке генной терапии сетчатки с использованием вектора аденоассоциированного вируса типа 2 (AAV2), экспрессирующего трансген хороидеремии (NCT01461213). Изначально было набрано 12 пациентов, 5 из которых получили 1×10^{10} геномных частиц (гч) AAV.REP1, а 6 получили 1×10^{11} гч. Хирургическое осложнение у одного пациента привело к истончению сетчатки и снижению дозы вектора менее 10^{10} гч. Первичным критерием оценки безопасности и эффективности была острота зрения через два года. Второстепенными критериями были чувствительность сетчатки и анатомические изменения. По всей группе из 14 пациентов к двум годам медиана остроты зрения улучшилась на 4,5 буквы на глазах, которые подвергались лечению, по сравнению с потерей 1,5 буквы на глазах, которые не подвергались лечению ($p = 0,03$). У 12 пациентов, получавших генную терапию без осложнений, глаза, которые подвергались лечению, через два года видели на 5,5 букв больше их исходного уровня ($p = 0,02$). По сравнению с глазами, которые не подвергались лечению, это представляло собой медианный прирост на 4,5 буквы через два года в пользу глаз, получавших генную терапию ($p = 0,003$). К этому времени 6 из 12 глаз, которые подвергались лечению, видели более одной зрительной строки (> 5 букв), в сравнении с ни одним из 12 глаз, которые не подвергались лечению. При последнем наблюдении (диапазон 2-5 лет) острота зрения сохранялась или повышалась во всех 12 исследуемых глазах, получавших генную терапию в соответствии с протоколом, по сравнению только с 4 из 12 глаз, которые не подвергались лечению. Это было эквивалентно средней разнице между глазами 15,9 букв (> 3 строк). Не наблюдалось статистически значимых различий во вторичных конечных точках, таких как микропериметрия, толщина сетчатки или потеря внешнего края сетчатки между глазами, которые подвергались и не подвергались лечению, в течение двух лет наблюдения. Генная терапия сетчатки при хороидеремии кажется безопасной и может улучшить остроту зрения.

[0533] В этом демаскирующем, нерандомизированном проспективном клиническом исследовании интервенционной генной терапии, 14 участников были набраны с информированного согласия и прошли курс генной терапии на один глаз с использованием вектора AAV2.REP1. Обычно глаз, выбранный для лечения, имел

худшую остроту зрения на исходном уровне, но в 3 случаях был выбран глаз с большей остротой из-за других факторов, таких как сужение поля зрения. Все участники были мужчинами в возрасте от 25 до 73 лет с подтвержденными нулевыми мутациями в гене *СНМ*. Основная цель исследования заключалась в оценке безопасности в отношении сохранения зрения через два года после операции.

Первоначально 12 пациентов должны были быть включены в две группы по шесть пациентов, каждый из которых будет находиться под наблюдением в течение 24 месяцев. Однако осложнения у двух пациентов привели к задержке на 24 месяца в середине испытания и к изменению протокола, касающегося хирургической техники и схемы подавления иммунитета. Комитет по этике одобрил продление исследования вместе с набором еще двух пациентов, так что в общей сложности 12 пациентов прошли лечение генной терапией в соответствии с протоколом без осложнений.

[0534] В первой группе из 6 пациентов субретинальная инъекция до 1×10^{10} геномных частиц (гч), проанализированная с использованием эталонного суперспирального плазмидного вектора, была введена под сетчатку в двухэтапной процедуре. Это включало начальную отслойку сетчатки с помощью сбалансированного солевого раствора, вводимого через тefлоновую канюлю 41 калибра (G) (DORC BV, Zuidland, Нидерланды), и вторичную инъекцию вектора AAV.REP1 во вновь созданное субретинальное пространство. У пациента 6 (С1) трудности с отслоением сетчатки и растяжением папилломакулярного пучка привели к снижению дозы генной терапии до $<6 \times 10^9$ и последующему истончению сетчатки, но все остальные пациенты получали либо полную низкую дозу 1×10^{10} гч (L1-5) или высокую дозу 1×10^{11} гч (С2 и Н1-7), согласно протоколу. Первоначально преднизолон вводили перорально в дозе 1 мг/кг в течение 3 дней до и 7 дней после генной терапии, но у С2 развились витрит и ретинит через 2 недели после операции, что отрицательно повлияло на его зрение.

Впоследствии протокол был изменен таким образом, что Н1-7 получили продление схемы введения преднизолона: 0,5 мг/кг (дни 8-14), 0,25 мг/кг (дни 15-16), затем 0,125 мг/кг (дни 17-18). Воздушный пузырь в системе инъекции расширился в субретинальное пространство у Н3, и введение вектора было отложено, потому что предполагалось, что вектор будет вытеснен субретинальным воздухом. В систему инъекции были внесены изменения, чтобы обеспечить более контролируруемую инфузию вектора в субретинальное пространство и снизить вероятность захвата пузырьков воздуха. Протокол позволял отложить введение вектора, если показано по

хирургическим причинам, и НЗ был возвращен для генной терапии сетчатки позднее, когда полная доза вектора вводилась без осложнений.

[0535] Чтобы помочь визуализировать отслоение сетчатки и контролировать растяжение сетчатки, НЗ-7 была проведена интраоперационная оптическая когерентная томография (ОСТ). Она включала вертикально-ориентированный Heidelberg Spectralis, который перемещался в операционное поле и из него на различных этапах для оценки уровня субретинальной инъекции и степени растяжения сетчатки.

[0536] При хороидеремии, в отличие от многих других дегенераций сетчатки, потеря ПЭС приводит к рубцовой реакции подлежащей сосудистой оболочки, которая затем прочно прикрепляется к остаточной сетчатке. Однако центральный островок функциональной сетчатки остается нетронутым, и внутри него можно идентифицировать плоскость ткани для введения вектора между ПЭС и фоторецепторами. Однако, если жидкость вводится в эту плоскость слишком быстро, растущий пузырь с жидкостью сформирует плотный пузырь и растянет центральную сетчатку, потому что периферическая рубцовая ткань будет препятствовать распространению субретинальной жидкости наружу к периферии сетчатки. Эта реакция растяжения сетчатки имеет два отрицательных последствия. Во-первых, это может напрямую повредить нейросенсорную сетчатку - у С1 папилломакулярный пучок подвергался растяжению, как сообщалось ранее, потому что внешний ядерный слой в этой области был недостаточным, что делало его тоньше, чем центральная сетчатка, и подвергалось большему растяжению при заданном давлении, согласно данным Закон Гука. Во-вторых, более высокое давление жидкости в пузыре приведет к оттоку суспензии вектора обратно через расширенную ретиномотию в стекловидное тело, тем самым уменьшая введенную терапевтическую дозу и увеличивая риск воспаления. Следовательно, после осложнения у С1, при котором вектор вводили вручную из шприца объемом 1 мл, было разработано и испытано новое устройство для введения вектора, которое позволило точно управлять медленной инфузией вектора с помощью педали. Это было успешно использовано у НЗ-7, у которых введение вектора было несложным. Пузырь с тяжелой жидкостью, перфтор-н-октаном (Bausch & Lomb, Рочестер, Нью-Йорк, США) использовали для стабилизации фокальных областей истончения сетчатки у Р10 и Р11 во время инфузии вектора.

[0537] Зрительная функция оценивалась с помощью наиболее скорректированной остроты зрения (BCVA) в соответствии с протоколом исследования раннего лечения

диабетической ретинопатии (ETDRS). Кроме того, тест на контрастную чувствительность Пелли-Робсона проводился при исходном уровне, через 1 год и 2 года. Тестирование микропериметрии с использованием микропериметра MAIA (CenterVue SpA, Падуя, Италия) следовало протоколу, описанному ранее [MacLaren et al., 2014], за исключением H3-7, где использовались стандартные серийные центральные сетки 20° (38 стимулов). Для участников с сильным ограничением поля зрения, которые могли достичь едва обнаруживаемой или средней пороговой чувствительности 0 дБ на сетке 20° (H4-6), вместо этого использовалась центральная сетка 10°. После субъективных сообщений об улучшении цветового зрения у L3, оценка цветового зрения с использованием теста Farnworth-Munsell со 100 оттенками (FM100) была добавлена в изменение протокола и включена для H1-7. В то время как H2, H5, H6 и H7 сообщали о дальнейших субъективных описаниях улучшенного восприятия цвета глазом, который подвергался лечению, испытание оказалось трудным для выполнения у пациентов с выраженной потерей поля зрения. Анатомическая оценка включала оптическую когерентную томографию (ОСТ) спектральной области с использованием Spectralis (Heidelberg Engineering, Гейдельберг, Германия) и визуализацию автофлуоресценции глазного дна (AF) (BluePeak, Heidelberg Engineering). Иммунологические тесты для оценки ответа Т-клеток на AAV (ELISpot) следовали методике, описанной ранее [MacLaren et al., 2014].

[0538] Из-за эффекта насыщения включения в исследование глаз с близкой к максимальной остротой зрения, баллы ETDRS оказались искаженными (критерий нормальности Шапиро-Уилка при 0,05 альфа) и, следовательно, представлены как медианные значения с межквартильными диапазонами (IQR). Изменения между и глазами, который подвергался лечению, и контрольными глазами сравнивали с использованием рангового критерия Вилкоксона. Было обнаружено, что данные микропериметрии и анатомические оценки имеют нормальное распределение и сравниваются с использованием парного t-критерия.

Результаты

[0539] Всего было набрано 14 пациентов, 13 из которых получали либо 1×10^{10} гч (L1-5), либо 1×10^{11} гч (C2 и H1-7) вектора AAV.REP1 (**Таблица 59**). Были отмечены значительные нежелательные явления (НЯ), связанные с введением вектора, у двух пациентов: C1 и C2. У C1 хирургическое осложнение привело к истончению сетчатки и введению недостаточной дозы вектора. У C2 наблюдалось значительное воспаление сетчатки через 2 недели после операции, которое, скорее всего, было связано с

вектором. У Н3 субретинальный пузырь воздуха препятствовал введению вектора с первой попытки, но повторная доставка вектора была успешной без осложнений в более поздний срок. Изменение протокола, особенно в отношении хирургического вмешательства, было разработано, чтобы уменьшить вероятность возникновения этих нежелательных явлений в будущем. Комитет по этике одобрил набор еще двух пациентов, тем самым обеспечив 12 пациентов, получавшим лечение в соответствии с протоколом, с двухлетним наблюдением, в том числе 5 пациентов с низкой дозой (L1-5) и 7 с высокой дозой (H1-7).

[0540] Таблица 59: Демографические характеристики участников исследования.

ID	Возраст (лет)	Мутация <i>СНМ</i>	Прогнозируемая последовательность белка	Глаз, который подвергался лечению	Доза вектора (гв)
L1	63	c.940+2T>C	мутация сайта донора сплайсинга - интрон 7 (+2)	левый	1x10 ¹⁰
L2	47	c.189+1G>C	мутация сайта донора сплайсинга - интрон 3 (+1)	левый	1x10 ¹⁰
L3	36	c.492_493delGA	N165Cfs*8 (экзон 6)	левый	1x10 ¹⁰
L4	55	c.535_538delGAAA	E179Tfs*17	левый	1x10 ¹⁰
L5	41	c.529delG	E177Kfs*20	правый	1x10 ¹⁰
C1	57	c.819+1G>T	мутация сайта донора сплайсинга - интрон 6 (+1)	левый	6x10 ⁹
C2	44	c.130G>T	G44* (экзон 3)	левый	1x10 ¹¹
H1	38	c.799C>T	R267* (экзон 6)	левый	1x10 ¹¹
H2	43	c.877C>T	R293* (экзон 7)	левый	1x10 ¹¹
H3	41	c.1264C>T	Q422* (экзон 10)	правый	1x10 ¹¹
H4	59	c.1335_1336insA	R446Tfs*16	правый	1x10 ¹¹
H5	72	c.757C>T	R253* (экзон 6)	правый	1x10 ¹¹
H6	55	c.799C>T	R267* (экзон 6)	левый*	1x10 ¹¹
H7	24	c.525_526delAG	E177Kfs*6	правый	1x10 ¹¹

Все участники - мужчины европеоидной расы с генетически подтвержденной хороидеремией и перечислены в порядке прохождения генной терапии. L1-5 и H1-7 прошли несложную генную терапию с низкой и высокой дозами соответственно. Операция у C1 осложнилась растяжением сетчатки, что привело к недостаточной дозировке. У C2 развилось заметное послеоперационное внутриглазное воспаление, которое привело к резкому снижению остроты зрения с последующим медленным восстановлением после того, как воспаление рассосалось.

[0541] *Оценка остроты зрения*

[0542] В общей сложности 12 человек получили вектор AAV.REP1 путем субретинальной инъекции без осложнений, а 2-е были пролечены вне протокола из-за нежелательных явлений. В конечной точке двухлетнего испытания средняя острота зрения на 14 глазах, которые подвергались лечению, улучшилась на 4,5 буквы (IQR: от -2,0 до 8,8), а на 14 глазах, которые не подвергались лечению, снизилась на -1,5 буквы (IQR: от -5,0 до 0,0.). Следовательно, в целом предпочтение отдается глазам, которые подвергались лечению, несмотря на значительные осложнения у 2 пациентов (ранговый критерий Вилкоксона, $W=68$, $z=2,12$, $p=0,034$). В дальнейшем, с целью оценки эффективности исследуемого лекарственного препарата (ИЛП), о 12 пациентах, получающих генную терапию согласно протоколу (L1-5 и H1-7), сообщают отдельно от 2 пациентов с хирургическими или медицинскими осложнениями (C1 и C2).

[0543] Из-за задержки в середине испытания для оптимизации хирургической техники, первые 5 пациентов (L1-5) имеют 5-летний период наблюдения, тогда как последние 5 (H3-7) только недавно достигли 2-летнего периода наблюдения. с промежуточными периодами наблюдения между ними. Таким образом, данные представлены двумя способами: первый для всех 12 пациентов через 2 года в соответствии с исходной конечной точкой, определенной в протоколе, а второй - с конечной точкой наблюдения, для которой L1-5 и H1-2 продлевается за 2 года.

[0544] Через 2 года медиана остроты зрения улучшилась на 5,5 букв (IQR: от 2,5 до 9,0) на 12 глазах, которые подвергались лечению, (ранговый критерий Вилкоксона, $W=60$, $z=2,33$, $p=0,020$). Напротив, в глазах, которые не подвергались лечению, за этот период наблюдалась небольшая потеря -1,0 букв (IQR: от -5,0 до +1,0) (Таблица 60 и Фиг. 20). Это представляет собой медианное увеличение на 4,5 буквы (IQR: от 2,0 до 14,0) для глаз, которые подвергались лечению, по сравнению с другими глазами, которые не подвергались лечению (ранговый критерий Вилкоксона, $W=76$, $z=2,96$, $p=0,003$). При последнем наблюдении, глаза, которые подвергались лечению, показали увеличение медианы на 6,5 букв (IQR: от 3,8 до 10,3), тогда как глаза, которые не подвергались лечению, показали потерю -2,0 буквы (IQR: от -5,3 до 0,3). Это представляет собой медианное увеличение на 8 букв (IQR: от 4,0 до 18,5) для глаза, который подвергся лечению, по сравнению с другим глазом, который не подвергся лечению (ранговый критерий Вилкоксона, $W=78$, $z=3,04$, $p=0,002$).

[0545] К последнему наблюдению, острота зрения поддерживалась или повышалась во всех 12 глазах, которые подвергались лечению генной терапией, но 8 из 12 глаз, которые не подвергались лечению, ухудшились в разной степени в течение этого периода. Острота зрения - это биологический показатель, который может варьироваться, но тестирование проводилось стандартным образом, и ни один из глаз, которые не подвергались лечению, не показал более одной строки (> 5 букв) через 24 месяца. Напротив, 6 из 12 глаз, которые не подвергались лечению, (50%) показали увеличение более чем на одну строку через 24 месяца. По сравнению с глазом, который не подвергался лечению, прирост в две строки или более наблюдался у 4 из 12 пациентов через 24 месяца (**Таблица 60: Жирный шрифт**). К последнему наблюдению это число увеличилось до 6 из 12 (50%), причем 4 из них имели прирост в три строки или больше (≥ 15 букв) в пользу глаз, которые подвергались лечению. (**Таблица 60: Жирный шрифт**). При последнем наблюдении острота зрения на глазу, который подвергался лечению, улучшилась по сравнению с глазом, который не подвергался лечению, у каждого из 12 пациентов (медиана = 8,5 букв, IQR: от 4,0 до 18,5), что эквивалентно среднему приросту на 15,9 букв (> 3 строк) в пользу глаз, получающих генную терапию

[0546] Таблица 60: Результаты оценки остроты зрения (наиболее скорректированные баллы по шкале ETDRS) через 2 года и последнее наблюдение для всех 12 участников. гч = геномные частицы вектора AAV2.REP1; Мед = медиана; ТЕ = глаз, который подвергался лечению; СЕ = контрольный глаз; мес. = месяцы; г = годы; Разн. = разница между глазами; Наблюд.= наблюдение; изменения зрения на 2 строки (10 букв) или больше между глазами выделены жирным шрифтом.

		Низкая доза (1×10^{10} гч)					Низкая доза (1×10^{11} гч)							Мед
		L1	L2	L3	L4	L5	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	
Исходное значение	ТЕ	23	79	89	53	79	77	76	70	61	67	60	39	68,5
	СЕ	58	82	85	76	83	87	88	88	57	74	26	87	82,5
24 мес.	ТЕ	41	73	94	61	76	78	80	79	70	73	63	53	73,0
	СЕ	62	77	85	70	78	86	88	87	62	78	6	84	78,0
Изменение (24 мес.)	ТЕ	18	-6	5	8	-3	1	4	9	9	6	3	14	+5,5
	СЕ	4	-5	0	-6	-5	-1	0	-1	5	4	-20	-3	-1,0
Разн. (24 мес.)		14	-1	5	14	2	2	4	10	4	2	23	17	+4,5
Последнее наблюд.	ТЕ	48	79	93	73	84	80	83	79	70	73	63	53	76,0
	СЕ	0	77	86	73	77	86	88	87	62	78	6	84	77,5

Изменение (последнее наблюд.)	TE	25	0	4	20	5	3	7	9	9	6	3	14	+6,5
	SE	-58	-5	1	-3	-6	-1	0	-1	5	4	-20	-3	-2,0
Разн. (последнее наблюд.)		83	5	3	23	11	4	7	10	4	2	23	17	+8,5
Последнее наблюд. (г)		5	5	5	5	5	4	4	2	2	2	2	2	4,0

[0547] Микропериметрия оценивает среднюю чувствительность сетчатки в более широкой области макулы, чем острота зрения, но требует больше времени для выполнения и требует концентрации, особенно у пациентов с плохой фиксацией [Jolly et al., 2017]. Средняя чувствительность сетчатки в глазах, которые подвергались лечению, составляла $4,0 \pm 0,7$ децибела (дБ) на исходном уровне и $3,3 \pm 0,6$ через 2 года, что представляет собой небольшое статистически незначимое снижение ($p = 0,07$). Напротив, для глаз, которые не подвергались лечению, значительно снизилось с $4,8 \pm 0,8$ дБ на исходном уровне до $3,3 \pm 0,7$ дБ через 2 года ($p = 0,004$). Хотя наблюдалось относительное усиление в пользу глаз, которые подвергались лечению, по сравнению с глазами, которые не подвергались лечению, $0,8 \pm 0,53$ дБ (95% CI: от 0,3 до 1,8 дБ) в конечной точке 2-летнего исследования, оно не было статистически значимым ($p = 0,17$). Данные и промежуточный анализ за 1-й год показаны на Фиг. 21. На этом этапе средняя потеря чувствительности сетчатки в глазах, которые подвергались лечению, была меньше, чем в глазах, которые не подвергались лечению, на $0,9 \pm 0,5$ дБ (95% CI: от 0,0 до 1,8 дБ), что позволяет предположить, что улучшение по сравнению с глазом, который не подвергался лечению, наблюдаемое через 2 года, может быть длительным.

[0548] Микропериметрия также дает полезную информацию о фиксации, то есть о локусе сетчатки, который имеет максимальную чувствительность (обычно фовеальная зона). У всех пациентов, кроме L1, сохранялась некоторая степень фовеальной или парафовеальной фиксации, что согласуется с центростремительной природой потери поля зрения при этом заболевании. Ранее было отмечено, что L1 изменил свою фиксацию (или предпочтительный локус сетчатки), чтобы использовать этот островок, который подвергался лечению, минуя островок сетчатки, который не подавался лечению. У этого пациента это сохранялось до 5 лет, что соответствовало устойчивому улучшению остроты зрения.

[0549] *Сохранение структуры сетчатки:* Анатомическая оценка включала оптическую когерентную томографию (ОСТ), которая дает вид в поперечном сечении для измерения толщины сетчатки и автофлуоресценции, которая генерирует карту, которая может использоваться для оценки сохранившейся области сетчатки. Глаза не были рандомизированы, и у 9 из 12 пациентов, участвовавших в исследовании, для генной терапии был выбран глаз с более высокой остротой зрения. (Таблица 59).

[0550] ОСТ использовалась в первую очередь в целях безопасности для оценки истончения сетчатки, которое могло произойти, например, в результате хирургической травмы или в случае длительного токсического эффекта сверхэкспрессии белка REP1. Средняя толщина 12 глаз, которые подвергались лечению по протоколу, в точке фиксации (по данным микропериметрии) на исходном уровне составляла 224,8 мкм по сравнению с 251,9 мкм в глазах, которые не подвергались лечению. Через 24 месяца средний размер для глаз которые подвергались лечению, уменьшился до 207,7 мкм, а для глаз, которые не подвергались лечению, - до 245,6 мкм, что было статистически значимым ($n = 12$, $p = 0,04$). Однако дальнейший анализ подгрупп показал, что в первых 7 глазах, которым вручную вводили вектор в субретинальное пространство (L1-5 и H1-2), истончение сетчатки было больше в глазах, которые подвергались лечению, (в среднем 23,1 мкм), чем в глазах, которые не подвергались лечению (6,4 мкм) ($n = 7$, $p = 0,02$). Однако в глазах, в которые вводили автоматическую инъекцию, после улучшения системы доставки вектора (H3-7) не было обнаружено существенной разницы ($n = 5$, $p = 0,72$).

[0551] Для измерения площади автофлуоресценции коррелирует с площадью уцелевших фоторецепторов, рассчитанной из множества срезов через зону эллипсоида. Во всей группе из 12 пациентов $81,1 \pm 3,2\%$ площади автофлуоресценции сохранялось в глазах, которые подвергались лечению, тогда как в глазах, которые не подвергались лечению, через 2 года сохранялось $80,8 \pm 2,1\%$, что было примерно одинаково. Однако следует отметить, что уменьшение AF происходит только в большинстве внешних клеток сетчатки на переднем крае дегенерации, и 2 года - недостаточное время для оценки долгосрочных эффектов генной терапии сетчатки на более здоровые центральные зоны. Только у одного пациента (H5) не было заметного снижения (100% сохранение) через 2 года, и оно наблюдалось только на его глазу, который подвергался лечению. Долгосрочное (5 лет) наблюдение за 5 пациентами показало аналогичную картину: $66,1 \pm 5,0\%$ оставшейся аутофлуоресценции в глазах, которые подвергались лечению, по сравнению с $64,9 \pm 3,6\%$ в глазах, которые не подвергались лечению

(Таблица S2B). Однако следует отметить, что это была неоднозначная картина: пациенты с большим увеличением остроты зрения чувствовали себя намного лучше, чем другие. Кроме того, за этот период времени между пациентами наблюдались значительные различия в измеренной скорости дегенерации даже на неоперированных глазах, которая составляла от 58% до 78%. Это подчеркивает необходимость не переоценивать ограниченный нерандомизированный набор данных.

[0552] *Нежелательные явления*

[0553] Все пациенты были включены в исследование без визуальной значимой катаракты на исходном уровне из-за необходимости четкого обзора ретиномии 41-го калибра, но образование катаракты - хорошо известного и почти неизбежного нежелательного явления операции витрэктомии. У 2 участников (H5 и H6) ранее была проведена операция по удалению катаракты. У одного пациента развилась визуальная значимая катаракта, которая была удалена через 1 год после генной терапии (H3), но четыре других пациента (L2, L4, L5, H2) перенесли операцию по удалению катаракты после завершения 2-летнего наблюдения. У остальных пяти пациентов (L1, L3, H1, H4 и H7) операция по удалению катаракты еще не проводилась, хотя у всех есть признаки прогрессирования катаракты по классификации катаракты LOCS III. Во всей группе из 14 пациентов, включая двух пациентов с осложнениями, острота зрения на глазах, которые подвергались лечению, улучшилась по сравнению с глазами, которые не подвергались лечению, за этот период. Принимая во внимание только 12 пациентов, которые прошли неосложненную генную терапию сетчатки без отклонений от протокола, к 2-летней конечной точке остроты зрения на глазах, которые подвергались лечению, улучшилась по сравнению с исходным уровнем. В самый последний проанализированный момент времени, который составляет до 5 лет, все 12 глаз, которые подвергались лечению, сохранили или приобрели остроту зрения выше их исходного уровня, несмотря на различные потери остроты зрения в 8 из 12 глаз, которые не подвергались лечению, в течение этого периода. Благоприятное воздействие на остроту зрения в сочетании с хорошим профилем безопасности требует дальнейшей оценки генной терапии хороидеремии как потенциального лечения в полностью рандомизированном проспективном клиническом исследовании фазы III (см. Пример 14).

[0554] Хотя не было существенной разницы в приросте остроты зрения между когортами с низкой и высокой дозой, следует, однако, отметить, что это была очень небольшая исследуемая группа, в которой только 5 пациентов получали лечение в

низкой дозе (1×10^{10}). Учитывая гетерогенную природу врожденной противовирусной иммунной системы человека, вполне вероятно, что пороговая доза может быть терапевтической у некоторых, но не у всех пациентов. Следовательно, может быть выгодно лечить максимально переносимой дозой, пока не наблюдаются токсические эффекты. Превосходное сохранение зрительной функции у пациентов, получавших высокие дозы, с течением времени поддерживает этот подход. Также стоит иметь в виду, что пациенты, отобранные для этого исследования, как правило, находились на конечной стадии с очень маленькими островками остаточной сетчатки и, следовательно, с небольшим количеством оставшихся клеток сетчатки для лечения. Низкая доза может быть недостаточной для пациентов на более ранней стадии, у которых гораздо большая целевая область будет подвержена воздействию вектора. Также следует отметить, что фармацевтический состав, использованный в этом исследовании, не содержит элементов PRE или WPRE, которые могут улучшить терапевтическую эффективность.

[0555] За исключением H5, дальнейшее сужение области автофлуоресценции у остальных пациентов не соответствовало другим доклиническим моделям, в которых улучшение зрительной функции в результате замены одного гена неизменно связано с замедлением дегенерации сетчатки. Здесь, однако, важно иметь в виду, что прогрессирование дегенерации, измеренное в течение двухлетнего периода времени, происходит только на самых дальних краях дегенерации сетчатки, и эта часть может быть слишком прогрессирующей для излечения. Прирост остроты зрения, напротив, происходил главным образом от центра сетчатки. Также сетчатку при хороидеремии трудно отделить за пределами сохранившейся сетчатки, что приводит к растяжению вышележащего пузыря. Вогнутая форма субретинального пространства увеличит высоту пузыря в центре, который, следовательно, будет последней частью сетчатки, которая снова присоединится по мере реабсорбции жидкости. Это потенциально может обеспечить центр сетчатки несколькими дополнительными часами воздействия вектора по сравнению с крайней периферией. Наконец, следует отметить, что глаза не были рандомизированы, и различия между глазами в области сохранившейся сетчатки, наблюдаемые у некоторых пациентов на исходном уровне, указывают на асимметричную скорость дегенерации. При лечении худшего глаза будет по определению предвзятое отношение к лечению глаза с более быстрой дегенерацией.

[0556] В то время как острота зрения поддерживалась или повышалась во всех глазах, которые подвергались лечению, на протяжении всего исследования, чувствительность

сетчатки, измеренная с помощью микропериметрии, показывала тенденцию к снижению, и хотя численно лучше, чем в глазах, которые не подвергались лечению, статистически значимой разницы между ними не было. Скорее всего, это связано с повышенной вариабельностью выполнения микропериметрии по сравнению с чтением отдельных букв на высококонтрастной таблице для глаз. Тем не менее, тесты имеют небольшие различия в том, что они измеряют. Микропериметрия оценивает функцию сетчатки по многим точкам, усредненным по 10-30 градусам центральной части сетчатки, тогда как острота зрения - это измерение, производимое из одной точки, которая обычно имеет максимальную чувствительность и расположена в центре. Таким образом, поддержание чувствительности сетчатки улучшается благодаря успешной трансдукции всей области, измеряемой вплоть до краев сохранившейся сетчатки. Например, если только 20% пигментных эпителиальных клеток сетчатки централизованно успешно трансдуцируются вектором, этого может быть достаточно, чтобы увидеть увеличение остроты зрения, если эти клетки находятся ниже фовеальной зоны. Однако оставшиеся 80% нетрансдуцированных клеток продолжают дегенерировать, и это снижение со временем отразится в постепенном снижении микропериметрии, но острота зрения останется стабильной. Однако, если генная терапия успешна в остановке дегенерации в успешно трансдуцированных областях, то в конечном итоге останутся только трансдуцированные клетки, и показания микропериметрии затем стабилизируются, чтобы оставаться постоянными с течением времени. Этот эффект «плато» теперь проявляется у L1, который также сохранил прирост остроты зрения и имеет наибольшее время наблюдения. В качестве альтернативы может быть простой фактор, что чувствительность сетчатки, измеренная с помощью микропериметрии, более чувствительна к образованию катаракты, чем острота зрения с высокой контрастностью. Через 2 года после витрэктомии только один из 10 пациентов, получавших лечение по факичным протоколам, перенес операцию по удалению катаракты.

[0557] Успех хирургического вмешательства является критическим фактором при интерпретации результатов этого и любого другого исследования генной терапии, которое включает доставку вектора под сетчатку. Одно потенциально нежелательное явление растяжения сетчатки было связано с хирургическим вмешательством. Другое значительное нежелательное явление - воспаление - может быть в равной степени связано с хирургическим вмешательством, если во время инъекции произошел рефлюкс вектора в стекловидное тело, что, как известно, вызывает воспаление. После

изменения протокола в середине испытания была адаптирована автоматизированная система субретинальной инъекции, которая обеспечила точную и контролируемую доставку вектора в субретинальное пространство. Этому способствовало также интраоперационное сканирование сетчатки (ОСТ), которое предоставило в реальном времени поперечное изображение отслаиваемой сетчатки и помогло идентифицировать субретинальное пространство у некоторых пациентов с более прогрессирующей формой. Эти дополнительные хирургические усовершенствования повысят безопасность будущих исследований генной терапии. Тем не менее, результаты этого клинического исследования фазы I/II показывают, что генная терапия хороидеремии в целом безопасна.

Пример 14: Исследование Близнецов

[0558] Это многоцентровое открытое проспективное двустороннее интервенционное исследование безопасности AAV2-REP1 у взрослых мужчин с генетически подтвержденным СНМ.

[0559] Исследование будет состоять из скринингового визита, за которым последуют 2 периода лечения (период 1 и период 2), до 9 визитов за период (Фиг. 22). Во время скринингового визита субъекты оцениваются на соответствие критериям для обоих глаз. Исследователь назначает порядок, в котором глаза подвергаются лечению (т.е. исследуемый глаз 1 [SE1] и исследуемый глаз 2 [SE2], соответственно), при этом каждому глазу присваивается номер. Это задание выполняется в сотрудничестве с субъектами; однако обычно в первую очередь выбирают для лечения худший глаз. Целевой интервал между хирургической процедурой на SE1 и SE2 определяется во время скринингового визита. За каждым исследуемым глазом наблюдают в течение как минимум 12 месяцев после лечения, до 9 визитов за период лечения: визит 1 (день 0, визит в день инъекции); визит 2 (день 1, контрольный визит после операции); визит 3 (день 3); визит 4 (день 7); визит 5 (день 14); визит 6 (1 месяц); визит 7 (3 месяц); визит 8 (6 месяц) и визит 9 (12 месяц).

[0560] В период 1, визит 1 (день 0, визит в день инъекции в SE1) субъекты подвергаются витрэктомии с отслоением сетчатки и получают субретинальную инъекцию AAV2-REP1 в SE1. Визиты 2–9 проводятся в соответствии с графиком процедур исследования, если в это время не начинается период 2. Офтальмологические оценки во время периода 1, визитов 2–9, выполняются на обоих глазах.

[0561] В период 2, визит 1 (день 0, визит в день инъекции в SE2) субъекты подвергаются витрэктомии с отслоением сетчатки и получают субретинальную

инъекцию AAV2-REP1 в контралатеральный глаз, который не подвергали лечению, (SE2). Субъекты больше не следуют графику визитов периода 1, а вместо этого посещают период 2, визиты 2-9, в соответствии с графиком процедур исследования. Офтальмологические осмотры, запланированные на период 2, визиты 2–9, будут проводиться на обоих глазах.

[0562] На протяжении всего исследования субъектов оценивают на безопасность и эффективность; оценки изложены в графике процедур исследования. Пациентам, у которых развивается катаракта, может быть проведена операция по удалению катаракты, если это будет сочтено клинически необходимым. Если операция по удалению катаракты проводится, она проводится как минимум за 4 недели до 12 месяца (визит 9) для соответствующего глаза.

[0563] Первичной конечной точкой является оценка безопасности после двустороннего введения AAV2-REP1. Вторичные конечные точки исследования включают изменение по сравнению с исходным уровнем остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA), измеренной с помощью таблицы изучения раннего лечения диабетической ретинопатии (ETDRS), изменение аутофлуоресценции (AF) по сравнению с исходным уровнем, изменение спектральной области по сравнению с исходным уровнем в оптической когерентной томографии (SD-OCT) и отклонение от исходного уровня в микропериметрии.

[0564] *Критерии включения:*

[0565] Во время скринингового визита субъекты имеют право на участие в исследовании, если они соответствуют всем следующим критериям включения. Критерии включения: (1) _ готовы и способны дать информированное согласие на участие в исследовании для лечения обоих глаз, (2) пол мужской, возраст ≥ 18 лет, (3) есть генетически подтвержденный диагноз СНМ, (4) есть активное заболевание, клинически видимое в макулярной области обоих глаз, (5) есть BCVA: ≥ 74 букв ETDRS (эквивалентно лучше чем или равно 6/9 или 20/32 по Снеллену, десятичное значение 0,63, LogMar 0,2) в обоих глазах, если не было предшествующего лечения AAV2-REP1 ≥ 74 букв ETDRS (эквивалентно лучше чем или равно 6/9 или 20/32 по Снеллену, десятичное значение 0,63, LogMar 0,2) в глазу, который не подвергался лечению, если предыдущее лечение AAV2-REP1 было получено в альтернативном исследовании. Если ранее в альтернативном исследовании было получено лечение AAV2-REP1, субъекты могут иметь право на участие после утверждения спонсором.

[0566] *Критерий исключения:*

[0567] Во время скринингового визита субъекты не имеют права на участие в исследовании, если они соответствуют любому из следующих критериев исключения. Критерии исключения: (1) есть в анамнезе амблиопию или воспалительное заболевание любого глаза, (2) не желают использовать методы барьерной контрацепции в течение 3 месяцев после лечения AAV2-REP1 на любом глазу, (3) перенесли предыдущие внутриглазные операции на любом глазу в течение 3 месяцев после скринингового визита, (4) имеется какое-либо другое серьезное глазное или неглазное заболевание/расстройство, которое, по мнению исследователя, может подвергнуть субъектов риску из-за участия в исследовании или может повлиять на результаты исследования или способность субъекта участвовать в исследовании, и (5) участвовали в другом исследовании, включающем исследуемый продукт, в течение последних 12 недель или получали терапию на основе генов/клеток в любое время ранее, за исключением лечения в рамках другого исследования с AAV2-REP1. Это серьезное глазное или неглазное заболевание/расстройство, которое, по мнению исследователя, может либо подвергать субъектов риску из-за участия в исследовании, либо может влиять на результаты исследования или способность субъекта участвовать в исследовании, включает, помимо прочего, потенциального субъекта: а) с противопоказанием к пероральному кортикостероиду (например, преднизолон/преднизон), б) с клинически значимой катарактой любого глаза, в) который, по клиническому мнению исследователя, не подходит для операции на сетчатке глаза.

[0568] *Исследуемый продукт, дозировка и способ введения:* Для каждого глаза, субъекты будут подвергнуты витрэктомии и отслоению сетчатки и получают 0,1 мл субретинальной инъекции исследуемого препарата, содержащего 1×10^{11} геномных частиц AAV2-REP1.

[0569] *Критерии оценки:* Оценка безопасности основана на полном офтальмологическом обследовании (включая внутриглазное давление [ВГД], исследование с помощью щелевой лампы, определение степени помутнения хрусталика и дилатационная офтальмоскопия); фотографии глазного дна; сообщении о нежелательных явлениях (НЯ); выделении вектора и отборе образцов на иммуногенность; и показателях жизнедеятельности.

[0570] *Эффективность:* Оценка эффективности основана на BCVA (измеряется с помощью таблицы ETDRS), аутофлуоресценции глазного дна, SD-OCT и микропериметрии.

[0571] *Статистическая методология:* Формальный расчет размера выборки не производился. Значения непрерывных переменных с течением времени приведены с использованием описательной статистики (т.е. среднее значение, стандартное отклонение, 95% доверительный интервал [CI], медиана, Q1, Q3, P05, P95, мин и макс). Категориальные переменные описываются с течением времени с помощью подсчетов, процентов и 95% доверительных интервалов. Краткие описания сводятся в таблицу по визиту и глазу. Формальное статистическое тестирование не проводится. НЯ приведены по системным классам органов, предпочтительным терминам и глазам. Приведены как количество субъектов, так и количество глаз, испытывающих НЯ, а также количество явлений. Аналогичные краткие описания будут подготовлены для НЯ, связанных с исследуемым препаратом/процедурой, НЯ, приводящих к прекращению приема, и серьезных НЯ. НЯ также приведены по максимальной степени тяжести, связи с исследуемым препаратом/процедурой, а также по времени до начала и устранения. Будут описаны профили выделения вектора и иммунного ответа. Остальные оценки безопасности анализируются с использованием описательной статистики.

[0572] СНМ является неизлечимым, и до разработки фармацевтических композиций по настоящему описанию лечение было в лучшем случае поддерживающим.

Фармацевтическая композиция вводится субъектам этого испытания, AAV2-REP1 представляет собой частицу AAV2, инкапсулирующую 1,962 т.п.н. комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) гена REP1 человека дикого типа. AAV2-REP1 экспрессирует высокие уровни белка REP1 человека, восстанавливает REP1 в фибробластах с СНМ человека, обеспечивает функциональное восстановление человеческих клеток с СНМ, экспрессирует белок в сетчатке мышей с СНМ *in vivo* и не токсичен при сверхэкспрессии на одну логарифмическую единицу. Кроме того, сверхэкспрессия белка REP1 человека не оказывает значительного отрицательного воздействия на функцию сетчатки.

[0573] Учитывая, что СНМ влияет на оба глаза, это исследование демонстрирует двустороннее введение AAV2-REP1. Новые данные доклинических и клинических исследований векторов AAV2 демонстрируют, что векторы AAV2 вызывают минимальный иммунный ответ, в том числе после двустороннего введения. Цель этого исследования - предоставить важную информацию о безопасности и переносимости последовательного двустороннего лечения AAV2-REP1.

[0574] *Введенное лечение*

[0575] Подходящим субъектам проводят витрэктомию и отслоение сетчатки в каждом глазу. В период 1, визит 1 (день 0, визит в день инъекции в SE1) субъекты получают 0,1 мл субретинальной инъекции исследуемого препарата, содержащего 1×10^{11} гч AAV2-REP1, в SE1. В период 2, визит 1 (день 0, визит в день инъекции в SE2), субъекты получают ту же субретинальную инъекцию AAV2-REP1 в SE2.

[0576] *Описание фармацевтической композиции*

[0577] Вектор AAV2 содержит рекомбинантную кДНК человека, кодирующую REP1 (AAV2-REP1). Векторный геном (AAV2-CBA-hREP1-WPRE-BGH) состоит из кассеты сильной конститутивной экспрессии, гибридного промотора CBA, кДНК человека, кодирующей REP1, модифицированной последовательности посттранскрипционного регуляторного элемента (WPRE) вируса гепатита сурка и последовательности полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-polyA), фланкированной инвертированными концевыми повторами AAV2. Фрагмент кДНК был первоначально выделен из библиотеки кДНК сетчатки человека здоровых людей.

[0578] Лекарственный продукт AAV2-REP1 приготовлен в виде стерильного 20 мМ раствора с трис-буфером, рН 8,0 и содержит 1 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl и 0,001% PF68. Лекарственный продукт представляет собой прозрачную или слегка опалесцирующую бесцветную суспензию, прошедшую стерильную фильтрацию, с целевой концентрацией 1×10^{12} гч/мл.

[0579] AAV2-REP1 поставляется в стерильных флаконах с пробками и крышками. На каждый глаз, подлежащий лечению, поставляется 0,3 мл суспензии вектора. Перед отправкой каждый флакон помещается в помеченный вторичный контейнер. Лекарственный продукт следует хранить при температуре $\leq -60^\circ \text{C}$ ($\leq -76^\circ \text{F}$) в морозильной камере с контролируемым доступом и контролем температуры.

[0580] *Процедура витрэктомии и введение AAV2-REP1*

[0581] Инъекция AAV2-REP1 выполняется квалифицированным и опытным ретинологом. Из-за сложности и непредсказуемости отслоения сетчатки при СНМ, при котором сетчатка и сосудистая оболочка могут быть чрезвычайно тонкими и местами слиты, была разработана модификация техники субретинальной генной терапии. Она включает выполнение доставки вектора в 2 этапа после витрэктомии. Преимущество двухэтапной процедуры заключается в том, что любые неожиданные осложнения в виде отслоения сетчатки можно лечить консервативно, сводя к минимуму опасения по поводу выхода вектора в стекловидное тело. Кроме того, инъекцию можно было отложить на более поздний срок, если, например, образовался макулярный разрыв

сетчатки, который требует обработки газом. Кроме того, поскольку объем жидкости, необходимый для отделения фовеальной зоны, является переменным, удалив вектор с первого этапа, точную постоянную дозу с точки зрения геномных частиц все же можно вводить в субретинальное пространство.

[0582] Сначала субъекты подвергаются стандартной витрэктомии и отслоению заднего гиалоида в соответствующем исследуемом глазу (Фиг. 23). Все операции будут проводиться с использованием стандартной системы витрэктомии VIOM. Обычно предпочтение отдается наложению швов 23-го калибра, чтобы избежать любого потенциального риска протекания раны. Сетчатку отсоединяют с помощью 0,1–0,5 мл сбалансированного солевого раствора (BSS), вводимого через субретинальную канюлю 41-калибра, подключенную к набору для инъекций в стекловидное тело. Однократная доза AAV2-REP1 будет введена в субретинальную жидкость через то же место входа.

[0583] На втором этапе процедуры канюля BSS удаляется из глаза и AAV2-REP1 подготавливается для инъекции. Дозу $1,0 \times 10^{11}$ гч AAV2-REP1 вводят в субретинальное пространство через то же место входа. Вектор необходимо набрать в шприц на 1 мл, чтобы избежать образования пузырьков воздуха, и использовать соединитель, чтобы шприц на 1 мл можно было подключить к линии постоянного давления аппарата для витрэктомии. Субретинальная инъекция будет нацелена на любую область макулы, но, если возможно, также будет включать фовеальную зону. В каждом случае вектор вводится таким образом, чтобы субретинальная жидкость перекрывала все краевые границы центральной области, которая еще не подверглась хориоретинальной дегенерации, что определяется по автофлуоресценции глазного дна. После закрытия раны необходимо утилизировать все промывочные жидкости, которые могли пройти через глаз, чтобы ограничить возможное распространение вектора.

[0584] *Сопутствующая терапия:*

[0585] Субъекты не могут участвовать в другом исследовании с участием исследуемого продукта в течение последних 12 недель или получать генную/клеточную терапию в любое время ранее, за исключением случаев, когда они получали лечение в рамках другого исследования с помощью AAV2-REP1. На протяжении исследования исследователи могут назначать любые сопутствующие лекарства или способы лечения, которые считаются необходимыми для оказания адекватной поддерживающей терапии. Подробная информация о сопутствующих лекарствах собирается во время скринингового визита и обновляется во время каждого

визита в рамках исследования (включая визит ЕТ, если применимо). Сопутствующие лекарства (включая пероральные кортикостероиды), принимаемые во время исследования, должны быть зарегистрированы в медицинских записях субъекта и в eCRF; исключением являются любые лекарства, используемые в ходе процедуры исследования (например, анестезия, глазные капли для расширения глаз).

[0586] Чтобы свести к минимуму воспаление, вызванное хирургическим вмешательством, и потенциальные или неожиданные иммунные реакции на вектор/трансген, всем субъектам перед каждой операцией будет назначен 21-дневный курс перорального приема преднизона/преднизолона. Следовательно, для каждой операции это будет преднизон/преднизолон в дозе 1 мг/кг/день в общей сложности в течение 10 дней (начиная за 2 дня до инъекции вектора, в день инъекции, и в течение 7 дней после); затем 0,5 мг/кг/день в течение 7 дней; 0,25 мг/кг/день в течение 2 дней; и 0,125 мг/кг/день в течение 2 дней (всего 21 день). Подробности использования кортикостероидов записываются каждым субъектом в дневник.

[0587] *Процедуры исследования*

[0588] При каждом визите в рамках исследования следует стараться выполнять все процедуры на обоих глазах.

[0589] *Скрининговый визит*

[0590] Исследователь объясняет цель исследования, процедуры и обязанности каждого потенциального субъекта. Процедуры скрининга будут состоять из следующего (все офтальмологические оценки будут проводиться на обоих глазах): демографические данные, медицинский и глазной анамнез, основные показатели жизнедеятельности, вес, отбор проб на выделение вектора - кровь, слезы (оба глаза), моча, слюна, отбор проб на иммуногенность (иммуноферментный анализ [ИФА] и иммуноферментный анализ [ELISPOT]), BCVA, полное офтальмологическое обследование (включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна), SD-OCT, автофлуоресценция, микропериметрия, цветная фотография глазного дна с 7 полями (включая стереофотографии для полей 1, 2 и 3), мониторинг серьезных НЯ (СНЯ), обзор лекарств.

[0591] Субъектам, которые соответствуют всем критериям включения и ни одному из критериев исключения, будет присвоен номер субъекта, и они будут включены в исследование. Исследователь назначает порядок, в котором обрабатываются глаза (т.е. SE1 и SE2, соответственно). Это будет сделано в сотрудничестве с субъектом;

тем не менее, для лечения обычно выбирают худший глаз. Целевой интервал между хирургической процедурой на SE1 и SE2 определяется во время этого визита.

[0592] Предполагается, что для каждого субъекта интервал между лечением SE1 и SE2 будет составлять от нескольких недель до месяцев. Хотя этот интервал определяется в каждом конкретном случае, следует постараться составить график различных интервалов лечения (например, с интервалом 1, 3 или 6+ месяцев), чтобы лучше охарактеризовать иммунологический профиль и профиль безопасности последовательного введения лечения.

[0593] Следующий визит в рамках исследования (период 1, визит 1) должен быть запланирован в течение 10 недель после скринингового визита. Субъекты будут посещать визиты 2-9 периода 1, если не начнется второй визит для операции (период 2, визит 1), которой будет означать начало 2-го периода исследования. Учитывая, что время второго визита для операции (период 2, визит 1) будет варьироваться между субъектами, продолжительность периода исследования 1 также будет различной.

[0594] Субъектам назначают два 21-дневных курса пероральных кортикостероидов (например, преднизолон/преднизон) и инструктируют начать прием препарата за 2 дня до следующей

операции: период 1, визит 1 для SE1 и период 2, визит 1 для SE2. Субъектам будут выдаваться дневники, в которых будет фиксироваться соответствие кортикостероидов в течение каждого 21-дневного периода. Субъектам рекомендуется использовать барьерные контрацептивы в течение 3 месяцев с момента начала лечения.

[0595] График процедур идентичен для периодов 1 и 2; в течение каждого периода процедуры должны проводиться как на SE1, так и на SE2.

[0596] Если субъект ранее участвовал в клиническом испытании AAV2-REP1 для лечения СНМ и получил AAV2-REP1 в один глаз, глазу, который не подвергался лечению, будет присвоен статус SE2 во время скринингового визита, и субъект немедленно перейдет в период 2.

[0597] *Период 1 и 2, визит 1 (день 0, визит в день инъекции)*

[0598] На визите 1 (день 0, визит в день инъекции) выполняются следующие оценки: полное офтальмологическое обследование (включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна), мониторинг НЯ/СНЯ и обзор сопутствующих лекарств (включая обзор дневника кортикостероидов).

[0599] Затем субъекты подвергаются витректомии и получают субретинальную инъекцию объемом 0,1 мл AAV2-REP1, содержащую 1×10^{11} гч, в их первый (SE1) глаз.

[0600] Субъекты тщательно наблюдаются на предмет возникновения НЯ во время процедуры. Субъекты возвращаются в исследовательский центр через 1, 3, 7 и 14 дней после операции для послеоперационного наблюдения (визит 2 [день 1], визит 3 [день 3], визит 4 [день 7] и визит 5 [день 14], соответственно).

[0601] Чтобы обеспечить точную характеристику профиля безопасности и иммуногенности AAV2-REP1, лечение SE2 не должно проводиться, если предыдущая внутриглазная операция была выполнена на том же глазу в течение 3 месяцев до запланированной даты лечения. Если внутриглазная операция произошла в течение 3 месяцев, лечение SE2 следует отложить до тех пор, пока не пройдет 3-месячный интервал и не наступит полное послеоперационное восстановление глаза.

[0602] *Период 1 и 2, визит 2 (послеоперационный визит в день 1)*

[0603] Во время визита 2 для каждого глаза проводится оценка состояния и процедуры. Во время визита 2 (день 1) субъекты возвращаются в исследовательский центр для своего первого послеоперационного визита по поводу того же глаза, на котором была сделана операция во время визита 1 (период 1 [SE1] или период 2 [SE2]). Выполняются следующие оценки: показатели жизнедеятельности, отбор проб на выделение вектора - кровь, слезы (оба глаза), моча, слюна, отбор проб на иммуногенность (ИФА и ELISPOT), BCVA, полное офтальмологическое обследование (включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна), SD-OCT, мониторинг НЯ/СНЯ, обзор лекарств (включая обзор дневника кортикостероидов).

[0604] *Период 1 и 2, визит 3 (день 3)*

[0605] Во время визита 3 (день 3) для каждого глаза проводится оценка состояния и процедуры. Во время визита 3 (день 3) субъекты возвращаются в исследовательский центр для своего второго послеоперационного визита по поводу того же глаза, на котором была сделана операция во время визита 1 (период 1 [SE1] или период 2 [SE2]). Будут выполнены следующие оценки: показатели жизнедеятельности, отбор проб на выделение вектора - кровь, слезы (оба глаза), моча, слюна, отбор проб на иммуногенность и, BCVA, полное офтальмологическое обследование (включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное

исследование глазного дна), SD-OCT, мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств (включая обзор дневника кортикостероидов).

[0606] *Период 1 и 2, визит 4 (день 7)*

[0607] Во время визита 4 (день 7 ± 1 день) для каждого глаза проводится оценка состояния и процедуры. Во время визита 4 (день 7 ± 1 день) субъекты возвращаются в исследовательский центр для своего третьего послеоперационного визита по поводу того же глаза, на котором была сделана операция во время визита 1 (период 1 [SE1] или период 2 [SE2]).

Будут выполнены следующие оценки: показатели жизнедеятельности, отбор проб на выделение вектора - кровь, слезы (оба глаза), моча, слюна, отбор проб на иммуногенность (ИФА и ELISPOT), BCVA, полное офтальмологическое обследование (включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна), SD-OCT, автофлуоресценция, мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств (включая обзор дневника кортикостероидов).

[0608] *Период 1 и 2, визит 5 (день 14)*

[0609] Во время визита 5 (день 14 ± 3 дня) для каждого глаза проводится оценка состояния и процедуры. Во время визита 5 (день 14 ± 3 дня) субъекты возвращаются в исследовательский центр для своего четвертого послеоперационного визита по поводу того же глаза, на котором была сделана операция во время визита 1 (период 1 [SE1] или период 2 [SE2]). Будут выполнены следующие оценки: показатели жизнедеятельности, отбор проб на выделение вектора - кровь, слезы (оба глаза), моча, слюна, отбор проб на иммуногенность (ИФА и ELISPOT), BCVA, полное офтальмологическое обследование (включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна), SD-OCT, автофлуоресценция, мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств (включая обзор дневника кортикостероидов)

[0610] *Период 1 и 2, визит 6 (месяц 1) и визит 7 (месяц 3)*

[0611] Во время визита 6 (месяц 1 ± 7 дней) и визита 7 (месяц 3 ± 14 дней) для каждого глаза проводится оценка состояния и процедуры. Выполняются следующие оценки: показатели жизнедеятельности, отбор проб на выделение вектора - кровь, слезы (оба глаза), моча, слюна, отбор проб на иммуногенность (ИФА и ELISPOT), BCVA, полное офтальмологическое обследование (включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна), SD-OCT,

автофлуоресценция, микропериметрия, мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств (включая обзор и возврат дневника кортикостероидов).

[0612] *Период 1 и 2, визит 8 (месяц 6) и визит 9 (месяц 12)*

[0613] Во время визита 8 (месяц 6 ± 14 дней) и визита 9 (месяц 12 ± 14 дней) для каждого глаза проводится оценка состояния и процедуры. Выполняются следующие оценки: показатели жизнедеятельности (визит 9, только месяц 12), отбор проб на иммуногенность (ИФА и ELISPOT), BCVA, полное офтальмологическое обследование (включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна), SD-OCT, автофлуоресценция, микропериметрия, цветная фотография глазного дна с 7-полями (включая стереофотографии для полей 1, 2 и 3) (визит 9, только месяц 12), мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств.

[0614] *Досрочное прекращение*

[0615] В случае, если субъект прекращает исследование в любое время, исследовательский центр должен приложить все разумные усилия для обеспечения проведения визита ET. Должны быть выполнены следующие оценки (все офтальмологические оценки будут проводиться на обоих глазах): показатели жизнедеятельности, отбор проб на выделение вектора - кровь, слезы (оба глаза), моча, слюна (только если визит ET происходит в течение 3 месяцев после лечения), отбор проб на иммуногенность (ИФА и ELISPOT), BCVA, полное офтальмологическое обследование (включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна), SD-OCT, автофлуоресценция, микропериметрия, цветная фотография глазного дна с 7 полями (включая стереоскопические фотографии для полей 1, 2 и 3), мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств.

[0616] *Нежелательные явления*

[0617] НЯ - это любое нежелательное медицинское явление у субъекта клинического исследования, которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с исследуемым лекарством/хирургической процедурой. Следовательно, НЯ может быть любым неблагоприятным и непреднамеренным признаком (включая аномальные лабораторные данные), симптомом или заболеванием, временно связанным с использованием исследуемого препарата/хирургической процедуры, независимо от того, связаны ли они с исследуемым препаратом или с хирургической процедурой,

описанной в этом протоколе. НЯ также должны включать любое ранее существовавшее состояние (кроме СНМ) или заболевание, которое ухудшается во время исследования (т.е. увеличивается по частоте или интенсивности).

[0618] *Серьезное нежелательное явление*

[0619] СНЯ определяется как любое неблагоприятное медицинское происшествие, которое: приводит к смерти, опасно для жизни, требует госпитализации в стационар или продления существующей госпитализации, приводит к стойкой или значительной инвалидности/недееспособности, является врожденной аномалией/врожденным дефектом, приводит к потере зрения или угрожает зрению, является другим важным медицинским явлением (ями). Термин «опасный для жизни» в определении «серьезного» относится к явлению, при котором субъект находится под угрозой смерти во время явления. Это не относится к явлению, которое гипотетически могло бы вызвать смерть, если бы оно было более серьезным. Госпитализация по поводу ранее существовавшего состояния, включая плановые процедуры, состояние которого не ухудшилось, не является СНЯ. Другие явления, которые могут не привести к смерти, не опасны для жизни или не требуют госпитализации, могут рассматриваться как СНЯ, когда, на основании соответствующего медицинского заключения, явление может поставить под угрозу субъекта и может потребовать медицинского или хирургического вмешательства для предотвращения одного из результатов, перечисленных выше.

[0620] О следующих явлениях потери зрения или угрожающих зрению явлениях следует сообщать как о СНЯ: устойчивое снижение VA на ≥ 15 букв на таблице ETDRS по сравнению с исходным уровнем, за исключением явлений, связанных с операцией. Устойчивый определяется как продолжающийся 48 часов или более до восстановления; восстановление, определяемое как VA, вернулось в пределы 5 букв от исходного уровня VA.

[0621] Связанные с хирургическим вмешательством явления снижения VA определяются как уменьшение VA, происходящее в тесной временной ассоциации (в течение <24 часов) с хирургическим введением исследуемого препарата и которое восстанавливается на 7-й день (период 1/2, визит 4) после операция. Об этих явлениях нельзя сообщать как о НЯ или СНЯ. Однако о них следует сообщать как о НЯ, если, по мнению исследователя, их развитие с точки зрения продолжительности или тяжести не может быть объяснено процедурой. Это может включать явления, когда патологическое течение послеоперационного снижения VA связано с другим осложнением, связанным с операцией или исследуемым препаратом, или когда

патологическое течение послеоперационного снижения VA может быть связано с другой идентифицируемой причиной, но не ограничивается ими. НЯ являются те, которые, по мнению исследователя, фактически или потенциально требуют какого-либо хирургического или медицинского вмешательства для предотвращения необратимой потери зрения.

[0622] *Лабораторные оценки*

[0623] *Выделение вектора*

[0624] Образцы крови, слез (оба глаза), мочи и слюны собираются и тестируются с использованием соответствующего анализа для доказательства выделения и рассеивания вектора.

[0625] *Иммуногенность*

[0626] Для оценки иммуногенности кровь будет собираться во время, указанное в Таблице 61 (График процедур исследования). Планируются иммуноанализы для оценки антител и клеточных ответов на AAV2-REP1. Анализы ELISPOT будут использоваться для опосредованных Т-клетками иммунных ответов на трансген, а ответы антител будут анализироваться с использованием методов на основе ИФА.

[0627] *Показатели жизнедеятельности*

[0628] Показатели *жизнедеятельности* (пульс, систолическое и диастолическое артериальное давление) будут измеряться во время, указанное в Таблице 61 (График процедур исследования). Измерение показателей жизнедеятельности следует проводить после того, как пациент посидит не менее 5 минут.

[0629] *Полное офтальмологическое обследование*

[0630] Полное офтальмологическое обследование будет выполнено для обоих глаз во время, указанное в Таблице 61 (График процедур исследования). Каждое офтальмологическое обследование будет включать ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, определение степени помутнения хрусталика и расширенную офтальмоскопию. Одинаковые устройства щелевой лампы и одинаковые условия освещения должны использоваться во время визитов в рамках исследования для любого субъекта. В дополнение к параметрам, перечисленным выше, субъектов тщательно обследуют на наличие внутриглазного воспаления после введения вектора. Катаракта также может развиваться в результате процедуры витрэктомии и потенциально может повлиять на VA. Поэтому дооперационная оценка степени помутнения и цвета хрусталика должна быть задокументирована. Пациентам, у которых развивается катаракта, может быть проведена операция по удалению

катаракты, если это будет сочтено клинически необходимым. Если операция по удалению катаракты проводится, она должна быть выполнена как минимум за 4 недели до 12 месяца (визит 9) для соответствующего глаза.

[0631] *Цветная фотография глазного дна с 7 полями*

[0632] Цветная фотография глазного дна с 7 полями будет выполнена для обоих глаз во время, указанное в Таблице 61 (График процедур исследования). Фотографирование глазного дна будет выполнено сертифицированными специалистами после расширения зрачка. Стереопереизображения должны быть сделаны для полей 1, 2 и 3. Все фотографии глазного дна будут отправлены исследовательскими центрами в Центр центрального чтения (CRC) для проверки; CRC вводит данные в систему электронного сбора данных (EDC). Полные технические характеристики для фотографии глазного дна см. в Руководстве по проведению исследования (которое будет включать процедуры из CRC относительно того, как следует проводить измерения).

[0633] *ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ*

[0634] *Острота зрения*

[0635] Чтобы оценить изменения остроты зрения (VA) за период исследования, оценивается BCVA с использованием таблицы VA ETDRS и выполняется для обоих глаз во время, указанное в Таблице 61 (График процедур исследования). Тест BCVA следует проводить до расширения зрачка, а рефракция на расстоянии должна быть выполнена до измерения BCVA. Изначально буквы читаются на расстоянии 4 метров от таблицы. Если на 4 метрах читается <20 букв, следует провести тестирование на 1 метре. BCVA следует указывать как количество букв, правильно прочитанных субъектом. Оценщики будут иметь соответствующую квалификацию для проведения оценки BCVA.

[0636] *Автофлуоресценция глазного дна*

[0637] Чтобы оценить изменения в области жизнеспособной ткани сетчатки, проводят автофлуоресценцию глазного дна на обоих глазах во время, указанное в Таблице 61 (График процедур исследования).

[0638] *Спектральная оптическая когерентная томография (SD-OCT)*

SD-OCT выполняется на обоих глазах во время, указанное в Таблице 61 (График процедур исследования). SD-OCT используется для количественной оценки целостности эллипсоидной зоны и снижения сигнала от внешнего ядерного слоя и сосудистой оболочки. Кроме того, оцениваются фовеальные изменения.

[0639] *Микропериметрия*

[0640] Микропериметрию проводят на обоих глазах во время, указанное в Таблице 61 (График процедур исследования). Микропериметрия проводится для оценки изменений чувствительности сетчатки в макуле.

[0641] Таблица 61: График процедур исследования

Visit	Screening ²	Study Period 1 / Period 2									ET Visit ⁴	Unscheduled Visit ^d
		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9		
Study Day/Month Visit Window	Screening ²	Day 0 Injection Day ^b (≤10 weeks Screening)	Day 1 Post op	Day 3 Post op	Day 7 ± 1d	Day 14 ± 3d	M 1 ± 7d	M 3 ± 14d	M 6 ± 14d	M 12 ± 14d		
Assessment/Procedures (All subjects/eyes)												
Informed Consent	X											
Demography, medical and ocular history	X											
Vital signs (pulse, blood pressure)	X		X	X						X	X	
Weight ^a	X											
Vector shedding sampling ^f	X		X	X	X	X	X	X			X ^g	
Immunogenicity sampling (ELISA and ELISPOT)	X		X		X	X	X	X	X	X	X	
BCVA	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Full ophthalmic exam ^h	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SD-OCT	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X
Autofluorescence	X				X	X	X	X	X	X	X	
Microperimetry	X						X	X	X	X	X	
7-field colour fundus photos ⁱ	X									X	X	
Study drug / sub-retinal injection / vitrectomy / retinal detachment		X										
AE/SAE monitoring ^l	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Concomitant medication ^h	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Пример 15: Исследование Star

[0642] Данное исследование представляет собой открытое многоцентровое глобальное интервенционное исследование с замаскированной оценкой результатов, проспективное, рандомизированное, с параллельным контролем. Исследование состоит из 8 визитов с 12-месячным периодом оценки. Во время скринингового визита/ визита для оценки исходного уровня каждый субъект оценивается на соответствие критериям. Для подходящих субъектов назначается исследуемый глаз, и субъекты рандомизируются в соотношении 2:1:2 для получения высокой дозы AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{11}$ геномных частиц [гч]), низкой дозы AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{10}$ гч) или входят в контрольную группу без лечения.

[0643] Во время визита в день инъекции (визит 2, день 0) субъекты в группах лечения высокой и низкой дозами AAV2-REP1 подвергаются витрэктомии и получают субретинальную инъекцию назначенной дозы препарата AAV2-REP1 в исследуемый глаз двойным слепым методом; затем эти субъекты возвращаются в исследовательский центр для 2-х контрольных послеоперационных визитов в день 1 (визит 3) и день 7 (визит 4). Субъекты в контрольной группе не подвергаются хирургическому вмешательству, не получают какое-либо исследуемое лекарство в исследуемый глаз (например, контрольный исследуемый глаз) и не посещают 2 послеоперационных визита в исследовательский центр. Вместо этого с контрольной группой происходит телефонный контакт из исследовательского центра в день 0 (визит 2), день 1 (визит 3) и день 7 (визит 4). За всеми субъектами наблюдают в течение 12 месяцев с визита 2 (день 0).

[0644] Данные исследования собираются для обоих глаз каждого субъекта. Поскольку лечение AAV2-REP1 требует инвазивной хирургической процедуры под общей анестезией, спонсор, исследователь и субъект демаскируются для процедуры исследования (т. е. витрэктомии и субретинальной инъекции), однако в группах лечения спонсор, исследователь и субъект маскируется для назначенной дозы ($1,0 \times 10^{11}$ гч или $1,0 \times 10^{10}$ гч). Чтобы еще больше минимизировать потенциальную погрешность оценок глаз, которые подвергались и не подвергались лечению, все субъективные офтальмологические оценки во время скринингового визита/ визита для оценки исходного уровня (визит 1) и начиная с 1 месяца (визит 5) и далее (включая оценку первичной конечной точки 12 месяца) будут проводиться маскированным оценщиком.

[0645] На протяжении всего исследования субъектов оценивают на эффективность и безопасность, как указано в Графике процедур исследования. Субъекты, у которых развивается катаракта, могут подвергнуться операции по удалению катаракты, если это будет сочтено клинически необходимым; если операция будет выполнена, ее следует провести как минимум за 4 недели до визита 12-го месяца/в конце исследования (EOS).

[0646] *Субъекты*

[0647] Примерно 140 субъектов рандомизированы в соотношении 2:1:2; 56 субъектов в группе с высокой дозой AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{11}$ гч), 28 субъектов в группе с низкой дозой AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{10}$ гч) и 56 субъектов в контрольной группе без лечения.

[0648] *Критерии включения:* Субъекты имеют право на участие в исследовании, если они соответствуют всем следующим критериям включения: (1) желают и могут дать информированное согласие на участие в исследовании, (2) мужчины и старше 18 лет, (3) имеют генетически подтвержденный диагноз СНМ, (4) имеют активное заболевание, клинически видимое в макулярной области исследуемого глаза, (5) имеют BCVA на уровне 34-73 буквы ETDRS (что эквивалентно остроте зрения по Снеллену хуже или равно 6/12 или 20/40, но не превышает 6/60 или 20/200 остроты по Снеллену) для исследуемого глаза.

[0649] *Критерий исключения:* Субъекты не имеют права на участие в исследовании, если они соответствуют любому из следующих критериев исключения: (1) имеют в анамнезе амблиопию подходящего глаза, (2) не желают использовать барьерные методы контрацепции в течение 3 месяцев при лечении AAV2-REP1, (3) предыдущая внутриглазная операция выполнена на исследуемом глазу в течение 3 месяцев до визита 1, (4) имеют какое-либо другое серьезное глазное или неглазное заболевание/расстройство, которое, по мнению исследователя, может подвергнуть субъектов риску из-за участия в исследовании, или может повлиять на результаты исследования или способность субъекта участвовать в исследовании (включая, помимо прочего, противопоказания к пероральному применению кортикостероидов (например, преднизолона/преднизона), с клинически значимой катарактой, который, по клиническому мнению исследователя, не является подходящим кандидатом для хирургического вмешательства на сетчатке) и (5) участвовали в другом исследовании с участием исследуемого продукта за последние 12 недель или получали генную/клеточную терапию в любое время ранее.

[0650] *Исследуемый продукт, дозировка и способ введения:* Все субъекты, получающие активное лечение, подвергаются витрэктомии и получают

субретинальную инъекцию 0,1 мл исследуемого препарата, содержащего либо высокую дозу ($1,0 \times 10^{11}$ гч) AAV2-REP1, либо низкую дозу ($1,0 \times 10^{10}$ гч) AAV2-REP1 в их исследуемый глаз.

[0651] *Критерии оценки:*

[0652] Первичная конечная точка эффективности - это доля субъектов с улучшением на ≥ 15 букв по сравнению с исходным уровнем остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA) к 12 месяцу, измеренному с помощью таблицы изучения раннего лечения диабетической ретинопатии (ETDRS). Ключевой вторичной конечной точкой является доля субъектов с улучшением BCVA на ≥ 15 букв по сравнению с исходным уровнем к 12 месяцу по сравнению с изменением BCVA за 12 месяцев. Другие вторичные конечные точки включают (1) долю субъектов с увеличением на > 10 букв по сравнению с исходным уровнем BCVA к 12 месяцу, (2) среднее значение среднего изменения BCVA от исходного уровня, полученное за 4, 8 и 12 месяцев, (3) изменение общей площади сохраненной аутофлуоресценции (AF) по сравнению с исходным уровнем на 12-м месяце, (4) изменение по сравнению с исходным уровнем в области сохраненной зоны эллипсоида (спектральная оптическая когерентная томография [SD-OCT]) на 12-м месяце, (5) изменение микропериметрии по сравнению с исходным уровнем на 12-м месяце, (6) изменение по сравнению с исходным уровнем показателя контрастной чувствительности на 12-м месяце, (7) изменение цветового зрения по сравнению с исходным уровнем на 12-м месяце, (8) изменение в тесте скорости чтения по сравнению с исходным уровнем на 12-м месяце, (9) поддержание BCVA на 12-м месяце, измеренного с помощью таблицы ETDRS, (10) изменение в Опроснике оценке состояния зрения на 25 пунктов (VFQ-25) по сравнению с исходным уровнем на 12-м месяце. Конечная точка эффективности исследования включает тангенциальную оценку других анатомических и функциональных показателей результата. Конечная точка безопасности включает оценку оценок безопасности, включая нежелательные явления (НЯ).

[0653] *Эффективность:* Оценка эффективности основана на BCVA, AF глазного дна, SD-OCT, микропериметрии, контрастной чувствительности, цветовом зрении, тестах на скорость чтения, VFQ-25 и остроте зрения при низкой освещенности (LLVA).

[0654] *Безопасность:* Оценка безопасности основана на полном офтальмологическом обследовании (включая внутриглазное давление, исследование с помощью щелевой лампы, определение степени помутнения хрусталика и дилатационная офтальмоскопия), фотографии глазного дна, сообщении о НЯ, иммуногенности и

показателях жизнедеятельности. Любая информация о безопасности, собранная в результате оценок эффективности (например, BCVA), используется при общей оценке безопасности при необходимости.

[0655] *Схема исследования*

[0656] *На Фиг. 24 представлена схема этого исследования.*

[0657] Во время скринингового визита/ визита для оценки исходного уровня (визит 1) каждый субъект оценивается на соответствие критериям для обоих глаз. Если у субъекта есть только один подходящий глаз, этот глаз обозначается как «исследуемый глаз», а другой (неподходящий) глаз обозначается как «другой глаз». Если у субъекта 2 подходящих глаза, выбор «исследуемого глаза» производится на основании клинических данных, и, как правило, он падает на более пораженный глаз. Это решение подробно обсуждается и согласовывается с каждым субъектом в рамках процесса получения информированного согласия. Выбор субъекта рассматривается в случаях, когда дегенерация между двумя глазами относительно симметрична.

[0658] Во время скринингового визита/ визита для оценки исходного уровня подходящие субъекты будут рандомизированы в соотношении 2:1:2 в группу с высокой дозой AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{11}$ гч), в группу с низкой дозой AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{10}$ гч) или в контрольную группу без лечения. Чтобы облегчить понимание схемы исследования, глаза классифицируют на 4 категории в зависимости от назначения группы лечения и назначения исследуемого/другого глаза: AAV2-REP1-исследуемый глаз (включает высокую и низкую дозу); AAV2-REP1-другой глаз (включает высокую и низкую дозу); контрольный исследуемый глаз; и контрольный другой глаз.

[0659] Во время визита в день инъекции (визит 2, день 0) субъекты в группах лечения AAV2-REP1 подвергаются витрэктомии и отслоению сетчатки перед получением субретинальной инъекции с высокой дозой AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{11}$ гч) или низкой дозой AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{10}$ гч) в их исследуемый глаз (то есть, в AAV2-REP1-исследуемый глаз) двойным слепым методом; затем эти субъекты возвращаются в исследовательский центр для 2-х контрольных послеоперационных визитов в день 1 (визит 3) и день 7 (визит 4). Субъекты в контрольной группе не подвергаются хирургическому вмешательству, не получают какое-либо исследуемое лекарство в исследуемый глаз и не посещают 2 послеоперационных визита в исследовательский центр для обеспечения безопасности. Вместо этого с контрольной группой происходит телефонный контакт из исследовательского центра в день 0 (визит 2), день 1 (визит 3)

и день 7 (визит 4). За всеми субъектами наблюдают в течение 12 месяцев с визита 2 (день 0).

[0660] Данные исследования собираются для обоих глаз каждого субъекта. Поскольку лечение AAV2-REP1 требует инвазивной хирургической процедуры под общей анестезией, спонсор, исследователь и субъект демаскируются для процедуры исследования (т. е. витрэктомии и субретинальной инъекции), однако в группах лечения спонсор, исследователь и субъект маскируются (двойное слепое) для назначенной дозы ($1,0 \times 10^{11}$ гч или $1,0 \times 10^{10}$ гч). Чтобы еще больше минимизировать потенциальную погрешность оценок глаз, которые подвергались и не подвергались лечению, все субъективные офтальмологические оценки во время скринингового визита/ визита для оценки исходного уровня (визит 1) и начиная с 1 месяца (визит 5) и далее, будут проводиться маскированным оценщиком. На протяжении всего исследования субъектов оценивают на предмет эффективности и безопасности. Оценка эффективности основана на BCVA, AF глазного дна, SD-ОСТ, микропериметрии, контрастной чувствительности, цветовом зрении, тестах на скорость чтения, VFQ-25 и остроте зрения при низкой освещенности (LLVA). Оценка безопасности основана на полном офтальмологическом обследовании (включая внутриглазное давление [ВГД], исследование с помощью щелевой лампы, определение степени помутнения хрусталика и дилатационная офтальмоскопия), фотографии глазного дна, сообщениях о нежелательных явлениях (НЯ), лабораторных оценках (иммуногенность) и показателях жизнедеятельности. Любая информация о безопасности, собранная в результате оценок эффективности (например, BCVA), используется при общей оценке безопасности при необходимости.

[0661] Субъекты, у которых развивается катаракта, могут подвергнуться операции по удалению катаракты, если это будет сочтено клинически необходимым; если операция будет выполнена, ее следует провести как минимум за 4 недели до визита 12-го месяца/в конце исследования (EOS) (первичная конечная точка).

[0662] Субъект считается завершившим исследование, если он прошел оценку через 12 месяцев. Конец испытания - это дата, когда последний субъект проходит свои оценки через 12 месяцев (или оценки досрочного прекращения [ET] в случае преждевременного прекращения исследования) или дата последнего сбора данных, если последний субъект выбывает из наблюдения. После завершения исследования субъекты, которые подвергались лечению, приглашаются к участию в долгосрочном

последующем исследовании, которое позволяет продолжить мониторинг эффективности и безопасности в течение 5 лет после лечения.

[0663] *Введенное лечение*

[0664] Во время скринингового визита/ визита для оценки исходного уровня подходящие субъекты рандомизируются в соотношении 2:1:2 для получения либо низкой дозы AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{10}$ гч), либо высокой дозы AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{11}$ гч), в то время как субъекты в контрольной группе без лечения не получают фиктивного хирургического вмешательства или исследуемого лекарства. Во время визита в день инъекции (визит 2, день 0) AAV2-REP1 вводят в виде инъекции под сетчатку после витрэктомии субъектам в группах AAV2-REP1.

[0665] *Описание фармацевтической композиции*

[0666] Вектор AAV2 содержит рекомбинантную кДНК человека, кодирующую REP1 (AAV2-REP1). Векторный геном (AAV2-CBA-hREP1-WPRE-BGH) состоит из кассеты сильной конститутивной экспрессии, гибридного промотора CBA, кДНК человека, кодирующей REP1, модифицированной последовательности посттранскрипционного регуляторного элемента (WPRE) вируса гепатита сурка и последовательности полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-polyA), фланкированной инвертированными концевыми повторами AAV2. Фрагмент кДНК был первоначально выделен из библиотеки кДНК сетчатки человека здоровых людей.

[0667] Лекарственный продукт AAV2-REP1 приготовлен в виде стерильного 20 мМ раствора с трис-буфером, pH 8,0 и содержит 1 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl и 0,001% PF68. Лекарственный продукт представляет собой прозрачную или слегка опалесцирующую бесцветную суспензию, прошедшую стерильную фильтрацию, с целевой концентрацией 1×10^{12} гч/мл.

[0668] AAV2-REP1 поставляется в стерильных флаконах с пробками и крышками. На каждый глаз, подлежащий лечению, поставляется 0,3 мл суспензии вектора. Перед отправкой каждый флакон помещается в помеченный вторичный контейнер. Лекарственный продукт следует хранить при температуре $\leq -60^\circ \text{C}$ ($\leq -76^\circ \text{F}$) в морозильной камере с контролируемым доступом и контролем температуры.

[0669] *Процедура витрэктомии и введение AAV2-REP1*

[0670] Инъекция AAV2-REP1 выполняется квалифицированным и опытным ретинологом. Из-за сложности и непредсказуемости отслоения сетчатки при СНМ, при котором сетчатка и сосудистая оболочка могут быть чрезвычайно тонкими и местами слиты, была разработана модификация техники субретинальной генной терапии. Она

включает выполнение доставки вектора в 2 этапа после витрэктомии. Преимущество двухэтапной процедуры заключается в том, что любые неожиданные осложнения в виде отслоения сетчатки можно лечить консервативно, сводя к минимуму опасения по поводу выхода вектора в стекловидное тело. Кроме того, инъекцию можно было отложить на более поздний срок, если, например, образовался макулярный разрыв сетчатки, который требует обработки газом. Кроме того, поскольку объем жидкости, необходимый для отделения фовеальной зоны, является переменным, удалив вектор с первого этапа, точную постоянную дозу с точки зрения геномных частиц все же можно вводить в субретинальное пространство.

[0671] Сначала субъекты подвергаются стандартной витрэктомии и отслоению заднего гиалоида в соответствующем исследуемом глазу (Фиг. 23). Все операции будут проводиться с использованием стандартной системы витрэктомии BIOM. Обычно предпочтение отдается наложению швов 23-го калибра, чтобы избежать любого потенциального риска протекания раны. Сетчатку отсоединяют с помощью 0,1–0,5 мл сбалансированного солевого раствора (BSS), вводимого через субретинальную канюлю 41-калибра, подключенную к набору для инъекций в стекловидное тело. Однократная доза AAV2-REP1 будет введена в субретинальную жидкость через то же место входа.

[0672] На втором этапе процедуры канюля BSS удаляется из глаза и AAV2-REP1 подготавливается для инъекции. Дозу $1,0 \times 10^{11}$ гч AAV2-REP1 вводят в субретинальное пространство через то же место входа. Вектор необходимо набрать в шприц на 1 мл, чтобы избежать образования пузырьков воздуха, и использовать соединитель, чтобы шприц на 1 мл можно было подключить к линии постоянного давления аппарата для витрэктомии. Субретинальная инъекция будет нацелена на любую область макулы, но, если возможно, также будет включать фовеальную зону. В каждом случае вектор вводится таким образом, чтобы субретинальная жидкость перекрывала все краевые границы центральной области, которая еще не подверглась хориоретинальной дегенерации, что определяется по автофлуоресценции глазного дна. После закрытия раны необходимо утилизировать все промывочные жидкости, которые могли пройти через глаз, чтобы ограничить возможное распространение вектора.

[0673] *Рандомизация*

[0674] Во время скринингового визита/ визита для оценки исходного уровня всем пациентам присваивается скрининговый идентификатор, который включает номер центра и номер субъекта. Если субъект соответствует всем критериям отбора при

скрининговом визите/ визите для оценки исходного уровня, назначается исследуемый глаз, и субъект рандомизируется в соотношении 2:1:2 для получения высокой дозы AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{11}$ гч), низкой дозы AAV2-REP1 ($1,0 \times 10^{10}$ гч) или входит в контрольную группу без лечения. Рандомизация создается с использованием проверенной системы, которая автоматизирует случайное распределение групп лечения по номерам рандомизации и стратифицирует по хирургическим группам.

[0675] *Сопутствующая терапия:*

[0676] Субъекты не могут участвовать в другом исследовании с участием исследуемого продукта в течение последних 12 недель или получать генную/клеточную терапию в любое время ранее, за исключением случаев, когда они получали лечение в рамках другого исследования с помощью AAV2-REP1. На протяжении исследования исследователи могут назначать любые сопутствующие лекарства или способы лечения, которые считаются необходимыми для оказания адекватной поддерживающей терапии. Подробная информация о сопутствующих лекарствах собирается во время скринингового визита и обновляется во время каждого визита в рамках исследования (включая визит ET, если применимо). Сопутствующие лекарства (включая пероральные кортикостероиды), принимаемые во время исследования, должны быть зарегистрированы в медицинских записях субъекта и в eCRF; исключением являются любые лекарства, используемые в ходе процедуры исследования (например, анестезия, глазные капли для расширения глаз).

[0677] Чтобы свести к минимуму воспаление, вызванное хирургическим вмешательством, и потенциальные или неожиданные иммунные реакции на вектор/трансген, всем субъектам перед каждой операцией будет назначен 21-дневный курс перорального приема преднизона/преднизолона. Следовательно, для каждой операции это будет преднизон/преднизолон в дозе 1 мг/кг/день в общей сложности в течение 10 дней (начиная за 2 дня до инъекции вектора, в день инъекции, и в течение 7 дней после); затем 0,5 мг/кг/день в течение 7 дней; 0,25 мг/кг/день в течение 2 дней; и 0,125 мг/кг/день в течение 2 дней (всего 21 день). Подробности использования кортикостероидов записываются каждым субъектом в дневник.

[0678] *МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ*

[0679] График процедур исследования представлен в Таблице 62: График процедур исследования.

[0680] *Визит 1 (скрининговый визит/ визит для оценки исходного уровня)*

[0681] Исследователь объясняет цель исследования, процедуры и обязанности каждого потенциального субъекта. Определяется желание и способность субъекта соответствовать требованиям протокола.

[0682] После получения информированного согласия субъекту присваивается идентификационный номер субъекта и проводится оценка для определения соответствия критериям. Скрининговые/исходные процедуры состоят из следующего (при необходимости оценки могут быть распределены на 2 дня подряд): демографические данные, медицинский и глазной анамнез (только субъекты с генетически подтвержденным диагнозом СНМ могут участвовать в исследовании). Генетическое подтверждение должно быть доступно до визита 1); показатели жизнедеятельности; вес; отбор проб для иммуноанализа (иммуоферментный анализ [ИФА] и метод иммуоферментных пятен [ELISPOT]); BCVA; LLVA; полное офтальмологическое обследование, включая IOP, обследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна; SD-OCT; АФ; микропериметрия; тест на контрастную чувствительность; тест цветового зрения; цветная фотография глазного дна с 7 полями (включая стереоскопические фотографии для полей 1, 2 и 3); тест на скорость чтения (если применимо); VFQ-25; мониторинг серьезных НЯ (СНЯ); обзор лекарств и выдача кортикостероидов (если они рандомизированы в группах AAV2-REP1). Чтобы получить точные значения BCVA на визите 1 (скрининговый/ для оценки исходного уровня) к оценке BCVA применяются следующие условия: если значение BCVA на визите 1 (скрининговый/ для оценки исходного уровня) составляет $\geq \pm 10$ букв увеличения или уменьшения для исследуемого глаза по сравнению с предыдущим визитом NIGHT в рамках исследования (если применимо), тогда BCVA необходимо повторить еще 2 раза, в результате чего на визите 1 будет выполнено 3 измерения BCVA. Чтобы облегчить дополнительные измерения BCVA, этот визит следует проводить в течение 2 дней, при этом BCVA измеряется дважды в день 1 и один раз в день 2 (до расширения зрачка). Все 3 значения BCVA должны быть записаны в eCRF. Наивысший балл будет использоваться для определения пригодности субъекта. Если значение BCVA на визите 1 (скрининговый/ для оценки исходного уровня) составляет $< \pm 10$ букв разницы для исследуемого глаза по сравнению с предыдущим визитом NIGHT в рамках исследования, то данные BCVA будут собраны за один раз и без повторов.

[0683] Субъектам, которые соответствуют всем критериям включения и ни одному из критериев исключения, назначается исследуемый глаз, и они включаются в

исследование. В это время субъектов информируют о результате рандомизации (то есть группа лечения AAV2-REP1 или контрольная группа) и инструктируют не раскрывать принадлежность к их группе лечения замаскированным экспертам во время исследования. Субъекты, рандомизированные в группы лечения AAV2-REP1 (вместе с исследователями и спонсором), остаются замаскированными до назначенной дозы.

[0684] Следующий визит в рамках исследования (визит 2) должен быть запланирован в течение 8 недель после скринингового визита/ визита для оценки исходного уровня.

Субъектам, рандомизированным в группы AAV2-REP1, назначают 21-дневный курс перорального кортикостероида (например, преднизолон/преднизон) и инструктируют начать прием препарата за 2 дня до их следующего визита в рамках исследования (визит 2). Субъектам, рандомизированным в группы AAV2-REP1, рекомендуется использовать барьерные контрацептивы в течение 3 месяцев с момента начала лечения.

[0685] Если субъект рандомизирован в контрольную группу, то визит 2 состоит из телефонного звонка.

[0686] *Визит 2 (день 0, визит в день инъекции или телефонный контакт)*

[0687] Во время визита 2 (день 0) все субъекты в группах AAV2-REP1 посетят участок хирургического вмешательства, и будут выполнены следующие оценки: полное офтальмологическое обследование, включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна; мониторинг НЯ/СНЯ; обзор сопутствующих лекарств; и обзор соответствия кортикостероидам.

[0688] Субъекты в группах AAV2-REP1 подвергаются витрэктомии и получают субретинальную инъекцию AAV2-REP1, содержащую либо низкую дозу AAV2-REP1 (1×10^{10} гв), либо высокую дозу AAV2-REP1 (1×10^{12} гв), в исследуемый глаз. Субъекты тщательно наблюдаются на предмет возникновения НЯ во время процедуры. Субъекты возвращаются в исследовательский центр через 1 и 7 дней после операции для послеоперационного наблюдения (визит 3 [день 1] и визит 4 [день 7], соответственно).

[0689] Субъекты в контрольной группе получают телефонный звонок в виде визита в рамках исследования в согласованные дату и время. Исследовательские центры проводят следующие оценки во время телефонного разговора: мониторинг НЯ/СНЯ и обзор сопутствующих лекарств.

[0690] *Визит 3 (послеоперационный визит в день 1)*

[0691] При визите 3 (день 1) субъекты в группах AAV2-REP1 возвращаются на участок хирургического вмешательства для послеоперационного визита. Выполняются следующие оценки: показатели жизнедеятельности; отбор проб для иммуноанализа

(только ИФА); BCVA; полное офтальмологическое обследование, включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна; SD-ОСТ; мониторинг НЯ/СНЯ; обзор лекарств; и обзор соответствия кортикостероидам. Субъектам напоминают о необходимости использования барьерной контрацепции в течение 3 месяцев с момента лечения.

[0692] Субъекты в контрольной группе получают телефонный звонок в виде визита в рамках исследования в согласованные дату и время. Исследовательские центры проводят следующие оценки во время телефонного разговора: мониторинг НЯ/СНЯ и обзор сопутствующих лекарств.

[0693] *Визит 4 (послеоперационный визит в день 7 ± 3 дня)*

[0694] При визите 4 (день 7 ± 3 дня) субъекты в группах AAV2-REP1 возвращаются в свой принимающий исследовательский центр (то есть на тот же участок, где был проведен их скрининговый визит/ визит для оценки исходного уровня в визит 1) для второго послеоперационного визита. Тем не менее, для тех субъектов, которые переместились из нехирургического участка в участок хирургического вмешательства, и в случае послеоперационного осложнения или по любой другой причине безопасности, которую хирург-исследователь и исследователь участка хирургического вмешательства сочтут целесообразным, визит 4 может проводиться на участке хирургического вмешательства. В этом случае послеоперационное наблюдение должно продолжаться на участке хирургического вмешательства до тех пор, пока хирург/исследователь на участке хирургического вмешательства не согласится выписать пациента на лечение в нехирургическом участке. Выполняются следующие оценки: показатели жизнедеятельности; отбор проб для иммуноанализа (только ИФА и ELISPOT); BCVA; LLVA; полное офтальмологическое обследование, включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна; SD- ОСТ; AF; микропериметрия; мониторинг НЯ/СНЯ; обзор лекарств; и обзор соответствия кортикостероидам.

[0695] Субъекты в контрольной группе получают телефонный звонок в виде визита в рамках исследования в согласованные дату и время. Исследовательские центры проводят следующие оценки во время телефонного разговора: мониторинг НЯ/СНЯ и обзор сопутствующих лекарств.

[0696] *Визит 5 (1 месяц ± 7 дней)*

[0697] Все субъекты посещают свой принимающий исследовательский центр (т. е. тот же участок, где был проведен их скрининговый визит/ визит для оценки исходного

уровня в визит 1), начиная с визита 5. На визите 5 (1 месяц \pm 7 дней), выполняются следующие оценки для всех субъектов (при необходимости оценки могут быть распределены на 2 дня подряд): показатели жизнедеятельности; отбор проб для иммуноанализа (ИФА и ELISPOT); BCVA; LLVA; полное офтальмологическое обследование, включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна; SD- OCT; AF; микропериметрия; мониторинг НЯ/СНЯ; обзор лекарств; и обзор соответствия кортикостероидам

[0698] Визит 6 (4 месяц \pm 7 дней)

[0699] На визите 6 (4 месяц \pm 7 дней), выполняются следующие оценки (при необходимости оценки могут быть распределены на 2 дня подряд): отбор проб для иммуноанализа (ИФА и ELISPOT); BCVA; LLVA; полное офтальмологическое обследование, включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна; SD- OCT; AF; микропериметрия; тест на контрастную чувствительность; тест цветового зрения; мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств.

[0700] Визит 7 (8 месяц \pm 14 дней)

[0701] На визите 7 (8 месяц \pm 14 дней), выполняются следующие оценки для (при необходимости оценки могут быть распределены на 2 дня подряд): BCVA, LLVA; полное офтальмологическое обследование, включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна; SD-OCT; AF; микропериметрия; тест на контрастную чувствительность; тест цветового зрения; мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств.

[0702] Визит 8 (12 месяц \pm 14 дней, визит в конце исследования)

[0703] На визите 8 (12 месяц \pm 14 дней), выполняются следующие оценки для (при необходимости оценки могут быть распределены на 2 дня подряд): показатели жизнедеятельности; BCVA; LLVA; полное офтальмологическое обследование, включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна; SD-OCT; AF; микропериметрия; тест на контрастную чувствительность; тест цветового зрения; цветная фотография глазного дна с 7 полями (включая стереоскопические фотографии для полей 1, 2 и 3); тест на скорость чтения (если применимо); VFQ-25; мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств.

[0704] Визит досрочного прекращения участия в исследовании

[0705] В случае, если субъект прекращает исследование в любое время, исследовательский центр должен приложить все разумные усилия для обеспечения проведения визита ЕТ. Должны быть выполнены следующие оценки: показатели жизнедеятельности; отбор проб для иммуноанализа (ИФА и ELISPOT), если визит ЕТ происходит в течение 4 месяцев; BCVA; LLVA; полное офтальмологическое обследование, включая ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, помутнение хрусталика и расширенное исследование глазного дна; SD-OCT; AF; микропериметрия; тест на контрастную чувствительность; тест цветового зрения; цветная фотография глазного дна с 7 полями (включая стереоскопические фотографии для полей 1, 2 и 3); тест на скорость чтения (если применимо); VFQ-25; мониторинг НЯ/СНЯ и обзор лекарств.

[0706] ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ

При всех визитах следует стараться выполнять все процедуры на обоих глазах.

[0707] Острота зрения с максимальной коррекцией

[0708] Чтобы оценить изменения остроты зрения (VA) за период исследования, BCVA оценивается для обоих глаз с использованием таблицы VA ETDRS во время, указанное в таблице 62: График процедур исследования. Тест BCVA следует проводить до расширения зрачка, а рефракция на расстоянии должна быть выполнена до измерения BCVA. Изначально буквы читаются на расстоянии 4 метров от таблицы. Если на 4 метрах читается <20 букв, следует провести тестирование на 1 метре. BCVA следует указывать как количество букв, правильно прочитанных субъектом. Во время скринингового визита/ визита для оценки исходного уровня глаза с BCVA на уровне 34-73 буквы по шкале ETDRS (эквивалентно остроте зрения по Снеллену хуже или равной 6/12 или 20/40, но не менее 6/60 или 20/200 остроты по Снеллену) будут допущены к участию в исследовании. Если субъект не может прочитать какие-либо буквы из таблицы BCVA, его проверяют на подсчет пальцев, движения рук или восприятие света.

[0709] Автофлуоресценция глазного дна

[0710] Чтобы оценить изменения в области жизнеспособной ткани сетчатки, проводят AF глазного дна для обоих глаз во время, указанное в Таблице 62: График процедур исследования. Все изображения AF глазного дна выполняются сертифицированными специалистами в исследовательском центре после расширения зрачка субъекту.

[0711] Спектральная оптическая когерентная томография (SD-OCT)

[0712] SD-OCT будет выполнен для обоих глаз во время, указанное в Таблице 2: График процедур исследования. Измерения SD-OCT выполняются сертифицированными специалистами в исследовательском центре после расширения зрачка субъекта. SD-OCT используется для оценки ряда переменных, включая количественную оценку целостности эллипсоидной зоны и снижения сигнала от внешнего ядерного слоя и сосудистой оболочки. Кроме того, поскольку прогрессирующее утолщение фовеа было отмечено на ранней стадии СНМ, оцениваются фовеальные изменения.

[0713] *Микропериметрия*

[0714] Микропериметрию проводят для обоих глаз во время, указанное в Таблице 62: График процедур исследования. Микропериметрия проводится сертифицированными специалистами для оценки изменений чувствительности сетчатки в макуле.

[0715] *Контрастная чувствительность*

[0716] Контрастная чувствительность измеряется для обоих глаз во время, указанное в Таблице 62: График процедур исследования. Контрастная чувствительность измеряется перед расширением зрачка с использованием таблицы Пелли-Робсона.

[0717] *Цветовое зрение*

[0718] Цветовое зрение проверяется на обоих глазах перед расширением зрачка во время, указанное в Таблице 62: График процедур исследования. Глаза тестируются отдельно и в одном и том же порядке при каждой оценке.

[0719] *Острота зрения при низкой освещенности*

[0720] LLVA измеряется для обоих глаз во время, указанное в Таблице 62: График процедур исследования. Тест следует проводить после тестирования BCVA до расширения зрачка, а рефракция на расстоянии должна быть выполнена до измерения LLVA. LLVA измеряется путем размещения фильтра нейтральной плотности с 2,0 логарифмическими единицами над передней частью каждого глаза и когда субъект читает нормально освещенную таблицу ETDRS. Изначально буквы читаются на расстоянии 4 метров от таблицы. Если на 4 метрах читается <20 букв, следует провести тестирование на 1 метре. LLVA отображается как количество букв, правильно прочитанных субъектом.

[0721] **Тест на скорость чтения**

[0722] Показатель чтения будет оцениваться до расширения зрачков во время, указанное в Таблице 62: График процедур исследования с использованием

Международных текстов на скорость чтения (IReST), которые обеспечивают стандартизированную оценку показателя чтения на 17 языках (Trauzettel-Klosinski et al., 2012).

[0723] Опросник VFQ-25

[0724] Субъекты заполняют VFQ-25 в сроки, указанные в Таблице 62: График процедур исследования. В этом опроснике измеряются параметры состояния здоровья, нацеленного на зрение, которые наиболее важны для людей с заболеваниями глаз (Mangione et al, 2001). Улучшение по VFQ-25 оценивается с использованием индивидуальных баллов, баллов по подшкалам и общего суммарного балла.

[0725] ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ

[0726] Полное офтальмологическое обследование

[0727] Полное офтальмологическое обследование проводится для обоих глаз во время, указанное в Таблице 62: График процедур исследования. Для субъектов в группах AAV2-REP1 полное офтальмологическое обследование проводится перед витрэктомией и введением исследуемого препарата во время соответствующего визита в рамках исследования. Офтальмологическое обследование будет включать ВГД, исследование с помощью щелевой лампы, определение степени помутнения хрусталика и расширенную офтальмоскопию. Одинаковые устройства щелевой лампы и одинаковые условия освещения должны использоваться во время визитов в рамках исследования для любого субъекта.

[0728] В дополнение к параметрам, перечисленным выше, соответствующих субъектов тщательно обследуют на наличие внутриглазного воспаления после введения вектора. Катаракта также может развиваться в результате процедуры витрэктомии и потенциально может повлиять на VA. Таким образом, дооперационная оценка степени помутнения и цвета хрусталика должна быть задокументирована в установленной клинической системе классификации помутнения хрусталика. Хирургическая операция по удалению катаракты эффективна у пациентов с СНМ и не имеет особых рисков. Следовательно, при наличии клинических показаний субъекты, у которых развивается катаракта, могут пройти хирургическую операцию по удалению катаракты. Если хирургическая операция по удалению катаракты проводится, ее следует провести как минимум за 4 недели до визита через 12 месяцев/визита EOS.

[0729] Цветная фотография глазного дна с полями

[0730] Чтобы помочь в объективной клинической оценке прогрессирующих изменений сетчатки, выполняется цветная фотография глазного дна с 7 полями для обоих глаз во

время, указанное в Таблице 62: График процедур исследования. Фотографирование глазного дна выполняется сертифицированными специалистами после расширения зрачка. Стереодиаграммы должны быть выполнены для полей 1, 2 и 3.

[0731] *Нежелательные явления*

[0732] НЯ - это любое нежелательное медицинское явление у субъекта клинического исследования, которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с исследуемым лекарством/хирургической процедурой. Следовательно, НЯ может быть любым неблагоприятным и непреднамеренным признаком (включая аномальные лабораторные данные), симптомом или заболеванием, временно связанным с использованием исследуемого препарата/хирургической процедуры, независимо от того, связаны ли они с исследуемым препаратом или с хирургической процедурой, описанной в этом протоколе. НЯ также должны включать любое ранее существовавшее состояние (кроме СНМ) или заболевание, которое ухудшается во время исследования (т.е. увеличивается по частоте или интенсивности).

[0733] *Серьезное нежелательное явление*

[0734] СНЯ определяется как любое неблагоприятное медицинское происшествие, которое: приводит к смерти, опасно для жизни, требует госпитализации в стационар или продления существующей госпитализации, приводит к стойкой или значительной инвалидности/недееспособности, является врожденной аномалией/врожденным дефектом, приводит к потере зрения или угрожает зрению, является другим важным медицинским явлением (ями). Термин «опасный для жизни» в определении «серьезного» относится к явлению, при котором субъект находится под угрозой смерти во время явления. Это не относится к явлению, которое гипотетически могло бы вызвать смерть, если бы оно было более серьезным. Госпитализация по поводу ранее существовавшего состояния, включая плановые процедуры, состояние которого не ухудшилось, не является СНЯ. Другие явления, которые могут не привести к смерти, не опасны для жизни или не требуют госпитализации, могут рассматриваться как СНЯ, когда, на основании соответствующего медицинского заключения, явление может поставить под угрозу субъекта и может потребовать медицинского или хирургического вмешательства для предотвращения одного из результатов, перечисленных выше.

[0735] О следующих явлениях потери зрения или угрожающих зрению явлениях следует сообщать как о СНЯ: устойчивое снижение VA на ≥ 15 букв на таблице ETDRS по сравнению с исходным уровнем, за исключением явлений, связанных с операцией. Устойчивый определяется как продолжающийся 48 часов или более до

восстановления; восстановление, определяемое как VA, вернулось в пределы 5 букв от исходного уровня VA.

[0736] Связанные с хирургическим вмешательством явления снижения VA определяются как уменьшение VA, происходящее в тесной временной ассоциации (в течение <24 часов) с хирургическим введением исследуемого препарата и которое восстанавливается на 7-й день (период 1/2, визит 4) после операции. Об этих явлениях нельзя сообщать как о НЯ или СНЯ. Однако о них следует сообщать как о НЯ, если, по мнению исследователя, их развитие с точки зрения продолжительности или тяжести не может быть объяснено процедурой. Это может включать явления, когда патологическое течение послеоперационного снижения VA связано с другим осложнением, связанным с операцией или исследуемым препаратом, или когда патологическое течение послеоперационного снижения VA может быть связано с другой идентифицируемой причиной, но не ограничивается ими. НЯ являются те, которые, по мнению исследователя, фактически или потенциально требуют какого-либо хирургического или медицинского вмешательства для предотвращения необратимой потери зрения.

[0737] *Анализ эффективности*

[0738] Статистические тесты выполняются на уровне альфа 0,05 (если не указано иное). Статистические тесты и 95% CI будут двусторонними.

[0739] *Первичная конечная точка эффективности*

[0740] Первичная конечная точка рассчитывается как доля субъектов с увеличением BCVA на ≥ 15 букв по сравнению с исходным уровнем во время визита через 12 месяцев. Если VA отсутствует во время визита через 12 месяцев, то недостающее значение будет вычислено с использованием метода LOCF. Первичная конечная точка приведены с использованием сводной статистики для категориальных данных, включая 95% CI.

Доля успешных результатов для первичной конечной точки сравнивается между группами исследования (высокая доза с контролем, низкая доза с контролем) с использованием точного критерия Фишера.

[0741] *Ключевая вторичная конечная точка эффективности*

[0742] Ключевой вторичной конечной точкой является анализ парной выборки доли субъектов с увеличением BCVA на ≥ 15 букв по сравнению с исходным уровнем во время визита через 12 месяцев для исследуемых глаз, которые подвергались лечению, в рамках исследования STAR по сравнению с долей субъектов с увеличением BCVA

≥15 букв от 4-го месяца (визит 2) до 16-го месяца (визит 5) в исследовании NIGHT (NSR-CHM-OS1). Анализ ключевой вторичной конечной точки выполняется в наборе данных для полного анализа с контролем по архивной статистике. Ключевые вторичные конечные точки, после лечения (данные STAR) и до лечения (данные NIGHT), будут приведены с использованием сводной статистики для категориальных данных, включая 95% CI. Доля успехов для категориальных переменных будет сравниваться до и после лечения в каждой группе лечения отдельно с использованием теста Макнемара.

[0743] *Другие вторичные конечные точки эффективности*

[0744] Категориальные вторичные конечные точки приведены и анализируются с использованием той же процедуры, что и категориальные первичные конечные точки.

[0745] Непрерывные вторичные конечные точки приведены с использованием сводной статистики для непрерывных данных, включая 95% CI. Разница между лечением в среднем изменении от исходного уровня и его 95% CI рассчитывается на основе LSMEANS модели ANCOVA, включая группу, которая подвергалась хирургическому вмешательству, исходное значение оценки, исследуемые группы и взаимодействие между исследуемыми группами и группой, которая подвергалась хирургическому вмешательству. Изменение по сравнению с исходным уровнем сравнивается между группами исследования (высокая доза с контролем, низкая доза с контролем) с использованием вышеупомянутой модели ANCOVA. Для общего суммарного балла VFQ-25 в модель добавляют ковариаты возраста и расы.

[0746] *Анализ безопасности*

[0747] Проверка достоверности для анализа безопасности не проводится. Анализ безопасности носят описательный характер, при необходимости с расчетом 95% CI.

[0748] *Нежелательные явления*

[0749] НЯ кодируют с помощью Медицинского словаря терминологии для регуляторной деятельности. Будет использоваться версия словаря, текущая на момент закрытия доступа к базе данных. Явления приведены по системным классам органов, предпочтительным терминам и группам. Приведены как количество глаз/субъектов, испытывающих НЯ, так и количество явлений. Аналогичные краткие описания составляются для НЯ, связанных с исследуемым препаратом/процедурой, НЯ, приводящих к прекращению приема, и СНЯ. НЯ приведены по максимальной степени тяжести, связи с исследуемым препаратом/процедурой, а также по времени до начала и устранения.

[0750] *Полное офтальмологическое обследование*

[0751] ВГД и изменение ВГД по сравнению с исходным уровнем приводятся относительно визитов, лечения и глаз. Отклонения от нормы при обследовании с помощью щелевой лампы и результаты дилатационной офтальмоскопии, а также отклонения от исходного уровня приводятся относительно визитов, лечения и глаз. Категории помутнение хрусталика и отклонения от исходного уровня приводятся относительно визитов, лечения и на глаз.

[0752] *Цветная фотография глазного дна с полями*

[0753] Категории результатов цветной фотографии глазного дна и отклонения от исходного уровня приводятся относительно визитов, лечения и на глаз.

[0754] Таблица 62: График процедур исследования.

Visit	Visit 1 ^a	Visit 2 ^b	Visit 3 ^b	Visit 4 ^b	Visit 5 ^a	Visit 6 ^a	Visit 7 ^a	Visit 8 ^{a,c}	Early Termination ^d	Unscheduled Visit ^e
Study Day/Visit Window	Screening/ Baseline ^f	Day 0 Injection Day	Day 1 Post op	Day 7 Post op ± 3d	Month 1 ± 7d	Month 4 ± 7d	Month 8 ± 14d	Month 12 ± 14d		
Assessments/Procedures (All Subjects/Eyes, Unless Otherwise Specified)										
Informed Consent	X									
Demography, medical and ocular history	X									
Vital signs (pulse, blood pressure)	X		X	X	X			X	X	
Weight ^g	X									
Immunoassay blood sampling (ELISA) ^h	X		X	X	X	X			X ^o	
Immunoassay blood sampling (ELISPOT) ^h	X			X	X	X			X ^o	
BCVA	X ⁱ		X	X	X	X	X	X	X	X
LLVA	X			X	X	X	X	X	X	
Full ophthalmic exam ⁱ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SD-OCT	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Autofluorescence	X			X	X	X	X	X	X	X
Microperimetry	X			X	X	X	X	X	X	
Contrast sensitivity ^j	X					X	X	X	X	
Colour vision	X					X	X	X	X	
7-field colour fundus photos ^k	X							X	X	
Reading speed test ^l	X							X	X	
VFQ-25 ^m	X							X	X	

ВКЛЮЧЕНИЕ В ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0755] Каждый документ, процитированный в данном документе, включая любые перекрестные ссылки или родственные патенты или заявки, настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, если это явно не исключено или не ограничено иным образом. Цитирование любого документа не является признанием того, что он является предшествующим уровнем техники по отношению к любому изобретению, раскрытому или заявленному в данном документе, или что он сам по себе или в любой комбинации с любой другой ссылкой или ссылками представляет, предлагает или раскрывает любое такое изобретение. Кроме того, в той степени, в которой любое значение или определение термина в данном документе противоречит любому значению или определению того же термина в документе, включенном посредством ссылки, значение или определение, присвоенное этому термину в этом документе, имеет преимущественную силу.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0756] Хотя были проиллюстрированы и описаны конкретные варианты осуществления в соответствии с настоящим изобретением, могут быть выполнены различные другие изменения и модификации, не выходящие за рамки сущности и объема настоящего изобретения. Объем прилагаемой формулы изобретения включает все такие изменения и модификации, которые находятся в пределах объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки частицы рекомбинантного AAV (rAAV - англ.: recombinant adeno-associated virus) из культуры клеток-хозяев млекопитающего, включающий стадии:

(a) культивирования множества клеток-хозяев млекопитающих в культуральной среде в условиях, подходящих для образования множества частиц rAAV, причем множество клеток-хозяев млекопитающих трансфицировали плазмидным вектором, содержащим экзогенную последовательность, вспомогательным плазмидным вектором и плазмидным вектором, содержащим последовательность, кодирующую вирусный белок Rep и вирусный белок Cap, для получения множества трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих;

(b) сбора культуральной среды, содержащей множество трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих;

(c) сбора множества частиц rAAV из множества трансфицированных клеток-хозяев млекопитающих;

(d) концентрирования множества частиц rAAV с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF - англ.: tangential flow filtration) для получения концентрированного множества частиц rAAV;

(e) обогащения концентрированного множества частиц rAAV до полных частиц rAAV с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности для получения обогащенного множества полных частиц rAAV;

(f) очистки обогащенного множества полных частиц rAAV с помощью анионообменной (AEX - англ.: anion exchange) хроматографии или аффинной хроматографии с получением элюата, содержащего очищенное и обогащенное множество полных частиц rAAV; и

(g) диафильтрации и концентрирования элюата со стадии (f) в буфере для состава путем тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для получения конечной композиции, содержащей очищенное и обогащенное множество полных частиц AAV и буфер для состава.

2. Способ очистки частицы рекомбинантного AAV (rAAV) из культуры клеток-хозяев млекопитающего, включающий стадии:

(a) культивирования множества клеток-хозяев млекопитающих в культуральной среде в условиях, подходящих для образования множества частиц гAAV-REP1, причем множество клеток-хозяев млекопитающих трансфецировали плазмидным вектором, содержащим экзогенную последовательность, где экзогенная последовательность содержит последовательность, кодирующую Rab-сопровождающий белок 1 (REP1 - англ.: Rab escort protein 1) человека, вспомогательным плазмидным вектором и плазмидным вектором, содержащим последовательность, кодирующую вирусный белок Rep и вирусный белок Cap, для получения множества трансфецированных клеток-хозяев млекопитающих;

(b) сбора культуральной среды, содержащей множество трансфецированных клеток-хозяев млекопитающих;

(c) сбора множества частиц гAAV из множества трансфецированных клеток-хозяев млекопитающих;

(d) концентрирования множества частиц гAAV с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для получения концентрированного множества частиц гAAV;

(e) обогащения концентрированного множества частиц гAAV до полных частиц гAAV с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности для получения обогащенного множества полных частиц гAAV;

(f) очистки обогащенного множества полных частиц гAAV с помощью анионообменной (АЕХ) хроматографии или аффинной хроматографии с получением элюата, содержащего очищенное и обогащенное множество полных частиц гAAV; и

(g) диафильтрации и концентрирования элюата со стадии (f) в буфере для состава путем тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для получения конечной композиции, содержащей очищенное и обогащенное множество полных частиц AAV и буфер для состава.

3. Способ по пп. 1 или 2, отличающийся тем, что культуральная среда содержит пониженное количество фетальной бычьей сыворотки.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что культуральная среда не содержит пониженное количество фетальной бычьей сыворотки.

5. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что культуральная среда содержит бессывороточную среду.
6. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что культуральная среда состоит из бессывороточной среды.
7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что культуральная среда содержит безбелковую среду.
8. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что культуральная среда состоит из безбелковой среды.
9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что культуральная среда содержит глицин, L-аргинин гидрохлорид, L-цистин дигидрохлорид, L-глутамин, L-гистидин гидрохлорид-Н₂О, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин гидрохлорид, L-метионин, L-фенилаланин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, дегидрат динатриевой соли L-тирозина, L-валин, холин хлорид, D-пантотенат кальция, фолиевую кислоту, ниацинамид, пиридоксин гидрохлорид, рибофлавин, тиамин гидрохлорид, i-инозитол, хлорид кальция (CaCl₂) (ангид.), нитрат железа (Fe(NO₃)₃·9H₂O), сульфат магния (MgSO₄) (ангид.), хлористый калий (KCl), бикарбонат натрия (NaHCO₃), хлорид натрия (NaCl), одноосновный фосфат натрия (NaH₂PO₄-H₂O) и D-глюкозу (декстрозу).
10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что клетки млекопитающих трансфецировали композицией, содержащей реагент трансдукции PEI.
11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что плазмидный вектор, содержащий экзогенную последовательность, дополнительно содержит последовательность, кодирующую 5' инвертированный концевой повтор (ITR - англ.: inverted terminal repeat), и последовательность, кодирующую 3' ITR.
12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая 5' ITR, получена из последовательности, кодирующей 5' ITR AAV серотипа 2 (AAV2).

13. Способ по п. 11 или п. 12, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая 5' ITR, содержит последовательность, которая идентична последовательности, кодирующей 5' ITR AAV серотипа 2 (AAV2).
14. Способ по п. 11 или п. 12, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая 5' ITR, содержит последовательность, которая не идентична последовательности, кодирующей 5' ITR AAV серотипа 2 (AAV2).
15. Способ по любому из пп. 11-14, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая 3' ITR, получена из последовательности, кодирующей 3' ITR AAV серотипа 2 (AAV2).
16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая 3' ITR, содержит последовательность, которая идентична последовательности, кодирующей 3' ITR AAV серотипа 2 (AAV2).
17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая 3' ITR, содержит последовательность, которая не идентична последовательности, кодирующей 3' ITR AAV серотипа 2 (AAV2).
18. Способ по любому из пп. 11-17, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая 5' ITR, или последовательность, кодирующая 3' ITR, содержит 145 пар оснований (п.о.).
19. Способ по любому из пп. 11-17, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая 5' ITR, или последовательность, кодирующая 3' ITR, содержит или состоит из 134, 135, 136 или 137 (п.о.).
20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что плазмидный вектор, содержащий экзогенную последовательность, вспомогательный плазмидный вектор или плазмидный вектор, содержащий последовательность, кодирующую вирусный белок Rep

и вирусный белок Сар, дополнительно содержит последовательность, кодирующую маркер селекции.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая маркер селекции, передает устойчивость к канамицину.

22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что стадия сбора (с) включает механическое разрушение множества трансфицированных клеток млекопитающих для высвобождения частиц рекомбинантного AAV (rAAV), продуцируемых множеством трансфицированных клеток млекопитающих.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что механическое разрушение включает микрофлюидизацию.

24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что стадия концентрирования дополнительно включает (1) осветление концентрированного множества частиц rAAV посредством глубоинной фильтрации для получения концентрированного и осветленного множества частиц rAAV.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что стадия концентрирования дополнительно включает (2) замораживание концентрированного и осветленного множества частиц rAAV при -80°C для получения промежуточного продукта способа.

26. Способ по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что стадия обогащения (е) включает ультрацентрифугирование в градиенте плотности йодиксанола для получения обогащенного множества частиц rAAV.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что градиент плотности йодиксанола включает композиции йодиксанола, имеющие концентрации 15%, 25%, 40% и 57%.

28. Способ по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что аффинная хроматография на стадии очистки (f) включает матрицу AVB-сефарозы.

29. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что буфер для состава содержит Трис, MgCl₂ и NaCl.

30. Способ по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что буфер для состава содержит 20 mM Трис, 1 mM MgCl₂ и 200 mM NaCl при pH 8.

31. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что буфер для состава содержит 20 mM Трис, 1 mM MgCl₂, 200 mM NaCl при pH 8 и полоксамер 188 при 0,001%.

32. Способ по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что анионообменная хроматография дополнительно включает стадии
создания анионообменной хроматограммы и
выбора пика на анионообменной хроматограмме, содержащего полные частицы rAAV.

33. Способ по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что TFF на стадии (d) или на стадии (g) выполняется с использованием фильтра с полыми волокнами 100 кДа (HFF – англ.: hollow fiber filter).

34. Способ по любому из пп. 1-33, отличающийся тем, что TFF на стадии (d) или на стадии (g) выполняется с использованием HFF 50 кДа.

35. Способ по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что стадия (g) способа дополнительно включает вторую TFF, причем TFF на стадии (d) и первая TFF на стадии (g) выполняются с использованием HFF 100 кДа, а вторая TFF на стадии (g) выполняется с использованием HFF 50 кДа.

36. Способ по любому из пп. 2-35, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая белок REP1 человека, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 gatatcgaat tcctgcagcc cggcggcacc atggcgggata ctctcccttc ggagtttgat
61 gtgatcgtaa tagggacggg tttgcctgaa tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt
```

121 ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga agctactatg gaggaaactg ggccagtttt
181 agctttttcag gactattgtc ctggctaaag gaataccagg aaaacagtga cattgtaagt
241 gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg
301 aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta ttttgttatg ccagtcagga tttgcatgaa
361 gatgtcgaag aagctggtgc actgcagaaa aatcatgctc ttgtgacatc tgcaaactcc
421 acagaagctg cagattctgc cttcctgcct acggaggatg agtcattaag cactatgagc
481 tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc agcgatccag agaatgctgct agaagtaa
541 ggtgctgaag tgacagggga aaaagaaaac cattgtgatg ataaaacttg tgtgcatca
601 acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg cctatagcag aagataccac agagcaacca
661 aagaaaaaca gaattactta ctcacaaatt attaaagaag gcaggagatt taatattgat
721 ttagtatcaa agctgctgta ttctcgagga ttactaattg atcttcta
781 gttagtgcgat atgcagagtt taaaaatatt accaggattc ttgcatctcg agaaggacga
841 gtggaacagg ttccgtgttc cagagcagat gtctttaata gcaaacact tactatggta
901 gaaaagcgaa tgctaataaa atttcttaca ttttgatgg aatatgagaa atatcctgat
961 gaataataag gatataaga gatcacattt tatgaatatt taaagactca aaaattaacc
1021 cccaacctcc aatataattgt catgcattca attgcaatga catcagagac agccagcagc
1081 accatagatg gtctcaaagc taccaaaaac tttcttact gtcttgggcg gtatggcaac
1141 actccatctt tgtttccttt atatggccaa ggagaactcc cccagtgttt ctgcaggatg
1201 tgtgctgtgt ttggtggaat ttattgtcct cgccattcag tacagtgcct ttagtgaggc
1261 aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata gatcagtttg gtcagagaat aatctctgag
1321 catttctctg tggaggacag ttactttcct gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg
1381 cagatctcca gggcagtgct gattacagat agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa
1441 cagatttcca ttttgacagt gccagcagag gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt
1501 gagttatggt cttcaacgat gacatgcatg aaaggcacct atttggttca tttgacttgc
1561 acatcttcta aaacagcaag agaagattta gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca
1621 tatactgaaa tggagataga aatgaacaa gtagaaaagc caagaattct gtgggctcct
1681 tacttcaata tgagagattc gtcagacatc agcaggagct gttataatga tttaccatcc
1741 aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag
1801 gctgaaacac ttttccagga aatctgcccc aatgaagatt tctgtcccc tccaccaaat
1861 cctgaagaca ttatccttga tggagacagt ttacagccag aggcttcaga atccagtgcc
1921 ataccagagg ctaactcgga gactttcaag gaaagcaca accttgghaa cctagaggag
1981 tcctctgaat aa (SEQ ID NO: 1)

37. Композиция по п. 36, отличающаяся тем, что белок REPI человека содержит или состоит из аминокислотной последовательности

1 MADTLPSEFD VIVIGTGLPE SIIAAACSRG GRRVLHVDSR SYGGNWASF SFSGLLSWLK
61 EYQENS DIVS DSPVWQDQIL ENEEAIASR KDKTIQHVEV FCYASQDLHE DVEEAGALQK
121 NHALVTSANS TEAADS AFLP TEDESLTMS CEMLTEQTPS SDPENALEVN GAEVTGEKEN
181 HCDDKTCVPS TSAEDMSENV PIAEDTTEQP KKNRITYSQI IKEGRRFNID LVSKLLYSRG
241 LLIDLLIKSN VSRYA EFKNI TRILAFREGR VEQVPCSRAD VFNSKQLTMV EKRLMKFLT
301 FCMEYEKYPD EYKGYEEITF YEYLKTKLTL PNLQYIVMHS IAMTSETASS TIDGLKATKN
361 FLHCLGRYGN TPFLFPLYGQ GELPQCFCRM CAVFGGIYCL RHSVQCLVVD KESRCKAII
421 DQFGQRIISE HFLVEDSYFP ENMCSRQYR QISRVLITD RSVLKTDSQ QISILTVPAE
481 EPGTFAVRVI ELCSSMTTCM KGTYLVLHLC TSSKTAREDL ESVVQKLFVP YTEMEIENEQ
541 VEKPRILWAL YFNMRDSSDI SRSCYNLPS NVYVCSGPDC GLGNDNAVKQ AETLFAQEICP
601 NEDFCPPPPN PEDIILDGDS LQPEASSESA IPEANSETFK ESTNLGNLEE SSE (SEQ ID NO: 2)

38. Фармацевтическая композиция, содержащая множество частиц rAAV, полученных способом по любому из пп. 1-37.

39. Фармацевтическая композиция по п. 38, содержащая

(a) от 0,5 до $2,5 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV);

(b) менее 50% пустых капсидов;

(c) менее 4 нг/мл остаточного белка клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл; и

(d) менее 7×10^{-3} пг/мл остаточной ДНК клетки-хозяина на $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл.

40. Фармацевтическая композиция по п. 39, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит

(e) множество функциональных гв/мл, причем каждый из функциональных геномов вектора способен экспрессировать экзогенную последовательность в клетке после трансдукции.

41. Фармацевтическая композиция по п. 40, отличающаяся тем, что после трансдукции клетки фармацевтической композицией множество функциональных гв/мл экспрессируют в 2 раза больше экзогенной последовательности по сравнению с уровнем экспрессии соответствующей эндогенной последовательности в нетрансдуцированной клетке.

42. Фармацевтическая композиция по п. 40, отличающаяся тем, что после трансдукции клетки фармацевтической композицией множество функциональных гв/мл экспрессируют экзогенную последовательность в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 раз больше, или в любое другое значение между указанными, по сравнению с уровнем экспрессии соответствующей эндогенной последовательности в нетрансдуцированной клетке.

43. Фармацевтическая композиция по п. 41 или п. 42, отличающаяся тем, что экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность идентичны.

44. Фармацевтическая композиция по п. 41 или п. 42, отличающаяся тем, что экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность не идентичны.

45. Фармацевтическая композиция по пп. 41, 42 или 44, отличающаяся тем, что экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность не идентичны, но белок, кодируемый экзогенной последовательностью, и белок, кодируемый эндогенной последовательностью, идентичны.

46. Фармацевтическая композиция по п. 42 или п. 43, отличающаяся тем, что экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или на любое другое процентное значение между указанными, идентичны.

47. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 37-44, отличающаяся тем, что экзогенная последовательность является кодон-оптимизированной по сравнению с эндогенной последовательностью.

48. Фармацевтическая композиция по п. 47, отличающаяся тем, что экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или на любое другое процентное значение между указанными, гомологичны.

49. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-48, отличающаяся тем, что после трансдукции клетки фармацевтической композицией по настоящему описанию экзогенная последовательность кодирует белок.

50. Фармацевтическая композиция по п. 49, отличающаяся тем, что белок, кодируемый экзогенной последовательностью, имеет уровень активности, равный или превышающий уровень активности белка, кодируемого соответствующей последовательностью нетрансдуцированной клетки.

51. Фармацевтическая композиция по п. 50, отличающаяся тем, что экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность идентичны.

52. Фармацевтическая композиция по п. 50, отличающаяся тем, что экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность не идентичны.
53. Фармацевтическая композиция по п. 52, отличающаяся тем, что экзогенная последовательность и соответствующая эндогенная последовательность по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или на любое другое процентное значение между указанными, идентичны.
54. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 49-52, отличающаяся тем, что активность включает связывание с, активацию и/или перенос одной или более функциональных групп на лиганд или субстрат.
55. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-54, отличающаяся тем, что белок включает белок REP-1, а активность включает пренилирование субстрата REP-1.
56. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-55, содержащая
(а) от 1,0 до $2,0 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV).
57. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-55, содержащая
(а) примерно $1,0 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV).
58. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-55, содержащая
(а) $1,0 \times 10^{12}$ геномов вектора (гв)/мл дефектного по репликации и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV).
59. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-55, содержащая
(b) менее 50% пустых капсидов или менее 30% пустых капсидов.

60. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-59, отличающаяся тем, что дефектный по репликации и рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) содержит последовательность, выделенную или полученную из AAV серотипа 2 (AAV2).
61. Фармацевтическая композиция по п. 60, отличающаяся тем, что последовательность, выделенная или полученная из AAV2, содержит последовательность, кодирующую инвертированный концевой повтор (ITR).
62. Фармацевтическая композиция по п. 60 или п. 61, отличающаяся тем, что дефектный по репликации и рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) содержит последовательность, кодирующую 5' ITR, и последовательность, кодирующую 3' ITR.
63. Фармацевтическая композиция по п. 62, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая 5' ITR, и последовательность, кодирующая 3' ITR, содержат последовательность ITR AAV2 дикого типа.
64. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-63, отличающаяся тем, что клетка-хозяин выделена или получена из культивируемой клеточной линии.
65. Фармацевтическая композиция по п. 64, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293.
66. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-63, отличающаяся тем, что клетка-хозяин выделена или получена из первичной клеточной линии.
67. Фармацевтическая композиция по п. 66, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой иммортализованную клетку или стволовую клетку.
68. Способ по любому из пп. 1-37, отличающийся тем, что клетка-хозяин выделена или получена из культивируемой клеточной линии.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку НЕК293.

70. Способ по любому из пп. 1-37, отличающийся тем, что клетка-хозяин выделена или получена из первичной клеточной линии.

71. Способ по п. 70, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой иммортализованную клетку или стволовую клетку.

72. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 38-67, отличающаяся тем, что каждый полный гAAV из множества полных частиц гAAV конечной композиции дополнительно содержит:

последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую от 5' до 3':

- (a) последовательность, кодирующую 5' ITR AAV2,
- (b) последовательность, кодирующую ранний энхансерный элемент,
- (c) последовательность, кодирующую промотор,
- (d) последовательность, кодирующую экзон и интрон,
- (e) последовательность, кодирующую сайт акцептора сплайсинга,
- (f) последовательность, кодирующую Rab-сопровождающий белок 1 (REP1),
- (g) последовательность, кодирующую посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE),
- (h) последовательность, кодирующую сайт полиаденилирования (полиА), и
- (i) последовательность, кодирующую 3' ITR AAV2.

73. Фармацевтическая композиция по п. 72, отличающаяся тем, что ранний энхансерный элемент содержит последовательность, выделенную или полученную из цитомегаловируса (CMV - англ.: Cytomegalovirus).

74. Фармацевтическая композиция по п. 73, отличающаяся тем, что ранний энхансерный элемент содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1  ATTGACGT  CAATAATGAC  GTATGTTCCC  ATAGTAACGC  CAATAGGGAC  TTTCCATTGA
61  CGTCAATGGG  TGGAGTATTT  ACGGTAAACT  GCCCACTTGG  CAGTACATCA  AGTGTATCAT
121  ATGCCAAGTA  CGCCCCSTAT  TGACGTCAAT  GACGGTAAAT  GGCCCCCCTG  GCATTATGCC
181  CAGTACATGA  CCTTATGGGA  STTTCSTACT  TGGCAGTACA  TCTACGTATT  AGTCATCGCT
```

241 АТТАССАТGG (SEQ ID NO: 3).

75. Фармацевтическая композиция по п. 73, отличающаяся тем, что ранний энхансерный элемент содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 ССАТТGACGT СААТААТGAC GТАТGТТССС АТАGТААСGС СААТАGГGAC ТТТССАТТGA
61 СGTСААТGГG TGGAGТАТТТ АСGGТAAACT GСССACTTGG СAGТАСАТСА АGТGТАТСАТ
121 АТGССАAGТА СGСССССТАТ TGACGTCAAT GACGGТAAAT GGССCGCCTG GCАТТАТGСС
181 СAGТАСАТGA ССТТАТGGGA СТТТССТАСТ TGGCAGTACA ТСТАСGТАТТ АGТСАТСGСТ
241 АТТАССАТGG (SEQ ID NO: 4).

76. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-75, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая промотор, содержит или состоит из последовательности, выделенной или полученной из последовательности, кодирующей ген куриного бета-актина (СВА).

77. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-75, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая экзон и интрон, содержит или состоит из последовательности, выделенной или полученной из последовательности, кодирующей ген куриного бета-актина (СВА).

78. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-75, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая промотор, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 TCGAGGTGAG CCCCACGTTT TGCTTCACTC TCCCCATCTC CCCCCCTCC CCACCCCCAA
61 TTTTGTATTT ATTTATTTTT TAATTATTTT GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG GGGGGGGGGG
121 GGC GCGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGGCGGGG CGGGGCGAGG CGGAGAGGTG
181 CGGCGGCAGC СААТСАGAGC GGC GCGCTCC GAAAGTTTCC TTTTATGGCG AGGCGGCGGC
241 GGC GCGCGCC СТАТААААAG СGAAGCGCGC GGCGGGCGGG AGTCGCTGCG CGCTGCCTTC
301 GCCCGTGCC CCGCTCCGCC GCCGCCTCGC GCCGCCGCC CCGGCTCTGA CTGACCGCGT
361 ТАСТСССАСА GGTGAGCGGG CGGGACGGCC СТТСТССТС GGGCTGТААТ TAGCGCTTGG
421 ТТТААТGACG GCTTGTТТСТ ТТТСТGTGGC TGCGTGAАAG ССТTGAGGGG СТССGGGAGG
481 GCCSTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGG (SEQ ID NO: 5).

79. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-78, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая экзон и интрон, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 TCGAGGTGAG CCCCACGTTT TGCTTCACTC TCCCCATCTC CCCCCCTCC CCACCCCCAA
61 TTTTGTATTT ATTTATTTTT TAATTATTTT GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG GGGGGGGGGG
121 GGC GCGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGGCGGGG CGGGGCGAGG CGGAGAGGTG
181 CGGCGGCAGC СААТСАGAGC GGC GCGCTCC GAAAGTTTCC TTTTATGGCG AGGCGGCGGC
241 GGC GCGCGCC СТАТААААAG СGAAGCGCGC GGCGGGCGGG AGTCGCTGCG CGCTGCCTTC
301 GCCCGTGCC CCGCTCCGCC GCCGCCTCGC GCCGCCGCC CCGGCTCTGA CTGACCGCGT

361 TACTCCCACA GGTGAGCGGG CGGGACGGCC CTTCTCCTCC GGGCTGTAAT TAGCGCTTGG
421 TTTAATGACG GCTTGTCTTCT TTTCTGTGGC TGCCTGAAAAG CCTTGAGGGG CTCCGGGAGG
481 GCCCTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGG (SEQ ID NO: 5).

80. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-79, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая сайт акцептора сплайсинга, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности, кодирующей сайт акцептора сплайсинга бета-глобина *Oryctolagus cuniculus*.

81. Фармацевтическая композиция по п. 80, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая сайт акцептора сплайсинга бета-глобина *Oryctolagus cuniculus*, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 CTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCCTA CAGCTCCTGG GCAACGTGCT
61 GGTТАТТGTG CTGTCTCATC АТТТТGGСAА АGААТТ (SEQ ID NO: 6)

82. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-81, отличающаяся тем, что последовательность, содержащая ранний энхансерный элемент, последовательность, содержащая промотор, последовательность, содержащая интрон и экзон, и последовательность, содержащая сайт акцептора сплайсинга, содержат или состоят из последовательности нуклеиновой кислоты

1 TCGAGGTGAG CCCCACGTTT TGCTTCACTC TCCCCATCTC CCCCCCTCC CCACCCCCAA
61 TTTTGATATTT АТТТАТТТТТ ТААТТАТТТТ GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG GGGGGGGGGG
121 GGC GCGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGGCGGGG CGGGGCGAGG CGGAGAGGTG
181 CGGCGGCAGC CAATCAGAGC GGC GCGCTCC GAAAGTTTCC TTTTATGGCG AGGCGGCGGC
241 GGC GGC GGC STATAAAAAG CGAAGCGCGC GGC GGGCGGG AGTCGCTGCG CGCTGCCTTC
301 GCCCGTGCC CCGCTCCGCC GCCGCTCGC GCCGCCCGCC CCGGCTCTGA CTGACCGCGT
361 TACTCCCACA GGTGAGCGGG CGGGACGGCC CTTCTCCTCC GGGCTGTAAT TAGCGCTTGG
421 TTTAATGACG GCTTGTCTTCT TTTCTGTGGC TGCCTGAAAAG CCTTGAGGGG CTCCGGGAGG
481 GCCCTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGG TGTCCGCGGG GGGACGGCTG CCTTCGGGGG
541 GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG GCGGCTCTAG AGCCTCTGCT
601 AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCCTA CAGCTCCTGG GCAACGTGCT GGTТАТТGTG
661 CTGTCTCATC АТТТТGGСAА АGААТТGGAT C (SEQ ID NO: 7).

83. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-81, отличающаяся тем, что последовательность, содержащая ранний энхансерный элемент, последовательность, содержащая промотор, последовательность, содержащая интрон и экзон, и последовательность, содержащая сайт акцептора сплайсинга, содержат или состоят из последовательности нуклеиновой кислоты

1 CCATTGACGT CAATAATGAC GATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA
61 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT
121 ATGCCAAGTA CGCCCCSTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC

181 CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
241 ATTACCATGG TCGAGGTGAG CCCCACGTTT TGCTTCACTC TCCCCATCTC CCCCCCTCC
301 CCACCCCAA TTTTGTATTT ATTTATTTTT TAATTATTTT GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG
361 GGGGGGGGGG GGC GCGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGGCGGGG CGGGGCGAGG
421 CGGAGAGGTG CGGCGGCAGC CAATCAGAGC GGCGCGCTCC GAAAGTTTCC TTTTATGGCG
481 AGGCGGCGGC GGC GGGCGGCC CTATAAAAAG CGAAGCGCGC GGC GGGCGGG AGTCGCTGCG
541 CGCTGCCTTC GCCCCGTGCC CCGCTCCGCC GCCGCCTCGC GCCGCCGCC CCGGCTCTGA
601 CTGACCGCGT TACTCCCACA GGTGAGCGGG CGGGACGGCC CTCTCCTCC GGGTGTAAAT
661 TAGCGCTTGG TTTAATGACG GCTTGTTTCT TTTCTGTGGC TGCGTAAAAG CCTTGAGGGG
721 CTCCGGGAGG GCCCTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGGC TGTCCGCGGG GGGACGGCTG
781 CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG GCGGCTCTAG
841 AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCCTA CAGCTCCTGG GCAACGTGCT
901 GGTTATTGTG CTGTCTCATC ATTTTGGCAA AGAATTGGAT C (SEQ ID NO: 8).

84. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-83, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая белок REP1, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности REP1 млекопитающего.

85. Фармацевтическая композиция по п. 84, отличающаяся тем, что последовательность REP1 млекопитающего выделена или получена от мыши, крысы, кролика, не являющегося человеком примата или человека.

86. Фармацевтическая композиция по п. 84, отличающаяся тем, что последовательность REP1 млекопитающего выделена или получена от человека.

87. Фармацевтическая композиция по п. 86, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая белок REP1 человека, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 gatatcgaat tcttgcagcc cggcggcacc **atggcggata** ctctcccttc ggagtttgat
61 gtgatcgtaa tagggacggg tttgcctgaa tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt
121 ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga agctactatg gaggaactg ggccagtttt
181 agcttttcag gactattgtc ctggctaaag gaataccagg aaaacagtga cattgtaagt
241 gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg
301 aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta tttgttatg ccagtcagga tttgcatgaa
361 gatgtcgaag aagctgggtgc actgcagaaa aatcatgctc ttgtgacatc tgcaaactcc
421 acagaagctg cagattctgc cttcctgcct acggaggatg agtcattaag cactatgagc
481 tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc agcgatccag agaatgctc agaagtaaat
541 ggtgctgaag tgacagggga aaaagaaaac cattgtgatg ataaaacttg tgtgccatca
601 acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg cctatagcag aagataccac agagcaacca
661 aagaaaaaca gaattactta ctacaaaatt attaaagaag gcaggagatt taatattgat
721 ttagtatcaa agctgctgta ttctcgagga ttactaattg atcttctaata caaatctaata
781 gttagtcgat atgcagagtt taaaaatatt accaggattc ttgcatctcg agaaggacga
841 gtggaacaggt ttccgtgttc cagagcagat gtctttaata gcaacaact tactatggta
901 gaaaagcgaa gtctaataga atttcttaca tttgtatgg aatatgagaa atatcctgat
961 gaatataaag gatatgaaga gatcacattt tatgaatatt taaagactca aaaattaacc
1021 cccaacctcc aatatattgt catgcattca attgcaatga catcagagac agccagcagc

1081 accatagatg gtctcaaagc taccaaaaac tttcttcaact gtcttgggcg gtatggcaac
 1141 actccatttt tgtttccttt atatggccaa ggagaactcc cccagtgttt ctgcaggatg
 1201 tgtgctgtgt ttgggtggaat ttattgtctt cgccattcag tacagtgcct tgtagtggac
 1261 aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata gatcagtttg gtcagagaaat aatctctgag
 1321 catttcctcg tggaggacag ttacttttctt gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg
 1381 cagatctcca gggcagtgct gattacagat agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa
 1441 cagatttcca ttttgacagt gccagcagag gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt
 1501 gagttatggt cttcaacgat gacatgcatg aaaggcacct atttggttca tttgacttgc
 1561 acatcttcta aaacagcaag agaagattta gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca
 1621 tatactgaaa tggagataga aatgaacaa gtagaaaagc caagaattct gtgggctctt
 1681 tacttcaata tgagagattc gtcagacatc agcaggagct gttataatga tttaccatcc
 1741 aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag
 1801 gctgaaacac ttttccagga aatctgcccc aatgaagatt tctgtcccc tccaccaaat
 1861 cctgaagaca ttatccttga tggagacagt ttacagccag aggcttcaga atccagtgcc
 1921 ataccagagg ctaactcgga gactttcaag gaaagcacia accttggaac cctagaggag
 1981 tcctctgaat aa (SEQ ID NO: 9).

88. Композиция по п. 86 или п. 87, отличающаяся тем, что белок REP1 человека содержит или состоит из аминокислотной последовательности

1 MADTLPSEFD VIVIGTGLPE SIIAAACSRG GRRVLHVDSR SYYGGNWASF SFSGLLSWLK
 61 EYQENS DIVS DSPVWQDQIL ENEEAIALSR KDKTIQHVEV FCYASQDLHE DVEEAGALQK
 121 NHALVTSANS TEAADS AFLP TEDESLSTMS CEMLTEQTPS SDPENALEVN GA EVTGEKEN
 181 HCDDKTCVPS TSAEDMSENV PIAEDTTEQP KKNRITYSQI IKEGRRFNID LVSKLLYSRG
 241 LLIDLLIKSN VSRYA EFKNI TRILAFREGR VEQVPCSRAD VFNSKQLTMV EKRMLMKFLT
 301 FCMEYEKYPD EYKGYEEITF YEYLKTQKLT PNLQYIVMHS IAMTSETASS TIDGLKATKN
 361 FLHCLGRYGN TPFLFPLYGQ GELPQCFCRM CAVFGGIYCL RHSVQCLVVD KESRKCKAII
 421 DQFGQRIISE HFLVEDSYFP ENMCSR VQYR QISR AVLITD RSVLKTDS DQ QISILTVPAE
 481 EPGTF AVRVI ELCSSTMTCM KGTYLVHLTC TSSKTAREDL ESVVQKLFVP YTEMEIENEQ
 541 VEKPRILWAL YFNMRDSSDI SRSCYN DLPS NVYVCSG PDC GLGNDNAVKQ AETL FQ EICP
 601 NEDFCPPPPN PEDIILDGDS LQPEASSESA IPEANSETFK ESTNLGNLEE SSE (SEQ ID NO:
 10).

89. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-88, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая PRE, содержит последовательность, выделенную или полученную из вируса гепатита сурка (WPRE - англ.: Woodchuck Hepatitis virus).

90. Фармацевтическая композиция по п. 89, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая WPRE, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

1 atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc
 61 cttttacgct atgtggatac gctgctttaa tgcttttgta tcatgctatt gcttcccgta
 121 tggttttcat tttctcctcc ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagtgtg
 181 ggcccgttgt caggcaacgt ggcgtggtgt gcactgtgtt tgctgacgca acccccactg
 241 gttggggcat tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac tttcgctttc cccctccta
 301 ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgtcg ctggacaggg gctcggctgt
 361 tgggcaactga caattccgtg gtgttctcgg tgaaatcatc gtcctttcct tggctgctcg
 421 cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca
 481 atccagcggg ccttccctcc cgcggcctgc tgccggctct gcggcctctt ccgctcttc
 541 gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc tttgggccgc ctccccgc (SEQ ID NO: 11).

91. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-90, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая сайт полиаденилирования (полиА), содержит последовательность, выделенную или полученную из гена млекопитающего.

92. Фармацевтическая композиция по п. 91, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая сайт полиаденилирования (полиА), содержит последовательность, выделенную или полученную из гена гормона роста крупного рогатого скота (BGH).

93. Композиция по п. 92, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая сайт полиА, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1 tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc
61 cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga
121 aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga
181 cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgctg tgggctctat
241 ggcttctgag gcggaagaagaa ccagctgggg (SEQ ID NO: 12).
```

94. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-93, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая 5' ITR AAV2, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1 ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt
61 ggtcgccccg cctcagtgag ctagcgagcg cgcagagagg gaggggccaatctccatcact
121 aggggttcct ttagttaaata gatt (SEQ ID NO: 13).
```

95. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-93, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая 3' ITR AAV2, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты

```
1 AGGAACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG STCACTGAGG
61 CCGGGCGACC AAAGGTCGCC CGACGCCCGG GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAGA
121 G (SEQ ID NO: 14).
```

96. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-95, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, содержащая, от 5' к 3', элементы от (a) до (i), содержит или состоит из последовательности ДНК.

97. Фармацевтическая композиция по п. 96, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, содержащая, от 5' к 3', элементы от (а) до (i), содержит или состоит из одноцепочечной последовательности ДНК.

98. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-97, отличающаяся тем, что каждый гААV из множества полных гААV конечной композиции содержит капсидный белок, выделенный или полученный из ААV2.

99. Фармацевтическая композиция по п. 98, отличающаяся тем, что капсидный белок ААV2 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью

```
1 MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKCLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD
61 KGEFVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ
121 AKKRVLEPLG LVEEPVKTAP GKRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD
181 SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI
241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI
301 NNNWGFPRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG
361 CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPPF
421 HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG
481 PCYRQQRVSK TSADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL
541 IFGKQGSEKT NVDIEKVMIT DEEEIIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV
601 LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT
661 FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY
721 SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO: 15).
```

100. Фармацевтическая композиция по п. 98, отличающаяся тем, что капсидный белок ААV2 содержит аминокислотную последовательность

```
1 MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKCLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD
61 KGEFVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ
121 AKKRVLEPLG LVEEPVKTAP GKRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD
181 SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI
241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI
301 NNNWGFPRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG
361 CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPPF
421 HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG
481 PCYRQQRVSK TSADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL
541 IFGKQGSEKT NVDIEKVMIT DEEEIIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV
601 LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT
661 FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY
721 SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO: 15).
```

101. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-100, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит буфер для состава.

102. Фармацевтическая композиция по п. 101, отличающаяся тем, что буфер для состава содержит Трис, $MgCl_2$ и $NaCl$.
103. Фармацевтическая композиция по п. 101, отличающаяся тем, что буфер для состава содержит 20 мМ Трис, 1 мМ $MgCl_2$ и 200 мМ $NaCl$ при pH 8.
104. Фармацевтическая композиция по п. 101, отличающаяся тем, что буфер для состава содержит 20 мМ Трис, 1 мМ $MgCl_2$, 200 мМ $NaCl$ при pH 8 и полоксамер 188 при 0,001%.
105. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-104, отличающаяся тем, что множество полных гAAV находятся в концентрации от 1×10^8 геномных частиц (гч)/мл до 1×10^{14} гч/мл, включая конечные точки.
106. Фармацевтическая композиция по п. 105, отличающаяся тем, что множество полных гAAV находятся в концентрации от $0,5 \times 10^{10}$ гч/мл до $2,5 \times 10^{12}$ гч/мл, включая конечные точки.
107. Фармацевтическая композиция по п. 105, отличающаяся тем, что множество полных гAAV находятся в концентрации от 1×10^{11} гч/мл до 5×10^{13} гч/мл, включая конечные точки.
108. Фармацевтическая композиция по п. 105, отличающаяся тем, что множество полных гAAV находятся в концентрации от 1×10^{11} гч/мл до 2×10^{12} гч/мл, включая конечные точки.
109. Фармацевтическая композиция по п. 105, отличающаяся тем, что множество полных гAAV находятся в концентрации 1×10^{12} гч/мл.
110. Фармацевтическая композиция по п. 105, отличающаяся тем, что множество полных гAAV находятся в концентрации 1×10^{11} гч/мл.

111. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 72-110, отличающаяся тем, что концентрацию множества полных гAAV измеряют с помощью количественной ПЦР.
112. Фармацевтическая композиция по п. 111, отличающаяся тем, что в количественной ПЦР используется суперспирализованный плазмидный вектор в качестве стандарта.
113. Фармацевтическая композиция по п. 111, отличающаяся тем, что в количественной ПЦР используется линейризованный плазмидный вектор в качестве стандарта.
114. Устройство для доставки, содержащее фармацевтическую композицию по любому из пп. 72-113.
115. Устройство для доставки по п. 114, отличающееся тем, что устройство для доставки содержит один или более из шприца, катетера и иглы.
116. Устройство для доставки по п. 114, отличающееся тем, что устройство для доставки подходит для введения фармацевтической композиции путем инъекции.
117. Устройство для доставки по п. 114, отличающееся тем, что устройство для доставки подходит для введения фармацевтической композиции путем инфузии.
118. Устройство для доставки по любому из пп. 114-117, отличающееся тем, что устройство для доставки подходит для введения фармацевтической композиции субретинальным путем.
119. Устройство для доставки по любому из пп. 114-117, отличающееся тем, что устройство для доставки подходит для введения фармацевтической композиции супрахориоидальным путем.
120. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 38-113.

121. Способ по п. 120, отличающийся тем, что заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство сетчатки.
122. Способ по п. 120 или п. 121, отличающийся тем, что заболевание или расстройство представляет собой хороидеремию.
123. Способ по любому из пп. 120-122, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество включает количество от минимально эффективного количества до максимально переносимого количества фармацевтической композиции.
124. Способ по п. 123, отличающийся тем, что минимально эффективное количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для трансдукции по меньшей мере одного нейрона сетчатки или ее целевой части.
125. Способ по п. 123, отличающийся тем, что минимально эффективное количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для трансдукции по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, или любого другого процентного значения между указанными, нейронов сетчатки или ее целевой части.
126. Способ по любому из пп. 123-125, отличающийся тем, что минимально эффективное количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для улучшения остроты зрения субъекта.
127. Способ по любому из пп. 123-125, отличающийся тем, что минимально эффективное количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для уменьшения признака или симптома заболевания сетчатки.
128. Способ по п. 127, отличающийся тем, что заболевание сетчатки представляет собой хороидеремию.

129. Способ по любому из пп. 123-128, отличающийся тем, что максимально переносимое количество включает количество фармацевтической композиции, достаточное для того, чтобы вызвать нежелательное явление.
130. Способ по п. 129, отличающийся тем, что нежелательное явление включает иммунный ответ на фармацевтическую композицию.
131. Способ по п. 130, отличающийся тем, что иммунный ответ включает воспаление.
132. Способ по п. 131, отличающийся тем, что воспаление является системным.
133. Способ по п. 131, отличающийся тем, что воспаление является локальным.
134. Способ по любому из пп. 129-133, отличающийся тем, что нежелательное явление является серьезным.
135. Способ по п. 134, отличающийся тем, что нежелательное явление нельзя предотвратить, уменьшить или контролировать, назначая субъекту вторичное лечение.
136. Способ по любому из пп. 120-135, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции включает количество, имеющее показатель множественности заражения (MOI - multiplicity of infection) от 10^4 до 10^6 , включая конечные точки.
137. Способ по п. 136, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции включает количество, имеющее показатель множественности заражения (MOI) от 10^4 до 10^5 , включая конечные точки.
138. Способ по 136, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции включает количество, имеющее показатель множественности заражения (MOI) 10^5 .

139. Способ по любому из пп. 120-135, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит от 1×10^8 гч до 1×10^{13} гч, включая конечные точки.
140. Способ по любому из пп. 120-135, отличающаяся тем, что терапевтически эффективное количество содержит от 6×10^9 гч до 1×10^{13} гч, включая конечные точки.
141. Способ по любому из пп. 120-135, отличающаяся тем, что терапевтически эффективное количество содержит от 6×10^9 гч до 7×10^{12} гч, включая конечные точки.
142. Способ по любому из пп. 120-135, отличающаяся тем, что терапевтически эффективное количество содержит от 6×10^9 гч до 5×10^{12} гч, включая конечные точки.
143. Способ по любому из пп. 120-135, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит от 1×10^{10} гч до 1×10^{12} гч, включая конечные точки.
144. Способ по любому из пп. 120-135, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит или состоит из 1×10^{10} гч.
145. Способ по любому из пп. 120-135, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит или состоит из 1×10^{11} гч.
146. Способ по любому из пп. 120-135, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит или состоит из 1×10^{12} гч.
147. Способ по любому из пп. 120-146, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит или состоит из объема от 10 мкл до 200 мкл, включая конечные точки.
148. Способ по п. 147, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит или состоит из объема от 10 мкл до 50 мкл, от 50 мкл до 100 мкл, от 100 мкл до 150 мкл или от 150 до 200 мкл, включая конечные точки для каждого диапазона.

149. Способ по любому из пп. 120-148, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит или состоит из объема от 70 мкл до 120 мкл, включая конечные точки.
150. Способ по любому из пп. 120-149, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит или состоит из объема 100 мкл.
151. Способ по любому из пп. 120-150, отличающийся тем, что стадия введения включает инъекцию или инфузию.
152. Способ по любому из пп. 120-151, отличающийся тем, что стадия введения включает субретинальный, супрахориоидальный или интравитреальный путь введения.
153. Способ по любому из пп. 120-152, отличающийся тем, что стадия введения включает субретинальную инъекцию или инфузию.
154. Способ по п. 153, отличающийся тем, что субретинальная инъекция или инфузия включает 2-этапную субретинальную инъекцию.
155. Способ по любому из пп. 120-152, отличающийся тем, что стадия введения включает супрахориоидальную инъекцию или инфузию.
156. Способ по любому из пп. 120-155, отличающийся тем, что субъектом является мужчина.
157. Способ по п. 156, отличающийся тем, что субъекту по меньшей мере 18 лет.
158. Способ по любому из пп. 120-157, отличающийся тем, что у субъекта имеется генетически подтвержденный диагноз хороидеремии.
159. Способ по п. 154, отличающийся тем, что у субъекта идентифицирована мутация в гене RRP1.

160. Способ по любому из пп. 120-159, отличающийся тем, что у субъекта проявляются клинические признаки хороидеремии в желтом пятне по меньшей мере одного глаза.
161. Способ по любому из пп. 120-160, отличающийся тем, что субъект имеет показатель остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA- англ.: Best Corrected Visual Acuity) 34-73 буквы по меньшей мере для одного глаза.
162. Способ по любому из пп. 120-161, отличающийся тем, что у субъекта имеется легкая хороидеремия или хороидеремия ранней стадии.
163. Способ по любому из пп. 120-162, отличающийся тем, что у субъекта прогрессирующая или тяжелая хороидеремия.
164. Способ по любому из пп. 120-163, отличающийся тем, что способ включает лечение 10 мм² сетчатки по меньшей мере одного глаза.
165. Способ по п. 164, отличающийся тем, что способ включает лечение от 5 мм² до 10 мм², включая конечные точки, сетчатки по меньшей мере одного глаза.
166. Способ по п. 164, отличающийся тем, что способ включает лечение от 2 мм² до 15 мм², включая конечные точки, сетчатки по меньшей мере одного глаза.
167. Способ по любому из пп. 120-166, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в один глаз субъекта.
168. Способ по любому из пп. 120-167, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в оба глаза субъекта.
169. Способ по п. 168, отличающийся тем, что глаза пациента лечат одновременно.
170. Способ по п. 169, отличающийся тем, что глаза субъекта лечат последовательно.

171. Способ по любому из пп. 120-170, отличающийся тем, что по меньшей мере один глаз субъекта лечили от хороидеремии до введения фармацевтической композиции субъекту.
172. Способ по любому из пп. 120-171, отличающийся тем, что способ включает введение от 1 до 12 доз на глаз, включая конечные точки.
173. Способ по п. 172, отличающийся тем, что способ включает введение по меньшей мере одной дозы, по меньшей мере один раз в день, один раз в неделю, один раз в месяц, один раз каждые три месяца, один раз каждые 6 месяцев или один раз в год.
174. Способ по п. 173, отличающийся тем, что способ включает введение нескольких доз, причем каждая доза содержит одинаковое количество фармацевтической композиции.
175. Способ по п. 173, отличающийся тем, что способ включает введение нескольких доз, причем каждая доза не содержит одинаковое количество фармацевтической композиции.
176. Способ по любому из пп. 172-175, отличающийся тем, что способ включает введение нескольких доз, причем каждая последующая доза содержит большее количество полных гAAV, чем предыдущая доза.
177. Способ по любому из пп. 172-175, отличающийся тем, что способ включает введение нескольких доз, причем каждая последующая доза содержит меньшее количество полных гAAV, чем предыдущая доза.
178. Способ по любому из пп. 172-177, отличающийся тем, что у субъекта возникло нежелательное явление после введения дозы, причем последующая доза содержит меньшее количество полных гAAV, чем предыдущая доза, которая вызвала нежелательное явление.

179. Способ по п. 178, отличающийся тем, что у субъекта исчезает нежелательное явление и субъекту вводят следующую дозу фармацевтической композиции.

180. Способ по п. 179, отличающийся тем, что доза, вызвавшая нежелательное явление, и последующая доза содержат равное количество полных гAAV.

181. Способ по п. 179, отличающийся тем, что доза, вызвавшая нежелательное явление, и последующая доза не содержат равное количество полных гAAV.

182. Способ по любому из пп. 120-181, отличающийся тем, что способ дополнительно включает введение субъекту определенного количества множества плацебо гAAV перед введением терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, причем каждый плацебо гAAV представляет собой пустой гAAV.

183. Способ по п. 182, отличающийся тем, что пустой гAAV не содержит промотора для экспрессии экзогенной последовательности или экзогенной последовательности.

184. Способ по любому из пп. 120-183, отличающийся тем, что введение определенного количества множества плацебо гAAV является системным.

185. Способ по любому из пп. 120-183, отличающийся тем, что введение определенного количества множества плацебо гAAV является локальным.

186. Способ по любому из пп. 182-185, отличающийся тем, что способ дополнительно включает

(a) определение того, индуцировало ли множество плацебо гAAV иммунный ответ у субъекта, и/или

(b) определение того, развилась ли у субъекта иммунная толерантность ко множеству плацебо гAAV, тем самым указывая, что введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции не должно вызывать у субъекта иммуноопосредованных нежелательных явлений.

187. Способ по любому из пп. 120-186, отличающийся тем, что способ дополнительно включает введение супрессора иммунного ответа.
188. Способ по п. 187, отличающийся тем, что супрессор включает противовоспалительный агент.
189. Способ по п. 188, отличающийся тем, что противовоспалительный агент включает кортикостероид.
190. Способ по п. 189, отличающийся тем, что кортикостероид включает преднизон или преднизолон.
191. Способ по любому из пп. 187-190, отличающийся тем, что введение супрессора иммунного ответа является системным.
192. Способ по п. 191, отличающийся тем, что супрессор иммунного ответа вводят перорально.
193. Способ по любому из пп. 187-190, отличающийся тем, что введение супрессора иммунного ответа является локальным.
194. Способ по п. 193, отличающийся тем, что супрессор иммунного ответа вводят в глаз, который подвергался лечению фармацевтической композицией.
195. Способ по любому из пп. 187-194, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию и супрессор иммунного ответа вводят одновременно.
196. Способ по п. 195, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию и супрессор иммунного ответа вводят в один и тот же день.
197. Способ по любому из пп. 187-194, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию и супрессор иммунного ответа вводят последовательно.

198. Способ по п. 197, отличающийся тем, что введение супрессора предшествует введению фармацевтической композиции по меньшей мере на один день.

199. Способ по п. 193, отличающийся тем, что введение фармацевтической композиции предшествует введению супрессора по меньшей мере на один день.

200. Способ по любому из пп. 120-199, отличающийся тем, что способ дополнительно включает определение исходной тяжести опосредованного хороидеремией повреждения по меньшей мере одного глаза субъекта.

201. Способ по любому из пп. 120-200, отличающийся тем, что способ дополнительно включает определение последующей тяжести опосредованного хороидеремией повреждения по меньшей мере одного глаза субъекта после введения фармацевтической композиции по меньшей мере в один глаз.

202. Способ по п. 200 или 201, отличающийся тем, что начальную или последующую тяжесть опосредованного хороидеремией повреждения определяют путем определения показателя теста остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA), измерения площади или объема жизнеспособной ткани сетчатки, измерения сохраненной зоны эллипсоида, измерения чувствительности сетчатки, измерения контрастной чувствительности, измерения цветового зрения, измерения остроты зрения при низкой освещенности, измерения скорости чтения или любого их сочетания.

203. Способ по п. 202, отличающийся тем, что в тесте BCVA используется таблица ETDRS (Изучение раннего лечения диабетической ретинопатии - англ.: Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study).

204. Способ по п. 202 или п. 203, отличающийся тем, что тест BCVA включает оценку одного или более из подсчета пальцев, движения руки, восприятия света и их комбинации.

205. Способ по п. 202, отличающийся тем, что измерение жизнеспособной ткани сетчатки включает аутофлуоресценцию глазного дна, причем измерение жизнеспособной ткани сетчатки включает определение уровня или паттерна аутофлуоресценции глазного дна.
206. Способ по п. 202, отличающийся тем, что измерение сохраненной зоны эллипсоида включает спектральную оптическую когерентную томографию (SD-OCT - англ.: Spectral Domain Optical Coherence Tomography).
207. Способ по п. 202, отличающийся тем, что измерение чувствительности сетчатки включает микропериметрию.
208. Способ по любому из пп. 120-207, отличающийся тем, что введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции ингибирует или снижает прогрессирование признака или симптома хороидеремии.
209. Способ по любому из пп. 120-207, отличающийся тем, что введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции уменьшает признак или симптом хороидеремии.
210. Способ по любому из пп. 120-207, отличающийся тем, что признак или симптом хороидеремии включает потерю фоторецепторных клеток, потерю клеток ПЭС (пигментный эпителий сетчатки - англ.: retinal pigment epithelial), снижение остроты зрения, снижение остроты зрения при низкой освещенности, общую площадь сохраненной аутофлуоресценции (AF - англ.: autofluorescence), низкий показатель по тесту BCVA, уменьшение площади сохраненной зоны эллипсоида, снижение чувствительности сетчатки, снижение контрастной чувствительности, снижение или ухудшение цветового зрения, снижение скорости чтения или любое их сочетание.
211. Способ по п. 210, отличающийся тем, что тяжесть признака или симптома хороидеремии определяют относительно здоровой сетчатки.

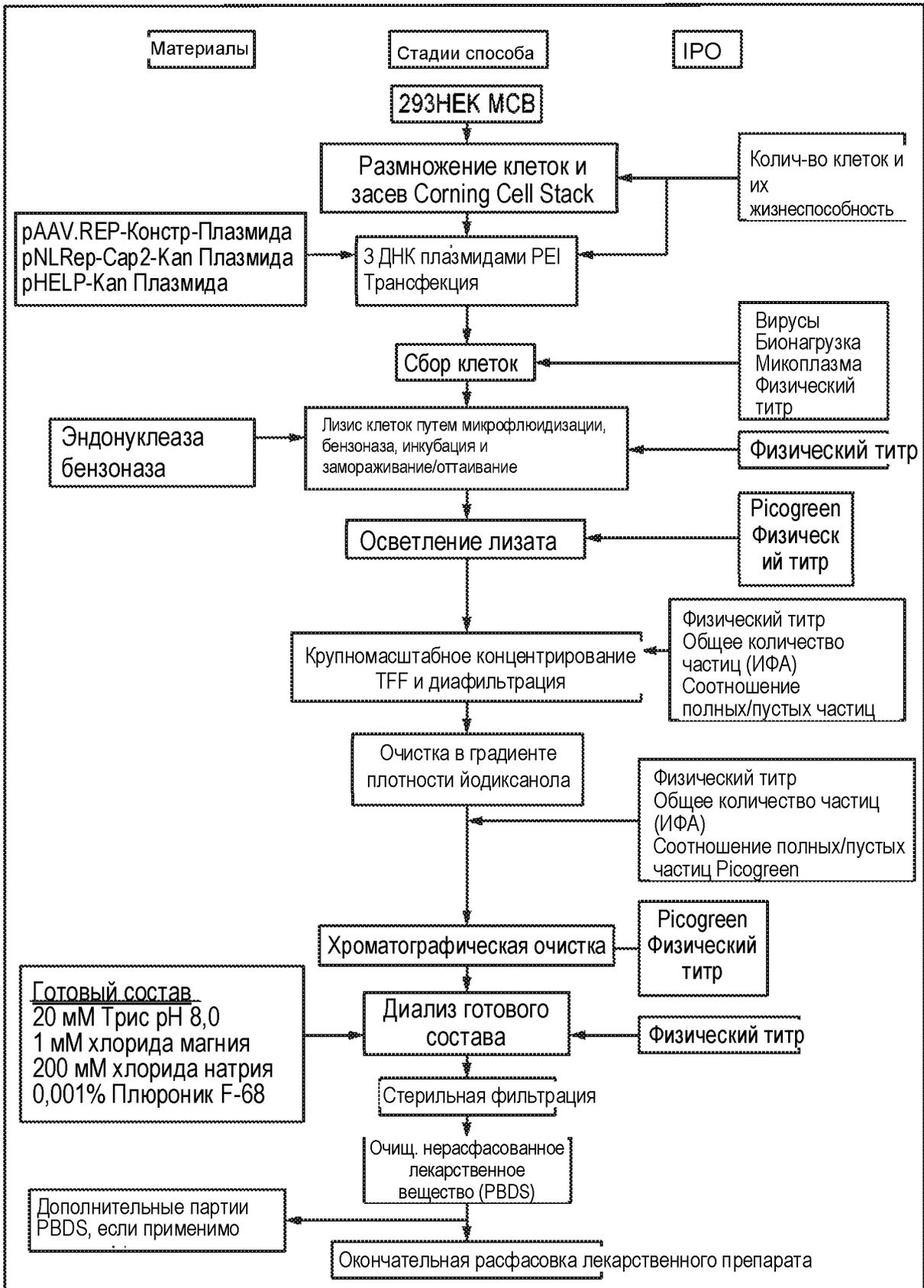
212. Способ по п. 211, отличающийся тем, что здоровая сетчатка принадлежит контрольному субъекту соответствующего возраста.

213. Способ определения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 38-212, включающий:

- (a) измерение площади сетчатки у субъекта, подлежащего лечению,
- (b) определение того, находится ли площадь (a) в центральной фовеальной зоне, равной $0,5 \text{ мм}^2$, или в желтом пятне,
- (c) вычисление количества палочек, колбочек и клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) на площади (a), и
- (d) умножение общего количества клеток на показатель множественности заражения (МОI), равный 1×10^5 , для вычисления количества геномных частиц (гч), которые должны быть включены в терапевтически эффективное количество,
 - при этом максимальная площадь сетчатки, подлежащей лечению, составляет 10 мм^2 ,
 - при этом плотность клеток ПЭС в сетчатке составляет 5000 клеток на мм^2 ,
 - при этом плотность палочек в сетчатке составляет 75000 палочек на мм^2 без учета центральной фовеальной зоны, равной $0,5 \text{ мм}^2$,
 - при этом плотность колбочек в сетчатке составляет 150000 колбочек на мм^2 в центральной фовеальной зоне, равной $0,5 \text{ мм}^2$, плотность колбочек в сетчатке 25000 на мм^2 в макуле за пределами центральной фовеальной зоны, равной $0,5 \text{ мм}^2$.

ФИГ. 1

Обзор типового способа получения AAV2-конструкта (Констр)



ФИГ. 2

Блок-схема производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта

Стадия	Условия	Описание стадии	IPC
Размножение клеток и засев Corning Cell Stack			
1	Оттаивание. $37 \pm 2^\circ\text{C}$, Инкубация: DMEM + 5% ФБС, 20 мл, $37 \pm 1^\circ\text{C}$; CO_2 инкубатор	Оттаивание клеток НЕК293 и посев в колбу T75	
2	Пассаж 1 20000 клеток/ cm^3 , DMEM + 5% ФБС, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, CO_2 инкубатор; 5 дней	Размножение в колбе T75 \rightarrow 1 х T175CB или 3 колбы T75	Количество клеток и их жизнеспособность
3	Пассаж 2 20000 клеток/ cm^3 , DMEM + 5% ФБС, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, CO_2 инкубатор; 4 дня	Размножение 1 х T175CB \rightarrow 4 T175CB или 3 колбы T75 \rightarrow 4 T175CB	Количество клеток и их жизнеспособность
4	Пассаж 3 20000 клеток/ cm^3 , DMEM + 5% ФБС, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, CO_2 инкубатор; 4 дня	Размножение 4 T175CB \rightarrow 8 T175CB	Количество клеток и их жизнеспособность
5	Пассаж 4 Соотношение 1/4, DMEM + 5% ФБС, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, CO_2 инкубатор; 3 дня	Размножение 6 T175CB \rightarrow 3 CS2CB	Количество клеток и их жизнеспособность
6	Пассаж 5 Соотношение 1/8, DMEM + 5% ФБС, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, CO_2 инкубатор; 4 дня	Размножение 2 CS2CB \rightarrow 3 CS10CB	Количество клеток и их жизнеспособность
7	Пассаж 6 Соотношение 1/4, DMEM + 5% ФБС, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, CO_2 инкубатор; 3 дня	Размножение 2 CS10CB \rightarrow 8 CS10CB	Количество клеток и их жизнеспособность
8	Пассаж 7 20,000 клеток/ cm^3 , DMEM + 5% ФБС, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, CO_2 инкубатор; 3 дня	Размножение 8 CS10CB \rightarrow 24 CS10CB	Количество клеток и их жизнеспособность

ФИГ. 2 (продолжение)

Транзиторная трансдукция плазмидной ДНК в 24 10-слойных емкостях			
9	Соотношение PEI: ДНК = 2:1; Соотношение ДНК: pAAV.конструкт-Kan: pHELP- Kan: pNLRrep-Cap2-Kan = 1:2:1.5	Трансдукция	Количество клеток и их жизнеспособность
10	Делают через 60 ± 13 часов после трансдукции, 90 Ед/мл бензоназы, 5 мг/мл $MgCl_2$	Сбор клеток	Придаточные вирусы, Бионагрузка, Микоплазма, Физический титр
Лизис микрофлюидизацией			
11	Микрофлюидизатор, буфер: Трис 20 мМ, $MgCl_2$ 1 мМ, NaCl 50 мМ, pH 8	Микрофлюидизация	Физический титр
12	Комн. тем-ра, макс. 18 часов	Инкубация с бензоназой	
13	Замораживание на $-20 \pm 5^\circ C$, оттаивание на протяжении ночи при комн. температуре	Замораживание/ размораживание	
Очистка			
14	Sartopure GF 0,65 мкм 0,4 м ² , Sartopore 2 0,2 мкм 0,2 м ² , буфер Трис 20 мМ, $MgCl_2$ 1 мМ, NaCl 50 мМ pH 8	Осветление лизата	Picogreen, Физический титр
15	Размер пор мембраны 100 кДа, буфер Трис 20 мМ, $MgCl_2$ 1 мМ и NaCl 500 мМ при pH 8	Крупномасштабное концентрирование TFF и диафильтрация	Физ. титр, общее кол-во Частицы (ИФА), Соотношение полных/пустых частиц
16	Градиент плотности (например, градиент йодиксанола 15%, 25%, 40%, 60%),	Ультрацентрифугирование	
17	Буфер Трис 10 мМ, pH 9,0 для UnoQ Трис 20 мМ, $MgCl_2$ 1 мМ, NaCl 200 мМ pH 8 для AVB	Разведение, 20x для UnoQ Разведение, 6x для AVB	Физический титр, Общее количество Частицы (ИФА), Соотношение полных/ пустых частиц, Picogreen

ФИГ. 2 (продолжение)

18	Упо Q, буфер для элюирования: Трис 10 мМ, NaCl 650 мМ pH 9 Буфер для элюирования AVB:Na ₂ HPO ₄ 10,8 мМ, лимонная кислота 44,6 мМ, NaCl 400 мМ, pH 2,6 (элюирован 4CV буфером нейтрализации Трис IM, pH 8,8)	Анионообменная хроматография AVB хроматография	Pisogreen, Физический титр
↓			
19	Кассета для диализа 100 кДа, 20 мМ Трис, 1 мМ MgCl ₂ и 200 мМ NaCl при pH 8	Диализ и Готовый состав	Физический титр
↓			
20	Фильтрация 0,2 мкм	Субмикронная фильтрация (если требуется для хранения лек вещества)	

ФИГ. 3

Структурная организация AAV2-Конструкта

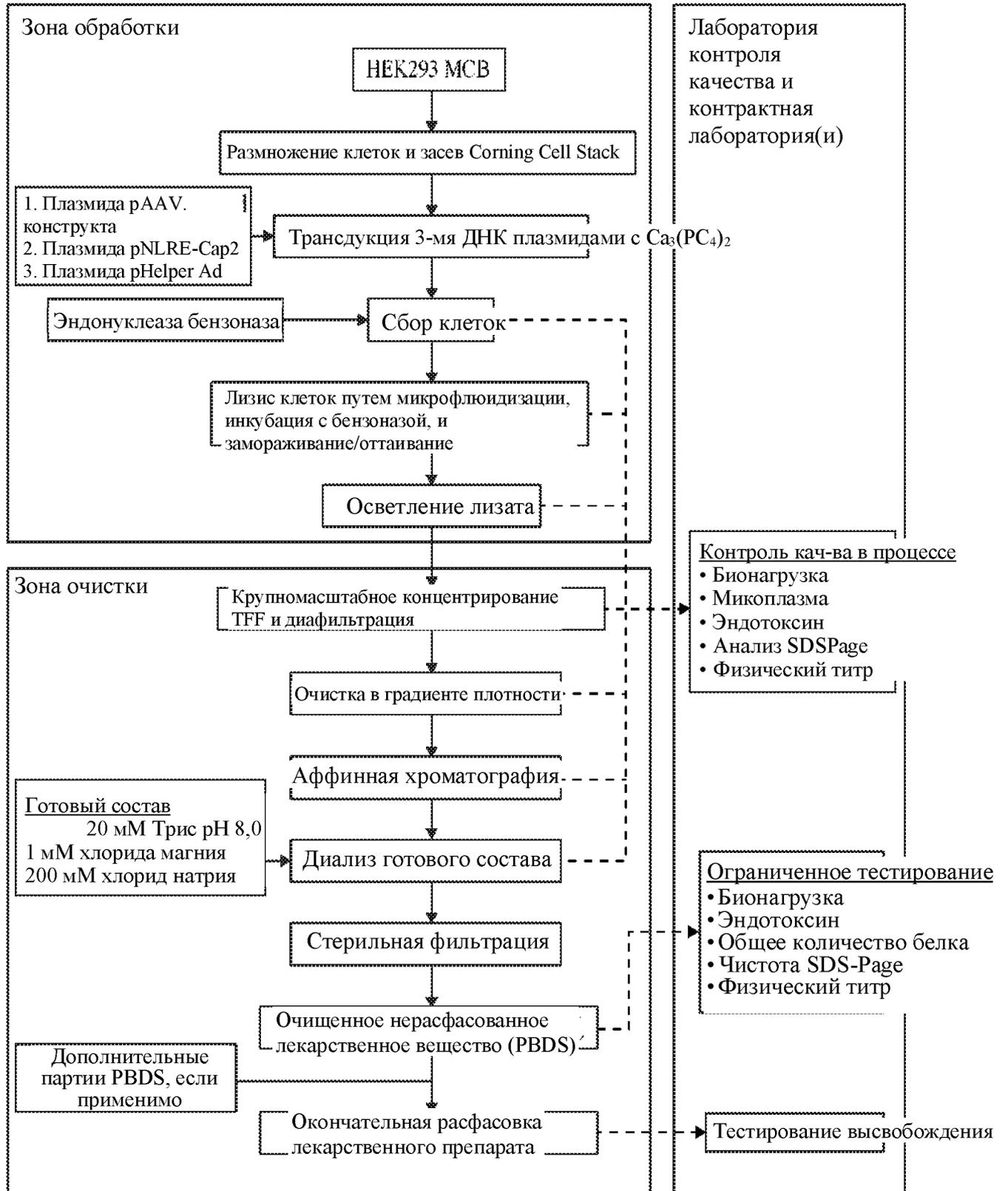


ФИГ. 4

Обзор получения МСВ НЕК293

Стадия	Детали операции
1.	<p style="text-align: center;">Приготовление среды</p> <p>Полная среда для выращивания готовится в соответствии с Разделом 4.0. Внесите аликвоту необходимого объема в стерильную прямоугольную бутылку для среды, если требуются меньшие объемы, и предварительно нагрейте на водяной бане с температурой $36,5^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$.</p>
2.	<p style="text-align: center;">Оттаивание исходного флакона</p> <p>Оттаивание 1 флакона с клетками НЕК 293 ATCC-CRL-1573., CTL 2015#0036L, в колбу T75 и культивирование в течение 4 дней при $36,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO_2, влажности $\geq 70\%$. Завершение смены среды через 24 ± 4 часа после восстановления.</p>
3.	<p style="text-align: center;">Пассаж клеток</p> <p>Последовательно размножьте клетки 5-6-ю пассажами. Пассаж через каждые 3-4 дня после достижения плотности посева, описанной в Разделе 5.3, Стадия 3. Инкубируйте колбы при $36,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO_2, влажности $\geq 70\%$. Размножение, пока не будет засеяно 50 тройных (T500) колб.</p>
4.	<p style="text-align: center;">Сбор клеток</p> <p>Через три дня после засева 50 тройных (T500) колб собирают и объединяют культуры клеток и инициируют накопление клеток.</p>
5.	<p style="text-align: center;">Получение МСВ</p> <p>Подготовьте и предварительно охладите Mr Frostys перед накоплением. Предварительно промаркируйте криопробирки как MSC класс II перед хранением. Соберите клетки центрифугированием. Ресуспендируйте клетки при плотности 1×10^7 жизнеспособных клеток/мл в свежей полной среде для выращивания. Добавьте равный объем 2-х Freeze Mix к культуре клеток, чтобы получить конечную концентрацию $5 \times 10^6 \pm 10\%$ жизнеспособных клеток/мл. С помощью пипетки на 5 мл вручную заполните предварительно маркированные криопробирки на 1,8 мл $1,1 \pm 0,1$ мл клеточной суспензии, пока вся клеточная суспензия используется. Два оператора будут заполнять каждый свои флаконы. Один оператор будет заполнять флаконы с нечетными номерами, а другой оператор - флаконы с четными номерами. Заморозьте аликвоты клеток в предварительно охлажденном Mr Frostys и храните в морозильной камере при температуре $\leq -70^{\circ}\text{C}$ минимум 24 часа/максимум 2 дня. Перенесите в газообразный азот для длительного хранения. ПРИМЕЧАНИЕ: Время от добавления 2-х Freeze Mix во флаконы до помещения в морозильную камеру с температурой $\leq -70^{\circ}\text{C}$, не должно превышать 120 минут.</p>

ФИГ. 5



ФИГ. 6

Блок-схема типового производства лекарственного вещества на основе AAV2-конструкта

Стадия	Условия	Описание стадии	IPC
Размножение клеток и засев Corning Cell Stack			
1	Оттаивание. 36 -38 °С, Инкубация: DMEM + 10% CCS, 25 мл, 37±1 °С; CO ₂ инкубатор, 3– 4 дня	Оттаивание клеток SG293 и посев в 1 колбу T175	
2	Каждая колба по 2 мл клеточной суспензии, 23 мл DMEM+10% CCS, 37 ±1 °С, CO ₂ инкубатор; 3 - 4 дня	Размножение в 4 колбах T175	
3	На слой клеток 1 колбы, DMEM + 10% CCS, объем 150 мл, CO ₂ инкубатор; 3 - 4 дня	Размножение в 2х 1-слойных	
4	На слой: 6,0 x 10 ⁷ клеток, DMEM + 10% CCS, объем 300 мл, CO ₂ инкубатор; 3 - 4 дня	Размножение в 2х 2-слойных	
5	4,0 x 10 ⁸ жизнеспособных клеток, 1,5l DMEM + 10% CCS, CO ₂ инкубатор	Размножение в 1х 10-слойной	
6	4 слоя: 1,2 x 10 ⁹ жизнеспособных клеток, 6,6l DMEM/Высок. + 4 mM SG-200 + 10% CCS 6l, CO ₂ инкубатор	Размножение в 4х 10-слойных	
7	12 слоев: 3,1 x 10 ⁹ жизнеспособных клеток, 18 l DMEM/Высок. + 4 mM SG-200 + 10% CCS, CO ₂ инкубатор	Размножение в 12х 10-слойных	
Транзиторная трансдукция плазмидной ДНК в двенадцати 10-слойных емкостях			
8	Хлорохин, преципитация ДНК/Са ₃ (РО ₄) ₂	Трансдукция	Бионагрузка
9	90 Ед/мл бензоназы, 5 мг/мл MgCl ₂	Сбор клеток	Бионагрузка, эндотоксин, микоплазма, придаточный вирус in vitro

ФИГ. 6 (продолжение)

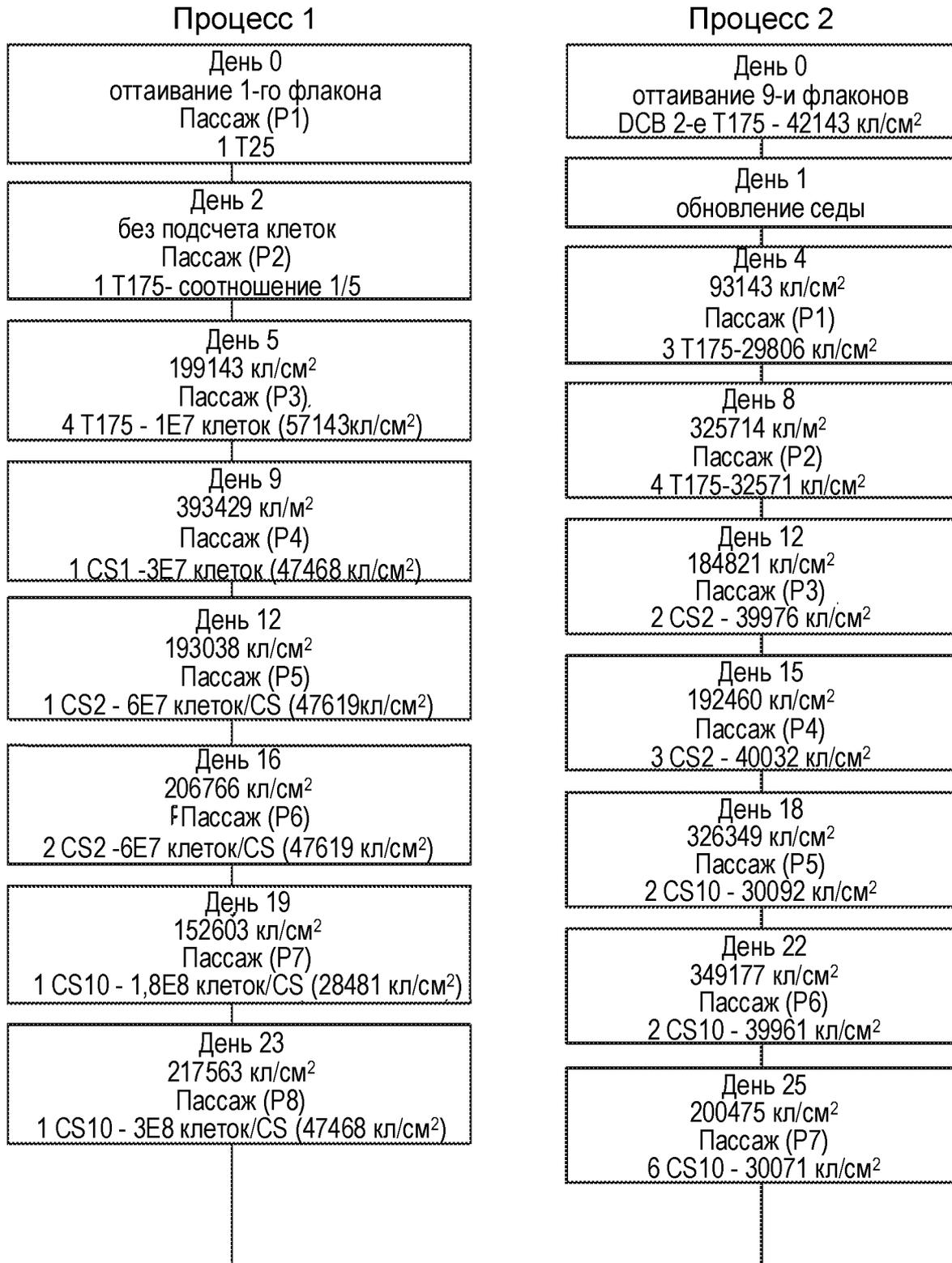
Стадия	Условия	Описание стадии	IPC
Лизис микрофлюидизацией			
10	Микрофлюидизатор, 0,5 кг TMN50	Микрофлюидизация	Бионагрузка, Физический титр
11	37± 1°C, 18± 2 час	Инкубация с бензоназой	
12	-20± 5°C, 36 час, 37± 1°C	Замораживание/ размораживание	
Очистка			
13	SartoPure Gf+, размер 1. SartoPore 2, размер 0, TMN50	Осветление и снижение бионагрузки	Бионагрузка, Физический титр
14	Размер пор мембраны 100 кДа, SSS, 20 mM Трис pH 8,0, 1 mM MgCl ₂ 500 mM NaCl, 0,1% неионогенного ПАВ	Концентрирование TFF и диафильтрация	Бионагрузка, Физический титр, Общее количество белка
15	Градиент йодиксанола (15%, 25%, 40%, 57%)	ультрацентрифугирование	Бионагрузка, Физический титр, SDS-PAGE
16	Матрица животного происхождения (например, гепарин), буфер для элюирования 20 mM Трис, pH 8,1 mM MgCl ₂ 400 mM NaCl	Колонка для аффинной хроматографии FPLC	Бионагрузка, Физический титр, SDS-PAGE
17	Кассета для диализа 10 кДа, 20 mM Трис, 1 mM MgCl ₂ и 200 mM NaCl при pH 8	Диализ и Готовый состав	Бионагрузка, Физический титр
18	Фильтр 0,22 мкм	Стерильная фильтрация	Бионагрузка, физический титр, Микро-BCA, SDS-PAGE

ФИГ. 7

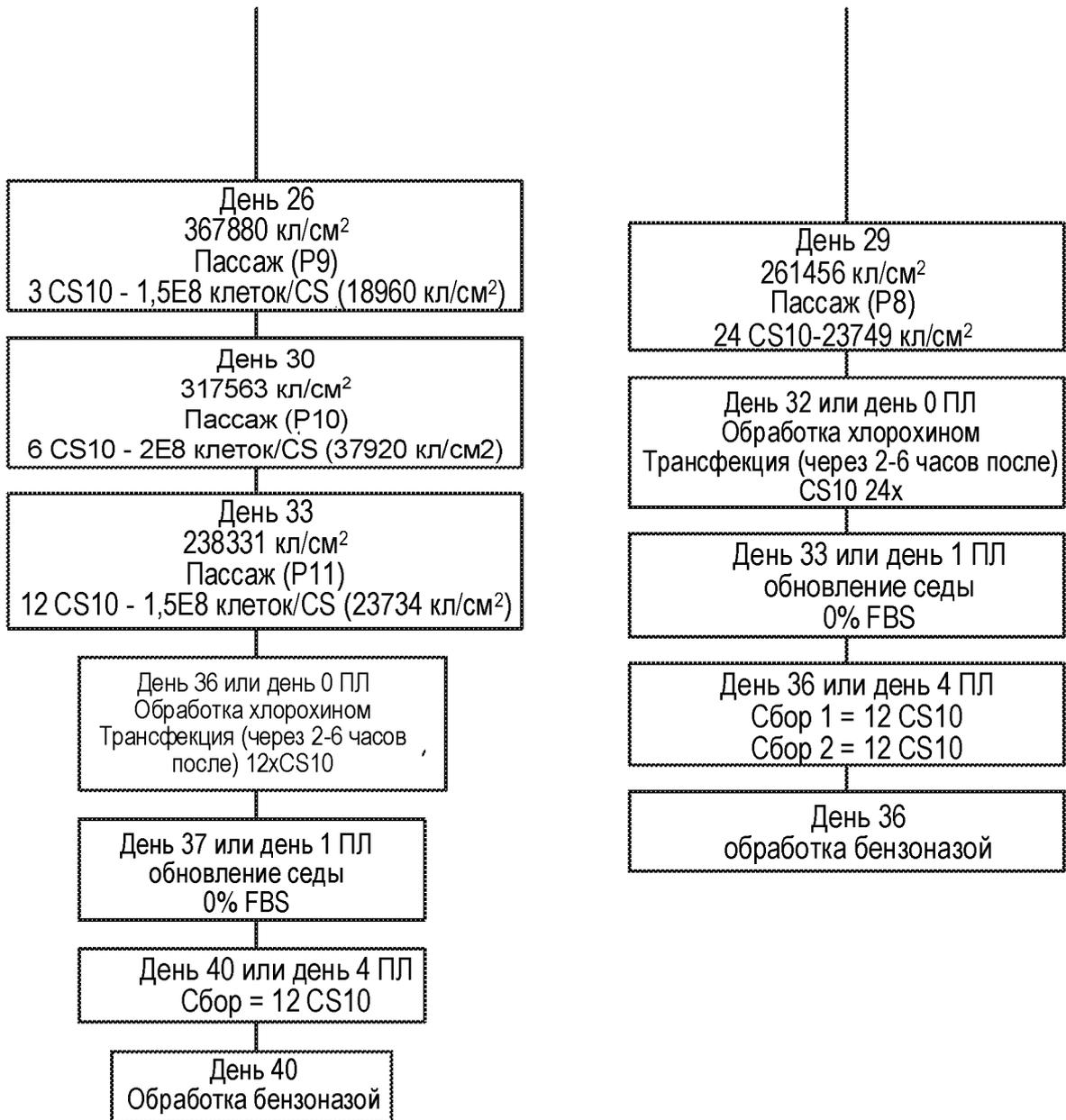
Блок-схема типового производства лекарственного продукта на основе AAV2-конструкта

Стадия	Условия	Описание стадии	ИРС
1	КТ	Оттаивание	
		↓	
2	20 мМ Трис, 1 мМ MgCl ₂ и 200 мМ NaCl	Разведение	Физический титр
	при pH 8	↓	
3	стерильные криопробирки из полипропилена на 0,5 мл	Асептическое заполнение	
		↓	
4		Маркировка	
		↓	
5		Хранение при ≤ -60	

ФИГ. 8



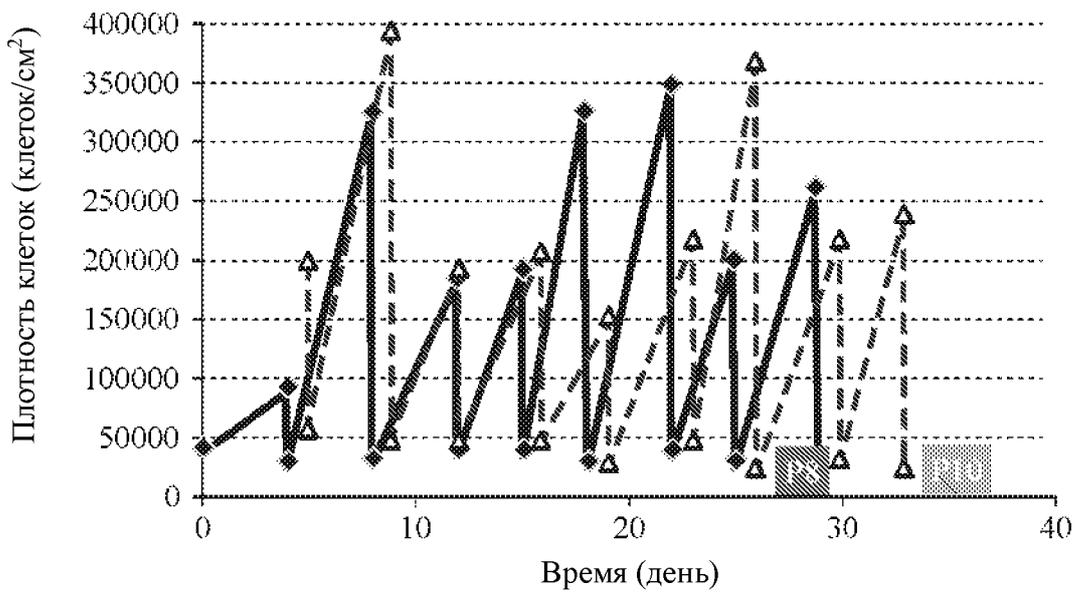
ФИГ. 8 (продолжение)



ФИГ. 9

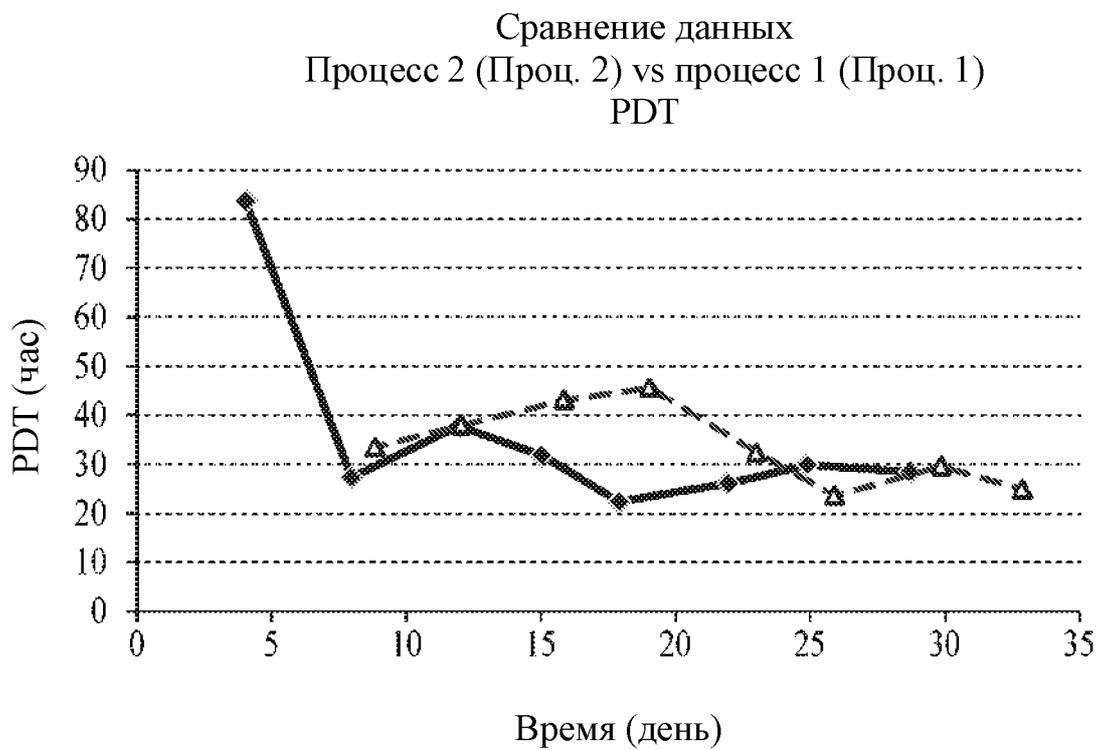
Сравнение роста клеток между процессом 1 (Δ) и процессом 2 (\blacklozenge) с точки зрения плотности клеток

Сравнение данных
Плотность клеток в процессе 2 (Проц. 2) vs процессе 1 (Проц. 1)



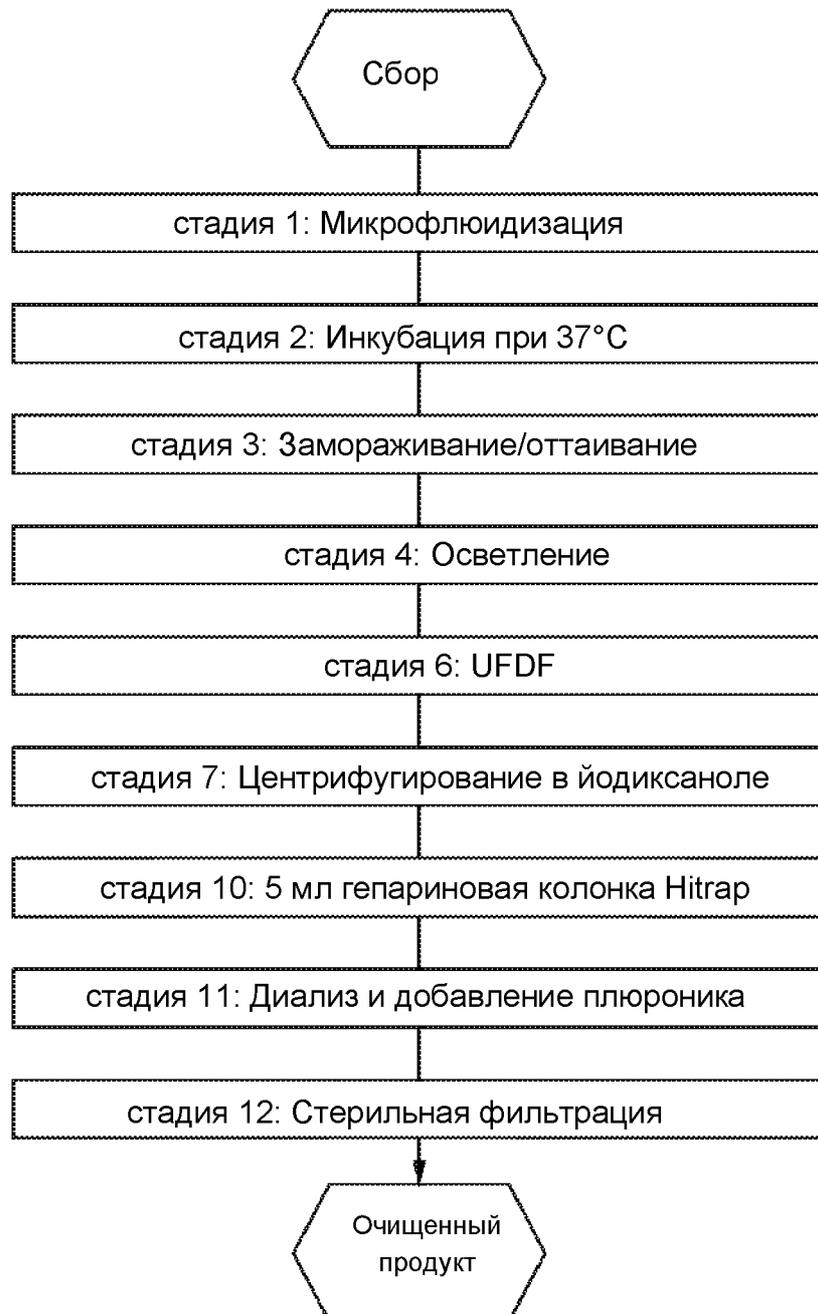
ФИГ. 10

Сравнение роста клеток между процессом 1 (Δ) и процессом 2 (\blacklozenge) с точки зрения времени удвоения популяции (PDT)



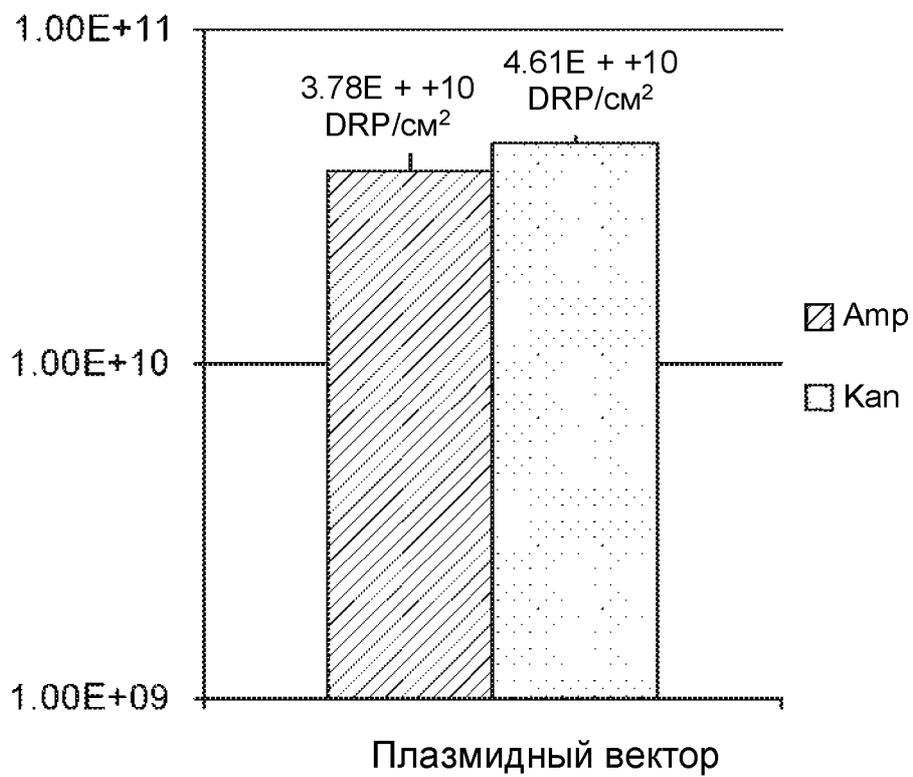
ФИГ. 11

Последующий процесс, перенесенный из исходного в усовершенствованный процесс



ФИГ. 12

Анализ выхода AVG DRP/см² для плазмид AmpR и KanR



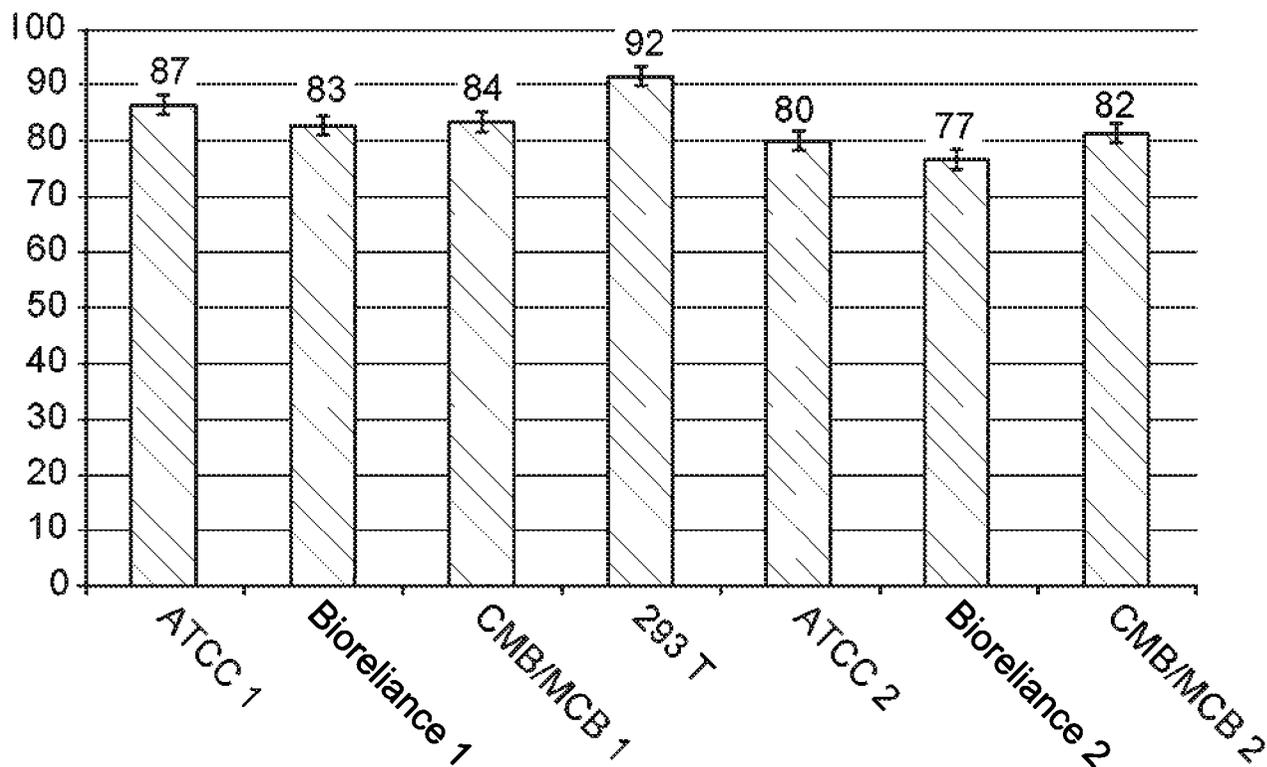
ФИГ. 13



ФИГ. 14

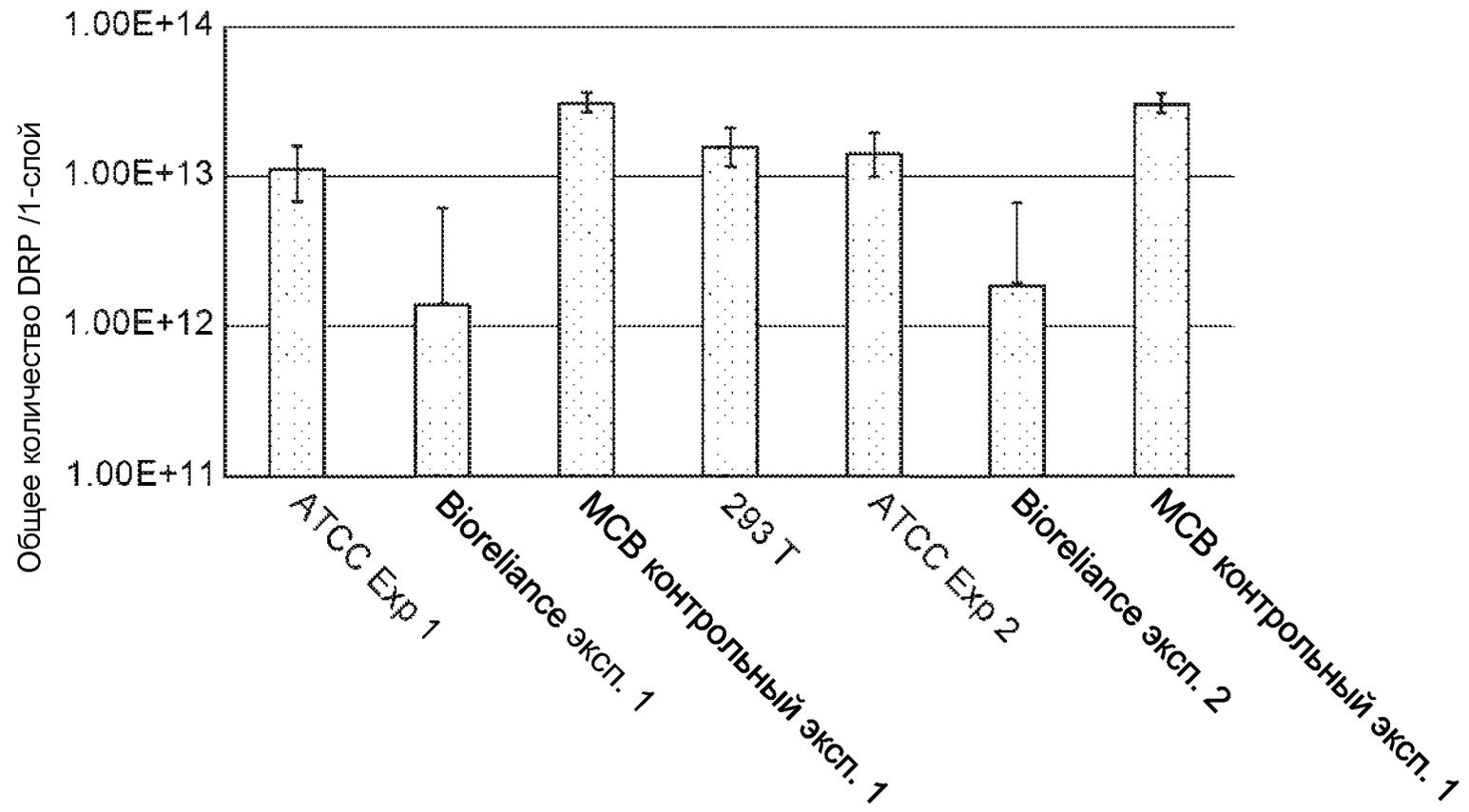
Процент GFP-положительных клеток

% GFP



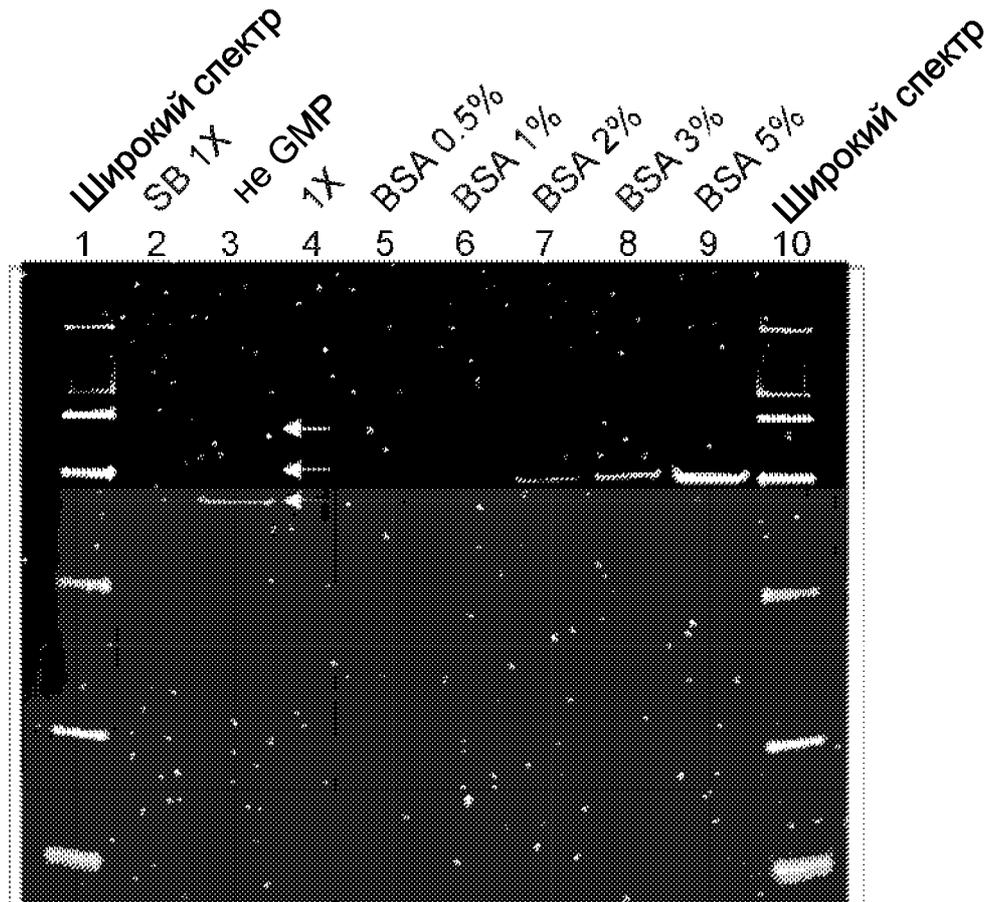
ФИГ. 15

Анализ выхода AAV2-конструкта
Средний выход



ФИГ. 16

Данные о чистоте для партии AAV2-конструкта
(не GMP) из усовершенствованного процесса

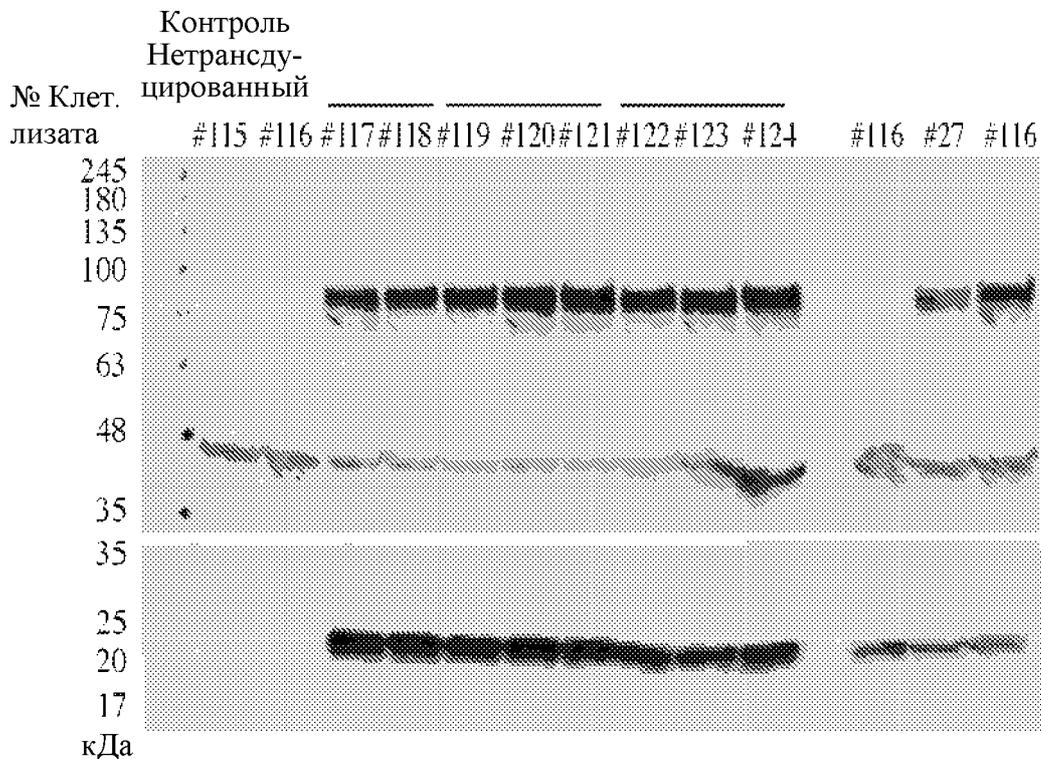


SB-буфер для образцов/отрицательный контроль
Тестовый продукт на основе AAV2-конструкта (не GMP)
(расфасованный препарат)
BSA Стандартный контроль бычьего сывороточного альбумина
Белыми стрелками отмечены три белка вирусного капсида.

ФИГ. 17

Экспрессия и активность конструктора после трансдукции клеток HEK293 *in vitro*
вектором AAV2-конструктора с эквивалентным MOI в партиях исходного и усовершенствованного
процессов (не GMP)

MOI 10,000



№ 115 и 116 = Нетрансдуцированный контроль

№ 117 и 118 = (усовершенствованный процесс) препарат в окончательной упаковке/расфасованный материал на основе AAV2-конструктора (не GMP)

№ 119-121 = (Усовершенствованный процесс) очищенный нерасфасованный/контейнер с лекарственным веществом/расфасованный материал на основе AAV2-конструктора (не GMP) (та же партия)

№ 122-124 = (Исходный процесс) клетки, трансдуцированные AAV2-конструктором, (не GMP) (для отличия от контроля AAV2-конструктора, который представляет собой положительный контроль только лизата)

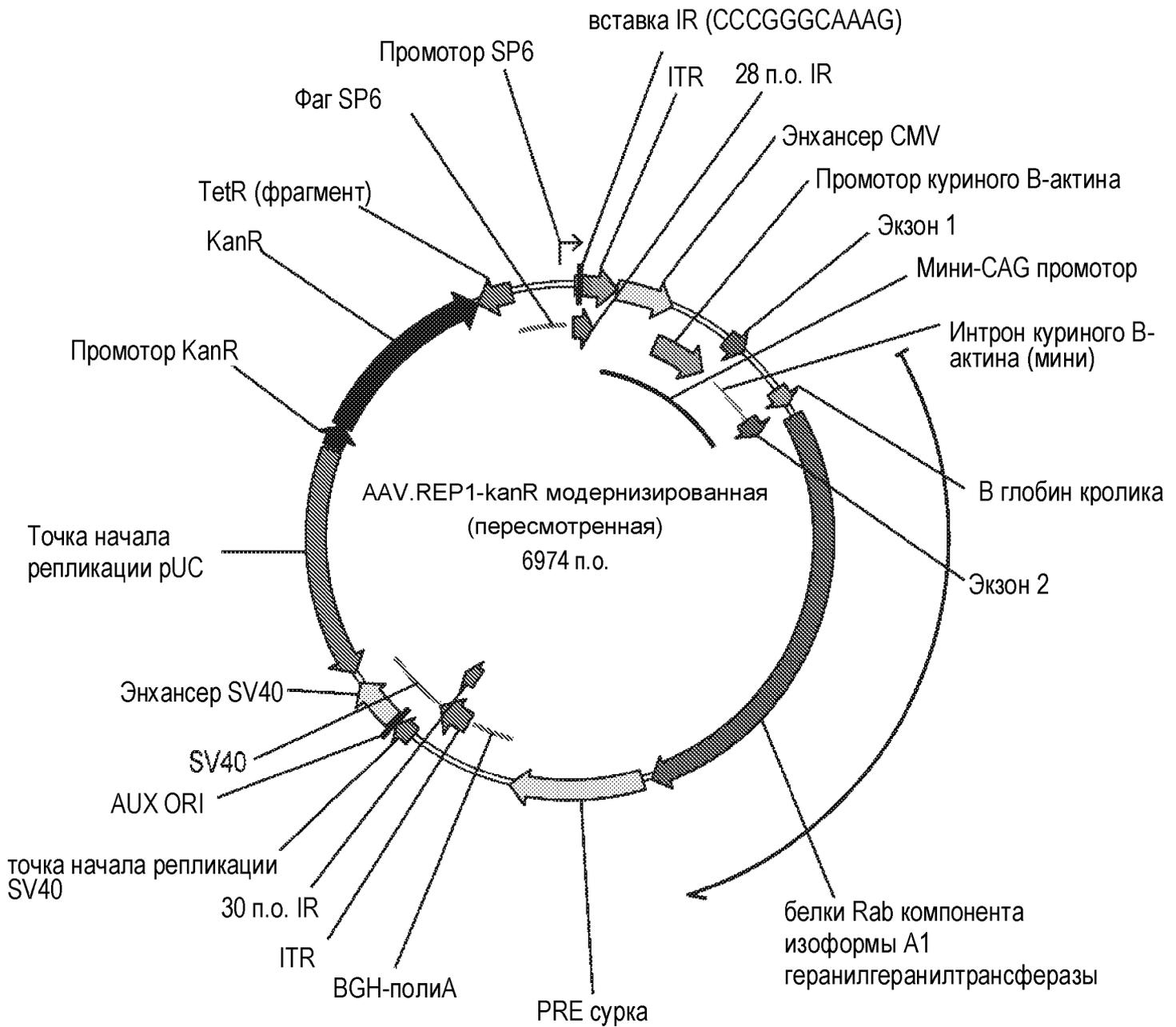
№ 116 (третий с конца) Положительный контроль = гомолог человеческого белка конструктора у рыбы

№ 27 (Исходный процесс) положительный контроль только лизата AAV2-конструктора (не GMP)

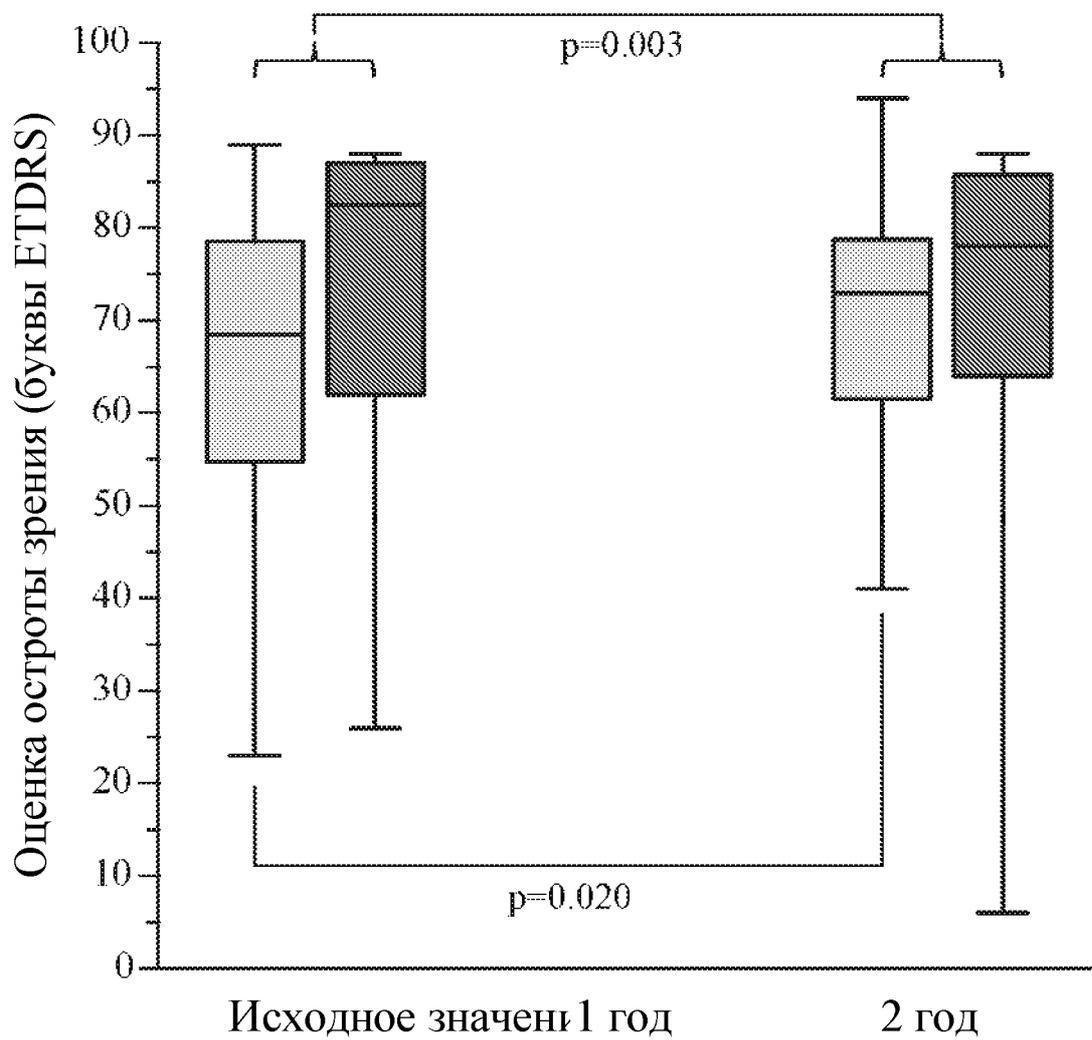
№ 116 (крайняя правая полоса) Положительный контроль = исходные уровни экспрессии белка конструктора

ФИГ. 18

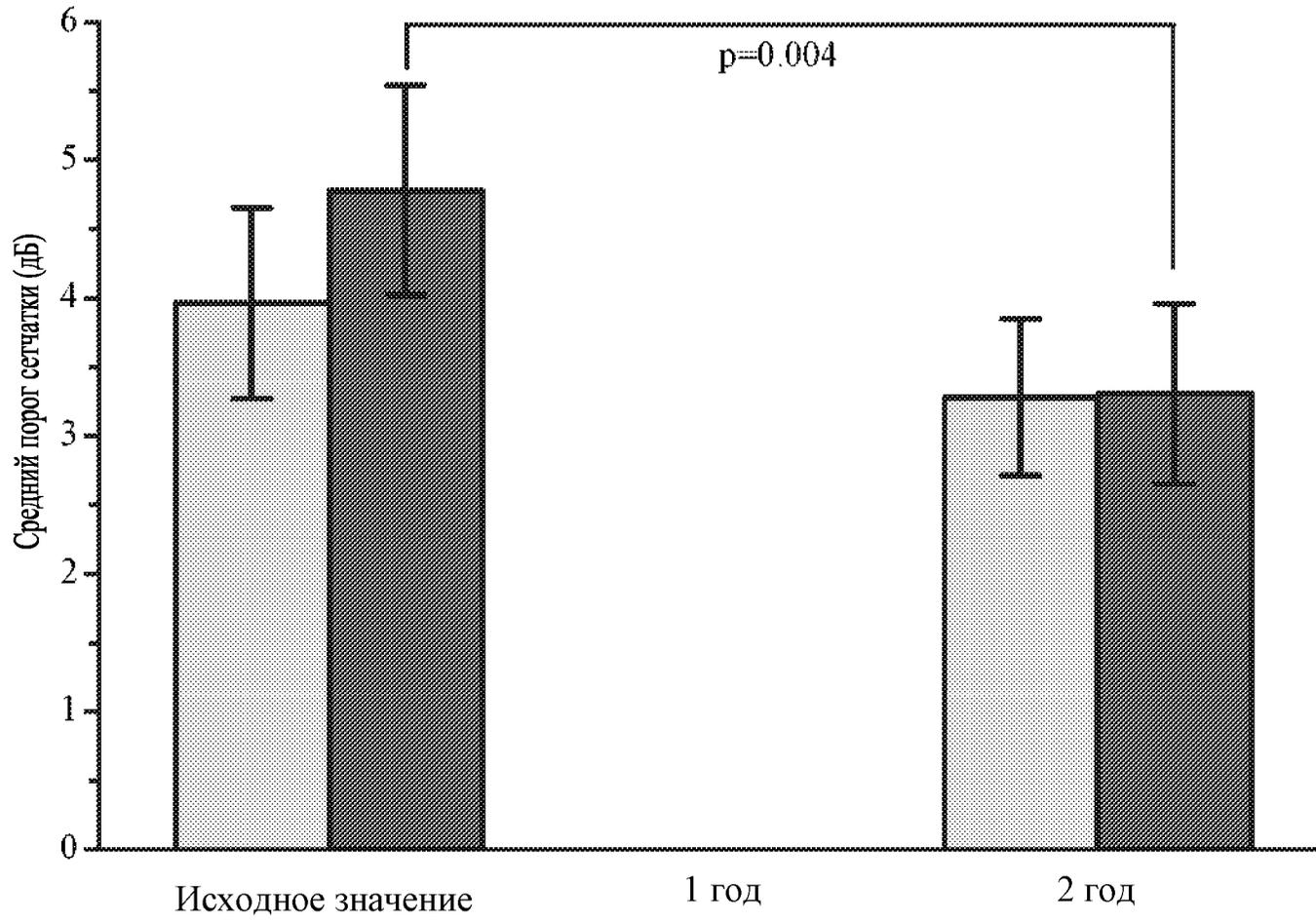
Карта плазмиды pAAV-REP-1-Kan



ФИГ. 20



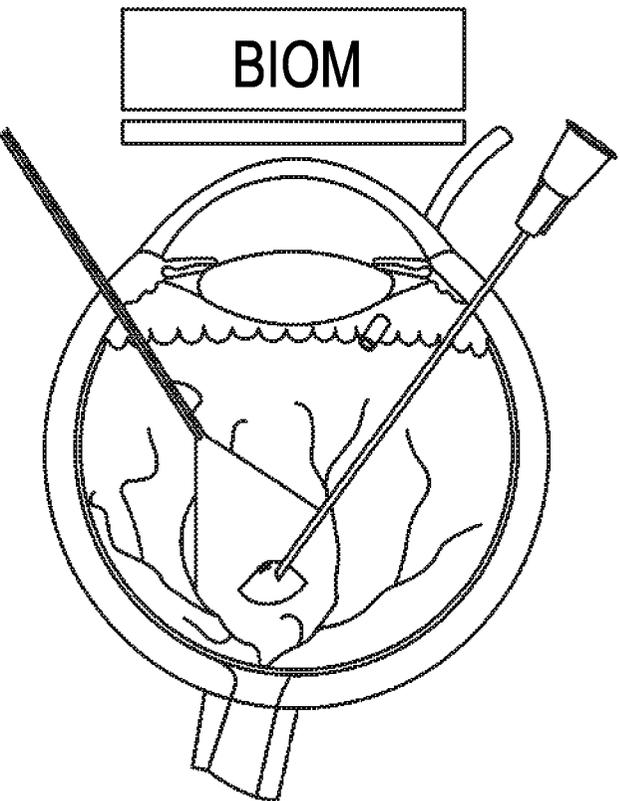
ФИГ. 21



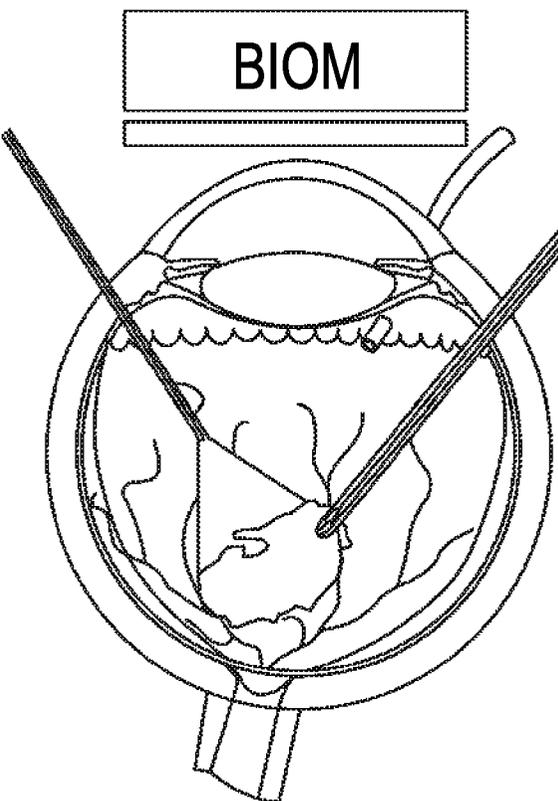
ФИГ. 22



ФИГ. 23В



ФИГ. 23А

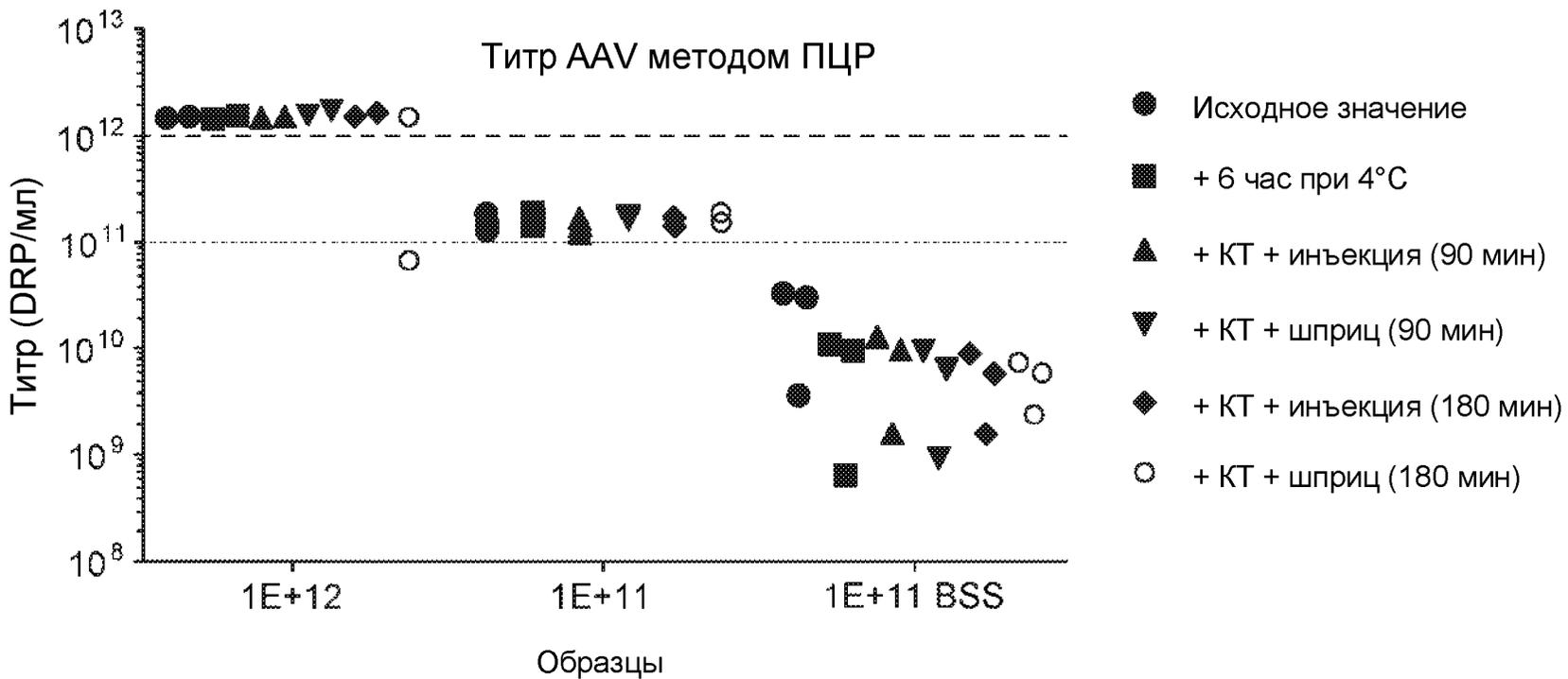


ФИГ. 24



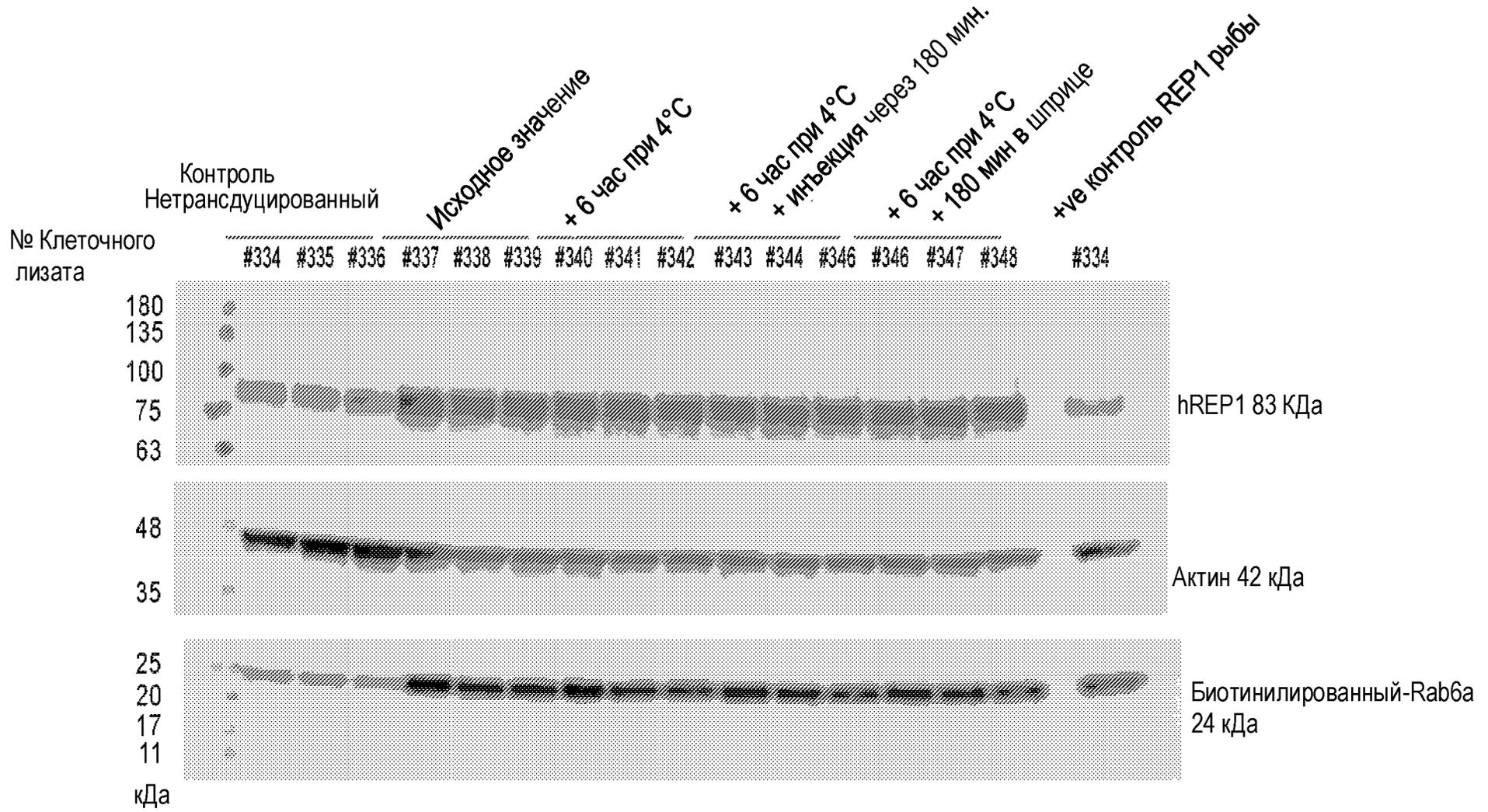
*Доза: 1×10^{11} гч или 1×10^{10} гч

ФИГ. 25



ФИГ. 26

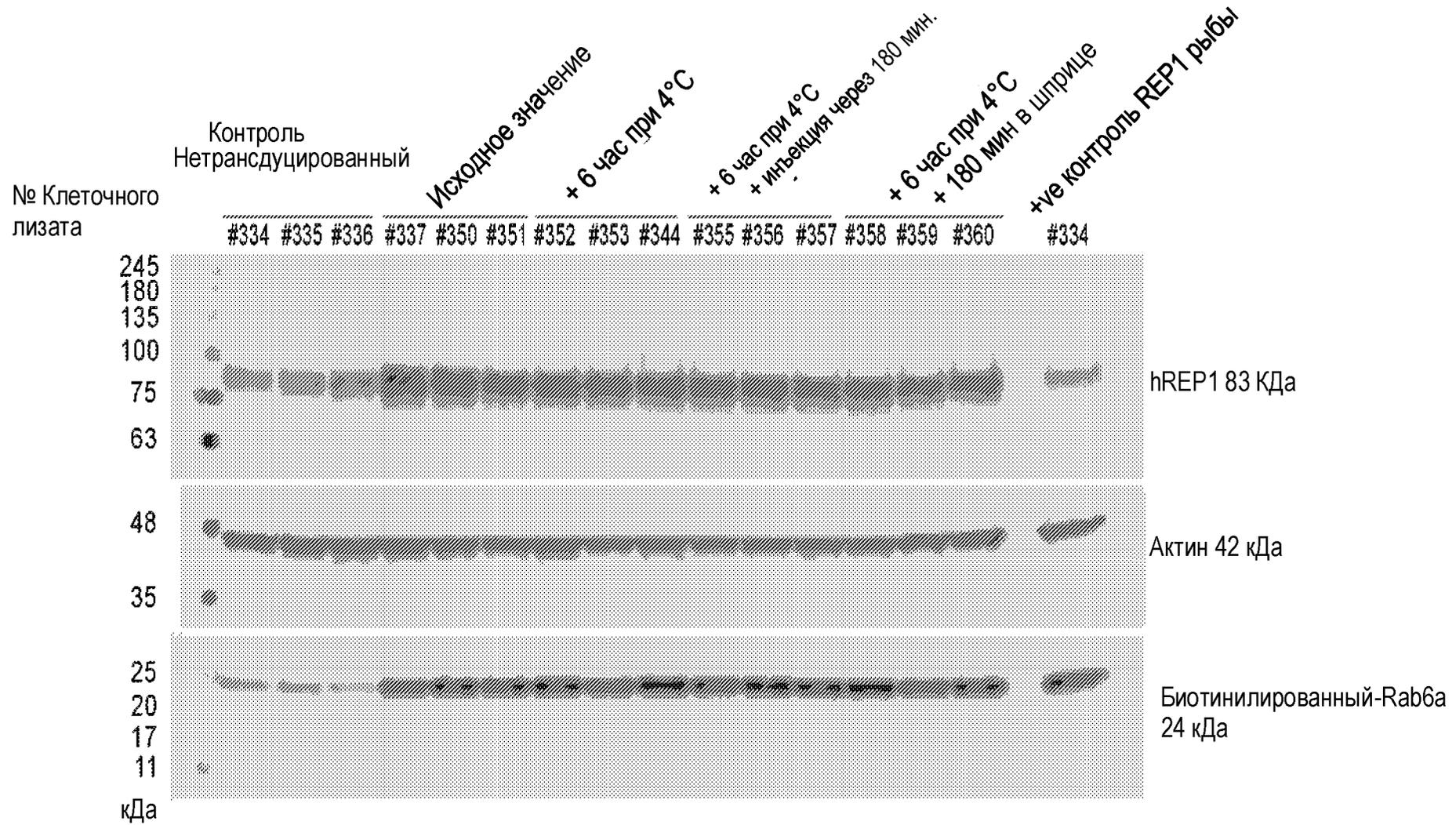
Активность пренилирования в исследовании совместимости гAAV2.REP-1
с использованием AAV2.REP1.ENG1014-A
Высокая доза, 1E+12 при MOI 10000



ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

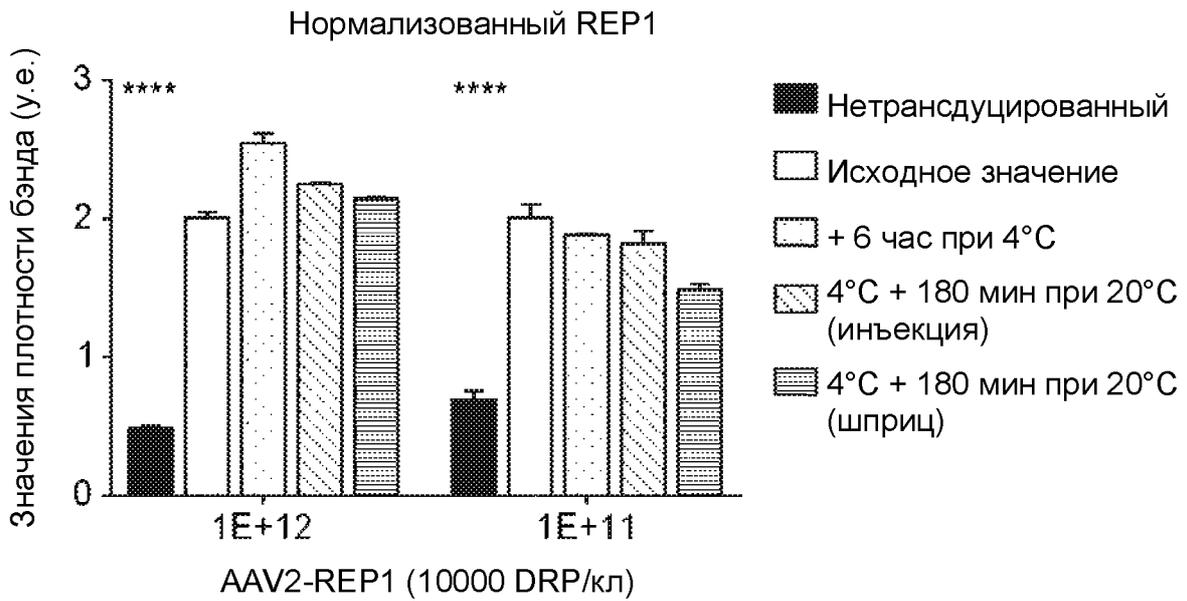
ФИГ. 27 Активность пренилирования в исследовании совместимости гAAV2.REP-1 с использованием AAV2.REP1.ENG1014-A
Низкая доза, 1E+11 при MOI 10000

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



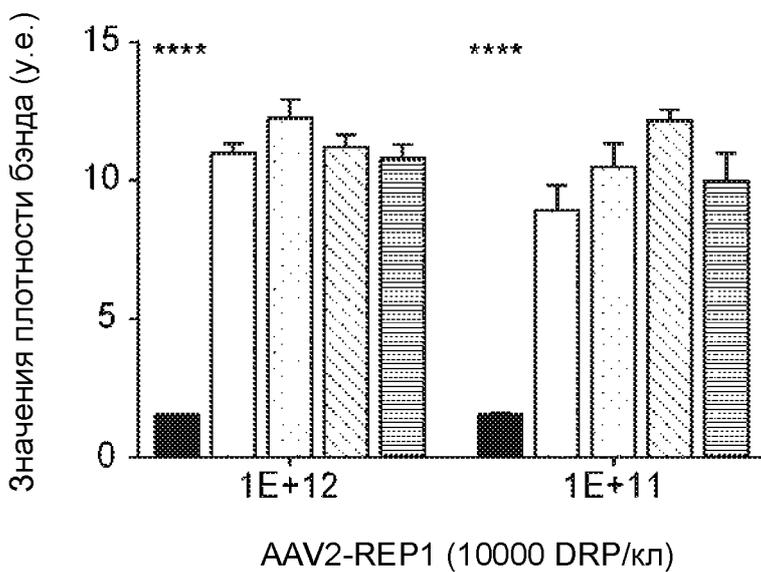
ФИГ. 28А

Полуколичественное определение WB



ФИГ. 28В

Нормализованный биотинилированный Rab6a



ФИГ. 29

L-ITR (5' ITR): (Нуклеотиды 1-130)

Промотор СAG: (Нуклеотиды 186-1127)

кДНК белка REP1 человека: (Нуклеотиды 1163-3125)

Мутированный сигнал WPRE: (Нуклеотиды с 3166 по 3758)

Сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота: (Нуклеотиды 3777-4035)

R-ITR (3' ITR): (Нуклеотиды 4093-4213)

```

1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG GCGGACCTTT
61 GGTGCGCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA CTCATCACT
121 AGGGGTTCCCT TGTAGTTAAT GATTAACCCG CCATGCTACT TATCTACGTA GCCATGCTCT
181 AGGTACCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
241 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA CTGGCAGTA CATCAAGTGT
301 ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
361 ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
421 TCGCTATTAC CATGGTCGAG GTGAGCCCCA CGTCTGCTT CACTCTCCCC ATCTCCCCCC
481 CCTCCCCACC CCAATTTTG TATTTATTTA TTTTTAATT ATTTTGTGCA GCGATGGGGG
541 CCGGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGCCG GGGCGGGCG GGGCGAGGGG CGGGGCGGGG
601 CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC GCTCCGAAAG TTTCTTTTA
661 TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA AAAAGCGAAG CGGCGGCGGG GCGGGAGTCCG
721 CTGCGCGCTG CCTTCGCCCC GTGCCCCGCT CCGCCGCGC CTGCGGCGCG CCGCCCCGGC
781 TCTGACTGAC CGCGTTACTC CCACAGGTGA GCGGCGGGG CGGCCCTTCT CCTCCGGGCT
841 GTAATTAGCG CTGGTTTAA TGACGGCTTG TTTCTTTCT GTGGCTGCGT GAAAGCCTTG
901 AGGGGCTCCG GGAGGGCCCT TTGTGCGGGG GGAGCGGCTC GGGGCTGTCC GCGGGGGGAC
961 GGCTGCCCTC GGGGGGGACG GGGCAGGGCG GGGTTCGGCT TCTGGCGTGT ACCGGGCGGC
1021 TCTAGAGCCT CTGCTAACCA TGTTCATGCC TTCTTCTTT TCCTACAGCT CCTGGGCAAC
1081 CTGCTGGTTA TTGTGCTGTC TCATCATTTT GCGCAAAGAA TGGATCCTAG CTTGATATCG
1141 AATTCCTGCA GCCCGGCGGC ACCATGGCGG ATACTCTCCC TTCGGAGTTT GATGTGATCG
1201 TAATAGGGAC GGGTTTGCCT GAATCCATCA TTGCAGCTGC ATGTTCAAGA AGTGGCCGGA
1261 GAGTCTGCA TGTTGATTCA AGAAGCTACT ATGGAGGAAA CTGGGCCAGT TTTAGCTTTT
1321 CAGGACTATT GTCTGGCTA AAGGAATACC AGGAAAACAG TGACATTGTA AGTGACAGTC
1381 CAGTGTGGCA AGACCAGATC CTTGAAAATG AAGAAGCCAT TGCTCTTAGC AGGAAGGACA
1441 AAATATTCA ACATGTGGA GTATTTTGT ATGCCAGTCA GGATTTGCAT GAAGATGTCC
1501 AAGAAGCTGG TGCCTGCAG AAAAATCATG CTCTTGTGAC ATCTGCAAC TCCACAGAAG
1561 CTGCAGATTC TGCCCTTCTG CCTACGGAGG ATGAGTCATT AAGCACTATG AGCTGTGAAA
1621 TGCTCACAGA ACAAACTCCA AGCAGCGATC CAGAGAATGC GCTAGAAGTA AATGGTGTCTG
1681 AAGTGACAGG GGAAAAGAA AACCATTTGT ATGATAAAAC TTGTGTGCCA TCAACTTCAG
1741 CAGAAGACAT GAGTGAAGAT GTGCCTATAG CAGAAGATAC CACAGAGCAA CCAAAGAAAA
1801 ACAGAATTAC TTAATCACA ATTATTAAG AAGGCAGGAG ATTTAATATT GATTTAGTAT
1861 CAAAGCTGCT GTATTCTCGA GGATTAATA TTGATCTTCT AATCAAATCT AATGTTAGTC
1921 GATATGCAGA GTTTAAAAAT ATTACCAGGA TTCTTGCAAT TCGAGAAGGA CGAGTGGAAC
1981 AGGTCCCGTG TTCCAGAGCA GATGTCTTTA ATAGCAAACA ACTTACTATG GTAGAAAAGC
2041 GAAATTTCTT GAAATTTCTT ACATTTTGTG TCGAATATGA GAAATATCCT GATGAATATA
2101 AAGGATATGA AGAGATCACA TTTTATGAAT ATTTAAAGAC TCAAAAATTA ACCCCCAACC
2161 TCCAATATAT TGTCATGCAT TCAATTGCAA TGACATCAGA GACAGCCAGC AGCACCATAG
2221 ATGGTCTCAA AGCTACCAA AACTTTCTTC ACTGTCTTGG GCGSTATGGC AACACTCCAT
2281 TTTTGTFTCC TTTATATGGC CAAGGAGAAC TCCCCCAGTG TTTCTGCAGG ATGTGTGCTG
2341 TGTTTGGTGG AATTTATTGT CTTCCGCATT CAGTACAGTG CCTTGTAGTG GACAAAGAAT
2401 CCAGAAAATG TAAAGCAATT ATAGATCAGT TTGGTCAGAG AATAATCTCT GAGCATTTC
2461 TCGTGGAGGA CAGTTACTTT CCTGAGAACA TGTGCTCACG TGTGCAATAC AGGCAGATCT
2521 CCAGGGCAGT GCTGATTACA GATAGATCTG TCCTAAAAAC AGATTCAGAT CAACAGATTT
2581 CCATTTTGAC AGTGCCAGCA GAGGAACCAG GAACTTTTGC TGTTGGGGTC ATTGAGTTAT
2641 GTCTTCAAC GATGACATGC ATGAAAAGCA CCTATTTGGT TCATTTGACT TGCACATCTT
2701 CTA AACAGC AAGAGAAGAT TTAGAATCAG TTGTGCAGAA ATTGTTTGTT CCATATACTG
2761 AAATGGAGAT AGAAAATGAA CAAGTAGAAA AGCCAAGAA TCTGTGGGCT CTTTACTTCA
2821 ATATGAGAGA TTCGTCAGAC ATCAGCAGGA GCTGTATAA TGATTTACCA TCCAACGTTT
2881 ATGCTGCTC TGGCCAGAT TGTGTTTAG GAAATGATA TGCACTCAA CAGGCTGAAA
2941 CACTTTTCCA GGAAATCTGC CCCAATGAAG ATTTCTGTCC CCTCCACCA AATCCTGAAG

```

ФИГ. 29 (продолжение)

3001 ACATTATCCT TGATGGAGAC AGTTTACAGC CAGAGGCTTC AGAATCCAGT GCCATACCAG
3061 AGGCTAACTC GGAGACTTTC AAGGAAAGCA CAAACCTTGG AAACCTAGAG GAGTCCTCTG
3121 AATAATCTAG TCGATTGAA TTCGATATCA AGCTTATCGA TAATCAACCT CTGGATTACA
3181 AAATTTGTGA AAGATTGACT GGTATTCTTA ACTATGTTGC TCCTTTTACG CTATGTGGAT
3241 ACGCTGCTT AATGCCCTTG TATCATGCTA TTGCTTCCCG TATGGCTTTC ATTTTCTCCT
3301 CCTGTATAA ATCCTGGTTG CTGTCTCTTT ATGAGGAGT GTGGCCCGTT GTCAGGCAAC
3361 GTGGCCTGCT GTGCACTGTG TTTGCTGACG CAACCCCCAC TGGTTGGGGC ATTGCCACCA
3421 CCTGTCAGCT CCTTTCGGG ACTTTCGCTT TCCCCCTCCC TATTGCCACG GCGGAACTCA
3481 TCGCCGCCTG CCTTGGCCGC TGCTGGACAG GGGCTCGGCT GTTGGGCACT GACAATTCCG
3541 TGGTGTGTC GGGGAAATCA TCGTCTTTC CTTGGCTGCT CGCCTGTGTT GCCACCTGGA
3601 TTCTGCGCGG GACGTCCTTC TGCTACGTCC CTTGGGCCCT CAATCCAGCG GACCTTCCTT
3661 CCCGCGGCT GCTGCCGGCT CTGCGGCCCTC TTCCGCGTCT TCGCCTTCGC CCTCAGACGA
3721 GTCGGATCTC CCTTTGGGCC GCCTCCCCGC ATCGATAACG TCGACTCGCT GATCAGCCTC
3781 GACTGTGCTT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCTTGGAC
3841 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATG CATCGCATTG
3901 TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA
3961 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCTT CTGAGGCGGA
4021 AAGAACCAGC TGGGGCTCGA CTAGAGCATG GCTACGTAGA TAAGTAGCAT GCGGGGTAA
4081 TCATTAAC TAAGGAACCC CTAGTGATGG AGTTGGCCAC TCCCTCTCTG CGCGCTCGCT
4141 CGCTCACTGA GGCCGGGCGA CCAAAGGTCG CCCGACGCC GGGCGGCCTC AGTGAGCGAG
4201 CGAGCGCGCA GAG

(SEQ ID NO: 25)