

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192323** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.12

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.02.21

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЙ ВИРУС ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ GRN-АССОЦИИРОВАННОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ ВЗРОСЛЫХ

(31) 62/809,329; 62/923,812; 62/969,108

(32) 2019.02.22; 2019.10.21; 2020.02.02

(33) US

(86) PCT/US2020/019149

(87) WO 2020/172490 2020.08.27

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

(72) Изобретатель:
Хиндерер Кристиан, Миллер Нимрод,
Уилсон Джеймс М. (US)

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

(57) Предложен рекомбинантный AAV (rAAV), подходящий для применения при лечении нейродегенерации у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью гранулина (GRN), такой как связанная с програнулином (PGRN) лобно-височная деменция (ЛВД). rAAV содержит (a) капсид аденоассоциированного вируса 1 и (b) геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина. Также предложен способ для лечения пациента-человека с PGRN-ЛВД и другой нейродегенерацией у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью гранулина (GRN), включающий доставку в центральную нервную систему (ЦНС) рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), имеющего капсид AAV аденоассоциированного вируса 1 (AAV1), при этом указанный rAAV дополнительно содержит геном вектора, упакованный в капсид AAV, при этом указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, кодирующую последовательность програнулина человека и регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию програнулина.

A1

202192323

202192323

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570307EA/042

РЕКОМБИНАНТНЫЙ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЙ ВИРУС ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ GRN-АССОЦИИРОВАННОЙ НЕЙРОДГЕНЕРАЦИИ ВЗРОСЛЫХ ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В данной заявке заявляются преимущества и приоритет по предварительной заявке США №№ 62/809329, поданной 22 февраля 2019 г., 62/923812, поданной 21 октября 2019 г., и 62/969108, поданной 2 февраля 2020 г., которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Лобно-височная деменция (ЛВД) представляет собой фатальное нейродегенеративное заболевание, которое обычно проявляется на шестом или седьмом десятилетии жизни с дефицитом управляющих функций, поведения, речи или понимания речи. Эти симптомы связаны с характерным паттерном атрофии головного мозга, затрагивающим лобную и височную коры. У всех пациентов наблюдается прогрессирующее течение, средняя выживаемость составляет 8 лет с момента появления симптомов (Coyle-Gilchrist IT, et al. *Neurology*. 2016;86(18):1736-43).

ЛВД имеет высокую наследственность, около у 40% пациентов имеется отягощенный семейный анамнез (Rohrer JD, et al. *Neurology*. 2009;73(18):1451-6.). У 5-10% пациентов с ЛВД патогенные мутации с потерей функции могут быть идентифицированы в гене гранулина (GRN), кодирующем програнулин (PGRN), убиквитарный лизосомный белок (Rohrer JD, et al. *Neurology*. 2009;73(18):1451-6). Носители мутации GRN демонстрируют быструю и широко распространенную атрофию головного мозга и могут иметь клинические признаки других нейродегенеративных заболеваний, таких как прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальный синдром, болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви или болезнь Альцгеймера (Le Ber I, et al. *Brain: a journal of neurology*. 2008;131(3):732-46.). Мутации GRN наследуются по аутосомно-доминантному типу с пенетрантностью более 90% к 70 годам (Gass J, et al. *Human molecular genetics*. 2006;15(20):2988-3001). В то время как наследование одной мутации GRN вызывает ЛВД и другие нейродегенеративные заболевания с поздним началом, пациенты с гомозиготными мутациями с потерей функции гораздо раньше выявляют нейрональный цероидный липофусциноз (НЦЛ, болезнь Баттена), характеризующийся накоплением аутофлуоресцентного материала (липофусцин) в лизосомах нейронов, быстрое снижение когнитивных функций и дегенерация сетчатки (Smith Katherine R, et al. *American Journal of Human Genetics* 2012;90(6):1102-7). Хотя у пациентов, гетерозиготных по мутациям GRN, симптомы проявляются гораздо позже, в конечном итоге у них в мозгу и сетчатке развиваются лизосомные накопительные повреждения, идентичные таковым у пациентов с НЦЛ, и также наблюдается прогрессирующая нейродегенерация (Ward ME, et al. *Science Translational Medicine*. 2017;9(385); Gotzl JK, et al. *Acta neuropathologica*. 2014;127(6):845-60). Недавно было обнаружено, что програнулин играет критическую

роль в лизосомной функции, способствуя окислению лизосом и выступая в качестве шаперона для лизосомальных протеаз, включая катепсин D (CTSD) (Beel S, et al. *Human molecular genetics*. 2017 Aug 1;26(15):2850-2863; Tanaka Y, et al. *Human molecular genetics*. 2017;26(5):969-88). Мутации в гене, кодирующем CTSD, также приводят к фенотипу НЦЛ, что подтверждает общую патофизиологию, связанную с недостаточной активностью лизосомальной протеазы (Siintola E, et al. *Brain: a journal of neurology*. 2006;129(Pt 6):1438-45).

В настоящее время не существует терапии, изменяющей заболевание, для нейродегенерации у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью GRN. Управление заболеванием включает поддерживающую терапию и лечение не по назначению, направленное на уменьшение связанных с заболеванием поведенческих, когнитивных и/или двигательных симптомов (Tsai and Boxer, 2016, *J Neurochem*. 138 Suppl 1:211-21). Кроме того, на более ранней стадии можно охватить большее количество пациентов с помощью скрининга пациентов с семейным анамнезом деменции, что в настоящее время не показано из-за отсутствия лечения. Таким образом, этот спектр заболеваний представляет собой область с высокой неудовлетворенной медицинской потребностью.

Необходимо лечение нейродегенеративных расстройств у взрослых, связанных с гаплонедостаточностью GRN, и сопутствующих симптомов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены рекомбинантные AAV (rAAV), подходящие для применения при лечении нейродегенерации, вызванной програнулином (PGRN) - зависимой лобно-височной деменцией (ЛВД) и других нейродегенеративных расстройств у взрослых, связанных с гаплонедостаточностью GRN. rAAV содержит капсид аденоассоциированного вируса 1 и геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV (ITR), кодирующую последовательность, кодирующую програнулин человека, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина. В некоторых вариантах реализации, геном вектора содержит 5' инвертированный концевой повтор AAV (ITR), кодирующую последовательность PGRN человека и регуляторные элементы, которые управляют его экспрессией, и AAV 5' ITR.

Также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая водный раствор и рекомбинантный AAV (rAAV). В некоторых вариантах реализации, водный раствор содержит искусственную спинномозговую жидкость с поверхностно-активным веществом, которая подходит для интратекального введения. Предложен способ лечения пациента-человека с нейродегенерацией, связанной с програнулином, лобно-височной деменцией (ЛВД) или другим нейродегенеративным заболеванием у взрослых, вызванным гаплонедостаточностью GRN. Указанный способ включает доставку rAAV, содержащего кодирующую последовательность програнулина человека, в центральную нервную систему (ЦНС). Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), имеющий капсид аденоассоциированного вируса 1 (AAV1), причем указанный rAAV дополнительно

содержит геном вектора, упакованный в капсид AAV, при этом указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина.

Предложен rAAV1.hPGRN для применения в способе лечения пациента-человека с PGRN-ЛВД или другим нейродегенеративным заболеванием у взрослых, вызванным гаплонедостаточностью GRN. Указанный способ включает введение в ЦНС rAAV, имеющего капсид аденоассоциированного вируса 1, кодирующего програнулин человека, который нацелен на эпендимоциты. rAAV1 дополнительно содержит геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека, и регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию програнулина в эпендимоциты. В одном варианте реализации, секретируемый програнулин человека экспрессируется после доставки генной терапии rAAV1.

Предложен способ лечения пациента-человека с нейродегенерацией, связанной с програнулином, лобно-височной деменцией (ЛВД) или другим нейродегенеративным заболеванием у взрослых, вызванным гаплонедостаточностью GRN. Указанный способ включает введение в центральную нервную систему (ЦНС) рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), имеющего капсид аденоассоциированного вируса 1 (AAV1), причем указанный rAAV дополнительно содержит геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина.

В некоторых вариантах реализации, способы, представленные в данном документе, могут дополнительно включать (а) неинвазивную оценку пациента на предмет уменьшения накопленных повреждений сетчатки в качестве предиктора уменьшения поражений головного мозга, (b) выполнение магнитно-резонансной томографии для оценки объема мозга и/или (с) измерение концентрации програнулина в спинномозговой жидкости.

Эти и другие аспекты данного изобретения будут очевидны из следующего подробного описания сущности изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлена линейная карта генома вектора AAV1.hPGRN. Геном вектора AAV1.CB7.C1.hPGRN.rBG содержит кодирующую последовательность для PGRN человека под контролем повсеместно распространенного промотора CB7, который состоит из гибрида энхансера IE ЦМВ и промотора β -актина курицы. Сокращения: БА, β -актин; п.о., пары оснований; IE ЦМВ, цитомегаловирус немедленной ранней стадии; ITR, инвертированные концевые повторы; ПолиА, полиаденилирование; rBG, β -глобин кролика.

На Фиг. 2 представлена линейная векторная карта цис-плазмиды, несущей геном вектора.

На Фиг. 3А - 3D проиллюстрирована естественная динамика накопления липофусцина и активности гексозаминидазы в мозге мышей $GRN^{-/-}$. Контрольные мыши $GRN^{-/-}$ (КО) или $GRN^{+/+}$ (ДТ) были умерщвлены в указанном возрасте ($n=10$ на момент времени). Неокрашенные срезы головного мозга визуализировали на наличие аутофлуоресцентного материала (липофусцин) в гиппокампе, таламусе и лобной коре, а отложения липофусцина количественно оценивали с помощью трех слепых рецензентов и усредняли (Фиг. 3А - Фиг. 3С). Количество липофусцина выражается относительно общей площади интересующей области. Активность гексозаминидазы измеряли в образцах мозга и нормализовали по общей концентрации белка (Фиг. 3D). Значения выражены как соотношение к контролю дикого типа.

На Фиг. 4А - 4G продемонстрирована коррекция лизосомной патологии в мозге молодых $GRN^{-/-}$ мышей с помощью AAV-опосредованной экспрессии PGRN. Контрольные мыши $GRN^{-/-}$ (КО) или $GRN^{+/+}$ (ДТ) получали однократную ICV-инъекцию носителя (ФСБ) или вектора AAVhu68, экспрессирующего PGRN человека (10^{11} GC) в возрасте 2 месяцев ($n=10$ на группу). Животных умерщвляли через 60 дней после инъекции, и PGRN человека измеряли в СМЖ (Фиг. 4А) и лобных долях головного мозга (Фиг. 4В) методом ИФА. Активность гексозаминидазы измеряли в образцах мозга (Фиг. 4С). Концентрация PGRN в головном мозге и активность Нех нормализовали по общей концентрации белка. Неокрашенные срезы головного мозга визуализировали на наличие аутофлуоресцентного материала (липофусцин) в гиппокампе, таламусе и лобной коре. Отложения липофусцина в гиппокампе, таламусе и лобной коре были количественно оценены с помощью слепого рецензента (Фиг. 4D - Фиг. 4G). Количество липофусцина выражается в поле с большим увеличением. $N=10$ на группу, за исключением гиппокампа КО+ФСБ $n=8$. $*p < 0,05$, $**p < 0,005$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием множественных сравнений Тьюки. Активность гексозаминидазы измеряли в сыворотке (Фиг. 4G).

На Фиг. 5А - 5D продемонстрирована коррекция лизосомной патологии в мозге пожилых $GRN^{-/-}$ мышей с помощью AAV-опосредованной экспрессии PGRN человека. Контрольные мыши $GRN^{-/-}$ (КО) или $GRN^{+/+}$ (ДТ) получали однократную ICV-инъекцию носителя (ФСБ) или вектора AAVhu68, экспрессирующего PGRN человека (10^{11} GC) в возрасте 7 месяцев. Через 4 месяца после инъекции животных умерщвляли. Активность гексозаминидазы измеряли в образцах мозга (Фиг. 5А) и отложения липофусцина были количественно определены в гиппокампе, таламусе и коре головного мозга с помощью слепого рецензента (Фиг. 5В - На Фиг. 5D). Количество липофусцина выражается в поле с большим увеличением. $*p < 0,05$, $**p < 0,005$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием множественных сравнений Тьюки.

На Фиг. 6А - 6С продемонстрирована коррекция микроглиоза мозга у пожилых мышей $GRN^{-/-}$ посредством AAV-опосредованной экспрессии PGRN. Контрольные мыши

GRN^{-/-} (KO) или GRN^{+/+} (WT) получали однократную ICV-инъекцию носителя (ФСБ) или вектора AAVhu68, экспрессирующего PGRN человека (10^{11} GC) в возрасте 7 месяцев. Через 4 месяца после инъекции животных умерщвляли, и срезы мозга окрашивали на CD68. CD68-положительные области на изображениях гиппокампа, таламуса и лобной коры были количественно определены с использованием программного обеспечения ImageJ с помощью слепого рецензента (Фиг. 6А - Фиг. 6С). Площади выражены в поле с высоким увеличением. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием множественных сравнений Тьюки.

На Фиг. 7А - 7С продемонстрирована экспрессия PGRN человека в макаках-резус после доставки AAV. Взрослым макакам-резус вводили векторы AAV1, AAV5 или AAVhu68 (3×10^{13} GC), экспрессирующие PGRN человека из промотора бета-актина курицы, путем ICM инъекции в день исследования 0 ($n=2$ на вектор). Двум дополнительным макакам вводили вектор AAVhu68, экспрессирующий hPGRN с промотора убиквитина С (AAVhu68 V2). Инъекцию ICM проводили под рентгеноскопическим контролем. После подтверждения размещения иглы с помощью рентгеноскопии и обратной инъекции в спинномозговую жидкость контрастное вещество продемонстрировало распределение внутри cisterna magna. Смещение контраста было очевидным во время последующей инфузии вектора. PGRN человека измеряли в спинномозговой жидкости обработанных макак (Фиг. 7А) и здоровых взрослых людей (Фиг. 7В) и в сыворотке обработанных макак (Фиг. 7С) методом ИФА. На Фиг. 7А и На Фиг. 7В пунктирные линии относятся к пределу количественного определения hPGRN в СМЖ при разведении 1:5.

На Фиг. 8А - 8С продемонстрирован иммунный ответ на PGRN человека у нечеловеческих приматов, обработанных вектором. После ICM введения векторов AAV1, AAV5 или AAVhu68 (3×10^{13} GC), экспрессирующих PGRN человека, с промотором бета-актина курицы или промотором убиквитина С (AAVhu68 V2) СМЖ собирали еженедельно для химического и цитологического анализа. Повышенное количество лейкоцитов (преимущественно малых лимфоцитов) было очевидно у большинства животных (Фиг. 8А). Ответы антител на PGRN человека измеряли с помощью ИФА в СМЖ (Фиг. 8В) и сыворотке (Фиг. 8С) животных, получавших AAVhu68 или AAV1. Антитела к PGRN человека не оценивались в образцах сыворотки или СМЖ животных, обработанных AAV5.

На Фиг. 9 продемонстрированы уровни трансдукции мозга после ICM введения векторов AAV1 и AAVhu68 нечеловеческим приматам. Взрослым макакам-резус вводили 3×10^{13} вектора GC AAVhu68 ($n=2$) или AAV1 ($n=2$), экспрессирующих GFP, из промотора бета-актина курицы путем инъекции ICM. Животных вскрывали через 28 дней после введения вектора, и срезы пяти областей правого полушария мозга анализировали с помощью иммуногистохимии GFP или иммунофлуоресценции с окрашиванием на GFP и DAPI. Совместное окрашивание с помощью маркеров определенных типов клеток (NeuN, GFAP и Olig2) позволило количественно оценить трансдуцированные, астроциты и

олигодендроциты. Средняя трансдукция каждого типа клеток была рассчитана для всех отобранных областей мозга. Планки погрешностей=СОС пяти срезов.

На Фиг. 10 представлена таблица, показывающая процент трансдукции нейронов, астроцитов и олигодендроцитов после введения ICM векторов AAV1 (ИН животного 1826 и 2068) и AAVhu68 (ИН животного 1518 и 2076) нечеловеческим приматам. Взрослым макакам-резус вводили 3×10^{13} вектора GC AAVhu68 (n=2) или AAV1 (n=2), экспрессирующих GFP, из промотора бета-актина курицы путем инъекции ICM в 0 день исследования. Животных вскрывали через 28 дней после введения вектора, и срезы пяти областей правого полушария мозга анализировали с помощью иммунофлуоресценции GFP с определением конкретных типов клеток (NeuN, GFAP и Olig2). Общее количество клеток каждого типа и количество экспрессирующих GFP клеток каждого типа определяли количественно с использованием программного обеспечения HALO. Процент трансдуцированных клеток каждого типа показан для каждой области. Для некоторых животных были проанализированы два среза из области 5.

На Фиг. 11A - 11B показаны результаты исследований медианной проводимости сенсорных нервов у нечеловеческих приматов. По оси Y отложены задержки от начала до пика амплитуды (пиковая задержка), измеренные с течением времени (ось x) после введения трех различных доз (3×10^{12} GC, 1×10^{13} GC или 3×10^{13} GC rAAV1.hPGRN или носитель).

На Фиг. 12A - 12D показаны результаты невропатологических исследований ганглиев задних корешков (DRG), срединного нерва и спинного мозга (SC) у нечеловеческих приматов (NHP) через 90 дней после обработки rAAV1.hPGRN.

На Фиг. 13 продемонстрирована блок-схема производственного способа для производства вектора. *Сокращения:* AEX, анионный обмен; CRL, Charles River Laboratories; кцПЦР, капельная цифровая полимеразная цепная реакция; DMEM, модифицированная среда Игла Дульбекко; ДНК, дезоксирибонуклеиновая кислота; FFB, буферный раствор, используемый для приготовления конечной композиции; GC - копии генома; HEK293, клетки 293 почки эмбриона человека; ITFFB, интратекальный буфер для приготовления конечной композиции; PEI, полиэтиленмин; ДНС-ПААГ, электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; TFF, тангенциальная поточная фильтрация; ф. США, Фармакопея США; WCB, рабочий банк клеток.

На Фиг. 14 продемонстрирована блок-схема производственного способа для композиции вектора. Производственный способ получения лекарственного средства GTP-205. *Сокращения:* Ad5, аденовирус серотипа 5; AUC, аналитическое ультрацентрифугирование; BDS, нерасфасованное лекарственное вещество; БСА, бычий сывороточный альбумин; CZ, хрустальный зенит; кцПЦР, капельная цифровая полимеразная цепная реакция; E1A, ранняя область 1A (ген); ИФА, иммуноферментный анализ; FDP, готовое лекарственное средство; GC, копии генома; HEK293, клетки 293 почки эмбриона человека; ITFFB, интратекальный буфер для готовой композиции; KanR, устойчивость к канамицину (ген); MC, масс-спектрометрия; NGS, секвенирование

следующего поколения; кПЦР, количественная полимеразная цепная реакция; ДНС-ПААГ, электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; TCID₅₀ инфекционная доза для культуры ткани 50%; УЭЖХ, ультраэффективная жидкостная хроматография; ф. США, Фармакопея США.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены рекомбинантный AAV (rAAV), подходящий для применения при лечении нейродегенеративных состояний, связанных с GRN-гаплонедостаточностью, таких как связанная с програнулином (PGRN) лобно-височная деменция (ЛВД), и композиции, содержащие его. В некоторых предпочтительных вариантах реализации, rAAV содержит капсид аденоассоциированного вируса 1 и геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека, и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина. В некоторых вариантах реализации, геном вектора содержит 5' инвертированный концевой повтор AAV (ITR), кодирующую последовательность PGRN человека и регуляторные элементы, которые управляют его экспрессией, и AAV 3' ITR. Также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая водный раствор и рекомбинантный AAV (rAAV). В некоторых вариантах реализации, водный раствор содержит искусственную спинномозговую жидкость с поверхностно-активным веществом, которая подходит для интратекального введения. Также предлагаются способы лечения пациента-человека с PGRN-ЛВД и/или лечения пациента с поражениями мозга, связанными с PGRN-ЛВД. В некоторых вариантах реализации представлены способы лечения или уменьшения микроглиоза у пациента. Способ включает доставку rAAV.PGRN в центральную нервную систему (ЦНС). В некоторых вариантах реализации, способы, представленные в данном документе, могут дополнительно включать мониторинг лечения посредством (a) неинвазивной оценки пациента на предмет уменьшения накопленных повреждений сетчатки в качестве предиктора уменьшения поражений головного мозга, (b) выполнения магнитно-резонансной томографии для оценки объема мозга и/или (c) измерения концентрации PGRN в СМЖ. Необязательно, может быть измерена концентрация PGRN в плазме.

В контексте данного документа термины «AAV.hPGRN» или «rAAV.hPGRN» используются для обозначения рекомбинантного аденоассоциированного вируса, который имеет капсид AAV, содержащий геном вектора, содержащий кодирующую последовательность програнулина человека под контролем регуляторных последовательностей. Могут быть указаны конкретные типы капсидов, такие как, например, AAV1.hPGRN, который относится к рекомбинантному AAV, имеющему капсид AAV1; AAVhu68.hPGRN, который относится к рекомбинантному AAV, имеющему капсид AAVhu68; AAV5.hPGRN относится к рекомбинантному AAV, имеющему капсид AAV5.

«Рекомбинантный AAV» или «rAAV» представляет собой устойчивую к ДНКазе вирусную частицу, содержащую два элемента, капсид AAV и геном вектора, содержащий по меньшей мере последовательности, не кодирующие AAV, упакованные в капсид AAV. Если не указано иное, этот термин может использоваться взаимозаменяемо с фразой «вектор rAAV». rAAV представляет собой «вирус с дефектом репликации» или «вирусный вектор», так как он лишен какого-либо функционального гена повтора AAV или функционального гена кэпа AAV и не может генерировать потомство. В некоторых вариантах реализации, единственными последовательностями AAV являются последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV, обычно расположенные на самых 5'- и 3'-концах генома вектора, чтобы позволить упаковывать генные и регуляторные последовательности, расположенные между ITR внутри капсида AAV.

В контексте данного документа термин «геном вектора» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, упакованной внутри капсида rAAV, который образует вирусную частицу. Такая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. В приведенных в данном документе примерах геном вектора содержит, как минимум, от 5' до 3', AAV 5' ITR, кодирующую(ие) последовательность(и) и AAV 3' ITR. Могут быть выбраны ITR из AAV2, AAV другого источника, чем капсид, или ITR, отличные от полноразмерных. В некоторых вариантах реализации, ITR происходят из того же источника AAV, что и AAV, который обеспечивает функцию воспроизведения во время продуцирования или транскомплементации AAV. Дополнительно, могут использоваться другие ITR. Дополнительно, геном вектора содержит регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию продуктов гена. Подходящие компоненты генома вектора обсуждаются в данном документе более подробно.

Терапевтический белок и последовательность кодирования:

rAAV содержит кодирующую последовательность для белка програнулина человека (hPGRN) или его варианта, который выполняет одну или более биологических функций hPGRN. Кодирующая последовательность этого белка встроена в геном вектора для экспрессии в центральной нервной системе (ЦНС).

hPGRN1 обычно характеризуется 593 аминокислотной последовательностью GenBank NP_002078, которая воспроизводится в SEQ ID NO: 1. Эта последовательность содержит сигнальный пептид в положениях с 1 по 17, причем секретируемый белок програнулина или секретируемый гранулин(ы) содержат аминокислоты от 18 до около 593. Этот белок может быть расщеплен на 8 цепей: гранулин 1 (он же гранулин G: около 58 до около аминокислоты 113), гранулин 2 (от около 123 до около 179), гранулин 3 (от около аминокислоты 206 до около аминокислоты 261), гранулин 4 (от около аминокислоты 281 до около аминокислоты 336), гранулин 5 (от около аминокислоты 364 до около аминокислоты 417), гранулин 6 (от около аминокислоты 442 до около аминокислоты 496) и гранулин 7 (от около аминокислоты 518 до около 573

аминокислоты), со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации, нативный сигнальный пептид может быть заменен гетерологичным сигнальным пептидом. Однако другие варианты реализации могут включать програнулин с экзогенным сигнальным пептидом (например, лидером IL2 человека). См. также, например, www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia. Таким образом, рассматриваются слитые белки, содержащие програнулин и/или его фрагменты. Такие слитые белки могут содержать один или более активных GRN (например, GRN 1, 2, 3, 4, 4, 6 или 7) в различных комбинациях друг с другом, или один или более из этих пептидов могут быть объединены с полным PGRN или другой белок, или пептид (например, другой активный белок или пептид, и/или сигнальный пептид, экзогенный по отношению к PGRN человека).

Геном вектора сконструирован так, чтобы нести кодирующую последовательность этого белка и экспрессировать этот белок в клетках человека и, в частности, в центральной нервной системе. В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность может быть нативной последовательностью, обнаруженной в GenBank: NM_002087.3, который воспроизводится в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность представлена в SEQ ID NO: 3. Некоторые другие варианты реализации будут охватывать кодирующую последовательность, которая на от 95% до 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 3, включая значения между ними. В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность оптимизирована по кодонам для лучшего терапевтического результата, например, повышенной экспрессии в клетках млекопитающих. Идентичность может быть оценена по кодирующей последовательности полноразмерного програнулина с сигнальной (лидерной) последовательностью, по програнулину без сигнальной (лидерной) последовательности или по длине кодирующей последовательности для слитого белка, как определено в данном документе. В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность представлена в SEQ ID NO: 3. Некоторые другие варианты реализации будут охватывать кодирующую последовательность, которая на от 95% до менее чем 100% идентична SEQ ID NO: 4. Идентичность может быть оценена по кодирующей последовательности полноразмерного програнулина с сигнальной (лидерной) последовательностью, по програнулину без сигнальной (лидерной) последовательности или по длине кодирующей последовательности для слитого белка, как определено в данном документе.

Соответственно, эти кодирующие последовательности кодируют полноразмерный програнулин. Однако другие варианты реализации могут охватывать активную цепь гранулина с гетерологичным сигнальным пептидом (например, лидером IL2 человека). См. также, например, www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia.

В некоторых вариантах реализации, фрагменты кодирующих последовательностей PGRN человека (например, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4), или последовательность около на 95-99,9% или на 100% идентичная ей. Такие фрагменты могут кодировать

активный GRN человека (аминокислоты 18-593) или слитый пептид, содержащий гетерологичный сигнальный пептид с активным GRN человека. В некоторых вариантах реализации, одна или более кодирующих последовательностей для одного или более активных GRN (например, GRN 1, 2, 3, 4, 4, 6 или 7) могут быть включены в геном вектора в различных комбинациях друг с другом, или один или более из этих пептидов могут быть объединены с полноразмерным PGRN или другой кодирующей последовательностью.

Не ограничиваясь теорией, считается, что AAV-опосредованная экспрессия PGRN в подмножестве клеток ЦНС (например, эпендимоцитах) обеспечивает депо секретируемого белка. Секретируемый белок PGRN (и/или один или более GRN) поглощается другими клетками через рецепторы сортинаина или манноза-6-фосфата, откуда он впоследствии транспортируется в лизосомы. В некоторых вариантах реализации, секретируемый белок представляет собой програнулин. В некоторых вариантах реализации, секретируемый белок представляет собой гранулин. В некоторых вариантах реализации, секретируемый белок содержит смесь програнулина и гранулина(ов).

В некоторых вариантах реализации, в дополнение к кодирующей последовательности програнулина, может быть включена другая кодирующая последовательность, не относящаяся к AAV, например, пептид, полипептид, белок, функциональная молекула РНК (например, микроРНК, ингибитор микроРНК) или другой интересующий продукт гена. Полезные продукты гена могут включать микроРНК. МикроРНК и другие малые интерферирующие нуклеиновые кислоты регулируют экспрессию генов посредством расщепления/деградации транскрипта целевой РНК или подавления трансляции целевой матричной РНК (мРНК). МикроРНК экспрессируются нативно, как правило, в виде конечных 19-25 нетранслируемых продуктов РНК. МикроРНК проявляют свою активность посредством специфичных для последовательности взаимодействий с 3'-нетранслируемыми областями (UTR) мРНК-мишеней. Эти эндогенно экспрессируемые микроРНК образуют шпильки-предшественники, которые впоследствии процессируются в дуплекс микроРНК, а затем в «зрелую» одноцепочечную молекулу микроРНК. Эта зрелая микроРНК направляет мультибелковый комплекс miRISC, который идентифицирует сайт-мишень, например, в областях 3' UTR, мРНК-мишеней на основе их комплементарности зрелой микроРНК.

В некоторых вариантах реализации, кассета экспрессии дополнительно содержит одну или более последовательностей-мишеней микроРНК, которые подавляют экспрессию hPGRN в ганглии дорзального корешка (drg). В некоторых вариантах реализации, кассета экспрессии содержит по меньшей мере два tandemных повтора последовательностей-мишеней drg-специфичной микроРНК, причем по меньшей мере два tandemных повтора содержат по меньшей мере первую последовательность-мишень микроРНК и по меньшей мере вторую последовательность-мишень микроРНК, которая может быть одинаковой или разной. В некоторых вариантах реализации, tandemные

последовательности-мишени микроРНК являются непрерывными или разделены спейсером из 1-10 нуклеиновых кислот, при этом указанный спейсер не является последовательностью-мишенью микроРНК. В некоторых вариантах реализации существует по меньшей мере две drg-специфичные последовательности-мишени микроРНК, расположенные на 3' к кодирующей последовательности hPGRN. В некоторых вариантах реализации, начало первого из по меньшей мере двух drg-специфичных tandemных повторов микроРНК находится в пределах 20 нуклеотидов от 3' конца последовательности, кодирующей hPGRN. В некоторых вариантах реализации, начало первого из по меньшей мере двух drg-специфичных tandemных повторов микроРНК находится в пределах 100 нуклеотидов от 3' конца последовательности, кодирующей hPGRN. В некоторых вариантах реализации, tandemные повторы микроРНК содержат от 200 до 1200 нуклеотидов по длине. В некоторых вариантах реализации существует по меньшей мере две drg-специфичные последовательности-мишени микроРНК, расположенные на 5' к кодирующей последовательности hPGRN. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере две drg-специфичные последовательности-мишени микроРНК расположены как на 5', так и на 3' к кодирующей последовательности hPGRN. В некоторых вариантах реализации, последовательность-мишень микроРНК по меньшей мере для первой и/или по меньшей мере второй последовательности-мишени микроРНК для мРНК кассеты экспрессии или положительной цепи ДНК выбрана из (i) AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (miR183, SEQ ID NO: 32); (ii) AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA (SEQ ID NO: 33), (iii) AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA (SEQ ID NO: 34); и (iv) AGGGATTCCTGGGAAACTGGAC (SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах реализации, две или более последовательных последовательностей-мишеней микроРНК являются непрерывными и не разделены спейсером. В некоторых вариантах реализации, две или более последовательностей-мишеней микроРНК разделены спейсером, и каждый спейсер независимо выбран из одного или более из (A) GGAT; (B) CACGTG; или (C) GCATGC. В некоторых вариантах реализации, спейсер, расположенный между последовательностями-мишенями микроРНК, может быть расположен на 3' к первой целевой последовательности микроРНК и/или 5' к последней целевой последовательности микроРНК. В некоторых вариантах реализации, спейсеры между последовательностями-мишенями микроРНК одинаковы. См. предварительную заявку на патент США № 62/783956, поданную 21 декабря 2018 г., и международную патентную заявку № PCT/US19/67872, поданную 12 февраля 2020 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

AAV1

AAVhu68, происходящий из Clade F, можно использовать для получения векторов, которые нацелены и экспрессируют hPGRN в ЦНС. Однако неожиданно было обнаружено, что AAV1-опосредованная доставка PGRN обеспечивает более высокую экспрессию PGRN в ЦНС, чем AAVhu68, даже несмотря на то, что наблюдались

сопоставимые концентрации в плазме. Авторы изобретения обнаружили, что интратекальная доставка rAAV1.PGRN является привлекательным путем для лечения, описанного в данном документе. Таким образом, в особенно желательных вариантах реализации выбирается капсид AAV1.

В некоторых вариантах реализации предлагается композиция, которая содержит водный раствор, подходящий для интратекальной инъекции, и запас rAAV, имеющего капсид AAV, который предпочтительно нацелен на эпендимоциты, причем rAAV дополнительно содержит геном вектора, имеющий последовательность, кодирующую PGRN, для доставки в центральную нервную систему (ЦНС). В некоторых вариантах реализации, композиция составлена для субзатылочной инъекции в *cisterna magna* (*intracisterna magna*). В некоторых вариантах реализации, rAAV вводят с помощью инъекции rAAV под контролем компьютерной томографии (КТ). В некоторых вариантах реализации, пациенту вводят разовую дозу композиции.

Капсид AAV1 относится к капсиду, содержащему белки AAV vp1, белки AAV vp2 и белки AAV vp3. В конкретных вариантах реализации, капсид AAV1 содержит предварительно определенное соотношение белков AAV vp1, белков AAV vp2 и белков AAV vp3 около 1:1:10, собранных в капсид икосаэдра T1 из 60 белков vp. Капсид AAV1 способен упаковывать геномные последовательности с образованием частицы AAV (например, рекомбинантного AAV, геном которого является геномом вектора). Обычно последовательности нуклеиновой кислоты капсида, кодирующие самый длинный из белков vp, т.е. VP1, экспрессируются в транс во время продукции rAAV, имеющего капсид AAV1, описаны, например, в патенте США 6759237, патенте США 7105345, патенте США 7186552, патенте США 8637255 и патенте США 9567607, которые включены в данный документ посредством ссылки.

Кодирующие последовательности капсида отсутствуют в готовом собранном rAAV1.hPGRN. Однако такие последовательности используются для получения рекомбинантного AAV. В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность капсида AAV1 представляет собой любую нуклеиновую последовательность, которая кодирует полноразмерный белок VP1 AAV1 из SEQ ID NO: 26, или их области VP2 или VP3. См., например, патент США 6759237, патент США 7105345, патент США 7186552, патент США 8637255 и патент США 9567607, которые включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность капсида AAV1 представляет собой SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах реализации, капсид AAV1 представляет собой белок, полученный из кодирующей последовательности SEQ ID NO: 25 с или без посттрансляционной модификацией. Однако варианты этой кодирующей последовательности могут быть сконструированы, и/или другие кодирующие последовательности могут быть подвергнуты обратной трансляции для желаемой системы экспрессии с использованием аминокислотной последовательности AAV1 VP1, AAV1 VP2 и/или AAV VP3.

В некоторых вариантах реализации композиции, содержащие рекомбинантный AAV1, имеют капсиды, в которых AAV1 содержит пять аминокислот с высокой степенью дезамидирования (N57, N383, N512 и N718) на основе нумерации первичной последовательности VP1 AAV1, воспроизводимой в SEQ ID NO: 26.

Модификация AAV1								
Фермент		Трипс ин	Трипс ин	Трипс ин	Трипс ин	Трипс ин	Трипс ин	Трипс ин
% покрытия	N+ 1	97,6	84,2	92,4	87,4	90,4	85,2	88,9
N35+Дезамидирование	Q	9,5						
~N57+Дезамидирование	G	100,0	100,0	100,0	92,0	89,3	86,1	85,5
~N94+Дезамидирование	H				2,3	3,7	4,9	2,2
N113+Дезамидирование	L		5,6					
~N214+Дезамидирование	N				0,9	0,4	1,0	0,7
~N223+Дезамидирование	A	21,4		25,9				
N227+Дезамидирование	W	4,9		3,1				
~N253+Дезамидирование	H		29,7					
Q259+Дезамидирование	I	24,6		14,2				
~N269+Дезамидирование	D			21,6			5,2	
~N271+Дезамидирование	H	27,7						
N286+Дезамидирование	R	5,4		5,2				

~N302+Дезамидирование	<u>NN</u> N	43,7	48,6	18,8	12,4	28,7	16,3	11,9
~N303+Дезамидирование	<u>NN</u> N		50,8	19,3				
~N383+Дезамидирование	G	88,5	86,9	82,5	82,1	84,6	83,4	92,3
~N408+Дезамидирование	N	58,2	43,2	40,5	30,1	25,7	28,3	22,8
~N451+Дезамидирование	Q	20,5						
~Q452+Дезамидирование	S	1,7						
N477+Дезамидирование	W	4,4	3,1	39,7	1,2	1,3	1,1	1,8
~N496+Дезамидирование	<u>NN</u> N	1,1		69,9				
N512+Дезамидирование	G	93,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	97,3
N651+Дезамидирование	T	2,0	2,1	1,6	0,6			
N691+Дезамидирование	S			57,1				
~N704+Дезамидирование	Y		9,4					
N718+Дезамидирование	G	98,7	98,1	98,2	89,5	91,9	92,3	87,4

В некоторых вариантах реализации, AAV1 характеризуется композицией капсида гетерогенной популяции изоформ VP, которые дезамидированы, как определено в следующей таблице, на основе общего количества белков VP в капсиде, как определено с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах реализации, капсид AAV модифицирован в одном или более из следующих положений в диапазонах, указанных ниже, как определено с помощью масс-спектрометрии. Количество остатков основано на опубликованной последовательности AAV1, воспроизведенной в SEQ ID NO: 26.

ТАБЛИЦА А

Положение капсида AAV1 на основе нумерации VP1	%
N35+Дезамидирование	1-15, 5-10
~N57+Дезамидирование	65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100
N113+Дезамидирование	0-8
~N223+Дезамидирование	0-30, 0, 20-28
N227+Дезамидирование	0, 1-5
~N253+Дезамидирование	0, 1-35
Q259+Дезамидирование	0, 10-25
~N269+Дезамидирование	0-25
~N271+Дезамидирование	0-25
N286+Дезамидирование	2-10
~N302+Дезамидирование	10-50
~N303+Дезамидирование	0-55
~N383+Дезамидирование	65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100
~N408+Дезамидирование	30-65
~N451+Дезамидирование	0-25
~Q452+Дезамидирование	0-5
N477+Дезамидирование	0-45
~N496+Дезамидирование	0-75
N512+Дезамидирование	75-100, 80-100, 90-100
N651+Дезамидирование	0-3
N691+Дезамидирование	0, 1-60
~N704+Дезамидирование	0-10
N718+Дезамидирование	75-100, 80-100, 90-100

Подходящие модификации включают модификации, описанные в абзаце выше, помеченном как модуляция дезамидирования, который включен в данный документ. В некоторых вариантах реализации, одно или более из следующих положений или глицин, следующий за N, модифицирован, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации конструируется мутант AAV1, в котором глицин, следующий за N в положении 57, 383, 512 и/или 718, сохраняется (т.е. остается немодифицированным). В

некоторых вариантах реализации, NG в четырех положениях, идентифицированных в предыдущем предложении, сохраняются с нативной последовательностью. Количество остатков основано на опубликованном AAV1 VP1, воспроизведенном в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах реализации, искусственный NG вводится в положение, отличное от одного из положений, указанных в таблице выше.

Векторы гAAV

Как указано выше, рекомбинантный AAV, имеющий капсид AAV1, являются предпочтительными векторами, описанными в данном документе, для лечения ЛВД. В некоторых вариантах реализации, например, в примерах ниже (например, AAVhu68 или AAV5), другие капсиды AAV могут использоваться для создания гAAV. В некоторых вариантах реализации может быть выбран капсид AAV1, и могут быть заменены один или более элементов генома вектора, содержащих кодирующую последовательность hPGRN.

В контексте данного документа капсид AAVhu68 относится к капсиду, как определено в WO 2018/160582, включенном в данный документ посредством ссылки. Как описано в данном документе, гAAVhu68 имеет капсид гAAVhu68, продуцируемый в продуцирующей системе, экспрессирующей капсиды из нуклеиновой кислоты AAVhu68 (например, SEQ ID NO: 30), который кодирует аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 31, и необязательно дополнительные последовательности нуклеиновых кислот, например, кодирующих белок vp 3, свободный от уникальных для vp1 и/или vp2 областей. RAAVhu68, образующийся в результате продукции с использованием одной последовательности нуклеиновой кислоты vp1, продуцирует гетерогенные популяции белков vp1, белков vp2 и белков vp3. В частности, капсид AAVhu68 содержит субпопуляции внутри белков vp1, внутри белков vp2 и внутри белков vp3, которые имеют модификации по сравнению с предсказанными аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 31. Эти субпопуляции включают, как минимум, остатки дезамидированного аспарагина (N или Asn). Например, аспарагины в парах аспарагин-глицин высоко дезамидированы. В одном варианте реализации, последовательность нуклеиновой кислоты AAVhu68 vp1 имеет последовательность SEQ ID NO: 30, или цепи, комплементарной ей, например, соответствующей мРНК или тРНК. В некоторых вариантах реализации, белки vp2 и/или vp3 могут экспрессироваться дополнительно или альтернативно из последовательностей нуклеиновых кислот, отличных от vp1, например, для изменения соотношения белков vp в выбранной системе экспрессии. В некоторых вариантах реализации также представлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность AAVhu68 vp3 SEQ ID NO: 31 (от около аминокислоты 203 до аминокислоты 736) без vp1-уникальной области (от около аминокислоты 1 до около 137 аминокислоты) и/или vp2-уникальных областей (от около аминокислоты 1 до около аминокислоты 202) или цепи, комплементарной ей, соответствующей мРНК или тРНК (от около нуклеотида 607 до около нуклеотида 2211 из SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах реализации также представлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную

последовательность AAVhu68 vp2 SEQ ID NO: 31 (от около аминокислоты 138 до 736 аминокислоты) без vp1-уникальной области (около от 1 до 137) или цепи, комплементарной ей, соответствующей мРНК или тРНК (нуклеотиды с 411 по 2211 из SEQ ID NO: 30).

В данном контексте капсид AAV5 имеет предсказанную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах реализации, капсид AAV5 экспрессируется из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28.

Геномные последовательности, которые упакованы в капсид AAV и доставляются в клетку-хозяин, обычно состоят по меньшей мере из трансгена и его регуляторных последовательностей, а также инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Как одноцепочечный AAV, так и самокомплементарный (sc) AAV охвачены гAAV. Трансген представляет собой кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную векторным последовательностям, которая кодирует полипептид, белок, функциональную молекулу РНК (например, микроРНК, ингибитор микроРНК) или другой представляющий интерес продукт гена. Кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторными компонентами таким образом, что позволяет транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию трансгена в клетке ткани-мишени.

Последовательности AAV вектора обычно включают цис-действующие 5' и 3' последовательности инвертированных концевых повторов (см., например, B. J. Carter, в «Handbook of Parvoviruses», ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). Последовательности ITR имеют длину около 145 п.н. Предпочтительно, в молекуле используются по существу полные последовательности, кодирующие ITR, хотя допустима некоторая незначительная модификация этих последовательностей. Возможность модифицировать эти ITR-последовательности находится в компетенции специалиста в данной области техники. (См., например, такие тексты, как Sambrook et al, «Molecular Cloning. A Laboratory Manual», 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532 (1996)). Примером такой молекулы, используемой в данном изобретении, является «цис-действующая» плаزمид, содержащая трансген, в которой выбранная последовательность трансгена и связанные регуляторные элементы фланкированы 5'- и 3'-последовательностями ITR AAV. В одном варианте реализации, ITR взяты из AAV, отличного от того, который поставляет капсид. В одном варианте реализации, последовательности ITR из AAV2. Была описана укороченная версия 5' ITR, названная Δ ITR, в которой удалены D-последовательность и сайт конечного разрешения (trs). В других вариантах реализации, используются полноразмерные 5' и 3' ITR AAV. Однако могут быть выбраны ITR из других источников AAV. Если источником ITR является AAV2, а капсидом AAV является другой источник AAV, полученный вектор можно назвать псевдотипированным. Однако могут быть подходящими другие конфигурации этих элементов.

В дополнение к основным элементам, идентифицированным выше для рекомбинантного вектора AAV, вектор также включает необходимые стандартные элементы управления, которые функционально связаны с трансгеном таким образом, чтобы обеспечить его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированы вирусом, продуцируемым согласно данному изобретению. В контексте данного документа «функционально связанные» последовательности включают как последовательности контроля экспрессии, которые примыкают к представляющему интерес гену, так и последовательности контроля экспрессии, которые действуют в транс-конфигурации или на расстоянии, чтобы контролировать интересующий ген.

Элементы регуляторного контроля обычно содержат промоторную последовательность как часть последовательностей контроля экспрессии, например, расположенную между выбранной 5' ITR-последовательностью и кодирующей последовательностью. В векторах, описанных в данном документе, могут быть использованы конститутивные промоторы, регулируемые промоторы [см., например, WO 2011/126808 и WO 2013/04943], тканеспецифические промоторы или промотор, реагирующий на физиологические сигналы. Промотор(ы) может быть выбран из различных источников, например, раннего энхансера/промотора цитомегаловируса человека (CMV), раннего энхансера/промотора SV40, промотора полиомавируса JC, основного белка миелина (MBP) или глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) промоторов, ассоциированных с латентностью (LAP), вируса простого герпеса (HSV-1), промотора длинных концевых повторов (LTR), вируса саркомы Рауса (RSV), нейрон-специфического промотора (NSE), промотора тромбоцитарного фактора роста (PDGF), hSYN, промотора меланин-концентрирующего гормона (MCH), CBA, промотора матриксного металлопротеина (MPP) и промотора бета-актина курицы. В дополнение к промотору вектор может содержать одну или более других подходящих последовательностей инициации, терминации, энхансера транскрипции, эффективных сигналов процессинга РНК, таких как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК, например WPRE; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, повышающие стабильность белка; и, если желательно, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. Примером подходящего энхансера является энхансер CMV. Другие подходящие энхансеры включают те, которые подходят для желаемых особенностей в ткани-мишени. В одном варианте реализации, кассета экспрессии содержит один или более энхансеров экспрессии. В другом варианте реализации, кассета экспрессии содержит два или более энхансеров экспрессии. Эти энхансеры могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Например, энхансер может включать немедленный ранний энхансер CMV. Этот энхансер может присутствовать в двух копиях, расположенных рядом друг с другом. Альтернативно, двойные копии энхансера могут

быть разделены одной или более последовательностями. В еще одном варианте реализации, кассета экспрессии дополнительно содержит интрон, например, интрон бета-актина курицы. Другие подходящие интроны включают интроны, известные в данной области, например, такие, которые описаны в WO 2011/126808. Примеры подходящих последовательностей полиА включают, например, SV40, SV50, гормон роста крупного рогатого скота (bGH), гормон роста человека и синтетические полиА. Необязательно, одна или более последовательностей могут быть выбраны для стабилизации мРНК. Примером такой последовательности является модифицированная последовательность WPRE, которая может быть сконструирована выше последовательности полиА и ниже кодирующей последовательности [см., например, MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619].

В одном варианте реализации, геном вектора содержит: AAV 5' ITR, промотор, необязательный энхансер, необязательный интрон, кодирующую последовательность для PGRN человека или слитый белок, содержащий их, поли А и AAV 3' ITR. В некоторых вариантах реализации, геном вектора содержит: AAV 5' ITR, промотор, необязательный энхансер, необязательный интрон, кодирующую последовательность для PGRN человека или слитый белок, содержащий его, поли А и AAV 3' ITR. В некоторых вариантах реализации, геном вектора содержит: AAV 5' ITR, промотор, необязательный энхансер, необязательный интрон, кодирующую последовательность huPGRN, поли А и AAV 3' ITR. В некоторых вариантах реализации, геном вектора содержит: AAV2 5' ITR, промотор EF1a, необязательный энхансер, необязательный промотор, huPGRN, поли А SV40 и AAV2 3' ITR. В некоторых вариантах реализации, геном вектора представляет собой AAV2 5' ITR, промотор UbC, необязательный энхансер, необязательный интрон, huPGRN, поли А SV40 и AAV2 3' ITR. В некоторых вариантах реализации, геном вектора представляет собой AAV2 5' ITR, промотор CB7, интрон, huPGRN, поли А SV40 и AAV2 3' ITR. В определенном варианте реализации, геном вектора представляет собой AAV2 5' ITR, промотор CB7, интрон, huPGRN, поли А бета-глобина кролика и AAV2 3' ITR. См., например, SEQ ID NO: 22 (EF1a.huPGRN.SV40), SEQ ID NO: 23 (UbC.PI.huPGRN.SV40) или SEQ ID NO: 24 (CB7.CI.hPGRN1.rGB). Кодирующие последовательности huPGRN выбраны из тех, что определены в данном описании. См., например, SEQ ID NO: 3 или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%, или SEQ ID NO: 4 или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%, или SEQ ID NO: Иллюстративные последовательности векторных элементов, используемых в приведенных ниже примерах, представлены, например, в SEQ ID NO: 6 (глобин кролика полиА), ITR AAV (SEQ ID NO: 7 и 8), промотор IE CMV человека (SEQ ID NO: 9), промотор CB (SEQ ID NO: 10), химерный интрон (SEQ ID NO: 11), промотор UbC (SEQ ID NO: 12), промотор EF-1a (SEQ ID NO: 17), интрон (SEQ ID NO: 13) и поздний поли А SV40 (SEQ ID NO: 14). Другие элементы генома вектора или варианты этих последовательностей могут быть выбраны для геномов векторов для определенных вариантов реализации данного изобретения.

Получение вектора

Для использования при получении вирусного вектора AAV (например, рекомбинантного (г) AAV) кассеты экспрессии могут быть перенесены в любой подходящий вектор, например, плазмиду, которая доставляется в упаковывающую клетку-хозяина. Плазмиды, используемые в данном изобретении, могут быть сконструированы таким образом, чтобы они были пригодны для репликации и упаковки *in vitro* в прокариотических клетках, клетках насекомых, клетках млекопитающих, среди прочего. Подходящие методы трансфекции и упаковки клеток хозяев известны и/или могут быть легко разработаны специалистом в данной области техники.

Способы создания и выделения AAV, подходящих для использования в качестве векторов, известны в данной области техники. См. в общем, например, Grieger & Samulski, 2005, «Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications» *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning et al., 2008, «Recent developments in adeno-associated virus vector technology» *J. Gene Med.* 10:717-733; и ссылки, цитируемые ниже, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. Для упаковки трансгена в вирионы ITR являются единственными компонентами AAV, необходимыми в цис-системе в той же конструкции, что и молекула нуклеиновой кислоты, содержащая кассеты экспрессии. Гены *cap* и *rep* могут поставляться в *транс* конфигурации.

В одном варианте реализации, описанные в данном документе кассеты экспрессии сконструированы в генетический элемент (например, челночную плазмиду), который переносит последовательности конструкции иммуноглобулина, переносимые на ней, в упаковывающую клетку-хозяина для получения вирусного вектора. В одном варианте реализации, выбранный генетический элемент может быть доставлен в упаковочную клетку AAV любым подходящим способом, включая трансфекцию, электропорацию, доставку липосомами, методы слияния мембран, высокоскоростные гранулы, покрытые ДНК, вирусную инфекцию и слияние протопластов. Также могут быть созданы клетки, стабильно упаковывающие AAV. Альтернативно, кассеты экспрессии можно использовать для создания вирусного вектора, отличного от AAV, или для получения смесей антител *in vitro*. Способы, используемые для создания таких конструкций, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методы. См., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

Термин «промежуточный AAV» или «промежуточный вектор AAV» относится к собранному капсиду гAAV, в котором отсутствуют желаемые геномные последовательности, упакованные в него. Их также можно называть «пустыми» капсидами. Такой капсид может не содержать поддающихся обнаружению геномных последовательностей кассеты экспрессии или только частично упакованных геномных

последовательностей, которых недостаточно для достижения экспрессии генного продукта. Эти пустые капсиды не могут передавать интересующий ген клетке-хозяину.

Описанный в данном документе рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV) может быть получен с использованием известных методик. См., например, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; США 7588772 B2. Такой способ включает культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок AAV; функциональный ген гер; кассету экспрессии, состоящую по меньшей мере из инвертированных концевых повторов AAV (ITR) и трансгена; и достаточные вспомогательные функции, позволяющие упаковывать кассету экспрессии в капсидный белок AAV. Были описаны способы получения капсида, его кодирующих последовательностей и способы получения вирусных векторов rAAV. См., например, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) и США 2013/0045186A1.

В одном варианте реализации, предоставлена культура клеток-продуцентов, пригодная для получения рекомбинантного AAV. Такая клеточная культура содержит нуклеиновую кислоту, которая экспрессирует капсидный белок AAV в клетке-хозяине; молекулу нуклеиновой кислоты, подходящую для упаковки в капсид AAV, например геном вектора, который содержит ITR AAV и последовательность нуклеиновой кислоты, не являющуюся AAV, кодирующую продукт гена, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине; и достаточные репродуктивные функции AAV и вспомогательные функции аденовируса, позволяющие упаковывать молекулу нуклеиновой кислоты в рекомбинантный капсид AAV. В одном варианте реализации, клеточная культура состоит из клеток млекопитающих (например, эмбриональных клеток 293 почки человека, среди прочего) или клеток насекомых (например, бакуловируса).

Обычно функции гер происходят из того же источника AAV, что и AAV, обеспечивая ITR, фланкирующие геном вектора. В приведенных в данном документе примерах выбираются ITR AAV2 и используется гер AAV2. Кодированная последовательность воспроизводится в SEQ ID NO: 27. Необязательно, могут быть выбраны другие последовательности гер или другой источник гер (и, возможно, другой источник ITR). Например, гер может быть, без ограничения, белком гер AAV1, белком гер AAV2; или гер 78, гер 68, гер 52, гер 40, гер68/78 и гер40/52; или его фрагментом; или другого источника. Необязательно, последовательности гер и сар находятся на одном и том же генетическом элементе в культуре клеток. Между последовательностью гер и геном сар может быть спейсер. Любая из этих последовательностей капсида AAV или мутантного AAV может находиться под контролем экзогенных регуляторных контрольных последовательностей, которые направляют их экспрессию в клетке-хозяине.

В одном варианте реализации, клетки получают в подходящей культуре клеток (например, НЕК 293). Способы производства векторов для генной терапии, описанные в данном документе, включают способы, хорошо известные в данной области техники,

такие как создание плазмидной ДНК, используемой для получения векторов для генной терапии, создание векторов и очистка векторов. В некоторых вариантах реализации, вектор для генной терапии представляет собой вектор AAV, а полученные плазмиды представляют собой цис-плазмиду AAV, кодирующую геном AAV и представляющий интерес ген, транс-плазмиду AAV, содержащую гены гер и сар AAV, и вспомогательную плазмиду аденовируса. Процесс создания вектора может включать этапы метода, такие как инициирование клеточной культуры, пассаж клеток, посев клеток, трансфекция клеток плазмидной ДНК, замена посттрансфекционной среды на бессывороточную среду и сбор вектор-содержащих клеток и культуральной среды.

В некоторых вариантах реализации, процесс производства гAAV.hPGRN включает временную трансфекцию клеток HEK293 плазмидной ДНК. Одну или более серий получают посредством PEI-опосредованной тройной трансфекции клеток HEK293 в биореакторах PALL iCELLis. Собранный материал AAV очищают последовательно с помощью осветления, TFF, аффинной хроматографии и анионообменной хроматографии в одноразовых закрытых биотехнологических системах, где это возможно.

Собранные клетки, содержащие вектор, и культуральные среды упоминаются в данном документе как сбор неочищенных клеток. В еще одной системе векторы для генной терапии вводят в клетки насекомых путем инфицирования векторами на основе бакуловирусов. Для обзоров этих производственных систем см. в целом, например, Zhang et al., 2009, «Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production», Human Gene Therapy 20:922-929, содержание каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. Способы изготовления и использования этих и других систем получения AAV также описаны в следующих патентах США, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки: 5139941; 5741683; 6057152; 6204059; 6268213; 6491907; 6660514; 6951753; 7094604; 7172893; 7201898; 7229823; и 7439065.

После этого сбор неочищенных клеток может быть субъектом таких стадий способа, как концентрирование сбор вектора, диафильтрация собранного вектора, микрофлюидизация собранного вектора, расщепление нуклеазами собранного вектора, фильтрация микрофлюидизированного промежуточного продукта, грубая очистка хроматографией, грубая очистка ультрацентрифугированием, замена буфера путем фильтрации в тангенциальном потоке и/или составление и фильтрация для приготовления основного вектора.

Двухступенчатая очистка с помощью аффинной хроматографии при высокой концентрации соли с последующей хроматографией на анионообменной смоле используется для очистки векторного лекарственного продукта и удаления пустых капсидов. Эти методы более подробно описаны в Международной патентной заявке № PCT/US2016/065970, поданной 9 декабря 2016 г., которая включена в данный документ в качестве ссылки. Способы очистки для AAV8, Международная патентная заявка № PCT/US2016/065976, поданная 9 декабря 2016 г., и rh10, Международная патентная заявка

№ PCT/US16/66013, поданная 9 декабря 2016 г., озаглавленная «Scalable Purification Method for AAVrh10», также поданная 11 декабря 2015 г., а также для AAV1, Международная патентная заявка № PCT/US2016/065974, поданная 9 декабря 2016 г., для «Scalable Purification Method for AAV1», поданная 11 декабря 2015 г., все включены в данный документ посредством ссылки.

Для расчета содержания пустых и полных частиц объемы полос VP3 для выбранного образца (например, в приведенных в данном документе примерах, препарат, очищенный градиентом йодиксанола, где количество GC=количество частиц) наносят на график относительно загруженных частиц GC. Полученное линейное уравнение ($y=mx+c$) используется для вычисления количества частиц в объемах полос пиков испытуемого вещества. Затем количество частиц (кч) на загруженные 20 мкл умножают на 50, чтобы получить количество частиц (кч)/мл. Кч/мл, разделенное на GC/мл, дает отношение частиц к копиям генома (кч/GC). Кч/мл - GC/мл дает кч/мл пустых. Кч/мл пустых, деленное на кч/мл, и умноженное на 100 дает процент пустых частиц.

Как правило, в данной области известны методы анализа пустых капсидов и векторных частиц AAV с упакованными геномами См., например, Gene Therapy (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., Molec. Ther. (2003) 7:122-128. Для тестирования денатурированного капсида методы включают подвергание обработанного исходного материала AAV электрофорезу в SDS-полиакриламидном геле, состоящем из любого геля, способного разделять три капсидных белка, например градиентного геля, содержащего 3-8% трис-ацетата в буфере, затем прогон геля до тех пор, пока материал образца не отделится, и нанесение геля на нейлоновые или нитроцеллюлозные мембраны, предпочтительно нейлон. Затем используют антитела против капсида AAV в качестве первичных антител, которые связываются с денатурированными белками капсида, предпочтительно моноклональное антитело против капсида AAV, наиболее предпочтительно моноклональное антитело против AAV-2 B1 (Wobus et al., J. Virol. (2000) 74:9281-9293). Затем используется вторичное антитело, которое связывается с первичным антителом и содержит средство для обнаружения связывания с первичным антителом, более предпочтительно анти-IgG-антитело, содержащее детектирующую молекулу, ковалентно связанную с ним, наиболее предпочтительно овечье антимышиное IgG антитело, ковалентно связанное с пероксидазой хрена. Метод обнаружения связывания используется для полуколичественного определения связывания между первичными и вторичными антителами, предпочтительно метод обнаружения, способный обнаруживать излучение радиоактивных изотопов, электромагнитное излучение или колориметрические изменения, наиболее предпочтительно набор для обнаружения хемилюминесценции. Например, для ДНС-ПААГ образцы из фракций колонки могут быть взяты и нагреты в загрузочном буфере ДНС-ПААГ, содержащем восстанавливающий агент (например, ДТТ), а капсидные белки разделяются на предварительно отлитых градиентных полиакриламидных гелях (например, Novex). Окрашивание серебром можно проводить с помощью SilverXpress (Invitrogen, CA) в соответствии с инструкциями производителя или

другим подходящим методом окрашивания, например, красителями SYPRO на рубин или кумасси. В одном варианте реализации, концентрацию геномов вектора AAV (vg) во фракциях колонки можно измерить с помощью количественной ПЦР в реальном времени (Q-PCR). Образцы разбавляют и переваривают ДНКазой I (или другой подходящей нуклеазой) для удаления экзогенной ДНК. После инактивации нуклеазы образцы дополнительно разбавляют и амплифицируют с использованием праймеров и флуорогенного зонда TaqMan™, специфичного для последовательности ДНК между праймерами. Количество циклов, необходимых для достижения определенного уровня флуоресценции (пороговый цикл, Ct), измеряется для каждого образца с помощью системы обнаружения последовательностей Applied Biosystems Prism 7700. Плазмидную ДНК, содержащую последовательности, идентичные последовательности, содержащейся в векторе AAV, используют для построения стандартной кривой в реакции Q-PCR. Значения порогового цикла (Ct), полученные из образцов, используются для определения титра генома вектора путем его нормализации до значения Ct стандартной кривой плазмиды. Также можно использовать анализы конечных точек, основанные на цифровой ПЦР.

В одном аспекте используется оптимизированный метод q-PCR, который использует сериновую протеазу широкого спектра действия, например, протеиназу К (например, коммерчески доступную от Qiagen). В частности, оптимизированный анализ титра генома кПЦР аналогичен стандартному анализу, за исключением того, что после расщепления ДНКазой I образцы разбавляют буфером протеиназы К и обрабатывают протеиназой К с последующей тепловой инактивацией. Подходящим образом образцы разбавляют буфером протеиназы К в количестве, равном размеру образца. Буфер протеиназы К может быть сконцентрирован в 2 раза или выше. Обычно обработка протеиназой К составляет около 0,2 мг/мл, но может варьировать от 0,1 мг/мл до около 1 мг/мл. Стадия обработки обычно проводится при температуре около 55°C в течение около 15 минут, но может выполняться при более низкой температуре (например, от около 37°C до около 50 °C) в течение более длительного периода времени (например, от около 20 минут до около 30 минут) или более высокой температуре (например, до около 60 °C) в течение более короткого периода времени (например, от около 5 до 10 минут). Точно так же тепловая инактивация обычно происходит при около 95°C в течение около 15 минут, но температуру можно снизить (например, от около 70 до около 90 °C) и увеличить время (например, от около 20 минут до около 30 минут). Затем образцы разбавляют (например, в 1000 раз) и подвергают анализу TaqMan, как описано в стандартном анализе.

Дополнительно или в качестве альтернативы можно использовать капельную цифровую ПЦР (ккПЦР). Например, были описаны способы определения титров одноцепочечного и самокомплементарного генома вектора AAV с помощью ккПЦР. См., например, M. Lock et al, *Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

Вкратце, способ отделения частиц rAAV, имеющих упакованные геномные последовательности, от не имеющих геном промежуточных AAV включает подвергание суспензии, содержащей рекомбинантные вирусные частицы AAV и промежуточные капсиды AAV, быстрой жидкостной хроматографии, в которой вирусные частицы AAV и промежуточные AAV связываются с сильной анионообменной смолой, уравновешенной при высоком pH, и подвергаются солевому градиенту, при мониторинге элюата на предмет поглощения ультрафиолетового излучения при около 260 и около 280. pH можно регулировать в зависимости от выбранного AAV. См., например, WO2017/160360 (AAV9), WO2017/100704 (AAVrh10), WO 2017/100676 (например, AAV8) и WO 2017/100674 (AAV1), которые включены в данный документ посредством ссылки. В этом методе полные капсиды AAV собираются из фракции, которая элюируется, когда соотношение A260/A280 достигает точки перегиба. В одном примере для стадии аффинной хроматографии диафильтрованный продукт можно наносить на аффинную смолу Capture Select™ Poros- AAV2/9 (Life Technologies), которая эффективно захватывает серотип AAV2. В этих ионных условиях значительный процент остаточной клеточной ДНК и белков проходит через колонку, в то время как частицы AAV эффективно захватываются.

Композиции.

В данном документе представлены композиции, содержащие по меньшей мере один стоковый rAAV.hPGRN (например, стоковый rAAV) и необязательный носитель, вспомогательное вещество и/или консервант. Стоковый rAAV относится к множеству одинаковых векторов rAAV, например, в количествах, описанных ниже при обсуждении концентраций и единиц дозировки.

В некоторых вариантах реализации, композиция содержит исходный вирус, который представляет собой рекомбинантный AAV (rAAV), подходящий для применения при лечении лобно-височной деменции, связанной с програнулином (ЛВД), причем указанный rAAV содержит: (а) капсид аденоассоциированного вируса 1 и (b) геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина. В некоторых вариантах реализации, геном вектора содержит промотор, энхансер, интрон, кодирующую последовательность PGRN человека и сигнал полиаденилирования. В некоторых вариантах реализации, интрон состоит из донора сплайсинга бета-актина курицы и акцепторного элемента сплайсинга бета-актина кролика. В некоторых вариантах реализации, геном вектора дополнительно содержит AAV2 5' ITR и AAV2 3' ITR, которые фланкируют все элементы генома вектора.

RAAV.hPGRN, предпочтительно суспендированный в физиологически совместимом носителе, можно вводить пациенту-человеку или млекопитающему, не относящемуся к человеку. В некоторых вариантах реализации для введения пациенту-человеку rAAV подходящим образом суспендируют в водном растворе, содержащем физиологический раствор, поверхностно-активное вещество и физиологически

совместимую соль или смесь солей. Соответственно, состав доводят до физиологически приемлемого pH, например, в диапазоне от 6 до 9, или от 6,5 до 7,5, от 7,0 до 7,7 или от 7,2 до 7,8. Поскольку pH спинномозговой жидкости составляет от около 7,28 до около 7,32, или pH от 7,2 до 7,4 для интратекальной доставки может потребоваться pH в этом диапазоне; тогда как для внутривенной доставки может быть желательным pH от около 6,8 до около 7,2. Однако другие значения pH в самом широком диапазоне и эти поддиапазоны могут быть выбраны для другого пути доставки.

В некоторых вариантах реализации, состав может содержать забуференный солевой водный раствор, не содержащий гидрокарбонат натрия. Такой состав может содержать забуференный солевой водный раствор, содержащий один или более из следующих компонентов: фосфат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид магния и их смеси в воде, такие как буфер Гарварда. Водный раствор может дополнительно содержать Kolliphor® P188, полоксамер, коммерчески доступный от BASF, который ранее продавался под торговым названием Lutrol® F68. Водный раствор может иметь pH 7,2 или pH 7,4.

В другом варианте реализации, состав может содержать забуференный солевой водный раствор, содержащий 1 mM фосфата натрия (Na_3PO_4), 150 mM хлорида натрия (NaCl), 3 mM хлорида калия (KCl), 1,4 mM хлорида кальция (CaCl_2), 0,8 mM хлорида магния (MgCl_2) и 0,001% Kolliphor® 188. См., например, harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html. В некоторых вариантах реализации предпочтительным является буфер Гарварда.

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

В другом варианте реализации, композиция содержит носитель, разбавитель, вспомогательное вещество и/или адъювант. Подходящие носители могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники с учетом признака, на который направлен переносимый вирус. Например, один подходящий носитель включает физиологический раствор, который может быть составлен с различными буферными растворами (например, забуференный фосфатом физиологический раствор). Другие типичные носители включают стерильный физиологический раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло и воду. Буфер/носитель должен включать компонент, который предотвращает прилипание rAAV к инфузионной трубке, но не влияет на активность связывания rAAV *in vivo*.

Необязательно, композиции могут содержать, помимо rAAV и носителя(ей), другие обычные фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы. Подходящие иллюстративные консерванты включают хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновую кислоту, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин,

глицерин, фенол и парахлорфенол. Подходящие химические стабилизаторы включают желатин и альбумин.

В контексте данного документа термин «носитель» включает любой и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и т.п. Использование таких сред и агентов для фармацевтических активных веществ хорошо известно в данной области техники. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным объектам и композициям, которые не вызывают аллергической или подобной нежелательной реакции при введении хозяину. Носители для доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и т.п., могут использоваться для введения композиций по данному изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, трансгены, доставляемые вектором гAAV, могут быть составлены для доставки либо инкапсулированными в липидную частицу, липосому, везикулу, наносферу, либо наночастицу или тому подобное.

В одном варианте реализации, композиция содержит конечный состав, подходящий для доставки субъекту, например, представляет собой водную жидкую суспензию, забуференную до физиологически совместимого pH и концентрации соли. Необязательно, в составе присутствуют одно или более поверхностно-активных веществ. В другом варианте реализации, композиция может транспортироваться в виде концентрата, который разбавляют для введения субъекту. В других вариантах реализации, композиция может быть лиофилизирована и восстановлена во время введения.

Подходящее поверхностно-активное вещество или комбинация поверхностно-активных веществ может быть выбрана из неионогенных поверхностно-активных веществ, которые не токсичны. В одном варианте реализации выбирают дифункциональное блок-сополимерное поверхностно-активное вещество с концевыми первичными гидроксильными группами, например, такое как Pluronic® F68 [BASF], также известное как Poloxamer 188, который имеет нейтральный pH, имеет среднюю молекулярную массу 8400. Могут быть выбраны другие поверхностно-активные вещества и другие полуксамеры, то есть неионные триблочные сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли(пропиленоксид)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксид)), SOLUTOL HS 15 (макрогол-15 гидроксистеарат), LABRASOL (полиоксикаприловый глицерид), полиокси-10-олеиловый эфир, TWEEN (сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот), этанол и полиэтиленгликоль. В одном варианте реализации, состав содержит полуксамер. Эти сополимеры обычно обозначаются буквой «Р» (полуксамер), за которой следуют три цифры: первые две цифры x 100 обозначают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового ядра, а последняя цифра x 10 обозначает процентное содержание полиоксиэтилена. В

одном варианте реализации выбран полоксамер 188. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в количестве от около 0,0005% до около 0,001% суспензии.

Векторы вводят в количествах, достаточных для трансфекции клеток и обеспечения достаточных уровней переноса и экспрессии генов, чтобы обеспечить терапевтический эффект без чрезмерных побочных эффектов или с приемлемыми с медицинской точки зрения физиологическими эффектами, которые могут быть определены специалистами в области медицины. Необязательно могут быть использованы пути, отличные от интратекального введения, такие как, например, прямая доставка в желаемый орган (например, печень (необязательно через печеночную артерию), легкое, сердце, глаз, почки), пероральный, ингаляционный, интраназальный, интратрахеальный, внутриартериальный, внутриглазный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный и другие исходные пути введения. При желании способы введения можно комбинировать.

Дозировки вирусного вектора будут зависеть в первую очередь от таких факторов, как состояние, которое лечат, возраст, вес и состояние здоровья пациента, и, таким образом, могут варьироваться среди пациентов. Например, терапевтически эффективная доза вирусного вектора для человека обычно находится в диапазоне от около 25 до около 1000 микролитров до около 100 мл раствора, содержащего концентрации от около 1×10^9 до 1×10^{16} вирусного вектора с геномом (для лечения среднего субъекта с массой тела 70 кг), включая все целые или дробные количества в пределах диапазона, и предпочтительно от $1,0 \times 10^{12}$ GC до $1,0 \times 10^{14}$ GC для пациента-человека. В одном варианте реализации, композиции составлены таким образом, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 или 9×10^9 GC на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте реализации, композиции составлены таким образом, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} или 9×10^{10} GC на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте реализации, композиции составлены таким образом, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} или 9×10^{11} GC на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте реализации, композиции составлены таким образом, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} или 9×10^{12} GC на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте реализации, композиции составлены таким образом, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} или 9×10^{13} GC на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте реализации, композиции составлены таким образом, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} или 9×10^{14} GC на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте реализации, композиции составлены таким образом, чтобы содержать по меньшей мере 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} ,

4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} или 9×10^{15} GC на дозу, включая все целые или дробные количества в пределах диапазона. В одном варианте реализации для применения людям доза может находиться в диапазоне от 1×10^{10} до примерно 1×10^{12} GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона.

В некоторых вариантах реализации, доза находится в диапазоне от около 1×10^9 GC/г массы мозга до около 1×10^{12} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза находится в диапазоне от около 1×10^{10} GC/г массы мозга до около $3,33 \times 10^{11}$ GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза находится в диапазоне от около $3,33 \times 10^{11}$ GC/г массы мозга до около $1,1 \times 10^{12}$ GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза находится в диапазоне от около $1,1 \times 10^{12}$ GC/г массы мозга до около $3,33 \times 10^{13}$ GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет менее $3,33 \times 10^{11}$ GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет менее $1,1 \times 10^{12}$ GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет менее $3,33 \times 10^{13}$ GC/г массы мозга.

В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 1×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 2×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 2×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 3×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 4×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 5×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 6×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 7×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 8×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 9×10^{10} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 1×10^{11} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 2×10^{11} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 3×10^{11} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза составляет около 4×10^{11} GC/г массы мозга.

В некоторых вариантах реализации, дозу вводят людям в виде фиксированной дозы в диапазоне от около $1,44 \times 10^{13}$ до $4,33 \times 10^{14}$ GC rAAV. В некоторых вариантах реализации, дозу вводят людям в виде фиксированной дозы в диапазоне от около $1,44 \times 10^{13}$ до 2×10^{14} GC rAAV. В некоторых вариантах реализации, дозу вводят людям в виде фиксированной дозы в диапазоне от около 3×10^{13} до 1×10^{14} GC rAAV. В некоторых вариантах реализации, дозу вводят людям в виде фиксированной дозы в диапазоне от около 5×10^{13} до 1×10^{14} GC rAAV.

В некоторых вариантах реализации, композиции могут быть составлены в виде дозированных единиц, которые содержат количество AAV, которое находится в диапазоне от около 1×10^{13} до 8×10^{14} GC rAAV. В некоторых вариантах реализации, композиции могут быть составлены в виде дозированных единиц, которые содержат количество rAAV,

которое находится в диапазоне от около $1,44 \times 10^{13}$ до $4,33 \times 10^{14}$ GC rAAV. В некоторых вариантах реализации, композиции могут быть составлены в виде дозированных единиц, которые содержат количество rAAV, которое находится в диапазоне от около 3×10^{13} до 1×10^{14} GC rAAV. В некоторых вариантах реализации, композиции могут быть составлены в виде дозированных единиц, которые содержат количество rAAV, которое находится в диапазоне от около 5×10^{13} до 1×10^{14} GC rAAV.

В некоторых вариантах реализации, rAAV вводят субъекту в виде разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, желательно несколько доз (например, 2 дозы).

Дозировка будет регулироваться для уравнивания терапевтического эффекта с любыми побочными эффектами, и такие дозировки могут варьироваться в зависимости от терапевтического применения, для которого используется рекомбинантный вектор. Уровни экспрессии трансгена можно контролировать для определения частоты дозирования, приводящей к вирусным векторам, предпочтительно векторам AAV, содержащим миниген. Необязательно, схемы дозирования, подобные описанным для терапевтических целей, могут быть использованы для иммунизации с использованием композиций по данному изобретению.

В контексте данного документа термины «интратекальная доставка» или «интратекальное введение» относятся к способу введения лекарственных средств посредством инъекции в спинномозговой канал, более конкретно в субарахноидальное пространство, чтобы оно достигло спинномозговой жидкости (СМЖ). Интратекальная доставка может включать люмбальную пункцию, внутрижелудочковую (включая интрацеребровентрикулярную (ICV)), субокципитальную/внутрицистермальную и/или C1-2 пункцию. Например, материал может быть введен для распространения по субарахноидальному пространству с помощью люмбальной пункции. В другом примере инъекция может производиться в cisterna magna или посредством интрапаренхимальной доставки. В некоторых вариантах реализации, rAAV вводят с помощью субзатылочной инъекции под контролем компьютерной томографии (КТ) в cisterna magna (intra-cisterna magna). В некоторых вариантах реализации, пациенту вводят разовую дозу.

В контексте данного документа термины «внутрицистермальная доставка» или «внутрицистермальное введение» относятся к способу введения лекарственных средств непосредственно в спинномозговую жидкость cisterna magna cerebellomedularis, более конкретно, путем субокципитальной пункции или путем прямой инъекции в cisterna magna или через постоянно установленную трубку.

В некоторых вариантах реализации, стоковый rAAV.hPGRN готовят в интратекальном буфере готового состава (ITFFB; искусственная СМЖ с 0,001% Pluronic F-68). Серию или серии замораживают, затем размораживают, при необходимости объединяют, доводят до целевой концентрации, стерильно фильтруют через фильтр 0,22 мкм и заполняют флаконы. В некоторых вариантах реализации, суспензию, содержащая буфер для состава rAAV1.hPGRN, доводят до pH от 7,2 до 7,4.

В одном варианте реализации, объемы для доставки доз гAAV1.hPGRN, представленных в данном документе, и концентрации могут быть определены специалистом в данной области техники. Например, могут быть выбраны объемы от около 1 мкл до 150 мл, при этом более большие объемы будут выбраны для взрослых. Обычно для новорожденных подходящий объем составляет от около 0,5 мл до около 10 мл, для детей более старшего возраста могут быть выбраны от около 0,5 мл до около 15 мл. Для малышей может быть выбран объем от около 0,5 мл до около 20 мл. Для детей может быть выбран объем до около 30 мл. Для дошкольного и подросткового возраста может быть выбран объем до около 50 мл. В других вариантах реализации, пациент может получить интратекальное введение в объеме от около 5 мл до около 15 мл, или от около 7,5 мл до около 10 мл. Могут быть определены другие подходящие объемы и дозировки. Дозировка будет регулироваться для уравнивания терапевтического эффекта с любыми побочными эффектами, и такие дозировки могут варьироваться в зависимости от терапевтического применения, для которого используется рекомбинантный вектор.

В некоторых вариантах реализации, композиция содержит: гAAV.EF1a.huPGRN.SV40, гAAV.UbC.PI.huPGRN.SV40 или гAAVCB7.CI.hPGRN1.rGB. Композиции, в которых капсидом гAAV является AAVhu68, AAV5 или AAV1, проиллюстрированы в примерах ниже. В особенно предпочтительных вариантах реализации, гAAV представляет собой AAV1. В некоторых вариантах реализации, кодирующие последовательности huPGRN выбраны из тех, что определены в данном описании. См., например, SEQ ID NO: 3 или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%, или SEQ ID NO: 4 или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%, или SEQ ID NO: Иллюстративные последовательности векторных элементов, используемых в приведенных ниже примерах, представлены, например, в SEQ ID NO: 6 (глобин кролика полиА), ITR AAV (SEQ ID NO: 7 и 8), промотор IE CMV человека (SEQ ID NO: 9), промотор CB (SEQ ID NO: 10), химерный интрон (SEQ ID NO: 11), промотор UbC (SEQ ID NO: 12), промотор EF-1a (SEQ ID NO: 17), интрон (SEQ ID NO: 13) и поздний поли А SV40 (SEQ ID NO: 14).

Применения

В данном контексте гаплонедостаточность PGRN относится к пациентам с мутацией в гене PGRN, которая приводит к недостаточным уровням PGRN и/или недостаточным уровням GRN. Целевая популяция для терапии гAAV1-PGRN включает пациентов, которые имеют гаплонедостаточность PGRN, и/или пациентов, которые в противном случае имеют дефицит PGRN или недостаточные уровни GRN. В некоторых вариантах реализации, пациент является гетерозиготным по мутации PGRN. В еще одном варианте реализации, пациент является гомозиготным по мутации PGRN. В некоторых вариантах реализации, пациенту вводят курс лечения иммуносупрессии в сочетании с гAAV1-опосредованной терапией hPGRN, предусмотренной в данном документе.

В некоторых вариантах реализации, гAAV1.PGRN полезен при лечении пациентов с гаплонедостаточностью GRN. Таким пациентам может быть поставлен диагноз

нейродегенерации у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью GRN, или они могут иметь предсимптоматический характер. RAAV1.PGRN можно вводить в виде однократной дозы с помощью субзатылочной инъекции под контролем компьютерной томографии (КТ) в cisterna magna (intra-cisterna magna [ICM]). Разовую дозу вводят на заранее установленном уровне. Превосходная трансдукция мозга, достигаемая при однократной инъекции ICM в NHP, привела к выбору этого пути введения. В некоторых вариантах реализации, введение вектора в ICM также приводит к снижению Т-клеточных ответов против PGRN по сравнению с другим путем введения (например, инъекцией в боковой желудочек). Некогда обычная процедура, инъекция ICM (также известная как субзатылочная пункция) была заменена люмбальной пункцией. Однако другие уровни дозирования и пути доставки могут быть выбраны и/или использованы в сочетании с этой rAAV1-опосредованной терапией hPGRN.

В некоторых вариантах реализации rAAV1-опосредованная терапия, описанная в данном документе, может обеспечивать экспрессию PGRN примерно на среднем, нормальном физиологическом уровне для человека без мутации GRN (гаплонедостаточность). Однако лечение может обеспечить терапевтический эффект, даже если увеличение экспрессии PGRN ниже нормального уровня, обеспечивая от около 40% до 99% нормальных средних уровней, например, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или другие значения между этими диапазонами. В некоторых вариантах реализации, это может быть результатом повышенного уровня PGRN по меньшей мере от 5% до около 70% или более по сравнению с уровнями экспрессии пациента до лечения. В некоторых вариантах реализации, лечение обеспечивает терапевтическую эффективность, когда введение rAAV1-опосредованного hPGRN приводит к повышенным уровням PGRN в спинномозговой жидкости (например, в 10-40 раз выше нормальных уровней).

В некоторых вариантах реализации, эффективность оценивается по одному или более из следующих показателей: повышение уровня белка PGRN в спинномозговой жидкости и/или изменение толщины коры головного мозга. В определенном варианте реализации, эффективность rAAV1-опосредованной терапии оценивается после введения разовой дозы ICM, что измеряется одним или более из следующих параметров: длительная выживаемость и улучшение клинических симптомов и повседневного функционирования, как оценивается с помощью Краткой шкалы оценки психического статуса (MMSE), Общего клинического впечатления об изменениях (CGI-C), батарей тестов на лобную дисфункцию (FAB), Шкалой оценки лобно-височной деменции (ЛВД), Фронтальной поведенческой шкалой (FBI), Унифицированной шкалы оценки болезни Паркинсона (UPDRS), тестирование беглости речи, рейтинга клинической деменции для суммы боксов лобно-височной лобарная дегенерации (CDR-FTLD sb) и/или нейропсихиатрического опросника (NPI). В некоторых вариантах реализации, эффективность демонстрируется улучшением уровней в спинномозговой жидкости легкой цепи нейрофиламентов (NFL), тау-белка, фосфорилированного тау-белка и маркеров

воспаления, и/или повышенными уровнями PGRN в плазме. В некоторых вариантах реализации, эффективность оценивается путем измерения снижения или изменения уровней микроглиоза.

В некоторых вариантах реализации, эффективность измеряется улучшением одного или более клинических симптомов, связанных с пациентами с GRN, включая, например, поведенческие дефициты (расторженность, апатия, потеря симпатии или сочувствия, компульсивное или стереотипное поведение или гипероральность) и когнитивное расстройство (снижение исполнительной функции без значительного влияния на эпизодическую память или зрительно-пространственные навыки).

В некоторых вариантах реализации наблюдается улучшение некоторых других, более атипичных симптомов, включая психические особенности (бред, галлюцинации и навязчивое поведение) и/или другие когнитивные нарушения (эпизодическое ухудшение памяти, апраксию и зрительно-пространственную дисфункцию). Оценка может выполняться с использованием критериев ЛВДС, включая визуализацию головного мозга для выявления признаков лобной и/или височной дегенерации, оценку снижения по шкале клинических оценок (например, Рейтинг клинической деменции для лобно-височной лобарной дегенерации [CDR-FTLD], Инвентаризация лобного поведения [FBI], нейропсихиатрический опросник [NPI] и шкала оценки лобно-височной деменции [FRS]) и, в конечном итоге, генетическое тестирование для подтверждения патогенной мутации GRN. Могут использоваться биомаркеры спинномозговой жидкости (СМЖ), включая тау и амилоид- β , а также изображения позитронно-эмиссионной томографии амилоида (ПЭТ).

В некоторых вариантах реализации, улучшение наблюдается у носителей мутации GRN, имеющих первичную прогрессирующую афазия (PPA), которая характеризуется симптомами, связанными с речью и языком. Их можно диагностировать с помощью руководств, основанных на критериях Месулама, в которых различают три клинических варианта PPA: семантический вариант PPA (svPPA), неглубокий вариант PPA (nfvPPA) и логопенический вариант PPA (lvPPA) (Gorno-Tempini et al., (2011). ADDIN EN.CITE «Classification of primary progressive aphasia and its variants» Neurology. 76(11):1006-14). nfvPPA проявляется дефицитом способности воспроизводить речь, а основные особенности включают аграмматизм в производстве речи, трудную речь и апраксию речи. У svPPA наблюдается дефицит способности понимать значения слов, а основные функции включают нарушение именования слов и понимание отдельных слов. lvPPA характеризуется трудностями при поиске подходящих слов во время разговора и не сопровождается ухудшением понимания слов. Основными особенностями lvPPA являются недостаток поиска слов и способность повторять предложения. Носители мутации GRN чаще всего присутствуют с nfvPPA; однако у них могут быть более широкие симптомы, охватывающие клинический спектр PPA, что приводит к диагнозу «PPA-без дополнительных указаний» (Gorno-Tempini et al., 2011; Woollacott and Rohrer, 2016).

Предложен способ лечения пациента-человека с нейродегенеративным состоянием, связанным с гаплонедостаточностью GRN. В некоторых вариантах реализации, это

состояние представляет собой лобно-височную деменцию, связанную с програнулином (ЛВД). Указанный способ включает доставку кодирующей последовательности для програнулина в центральную нервную систему (ЦНС) через рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), имеющий капсид аденоассоциированного вируса 1 (AAV1), причем указанный rAAV дополнительно содержит геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина.

Предложен способ лечения пациента-человека с поражением головного мозга, связанным со связанной с програнулином лобной височной деменцией или другим нейродегенеративным состоянием, связанным с гаплонедостаточностью GRN. Указанный способ включает введение кодирующей последовательности для програнулина в центральную нервную систему (ЦНС) через рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), имеющий капсид аденоассоциированного вируса 1 (AAV1), причем указанный rAAV дополнительно содержит геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина.

В некоторых вариантах реализации, способы, представленные в данном документе, могут дополнительно включать мониторинг лечения посредством (а) неинвазивной оценки пациента на предмет уменьшения накопленных повреждений сетчатки в качестве предиктора уменьшения поражений головного мозга, (b) выполнения магнитно-резонансной томографии для оценки объема мозга и/или (с) измерения концентрации програнулина в СМЖ. При желании можно оценить концентрацию програнулина в плазме.

В некоторых вариантах реализации, эффективность композиции rAAV.hPGRN оценивается одним или более из следующих преимущественно когнитивных, в первую очередь поведенческих, или когнитивных/других методов. Ниже описаны подходящие методы оценки.

В первую очередь оценки когнитивных способностей включают тестирование беглости речи, клинический коэффициент деменции для FTLN или краткая оценка когнитивных функций (MMSE). Тестирование беглости речи, вероятно, будет проводиться путем показа одной и той же картинки/фотографии каждому субъекту и запроса словесного описания. Во время описания скорость речи (слов/минута) будет подсчитываться, записываться и в конечном итоге сравниваться с показателями нейротипичных взрослых. CDR-FTLN - это расширенная версия классической CDR, которая исторически используется для оценки тяжести расстройств спектра болезни Альцгеймера. Оценка включает исходные 6 областей CDR (память, ориентация, суждения и решение проблем, общественные дела, дом и хобби, уход за собой), а также две дополнительные области: речь и поведение, что позволяет более точно определять

снижение в FTLD. Оценка «0» указывает на нормальное поведение или речь, в то время как оценка «1», «2» или «3» указывает на слабый или серьезный дефицит. «Сумма прямоугольников» или сумма баллов по отдельным областям используется для определения общей тяжести деменции. MMSE представляет собой глобальную когнитивную оценку с 11 вопросами, широко используемую в клинической и исследовательской практике. Задаются такие вопросы, как «Какой сейчас год? Время года? Дата? День недели? Месяц?», и за каждый правильный ответ дается один балл с максимальными баллами за каждый вопрос. Максимальный общий балл - 30, с двумя отсечками - 24 и 27. Эти пороговые значения являются индикаторами снижения когнитивных способностей.

В первую очередь оценки двигательной функции включают, например, унифицированную шкалу оценки болезни Паркинсона (UPDRS). UPDRS представляет собой оценку из 42 пунктов, состоящую из 4 частей, по нескольким областям, связанным с паркинсонизмом, таким как ментальность, поведение и настроение, и повседневная жизнь. Каждый пункт включает шкалу оценок, обычно от 0 (обычно указывающую на отсутствие ухудшения) до 4 (обычно обозначающую наиболее серьезное ухудшение). Баллы для каждой части подсчитываются, чтобы указать на тяжесть заболевания, при этом высокий балл 199 указывает на наихудшую/наиболее полное нарушение функций.

В первую очередь поведенческие оценки включают, например, нейропсихиатрический опросник (NPI) или фронтальную поведенческую инвентаризацию (FBI). NPI используется для выяснения наличия психопатологии у пациентов с заболеваниями головного мозга. Первоначально он был разработан для использования в группах населения, страдающих болезнью Альцгеймера; однако может быть полезно оценить изменения в поведении в других условиях. Оценка состоит из 10 поведенческих областей и 2 нейровегетативных областей, в пределах которых есть 4 балла: частота, тяжесть, общее состояние и дистресс со стороны лица, осуществляющего уход. Общий балл NPI получается путем сложения баллов доменов поведенческих доменов за вычетом баллов дистресса лица, осуществляющего уход. FBI - это оценка из 24 пунктов, предназначенная для оценки изменений в поведении и личности, связанных конкретно с bvЛВД, и для дифференциации ЛВД и других деменций. Он проводится как личное собеседование с основным лицом, осуществляющим уход, поскольку пациенты с диагнозом bvЛВД, как правило, не имеют достаточного представления об этих типах изменений. Он фокусируется на нескольких аспектах поведения и личности, оценивая каждый вопрос от 0 (нет) до 3 (серьезный/большую часть времени). Общий балл дает представление о серьезности заболевания и может использоваться для оценки изменений с течением времени.

Прочие/когнитивные и моторные оценки включают, например, шкалу оценки выраженности суицидальных тенденций Колумбийского университета (C-SSRS), глобальное клиническое впечатление об изменении (CGI-C), батарею тестов на лобную дисфункцию (FAB) и/или шкалу оценки лобно-височной деменции (FDR). C-SSRS

представляет собой 3-частную шкалу, измеряющую суицидальные идеи, интенсивность идей и суицидальное поведение с помощью вопросов, оценивающих суицидальные мысли и поведение. Результат этой оценки состоит из рейтинга летальности суицидального поведения, взятого непосредственно из шкалы, балла суицидальных мыслей и рейтинга интенсивности суицидальных мыслей. Оценка идей выше 0 может указывать на необходимость вмешательства в соответствии с руководящими принципами оценки. Рейтинг интенсивности находится в диапазоне от 0 до 25, где 0 означает отсутствие суицидальных идей. CGI-C представляет собой одну из трех частей краткой, широко используемой оценки, состоящей из 3 пунктов, которые оцениваются врачом-наблюдателем. CGI-C оценивается по 7 балльной шкале в диапазоне от 1 (очень сильно улучшилось) до 7 (очень сильно ухудшилось), начиная с включения в исследование, независимо от того, является ли какое-либо улучшение полностью результатом лечения. FAB представляет собой оценку, помогающую дифференцировать деменции с фронтальным дисэксективным фенотипом и типом Альцгеймера. Это особенно полезно для пациентов со слабоумием (MMSE > 24). Оценка состоит из 6 частей, касающихся когнитивных, моторных и поведенческих областей, с общим количеством баллов 18 и выше, указывающих на более высокие результаты. FDR представляет собой краткую стадию оценки пациентов с лобно-височной деменцией, которая выявляет различия в прогрессировании заболевания для подтипов ЛВД с течением времени. Это краткое интервью проводится с основным лицом, осуществляющим уход, и состоит из 30 вопросов, которые классифицируются как «Никогда», «Иногда» или «Всегда». Затем рассчитывается процентная оценка и она преобразуется в логит-оценку и, в конечном итоге, в оценку тяжести. Степень тяжести будет варьироваться от очень легкой до тяжелой.

Другие меры эффективности включают увеличение срока выживания с момента постановки диагноза после появления симптомов, что является мерой эффективности. В настоящее время ожидаемая продолжительность жизни пациентов с диагнозом нейродегенерация, вызванная мутациями GRN, составляет 7-11 лет с момента появления симптомов. Другим показателем эффективности является стабилизация и/или увеличение атрофии в толщине средней лобной коры и теменных областей, которые являются наиболее часто поражаемыми областями мозга во всех клинических проявлениях в целевой популяции. Это можно оценить с помощью MPT или других методов визуализации. Еще одна оценка включает биохимические биомаркеры. Уровни белка PGRN в СМЖ и плазме измеряются как показания трансдукции AAV, и ожидается, что они увеличатся у пациентов после введения rAAV1.hPGRN. В других вариантах реализации оценивают уровни легкой цепи нейрофиламента (NFL), тау-белка, фосфорилированного тау-белка и других воспалительных маркеров в СМЖ. В некоторых вариантах реализации модуляция и/или снижение уровней этих биомаркеров коррелирует с эффективностью.

Хотя в приведенных ниже примерах основное внимание уделяется лечению определенных состояний, связанных с гетерозиготной гаплонедостаточностью GRN, в определенных вариантах реализации векторы и композиции, описанные в данном документе, могут использоваться для лечения других заболеваний, например, заболеваний, связанных с гомозиготной мутацией гена GRN, таких как нейрональный цероид липофусциноз, рак (например, рак яичников, груди, надпочечников и/или поджелудочной железы), атеросклероз, диабет 2 типа и метаболические заболевания.

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

Термин «существенная гомология» или «существенное сходство» по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере около 95-99% выровненных последовательностей. Предпочтительно гомология охватывает полноразмерную последовательность или ее открытую рамку считывания, или другой подходящий фрагмент, который имеет длину по меньшей мере 15 нуклеотидов. В данном документе описаны примеры подходящих фрагментов.

Термины «идентичность последовательностей», «процент идентичности последовательностей» или «процент идентичности» в контексте последовательностей нуклеиновых кислот относятся к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия. Длина сравнения идентичности последовательностей может быть по всей длине генома, желательна полной длиной кодирующей последовательности гена или фрагмента, по меньшей мере от около 500 до около 5000 нуклеотидов. Однако также может быть желательна идентичность более мелких фрагментов, например, по меньшей мере, около из девяти нуклеотидов, обычно, по меньшей мере, от около 20 до около 24 нуклеотидов, по меньшей мере, от около 28 до около 32 нуклеотидов, по меньшей мере, около 36 или более нуклеотидов. Точно так же «процент идентичности последовательностей» можно легко определить для аминокислотных последовательностей по всей длине белка или его фрагмента. Соответственно, фрагмент имеет длину по меньшей мере около 8 аминокислот и может содержать до около 700 аминокислот. В данном документе описаны примеры подходящих фрагментов.

Термин «существенная гомология» или «существенное сходство», когда он относится к аминокислотам или их фрагментам, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими вставками или делециями аминокислоты с другой аминокислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере около 95-99% выровненных последовательностей. Предпочтительно, чтобы гомология была по всей длине

последовательности или ее белка, например, сар белка, гер белка или его фрагмента, который имеет длину по меньшей мере 8 аминокислот или, более желательно, по меньшей мере 15 аминокислот. В данном документе описаны примеры подходящих фрагментов.

Под термином «высококонсервативный» подразумевается идентичность по меньшей мере 80%, предпочтительно идентичность по меньшей мере 90% и более предпочтительно идентичность более 97%. Идентичность легко определяется специалистом в данной области техники с помощью алгоритмов и компьютерных программ, известных специалистам в данной области техники.

Обычно, когда речь идет об «идентичности», «гомологии» или «схождении» между двумя разными аденоассоциированными вирусами, «идентичность», «гомология» или «сходство» определяют в отношении «выровненных» последовательностей. «Выровненные» последовательности или «выравнивания» относятся к множественным последовательностям нуклеиновых кислот или последовательностям белков (аминокислот), часто содержащим поправки на отсутствующие или дополнительные основания, или аминокислоты по сравнению с эталонной последовательностью. В примерах выравнивание AAV выполняется с использованием опубликованных последовательностей AAV9 в качестве контроля. Выравнивание выполняется с использованием любой из множества общедоступных или коммерчески доступных Программ множественного выравнивания последовательностей. Примеры таких программ включают «Clustal Omega», «Clustal W», «CAP Sequence Assembly», «MAP» и «MEME», которые доступны через веб-серверы в Интернете. Другие источники таких программ известны специалистам в данной области техники. В качестве альтернативы также используются утилиты Vector NTI. Также существует ряд алгоритмов, известных в данной области техники, которые можно использовать для измерения идентичности нуклеотидных последовательностей, включая алгоритмы, содержащиеся в программах, описанных выше. В качестве другого примера полинуклеотидные последовательности можно сравнить с помощью Fasta™, программы в GCG версии 6.1. Fasta™ обеспечивает выравнивание и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между запросной и поисковой последовательностями. Например, процент идентичности последовательностей между последовательностями нуклеиновых кислот может быть определен с помощью Fasta™ с параметрами по умолчанию (размер слова 6 и фактор NOPAM для скоринговой матрицы), как предусмотрено в GCG версии 6.1, включенной в данный документ посредством ссылки. Для аминокислотных последовательностей также доступны программы множественного выравнивания, например, программы «Clustal Omega», «Clustal X», «MAP», «PIMA», «MSA», «BLOCKMAKER», «MEME» и «Match-Box». Обычно любая из этих программ используется с настройками по умолчанию, хотя специалист в данной области техники может изменить эти настройки по мере необходимости. В качестве альтернативы, специалист в данной области техники может использовать другой алгоритм или компьютерную программу, которая обеспечивает, по меньшей мере, уровень

идентичности или выравнивания, который обеспечивается упомянутыми алгоритмами и программами. См., например, J. D. Thomson et al., Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

Следует отметить, что употребление термина в единичном числе относится к один или более. Таким образом, употребление термина в единичном числе, «один или более» и «по меньшей мере один» используются в данном документе взаимозаменяемо.

Слова «содержит», «включает» и «содержащий» следует интерпретировать включительно, а не исключительно. Слова «состоит», «состоящий» и их варианты следует толковать исключительно, а не включительно. Хотя различные варианты реализации в описании представлены с использованием «состоящий из», в других обстоятельствах родственный вариант реализации также предназначен для интерпретации и описания с использованием «состоящий из» или «состоящий по существу из».

Используемый в данном документе термин «около» означает изменчивость в 10% ($\pm 10\%$, например, ± 1 , ± 2 , ± 3 , ± 4 , ± 5 , ± 6 , ± 7 , ± 8 , ± 9 , ± 10 или значения между ними) из приведенной ссылки, если не указано иное.

В данном контексте «заболевание», «расстройство» и «состояние» используются взаимозаменяемо для обозначения ненормального состояния у субъекта.

Если в данном описании не указано иное, технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, и со ссылкой на опубликованные тексты, которые предоставляют специалисту в данной области техники общее руководство по многим из терминов, используемых в данной заявке.

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

В данном контексте «экспрессионная кассета» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит кодирующую последовательность, промотор и может включать другие регуляторные последовательности для нее, причем эта кассета может быть доставлена через генетический элемент (например, плазмиду) к упаковывающей клетке-хозяину и упакована в капсид вирусного вектора (например, вирусной частицы). Обычно такая кассета экспрессии для создания вирусного вектора содержит кодирующую последовательность для продукта гена, описанного в данном документе, фланкированного сигналами упаковки вирусного генома и другими последовательностями контроля экспрессии, такими как описанные в данном документе.

Используемый в данном документе термин «функционально связанный» относится как к последовательностям контроля экспрессии, которые примыкают к представляющему интерес гену, так и к последовательностям контроля экспрессии, которые действуют транс- или на расстоянии, чтобы контролировать интересующий ген.

Термин «гетерологичный», когда он используется по отношению к белку или нуклеиновой кислоте, указывает, что белок или нуклеиновая кислота содержит две или более последовательностей, или подпоследовательностей, которые не находятся в одинаковых отношениях друг с другом в природе. Например, нуклеиновую кислоту обычно получают рекомбинантно, имея две или более последовательностей из неродственных генов, организованных для образования новых функциональных нуклеиновых кислот. Например, в одном варианте реализации нуклеиновая кислота имеет промотор из одного гена, предназначенный для управления экспрессией кодирующей последовательности из другого гена. Таким образом, со ссылкой на кодирующую последовательность промотор гетерологичен.

Термин «трансляция» в контексте данного изобретения относится к процессу на рибосоме, где цепь мРНК контролирует сборку аминокислотной последовательности с образованием белка или пептида.

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

ПРИМЕРЫ

Сокращения	Описание
A	Абсорбция
aa	Аминокислоты
AAV	Аденоассоциированный вирус
AAV1	Аденоассоциированный вирус серотипа 1
AAV2	Аденоассоциированный вирус серотипа 2
AAV5	Аденоассоциированный вирус серотипа 5
AAVhu68	Аденоассоциированный вирус серотипа hu68
ACMG	Американский колледж медицинской генетики
AD	Болезнь Альцгеймера
AD & FDM	База данных по болезни Альцгеймера и лобно-височной деменции
Ad5	Аденовирус серотипа 5
AE	Неблагоприятные события
AEX	Анионный обмен
AmpR	Устойчивость к ампициллину (ген)
ANOVA	Дисперсионный анализ
ARTFL	Прогрессивные исследования и лечение дегенерации лобно-височной доли
AUC	Аналитическое ультрацентрифугирование
BA	β-актин
BCA	Бицихониновая кислота
BDS	Нерасфасованная лекарственная субстанция
BMCB	Главный банк бактериальных клеток
п.о.	Пар оснований
BRF	Досье на серию
BSA	Бычий сывороточный альбумин
BSE	Синдром коровьего бешенства
BSC	Ламинарный бокс биологической защиты
bvLBD	Вариант поведения, лобно-височная деменция
BWCB	Рабочий банк бактериальных клеток
C9orf72	Открытая рамка считывания 72 хромосомы 9 (ген, человек)
cap	Капсид (ген)
CB7	Промотор β-актина курицы и энхансер ДТРВ

CBC	Полный анализ крови
CBER	Центр оценки и биологических исследований
CBS	Кортикобазальный синдром
CDR-FTLD sb	Шкала оценки клинической деменции (CDR) для лобно-височной долевой дегенерации Сумма пунктов
CFR	Свод федеральных правил
CFU	Колониеобразующие единицы
CGI-C	Клиническое глобальное впечатление от изменений
CI	Химерный интрон
CMC	Химическое производство и контроли
CMO	Организация контрактного производства
ЦМВ IE	Среднеранний энхансер цитомегаловируса
CNS	Центральная нервная система
COA	Сертификат анализа
CPE	Цитопатические эффекты
CRL	Лаборатории Чарльза Ривера
CRO	Контрактная исследовательская организация
CMЖ	Спинномозговая жидкость
C-SSRS	Шкала оценки выраженности суицидальных тенденций
CT	Компьютерная томография
CTL	Цитотоксический Т-лимфоцит
CTSD	Катепсин D
ккПЦР	Капельная цифровая полимеразная цепная реакция
DLS	Динамическое рассеяние света
DMEM	Среда Игла, модифицированная Дульбекко
DMF	Регистрационное досье на зарегистрированный лекарственный
DNA	Дезоксирибонуклеиновая кислота
DO	Растворенный кислород
DP	Лекарственный продукт
DRG	Ганглии спинного корня
DS	Лекарственное средство
E1A	Ранняя область 1A (ген)
ЭКГ	ЭКГ
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ИФА	Иммуноферментный анализ
ELISpot	Иммуноспотный анализ со связанным ферментом
EU	Единицы эндотоксина
F	Женский
F/U	Последующее врачебное наблюдение
FAB	Батарея тестов на лобную дисфункцию
FBI	Фронтальная поведенческая инвентаризация
FBS	Фетальная бычья сыворотка
FDA	Управление по контролю за продуктами и лекарственными средствами
FDP	Заполненный лекарственный продукт
FFB	Буфер для окончательной композиции
FIN	Исследование первого применения препарата у человека
FRS	Шкала оценки лобно-височной деменции
ЛВД	Лобно-височная деменция
FTLD	Лобно-височная долевая дегенерация
ЛВДС	Международный консорциум критериев поведенческих вариантов
GC	Копии генома
GENFI	Инициатива по генетической лобно-височной деменции

GLP	Надлежащая лабораторная практика
GMP	Надлежащая производственная практика
GRN	Предшественник гранулина (ген, человек)
Grn	Предшественник гранулина (ген, мышь)
GTP	Программа генной терапии
HCDNA	Дезоксирибонуклеиновая кислота клетки-хозяина
HCP	Белок клетки-хозяина
HEK293	Клеточная линия эмбриональной почки человека 293
HEX	Гексозаминидаза (белок)
hPGRN	Програнулин человека
hPGRN v2	Програнулин человек версия 2
ICH	Международная конференция по гармонизации
ICM	Intra-Cisterna Magna
ICP	Внутричерепное давление
ICV	Внутричерепно-вентрикулярный
IDS	Идуронат-2-сульфатаза
IDUA	Идуронидаза
IFN- γ	Интерферон гамма
IND	Новое исследуемое лекарственное средство
IT	Инtrateкально
ITFFB	Инtrateкальный буфер для окончательной композиции
ITR	Инвертированный концевой повтор
IU	Инфекционное отделение
в/в	Внутривенно
KanR	Устойчивость к канамицину (ген)
т.о.	Тысяч оснований
KO	Нокаут
LAL	Лизат амебоцитов мечехвоста
LBD	Деменция с тельцами Леви
LEFJLBDs	Продольная оценка пациентов с семейной лобно-височной деменцией
LFTs	Функциональные тесты печени
LLOQ	Нижний предел количественной оценки
LOD	Предел обнаружения
LP	Поясничная пункция
LTFU	Долгосрочное наблюдение
lvPPA	Логопенический вариант первичной прогрессирующей афазии
M	Мужчина
MAPT	Связанный с микротрубочками белок тау (ген, человек)
MBR	Сводный протокол сопровождения партии препарата
MCB	Главный банк клеток
MED	Минимальная эффективная доза
MMSE	Краткая оценка психического состояния
MRI	Магнитно-резонансная томография
mRNA	Рибонуклеиновая кислота мессенджер
MS	Масс-спектрометрия
MTD	Максимальная переносимая доза
N	Количество субъектов или животных
N/A	Не применимо
NAbs	Нейтрализующие антитела
NCL	Нейрональный цероидный липофосциноз
nvPPA	Неконтролируемый вариант первичной прогрессирующей афазии
NFL	Легкая цепь нейрофиламента
NGS	Секвенирование следующего поколения
NHP	Нечеловеческий примат
NHS	Исследование естественного развития болезни
NPI	Реестр нейропсихиатрии

NSAID	Нестероидный противовоспалительный препарат
OL	Открытое
ФСБ	Фосфатно-солевой буферный раствор
PD	Болезнь Паркинсона
PEI	Полиэтиленимин
PES	Полиэфирсульфон
PET	Позитронно-эмиссионная томография
PGRN	Програнулин (белок)
PI	Главный исследователь
POC	Доказательство концепции
PolyA	Полиаденилирование
PPA	Первичная прогрессирующая афазия
PSP	Прогрессирующий надъядерный паралич
QA	Проведение контроля качества
QC	Контроль качества
qPCR	Количественная полимеразная цепная реакция
rAAV	Рекомбинантный аденоассоциированный вирус
ROA	Путь введения
rcAAV	Аденоассоциированный вирус, способный к репликации
rBG	β-глобин кролика
rДНК	Рибосомальная дезоксирибонуклеиновая кислота
rep	Репликаза (ген)
РНК	Рибонуклеиновая кислота
SA	Простое
SAE	Серьезные побочные эффекты
SDS	Додecilсульфат натрия
SDS-PAGE	Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
SOP	Стандартная операционная процедура
SRT	Триггер проверки безопасности
ssDNA	Одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
svPPA	Семантический вариант первичной прогрессирующей афазии
TBD	Будет определен
TCID ₅₀	50% инфекционная доза тканевой культуры
TDP-43	ДНК-связывающий белок TAR 43 (белок)
TE	Трис-ЭДТК
TFF	Фильтрация в тангенциальном потоке
UbC	Убиквитин С
UCMЖ	Калифорнийский университет в Сан-Франциско
UPenn	Пенсильванский университет
UPenn-GTP	Программа генной терапии Пенсильванского университета
UPDRS	Единая шкала оценки болезни Паркинсона
UPLC	Сверхэффективная жидкостная хроматография
США	Соединенные Штаты
USP	Фармакопея США
WCB	Рабочий банк клеток
ДТ	Дикого типа

Пример 1: Материалы и способы

Векторы

Сконструированную кДНК PGRN человека клонировали в экспрессионную конструкцию, содержащую промотор бета-актина курицы с ранним энхансером цитомегаловируса, химерный интрон и последовательность полиаденилирования бета-глобина кролика (Фиг.1). Вторую сконструированную кДНК PGRN человека клонировали

в экспрессионную конструкцию, содержащую промотор убиквитина С человека. Конструкции экспрессии фланкированы инвертированными концевыми повторами AAV2. Аденоассоциированные вирусы серотипов 1, 5 и человека 68 (AAVhu68) были получены из этой конструкции путем тройной трансфекции HEK293 44 клеток и очистки йодиксанолом, как описано ранее (Lock M, et al. Hum Gene Ther. 2010;21(10): 1259-71).

Процедуры на животных

Все протоколы для работы с животными были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Пенсильванского университета. Пары мышей с нокаутом GRN были приобретены у лаборатории Джексона (кат. № 013175), и колония содержалась в Университете Пенсильвании. C57BL/6 дикого типа (кат. № 000664) служили контролем. В первом исследовании мышей в возрасте 2 месяцев анестезировали изофлураном и вводили в боковой желудочек головного мозга (ICV) 1×10^{11} копий геномов вектора (GC) в объеме 5 мкл. Через 60 дней после инъекции мышей умерщвляли обескровливанием под анестезией кетамин/ксилазином, и смерть подтверждали смещением шейных позвонков. Во втором исследовании мышей лечили в возрасте 7 месяцев и умерщвляли в возрасте 11 месяцев. Во время аутопсии сыворотку собирали сердечной пункцией, а СМЖ собирали субокципитальной пункцией с помощью иглы 32 размера, подсоединенной к полиэтиленовой трубке. Образцы сыворотки и СМЖ немедленно замораживали на сухом льду и хранили при -80 градусах до анализа. Фронтальную кору собирали для биохимии и немедленно замораживали на сухом льду, а остальную часть мозга фиксировали в 10% формалине для гистологии.

3-4-летних макак-резус приобретали у компании Covance. Для введения вектора животным вводили внутримышечно дексмететомидин и кетамин и затем вводили однократную инъекцию intra-cisterna magna (ICM) 3×10^{13} GC вектора AAV в 1 мл искусственной СМЖ. Размещение иглы было проверено с помощью миелографии с использованием флюороскопа (OEC9800 C-Arm, GE), как описано ранее (Katz N, et al. Hum Gene Ther Methods. 2018 Oct;29(5):212-219). Животных умерщвляли передозировкой барбитуратами. Собранные ткани немедленно замораживали на сухом льду или фиксировали в 10% формалине для гистологии.

Гистология и визуализация

Мозг мышей фиксировали в 10% формалине, криоконсервировали в сахарозе, заливали в компаунд с оптимальной температурой резки (OCT) и делали срезы в криостате. Были сделаны изображения с малым увеличением аутофлуоресцентного материала (липофусцин) интересующих областей. Отложения липофусцина количественно оценивали слепым методом с использованием программного обеспечения Image J. Ткани нечеловеческих приматов фиксировали в 10% формалине, заливали парафином и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E). Слайды были просмотрены сертифицированным ветеринарным патологом (ELB). Для животных, обработанных векторами GFP, срезы мозга окрашивали антителами к olig2, GFAP или NeuN. Все срезы были совместно окрашены DAPI и антителом к GFP, а затем флуоресцентными

вторичными антителами. Слайды сканировали на сканере слайдов Leica Aperio Versa 200 и загружали из eSlide Manager для анализа с помощью программного обеспечения для обработки изображений HALO (Indica Labs). От каждого животного отбирали пробы из пяти областей правого полушария и количественно определяли клетки с маркером каждого типа клеток. Клетки были обнаружены путем изменения следующих настроек: «минимальная ядерная интенсивность», «размер ядра», «агрессивность ядерной сегментации» и «минимальная ядерная округлость» на вкладке обнаружения ядер. Затем для каждого отдельного красителя были определены критерии для дальнейшей идентификации клеток и получения общего количества клеток для каждого маркера. Настройки были определены эмпирически на основе чувствительности и надежности обнаружения желаемого типа клеток; в некоторых случаях такие параметры, как обнаружение NeuN в цитоплазме, не отражали истинную внутриклеточную локализацию маркера, но обеспечивали большую специфичность и чувствительность обнаружения. Все клетки, обнаруженные автоматическими средствами, были проверены вручную. Для нейронов на вкладке «краситель 1» «порог положительной реакции ядра» и «порог положительной реакции цитоплазмы» были скорректированы для обнаружения только клеток с NeuN, присутствующим как в ядре, так и в цитоплазме. Для астроцитов были выбраны маркеры DAPI и GFAP, и оба они должны были присутствовать в ядре и цитоплазме клетки, чтобы их можно было включить в подсчет. Для олигодендроцитов подсчитывали клетку, если DAPI и olig2 присутствовали в ядре, но не в цитоплазме клетки. Для совместной локализации использовали те же настройки, однако GFP был включен в качестве дополнительного красителя в ядро для нейронов, а также в ядро и цитоплазму для астроцитов. Клетки, которые не экспрессировали все выбранные маркеры, были исключены из созданной таблицы результатов путем «маскирования» их с использованием функции «маскирование» ядра или цитоплазмы. Из-за нехватки GFP положительных клеток, совместно локализованных с olig2, трансдуцированные олигодендроциты подсчитывали вручную. В некоторых случаях кровеносные сосуды или части сосудистого сплетения проявляли автофлуоресценцию и были вручную очерчены и исключены с помощью инструмента «ножницы». Полученные значения были выражены в процентах GFP-положительных клеток для каждого маркера типа клеток.

Подготовка образцов для анализа на гексозаминидазу (Hex)

Сыворотку использовали непосредственно в анализе активности Hex, тогда как образцы мозга гомогенизировали в буфере для лизиса (0,2% Тритон-X100, 0,9% NaCl, pH 4,0) с последующими тремя циклами замораживания-оттаивания и освещением центрифугированием. Концентрации белка определяли методом Брэдфорда. Измерения активности Hex выполняли, как описано ранее (Hinderer C, et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2014;22(12):2018-27).

ИФА

Уровень PGRN человека измеряли с использованием набора DuoSet ELISA (R&D # DY2420) с небольшими модификациями. Вкратце, планшеты для ИФА из полистирола с

высоким связыванием покрывали в течение ночи при 4°C 5 мкг/мл захватывающего антитела человека к PGRN, разведенного в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). После промывания планшеты блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в ФСБ в течение 2 часов с последующей инкубацией образцов в течение одного часа. СМЖ человека и нечеловеческих приматов разводили 1: 5, тогда как образцы СМЖ мышей разводили 1:40 в ФСБ. Образцы головного мозга разбавляли до концентрации общего белка 2 мг/мл в буфере для лизиса. Связанное антитело выявляли с помощью биотинилированного мышинового антитела к програнулину человека и стрептавидина-HRP. Планшеты проявляли с использованием тетраметилбензидинового субстрата в течение 20 минут, затем реакцию останавливали 2 н. серной кислотой перед измерением оптической плотности при 450 нм.

Анализ нейтрализующих антител

Уровень нейтрализующих антител к AAVhu68 оценивали, как описано ранее (Calcedo R, et al. J Infect Dis. 2009;199(3):381-90).

Статистика

Сравнения ферментативной активности Нех, количества липофусцина и площади CD68+ у мышей дикого типа, мышей с нокаутом GRN и обработанных AAV GRN проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим апостериорным тестом множественных сравнений Тьюки.

Пример 2: AAV-опосредованная доставка трансгена GRN человека на модели мышинового заболевания

Рекомбинантные векторы AAV, содержащие капсиды AAVhu68, экспрессирующие PGRN человека (SEQ ID NO: 3) под контролем промотора CB7 и химерного интрона (CB7.CI.hPGRN.rBG), были получены с использованием опубликованных технологий тройной трансфекции, как описано, например, WO 2018/160582.

Мы оценили AAV-опосредованную доставку трансгена GRN человека на мышинной модели с нокаутом GRN. Мыши, гетерозиготные по мутациям GRN ($GRN^{+/-}$), не проявляют патологических признаков нейродегенеративного заболевания, связанного с GRN, вероятно, потому, что продолжительность жизни мышей не позволяет развиваться последствиям гаплонедостаточности GRN, которые впервые проявляются через несколько десятилетий у людей. Напротив, полный дефицит PGRN у мышей $GRN^{-/-}$ повторяет несколько ранних признаков гаплонедостаточности GRN у людей, таких как нарушение лизосомной функции, накопление аутофлуоресцентного лизосомального запасного материала (липофусцина) и активация микроглии, хотя мыши $GRN^{-/-}$ не проявляют потери нейронов даже в возрасте до двух лет (Lui H, et al. Cell. 2016; 165(4): 921-35; Ward ME, et al. Sci Transl Med. 2017 Apr 12;9(385):pii: eaah5642). Сообщалось, что у мышей $GRN^{+/-}$ и $GRN^{-/-}$ наблюдаются отклонения в поведении, но результаты были противоречивыми между группами (Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010; 177(1):311-24; Wils H, et al. The Journal of Pathology. 2012;228(1):67-76; Ghoshal N, et al. Neurobiology of Disease. 2012;45(1):395-408; Filiano AJ, et al. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for

Neuroscience. 2013;33(12):5352-61; Yin F, et al. The FASEB Journal. 2010;24(12):4639-47). Аналогичным образом, некоторые отчеты указывают на снижение выживаемости мышей $GRN^{-/-}$, тогда как другие обнаружили, что мыши $GRN^{-/-}$ имеют нормальную продолжительность жизни, что согласуется с нашим опытом (Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010; 177(1):311 -24; Wils H, et al. The Journal of Pathology. 2012;228(1):67-76). Хотя $GRN^{-/-}$ мыши не проявляют явных нейродегенеративных или неврологических признаков, замечательное биохимическое и гистологическое сходство с гаплонедостаточностью GRN у людей делает их потенциально информативной моделью для оценки новых методов лечения. Поэтому мы сосредоточили наш анализ на этих биохимических и гистологических находках у $GRN^{-/-}$ мышей.

Целью этого исследования было оценить, может ли доставка гена GRN человека в мозг устранить существующий лизосомный запасной материал и нормализовать функцию лизосом у мышей $GRN^{-/-}$. В ответ на лизосомное накопление клетки активируют экспрессию лизосомных ферментов, которые могут использоваться в качестве биомаркеров лизосомных накопительных болезней (Hinderer C, et al. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2014;22(12):2018-27; Gurda BL, et al. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2016;24(2):206-16; Karageorgos LE, et al. Experimental Cell Research. 1997;234(1):85-97). Мы оценили активность лизосомального фермента гексозаминидазы в ткани мозга мышей $GRN^{-/-}$ и $GRN^{+/+}$ разного возраста, а также отложения липофусцина в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе (Фиг. 3А-3D). Повышенная активность гексозаминидазы наблюдалась на протяжении всей жизни, тогда как липофусцин демонстрировал прогрессивное накопление. Липофусцин наблюдался уже в возрасте 2 месяцев, что согласуется с предыдущими данными (Klein ZA, et al. Neuron. 2017;95(2):281-96 e6). Наши первоначальные исследования были выполнены с вектором AAV на основе природного изолята AAVhu68, который тесно связан с кладом F изолята AAV9. Мы лечили $GRN^{-/-}$ мышей в возрасте 2-3 месяцев интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекцией либо вектора AAVhu68, экспрессирующего GRN человека, либо носителя (ФСБ) (N=10 на группу). Кроме того, группе мышей дикого типа вводили носитель (N=10). ICV ROA (включающий инъекцию вектора AAV непосредственно в СМЖ желудочков головного мозга) использовался, потому что небольшой размер 2-месячной мыши затрудняет надежное введение вектора через ICM-путь, который представляет собой ROA, который используется для исследования NHP и предлагаемого клинического исследования FHN. Предыдущие исследования продемонстрировали, что ICV введение AAVhu68 в дозе, выбранной для этого исследования (10^{11} GC), приводит к трансдукции, ограниченной областями мозга рядом с введенным желудочком, что делает эту систему полезной для оценки того, можно ли добиться глобального улучшения поражений головного мозга за счет секреции PGRN небольшой популяцией клеток.

Через два месяца после введения вектора животных умерщвляли и собирали головной мозг, СМЖ и сыворотку. Количественная оценка уровней белка PGRN человека

в головном мозге подтвердила трансдукцию в группе, обработанной AAV (Фиг. 4A-4F). PGRN представляет собой секретируемый белок, который можно измерить в СМЖ, и его уровень уменьшается в СМЖ носителей мутации GRN человека (Lui H, et al. *Cell*. 2016; 165(4):921-35; Meeter LH, et al. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2016;6(2):330-40). Поэтому мы оценили уровни белка PGRN в СМЖ мышей GRN^{-/-}, обработанных AAV, которые показали, что средняя концентрация в СМЖ составила 14 нг/мл, в то время как в группах, получавших носитель, уровень PGRN был ниже уровней обнаружения (Фиг. 4A-4F). Экспрессия PGRN сопровождалась нормализацией экспрессии лизосомального фермента, при этом уровни активности Нех возвращались к почти нормальным уровням в мозге мышей GRN^{-/-}, обработанных AAV (Фиг. 4A-4F).

После подтверждения экспрессии PGRN в головном мозге мышей GRN^{-/-} мы оценили, снижает ли экспрессия PGRN количество отложений липофусцина в гиппокампе, таламусе и коре головного мозга. С этой целью неокрашенные фиксированные срезы головного мозга помещали на покровное стекло, а аутофлуоресцентный липофусцин визуализировали и количественно оценивали слепым способом. У мышей GRN^{-/-}, получавших AAV, было обнаружено пониженное содержание липофусцина во всех областях мозга по сравнению с мышами GRN^{-/-}, получавшими носитель, и аналогичные уровни таковым у контрольных животных дикого типа соответствующего возраста (Фиг. 4A-4F).

Первоначальное доказательство концепции исследования продемонстрировало терапевтическую активность AAV опосредованной экспрессии PGRN у мышей, получавших лечение в раннем возрасте, когда в мозге только начинал появляться материал накопления. Впоследствии мы оценили влияние переноса генов у мышей старшего возраста с более серьезной ранее существовавшей патологией. В этом исследовании 7-месячные мыши GRN^{-/-} получили однократную ICV-инъекцию вектора AAVhu68, экспрессирующего PGRN человека или носитель, и были умерщвлены в возрасте 11 месяцев. Помимо обширных отложений липофусцина в головном мозге (Фиг. 5A-5D) у 11-месячных мышей GRN^{-/-} обнаружен обширный микроглиоз, подобный пациентам с ЛБД, вызванным мутациями GRN (Фиг. 6A-6C) (Ahmed Z, et al. *Journal of neuroinflammation*. J Neuroinflammation. 2007 Feb 11 ;4:7). Перенос гена GRN снижает активность Нех в головном мозге и отложения липофусцина у старых мышей, аналогично результатам у более молодых животных (Фиг. 5A-5D). Кроме того, размер и количество микроглии были нормализованы в головном мозге обработанных мышей (Фиг. 6A-6C).

В совокупности, ICV доставка вектора AAV, экспрессирующего PGRN человека, в мозг GRN^{-/-} мышей очистила агрегаты липофусцина и почти полностью нормализовала лизосомальную ферментативную активность, демонстрируя, что доставка гена PGRN может эффективно корректировать ключевые аспекты патофизиологии связанных с GRN нейродегенеративных болезней.

Пример 3: AAV-опосредованный перенос гена GRN у нечеловеческих приматов

Результаты на мышах $GRN^{-/-}$ демонстрируют, что доставка вектора AAV в СМЖ может обеспечить достаточную трансдукцию мозга для получения терапевтических уровней PGRN и предотвратить или обратить вспять биохимические и гистологические данные, связанные с дефицитом PGRN. Чтобы перенести этот подход на людей, были проведены исследования на нечеловеческих приматах с использованием доставки ICM, клинически значимого пути введения вектора. Интратекальная доставка AAV путем инъекции в cisterna magna представляет собой минимально инвазивный подход, который приводит к более обширной трансдукции в мозг, чем введение с помощью люмбальной пункции (Hinderer C, et al. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2014; 1:14051). Были использованы NHP в возрасте 3-10 лет, потому что этот возраст является репрезентативным для предполагаемой взрослой популяции пациентов. Макакам-резус (N=2 на группу) вводили одну инъекцию ICM под контролем изображения вектора AAV1, AAV5 или AAVhu68, экспрессирующего GRN человека из трансгена, названного hPGRN (SEQ ID NO: 3), под контролем промотора куриного BA и энхансера ЦМВ IE (называемый промотором CB7). Дополнительную группу обрабатывали вектором AAVhu68, несущим другую сконструированную последовательность трансгена (hPGRN v2, SEQ ID NO: 4), экспрессируемую с промотора убиквитина C (UbC). Уровни програнулина человека в СМЖ измеряли еженедельно, и животных умерщвляли через 35 дней после инъекции для анализа гистопатологии. Были выполнены предварительные анализы безопасности, включая ежедневные наблюдения в клетке, серийные медицинские осмотры, полные анализы крови, биохимические анализы сыворотки, биохимический анализ СМЖ и цитологию, а также полное вскрытие с микроскопической оценкой головного и спинного мозга. Группы лечения приведены в таблице ниже.

Капсид	Трансген	Промоутер	Вид	N	ROA	Доза	Объем введения
AAVhu68	hPGRN	CB7	Взрослая макака-резус	2	ICM	$3,00 \times 10^{13}$ GC	1 мл
AAVhu68	hPGRN v2	UbC		2			
AAV1	hPGRN	CB7		2			
AAV5	hPGRN	CB7		2			

Устойчивая экспрессия PGRN была обнаружена в СМЖ всех NHP после введения вектора (Фиг. 7А). У двух животных, обработанных вектором AAVhu68, уровни PGRN человека в СМЖ были до 10 раз выше, чем у здоровых людей в контрольной группе, и сходны с уровнями, которые обращали вспять лизосомные аномалии в мозге мышей $GRN^{-/-}$. Обработка AAV5 приводила к примерно эквивалентным уровням экспрессии AAVhu68 в СМЖ. Экспрессия PGRN человека была наибольшей у животных, обработанных вектором AAV 1, достигая более чем 40-кратного увеличения по сравнению с нормальным уровнем человека. Образцы СМЖ и плазмы от NHP, обработанных векторами AAVhu68 и AAV1,

тестировали на антитела к PGRN человека. У всех четырех животных выработались антитела к трансгенному продукту человека (Фиг. 8А-8С), что может объяснить снижение уровней экспрессии в конце исследования. Начало реакции антител к PGRN человека в СМЖ коррелировало с уровнями экспрессии трансгена, достигая пика раньше в группе AAV 1.

Доставка ICM AAV хорошо переносилась во всех группах лечения. Никаких отклонений, связанных с лечением, не было выявлено при ежедневных наблюдениях, физических осмотрах, общих анализах крови или панелях химического анализа сыворотки. Подобно другим исследованиям ICM AAV с использованием ксеногенного трансгена (Hordeaux J, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018; 10 (79-88)), анализ СМЖ выявил бессимптомный лимфоцитарный плеоцитоз, начинающийся через 7-21 день после инъекции для всех серотипов вектора, что отражает реакцию антител на продукт трансгена (Фиг. 8А-8С). Количество клеток в СМЖ снизилось по сравнению с пиковыми уровнями, но оставалось повышенным во время вскрытия у большинства животных. Гистопатология головного и спинного мозга оценивалась для групп, получавших AAV1 и AAVhu68. Результаты были аналогичны результатам предыдущих исследований ICM AAV (Hordeaux J, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;10:79-88; Hordeaux J, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018; 10: 68-78), со случайными минимальными лимфоцитарными инфильтрациями, обнаруженными в мозговых оболочках и сосудистом сплетении, и дегенерацией сенсорных нейронов и связанных с ними аксонов в некоторых ганглиях задних корешков (DRG) и участках спинного мозга. Как и в предыдущих исследованиях ICM AAV, обнаружение сенсорных нейронов обычно было минимальным или умеренным по степени тяжести и не было связано с клиническими признаками (Gurda BL, et al. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2016;24(2):206-16; Bordeaux J, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;10:79-88; Bordeaux J, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;10:68-78). Мы не отметили аномалий, связанных с векторами, в паренхиме мозга ни у одного животного.

Различия в паттернах трансдукции ЦНС после введения ICM векторов AAV 1 и AAVhu68 нечеловеческим приматам

Заметно более высокая экспрессия PGRN в СМЖ NBP, обработанных вектором AAV1, привела к дальнейшему изучению различий в паттернах трансдукции векторов AAV1, AAV5 и AAVhu68. NBP вводили однократной инъекцией ICM вектора AAV1, AAV5 или AAVhu68 (3×10^{13} GC, n=2 на вектор), экспрессирующих репортерный ген GFP. Через 28 дней после инъекции животных умерщвляли для гистологического анализа трансдукции в мозге.

Иммуногистохимия выявила диффузную, неоднородную трансдукцию по всему мозгу NBP, обработанных векторами AAV 1 и AAVhu68 (не показаны). Минимальная трансдукция наблюдалась в мозге животных, которым вводили вектор AAV5. Чтобы более точно охарактеризовать различия в трансдукции между AAV1 и AAVhu68, был разработан полуавтоматический способ количественного определения

трансдуцированных клеток в срезах, собранных из нескольких областей мозга. Используя срезы, окрашенные флуоресцентно меченными антителами к GFP и маркерами конкретных типов клеток, общее количество нейронов, олигодендроцитов и астроцитов было количественно определено окрашиванием NeuN, olig2 и GFAP, соответственно, с последующей количественной оценкой экспрессирующих GFP клеток каждого типа (Фиг. 9, Фиг.10). Каждый из AAV1 и AAVhu68 трансдуцировал менее одного процента клеток каждого типа во всех исследованных областях. Трансдукция нейронов двумя векторами была почти эквивалентной, тогда как AAVhu68, по-видимому, трансдуцировал несколько большее количество астроцитов и олигодендроцитов.

Примерно эквивалентная трансдукция мозга, наблюдаемая с векторами AAV 1 и AAVhu68, была неожиданной, учитывая резко более высокие уровни PGRN в СМЖ, достигнутые с помощью AAV1. Трансдукцию эпендимных клеток оценивали с помощью иммуногистохимии во многих областях бокового желудочка и четвертого желудочка животных, обработанных AAVhu68, и животных RAI 826, обработанных AAV1. Интересно, что несколько срезов мозга животного, получавшего AAV1 (RA 1826), которые содержали части желудочковой системы, продемонстрировали обширную трансдукцию эпендимных клеток, выстилающих желудочки, что не наблюдалось ни у одного из животных, получавших AAVhu68 (не показано). В среднем 48% эпендимных клеток трансдуцировались во всех областях, в которых были взяты образцы, включая лобный, височный и затылочный рог бокового желудочка и четвертого желудочка. Напротив, только 1-2% эпендимных клеток трансдуцировались в тех же областях мозга животных, которым вводили вектор AAVhu68. Только небольшие сегменты одного бокового желудочка были оценены у второго обработанного AAV 1 животного, которое показало около 1% трансдукцию эпендимных клеток, хотя анализ был ограничен небольшой областью выборки. Эти данные предполагают, что высокотрансдуцированные эпендимные клетки у животных, получавших AAV 1, могут быть источником высоких уровней PGRN в СМЖ, учитывая, что трансдукция других типов клеток была сходной между двумя серотипами. Эффект стороннего наблюдателя, опосредованный секретлируемым PGRN, делает ЛВД, вызванную мутациями GRN, исключительно хорошо поддающимися генной терапии AAV. Поскольку внеклеточные PGRN могут захватываться нейронами, высокие уровни PGRN в СМЖ, достигаемые с помощью вектора AAV1 - по-видимому, опосредованные хорошей трансдукцией эпендимных клеток - делают AAV 1 идеальным выбором для генной терапии GRN.

Пример 4: Рекомбинантный AAV1.PGRN

гAAV1.PGRN продуцируется тройной плазмидной трансфекцией клеток HEK293 с помощью: 1) цис-плазмиды AAV (названной pENN.AAV.CB7.C1.hPGRN.rBG.KanR), кодирующей кассету трангена, фланкированную ITR AAV, 2) транс- плазмиды AAV (названной pAAV2/1.KanR), кодирующей AAV2 rep and AAV1 cap гены и 3) вспомогательной плазмиды аденовируса (названной pAdAF6.KanR). Размер генома упакованного вектора гAAV1.PGRN составляет 4129 оснований.

Элементы последовательности плазмиды генома вектора AAV

Линейная карта генома вектора из цис- плазмиды, названной pENN.AAV.CB7.Cl.hPGRN.rBG.KanR (p4862). См. Фиг. 2.

Цис- плазида содержит следующие элементы последовательности генома вектора:

1. Инвертированный концевой повтор (ITR): ITR являются идентичными обратными комплементарными последовательностями, полученными из AAV2 (130 пар оснований [п.о.], GenBank: NC_001401), фланкирующими все компоненты генома вектора. ITR действуют как источник репликации векторной ДНК и как сигнал упаковки для генома вектора, когда функции AAV и помощника аденовируса предложены в транс. По существу, последовательности ITR представляют собой единственные цис- последовательности, необходимые для репликации и упаковки генома вектора.

2. Среднеранний энхансер цитомегаловируса человека (ЦМВ IE): Эта энхансерная последовательность получена из ЦМВ человеческого происхождения (382 п.о., GenBank: K03104.1) увеличивает экспрессию нижестоящих трансгенов.

3. Промотор β -актина курицы (BA): Этот очень распространенный промотор (282 п.о., GenBank: X00182.1) был выбран для управления экспрессией трансгена в любом типе клеток ЦНС.

4. Химерный интрон (CI): Гибридный интрон состоит из донора сплайсинга β -актина курицы (973 п.о., GenBank: X00182.1) и акцепторного элемента сплайсинга β -глобина кролика. Интрон транскрибируется, но удаляется из зрелой мРНК путем сплайсинга, объединяя последовательности по обе стороны от него. Было показано, что присутствие интрона в каскаде экспрессии облегчает транспорт мРНК из ядра в цитоплазму, таким образом увеличивая накопление постоянного уровня мРНК для трансляции. Это обычная особенность генных векторов, предназначенных для повышенных уровней экспрессии генов.

5. Кодированная последовательность: Сконструированная кДНК гена GRN человека кодирует белок PGRN человека (hPGRN), который участвует в лизосомной функции и других ролях в нервной системе (1785 п.о., GenBank: NM_002087.3; 593 аминокислоты [aa], GenBank: NP_002078).

6. Сигнал полиаденилирования β -глобина кролика (rBG PolyA): Сигнал rBG PolyA (127 п.н., GenBank: V00882.1) способствует эффективному полиаденилированию мРНК трансгена в цис. Этот элемент функционирует как сигнал для терминации транскрипции, специфического события расщепления на 3'-конце растущего транскрипта и добавления длинного полиаденильного хвоста.

Транс-плазида AAV1: pAAV2/1.KanR (p0069)

Транс- плазида AAV2/1 представляет собой pAAV2/1.KanR (p0069). Плазида pAAV2/1.KanR имеет длину 8113 п.н. и кодирует четыре белка репликазы AAV2 (Rep) дикого типа, необходимых для репликации и упаковки генома вектора AAV. pAAV2/1.KanR также кодирует три белка капсида (Cap) белка вириона AAV 1 дикого типа,

которые собираются в вирионную оболочку AAV серотипа 1 (AAV1), в которой находится геном вектора AAV. Гены *cap* AAV1, содержащиеся в pAAV2/1.KanR, были выделены из обезьяньего источника.

Чтобы создать конструкцию pAAV2/1.KanR, фрагмент размером 3 тыс. пар оснований (т.п.о.) из p5E18 (2/2), фрагмент размером 2,3 т.п.о. из pAV1H и фрагмент размером 1,7 т.п.о. из p5E18 (2/2) были включены с образованием pAAV2/1 (p0001), который содержит AAV2 гер и AAV1 *cap* в касете устойчивости к ампициллину (*AmpR*) (обозначаемой в литературе как p5E18[2/1]). Эта стратегия клонирования также переместила последовательность промотора p5 AAV (которая обычно управляет экспрессией гер) с 5'-конца гер на 3'-конец *cap*, оставляя после себя усеченный промоутер p5 выше гер. Этот усеченный промотор служит для подавления экспрессии гер и, следовательно, для максимального увеличения продукции вектора (Xiao et al., (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. J Virol. 73(5):3994-4003).

Для создания pAAV2/1.KanR для производства клинических продуктов ген устойчивости к ампициллину (*AmpR*) в основной последовательности pAAV2/1 был заменен геном устойчивости к канамицину (*KanR*). Все составные части транс-плазмид были проверены прямым секвенированием.

Плазида помощника аденовируса: pAdDeltaF6 (*KanR*)

Плазида pAdDeltaF6 (*KanR*) была сконструирована в лаборатории доктора Джеймса М. Уилсона и его коллег из Университета Пенсильвании и имеет размер 15774 п.о. Плазида содержит участки генома аденовируса, важные для репликации AAV; а именно, E2A, E4 и VA PНК (функции E1 аденовируса обеспечиваются клетками HEK293). Однако плазида не содержит других репликационных или структурных генов аденовируса. Плазида не содержит цис-элементов, критических для репликации, таких как ITR аденовирусов; следовательно, не ожидается образования инфекционного аденовируса. Плазида была получена из молекулярного клона Ad5 с делецией E1, E3 (pBHG10, плазида на основе pBR322). В Ad5 вводили делеции, чтобы исключить экспрессию ненужных генов аденовируса и уменьшить количество ДНК аденовируса с 32 т.п.о. до 12 т.п.о.). Наконец, ген устойчивости к ампициллину был заменен геном устойчивости к канамицину для создания pAdeltaF6 (*KanR*). Гены E2, E4 и VAI аденовируса, которые остаются в этой плазмиде, наряду с E1, который присутствует в клетках HEK293, необходимы для продукции вектора AAV. Вектор создается в соответствии со следующими блок-схемами, показанными на Фиг. 13 и 14.

Конечный продукт должен иметь pH в диапазоне от 6,2 до 7,7, как определено в USP <791>, и осмолярность от 260 до 320 мОсм/кг, как определено в USP <785>, и GC титр более или равный $2,5 \times 10^{13}$ GC/мл, как определено с помощью ккПЦР (Lock et al, (2014). “Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR.” Hum Gene Ther Methods. 25(2): 115-25.

ПРИМЕР 5: Определение минимальной эффективной дозы gAAV1.PGRN в GRN^{-/-} модели мыши

Доза (GC/г массы мозга)	• Мышь (GC)	• NHP (GC)	• Человек (GC)
$3,33 \times 10^{11}$	$1,30 \times 10^{11}$	$3,00 \times 10^{13}$	$4,33 \times 10^{14}$
$1,11 \times 10^{11}$	$4,40 \times 10^{10}$	$1,00 \times 10^{13}$	$1,44 \times 10^{14}$
$3,33 \times 10^{10}$	$1,30 \times 10^{10}$	$3,00 \times 10^{12}$	$4,33 \times 10^{13}$
$1,11 \times 10^{10}$	$4,40 \times 10^9$	-	$1,44 \times 10^{13}$

Влияние различных доз rAAV1.PGRN на поражения ЦНС в мышинной модели $Grn^{-/-}$ оценивается следующим образом. Эффективность оценивается по степени уменьшения патологии накопления в головном мозге (липофусцин), которая служит количественным показателем результата, напрямую связанным с патофизиологией заболевания. Кроме того, для выявления токсичности, специфической для заболевания, которая может не быть обнаружена в токсикологическом исследовании NHP, включены окончательный сбор крови для общего анализа крови и биохимических анализов сыворотки, а также гистопатология органов-мишеней. Мышей лечили в возрасте 5-6 месяцев, когда имеется обширное накопление липофусцина для воспроизведения болезненного состояния у пожилых субъектов с GRN гаплонедостаточностью. $Grn^{-/-}$ мыши получали одну из четырех доз rAAV1.PGRN ($1,30 \times 10^{11}$ GC, $4,40 \times 10^{10}$ GC, $1,30 \times 10^{10}$ GC или $4,40 \times 10^9$ GC) или носителя (ITFFB [искусственная СМЖ с 0,001% Pluronic F-68]) путем ICV инъекции (N=15 на группу). Мышам $Grn^{+/+}$ вводили носитель (N=15), и эти мыши служили в качестве нормального контроля. Через 90 дней после обработки животных умерщвляли, головной мозг собирали и делали срезы и количественно определяли повреждения липофусцином. MED определяется дозой, которая показывает значительное уменьшение повреждений мозга по сравнению с $GRN^{-/-}$ мышами, обработанными носителем, и значимость определяется с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим тестом множественных сравнений Тьюки (альфа=0,05), если применимо.

ПРИМЕР 6: Исследование токсикологии на нечеловеческих приматах

rAAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG, представляет собой нереплицирующийся рекомбинантный аденоассоциированный (AAV) вектор, состоящий из серотипа AAV1, который содержит кДНК сконструированного програнулина человека (PGRN) под контролем промотора бета-актина курицы с энхансером цитомегаловируса и последовательность полиаденилирования бета-глобина кролика, фланкированную инвертированными концевыми повторами AAV серотипа 2, приготовленными в интратекальном буфере конечной композиции (ITFFB). Титр ккПЦР составлял $2,04 \times 10^{13}$ GC/мл. pH ITFFB довели до pH 7,4, чтобы максимизировать растворимость тестируемого продукта. Контрольные продукты были приготовлены в день дозирования.

Разбавленные продукты хранили на влажном льду или при 2-8°C до дозирования в тот же день.

Было проведено 90-дневное исследование безопасности GLP на взрослых макаках-резус для изучения токсикологии rAAV1.PGRN после введения ICM. Для этого исследования были использованы NHP в возрасте от 3-10 лет, потому что этот возраст является репрезентативным для предполагаемой взрослой популяции пациентов-людей. Был выбран 90-дневный период оценки, поскольку он дает достаточно времени, чтобы секретируемый трансгенный продукт достиг стабильных уровней плато после введения ICM AAV. Макаки-резус получали один из трех уровней дозы - всего $3,00 \times 10^{12}$ GC, всего $1,00 \times 10^{13}$ GC или всего $3,00 \times 10^{13}$ GC (N=3 на дозу) rAAV1.hPGRN - или носитель (ITFFB; N=2). Уровни доз были выбраны так, чтобы они были эквивалентны тем, которые должны быть оценены в исследовании запланированной минимальной эффективной дозы (MED) при масштабировании по массе мозга (предполагая 0,4 г для мозга мыши и 90 г для мозга макаки-резус). Были выполнены базовые неврологические обследования, клиническая патология (подсчет клеток с дифференциалами, клиническая химия и панель коагуляции), химический анализ СМЖ и цитология СМЖ. После введения rAAV1.PGRN или носителя за животными ежедневно наблюдали на предмет признаков дистресса и аномального поведения.

Оценки клинической патологии крови и СМЖ и неврологические обследования выполняли еженедельно в течение 30 дней после введения rAAV1.PGRN или носителя, а затем каждые 30 дней. На исходном уровне и в каждую последующую 30-дневную точку времени реакцию нейтрализующих антител к AAV1 (Nabs) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) на AAV1 и продукт трансгена rAAV1.PGRN оценивали с помощью иммуноспотного анализа (ELISpot) с интерфероном гамма (IFN- γ).

Вид		Macaco mulatta		
Синоним		Макаки-резус		
Возраст животных на момент начала		3-8 лет		
Масса тела животных в начале исследования		3,0-10,0 кг		
Количество использованных животных		Всего 11 6 самцов 5 самок		
Обозначение группы	1	2	3	4
rAAV1.PGRN/ITFFB	Носитель (ITFFB)	rAAV1.PGRN	rAAV1.PGRN	rAAV1.PGRN
rAAV1.PGRN Доза (GC)	N/A	$3,0 \times 10^{12}$	$1,0 \times 10^{13}$	$3,0 \times 10^{13}$
Количество макак	2	3	3	3

Пол	Оба	Оба	Оба	Оба
ROA	ICM	ICM	ICM	ICM
Объем введения (мл)	До 2,0	До 2,0	До 2,0	До 2,0
День вскрытия	90±5	90±5	90±5	90±5

Через девяносто дней после введения gAAV1.PGRN или носителя животных умерщвляли и собирали ткани для всестороннего микроскопического гистопатологического исследования. Кроме того, лимфоциты собирали из печени, селезенки и костного мозга для оценки присутствия Т-клеток, реактивных как в отношении капсида, так и продукта трансгена, в этих органах во время вскрытия.

Биораспределение вектора оценивали с помощью количественной ПЦР в образцах тканей. Векторные геномы также были количественно определены в образцах сыворотки и СМЖ. Экскрецию векторов оценивали путем анализа геномов векторов, обнаруженных в моче и кале. Эти анализы были выполнены только для когорты с наивысшей дозой, поскольку предыдущие исследования продемонстрировали, что характер распределения вектора после введения ICM не зависит от дозы, а более высокие дозы вектора дают больший общий сигнал в анализе биораспределения на основе кПЦР, что обеспечивает максимальную чувствительность при обнаружении отложения вектора в тканях-мишенях (Hordeaux et al., 2018b).

Оценка скорости нервной проводимости

Животных успокаивали комбинацией кетамин/дексмедетомидин. Под действием седативного эффекта животных помещали в положение лежа на боку или на спине на процедурный стол с тепловыми пакетами для поддержания температуры тела. Использование электронных обогревателей не рекомендуется из-за возможного вмешательства в прием электрических сигналов.

Для исследований сенсорной нервной проводимости (NCS) зонд-стимулятор располагался над срединным нервом с катодом, ближайшим к месту записи, а два игольчатых электрода вводились подкожно на палец II на уровне дистальной фаланги (электрод сравнения) и проксимальной фаланги (регистрирующий электрод), а заземляющий электрод располагался проксимально от стимулирующего зонда (анода). Использовался детский стимулятор. Вызванные ответы дифференцированно усиливались и отображались на мониторе. Начальная сила стимула захвата была установлена на 0,0 мА, чтобы подтвердить отсутствие фонового электрического сигнала. Чтобы найти оптимальное местоположение стимула, силу стимула увеличили до 10,0 мА, и при перемещении зонда вдоль срединного нерва была создана последовательность стимулов, пока не было найдено оптимальное местоположение, определяемое окончательной формой волны. Удерживая датчик в оптимальном месте, мощность стимула постепенно увеличивалась до тех пор, пока пиковая амплитуда отклика не перестала увеличиваться. Каждый стимул-ответ был записан и сохранен в программе. Для срединного нерва было

усреднено до 10 максимальных стимулов. Расстояние (см) от места записи до стимулирующего катода было измерено и введено в программное обеспечение, а скорость проводимости была рассчитана с использованием задержки начала отклика и расстояния (см). Сообщали как скорость проводимости, так и среднее значение амплитуды потенциала действия сенсорного нерва (SNAP). Срединный нерв исследовали с двух сторон. Все необработанные данные, созданные прибором, были сохранены как часть файла исследования.

На Фиг. 11А и Фиг. 11В представлены результаты исследований на проводимость по срединному сенсорному нерву у NHP. При введенных дозах не наблюдалось никакого влияния на проводимость по срединному сенсорному нерву. Предварительный гистологический анализ показал результаты, главным образом, в пределах DRG, TRG, дорсальных трактов белого вещества спинного мозга и периферических нервов (Фиг. 12А - Фиг. 12D). Эти данные включали дегенерацию нейронов в DRG/TRG и дегенерацию аксонов (т. е. аксонопатию) в дорсальных отделах белого вещества спинного мозга и периферических нервов. В целом эти результаты наблюдались во всех обработанных группах; однако заболеваемость и тяжесть имели тенденцию быть выше у отдельных животных из групп со средней и высокой дозой в оба момента времени.

Учитывая тяжесть нейродегенеративного заболевания, связанного с GTW, ожидается, что профиль польза/риск для ICM-введения rAAV1.PGRN останется благоприятным.

Пример 7: Исследования на человеке

Было проведено первое на людях исследование повышения дозы фазы 1/2 FIH при однократном введении rAAV1.hPGRN пациентам с нейродегенеративным заболеванием у взрослых, вызванным мутациями в гене GRN (см. Таблицу ниже). rAAV1.hPGRN предназначен для замены гена GRN. Это исследование FIH оценивает безопасность и переносимость, а также собирает предварительные данные об эффективности. До 12 пациентов с симптоматическими гетерозиготными носителями мутации GRN получали лечение rAAV1.hPGRN и первоначально наблюдались в течение 2 лет (24 месяца) с продолжением долгосрочного наблюдения в течение 5 лет после введения дозы. Это исследование предоставляет данные для поддержки начала регистрационного исследования, в котором используется максимальная переносимая доза (MTD) фазы 1/2. Это регистрационное исследование оценивает влияние rAAV1.hPGRN на клинические исходы и биомаркеры, относящиеся к заболеванию. Все испытания включают введение одной дозы ICM rAAV1.hPGRN взрослым пациентам с GRN-ассоциированным нейродегенеративным заболеванием.

Название протокола(ов):	Открытое многоцентровое исследование с увеличением дозы фазы 1/2 для оценки безопасности и переносимости одной дозы rAAV1.hPGRN, вводимой в Cisterna Magna (ICM) взрослых пациентов с нейродегенеративным заболеванием с началом во взрослом возрасте, вызванным гетерозиготными мутациями в гене предшественника
-------------------------	---

	гранулина (GRN)
Количество субъектов:	До 12 оцениваемых субъектов
Цели:	<i>Первичная:</i> Оценить безопасность и переносимость гAAV1.hPGRN через 2 года (24 месяца) после введения разовой дозы ICM посредством оценки: Нежелательных явлений (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (НЯ) Показателей жизнедеятельности и медицинских осмотров Электрокардиограмм (ЭКГ) Исследования сенсорной нервной проводимости Лабораторных исследований (химический анализ сыворотки, гематология, исследования коагуляции, функциональные тесты печени [LFT], общий анализ мочи, биохимия и цитология СМЖ) Иммуногенности вектора и трансгенного продукта <i>Вторичная (поисковые показатели эффективности):</i> Оценить фармакодинамику и биологическую активность гAAV1.hPGRN в течение 2 лет (24 месяцев) после введения разовой дозы ICM на основе следующих конечных точек: Влияние гAAV 1.hPGRN на уровни белка PGRN в СМЖ Влияние гAAV 1.hPGRN на изменения толщины коры головного мозга Оценить эффективность гAAV 1.hPGRN через 2 года (24 месяца) после введения однократной дозы ICM, измеренную по: Влиянию гAAV 1.hPGRN на выживаемость Влиянию гAAV 1.hPGRN на клинические симптомы и повседневное функционирование, оцениваемое с помощью Краткого исследования психического состояния (MMSE), общего клинического впечатления от изменений (CGI-C), батареи фронтальных оценок (FAB), шкалы оценки лобно-височной деменции (FRS), фронтальной поведенческой инвентаризации (FBI), унифицированной шкалы оценки симптомов болезни Паркинсона (UPDRS), тестирования беглости речи, клинической шкалы оценки деменции для суммы полей лобно-височной долевой дегенерации (CDR-FTLD sb) и нейропсихиатрической инвентаризации (NPI) <i>Поисковая:</i> Оценить дополнительно фармакодинамические эффекты гAAV 1.hPGRN через 2 года (24 месяца) после приема одной дозы ICM, измеренные по: Уровням в СМЖ легкой цепи нейрофиламентов (NFL), тау-белка, фосфорилированного тау-белка и маркеров воспаления

	Уровням PGRN в плазме
Дизайн исследования:	Это фаза 1/2, FII, многоцентрового, открытого, одноэтапного исследования с повышением дозы rAAV1.hPGRN, вводимого путем однократной инъекции ICM у взрослых субъектов с нейродегенеративным заболеванием, начавшимся во взрослом возрасте, вызванным гаплонедостаточностью GRN. Безопасность и переносимость, фармакодинамику и клиническую эффективность оценивали в течение 2 лет, и всех субъектов наблюдали в течение 5 лет после введения rAAV 1.hPGRN для долгосрочной оценки безопасности и переносимости, фармакодинамики и клинических исходов. Исследование состоит из фазы скрининга для определения пригодности каждого потенциального субъекта в период от около -35 до -7 дня. После подтверждения соответствия субъекта критериям отбора и участия в исследовании субъект проходит базовую оценку, которая будет включать магнитно-резонансную томографию головного мозга (МРТ), LP для сбора СМЖ, анализ крови, сбор мочи, жизненно важные показатели, ЭКГ, медосмотр и клинические оценки. Базовые оценки производятся между -6 днем и 0 днем (включительно) до введения rAAV 1.hPGRN. Во время фазы лечения пациенты поступают в больницу утром 1 дня. Субъекты получают однократную дозу ICM rAAV1.hPGRN в 1 день и остаются в больнице в течение не менее 24 часов после приема дозы для наблюдения. Последующие визиты для исследования происходят на 7, 14, 30 день и через 6 месяцев после введения дозы, а затем каждые 6 месяцев в течение первых 2 лет после приема. Посещения LTFU происходят в течение дополнительных 3 лет с частотой каждые 12 месяцев в течение 5 лет после введения дозы.
	Исследование состоит из следующих трех групп, которым вводили rAAV1.hPGRN в виде одной инъекции ICM: Когорта 1 (низкая доза): Три подходящих субъекта последовательно регистрировали и вводили низкую дозу rAAV1.hPGRN с 4 недельным периодом наблюдения за безопасностью между каждым субъектом. Если триггеры обзора безопасности (SRT) не наблюдаются, все доступные данные по безопасности оцениваются комиссией по безопасности через 4 недели после введения третьему субъекту в когорте 1 rAAV1.hPGRN. Когорта 2 (высокая доза): Если принято решение продолжить, последовательно включаются три подходящих субъекта, которым вводят высокую дозу hAAV1.hPGRN с 4 недельным периодом

	наблюдения за безопасностью между каждым субъектом. Если SRT не наблюдаются, все доступные данные по безопасности оцениваются комиссией по безопасности через 4 недели после введения третьему субъекту когорты 2 гAAV1.hPGRN. Когорта 3 (MTD): В ожидании положительной рекомендации совета по безопасности в исследование включают 6 дополнительных субъектов, которым вводят дозу MTD гAAV1.hPGRN. Дозирование не меняется с 4 недельным периодом наблюдения за безопасностью между каждым субъектом. В совокупности ожидается общее включение 9 субъектов в когорту как с высокими, так и с низкими дозами, и всего 12 субъектов (по всем дозам).
Критерии включения:	1. > 35 лет и <75 лет на момент начала исследований 2. Подтвержденный клинический диагноз нейродегенеративного заболевания у взрослых, вызванного гетерозиготной мутацией GRN 3. Подтверждение мутации GRN как причинной по одному из следующих критериев: a. Мутация классифицируется как патогенная в базе данных по болезни Альцгеймера и лобно-височной деменции (AD&ЛВДМДБ) (AD&ЛВДМДБ and Cruts, (2019). "Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database." Получено 16 января 2019 г. с www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/default.cfm?MT=1&ML=1&Page=MutByQuery&Query=tblContexts.GeneSymbol%20In%20(%27GRN%27)&Selection=Gene%20In%20(GRN).) в соответствии с рекомендациями, опубликованными Американским колледжем медицинской генетики (ACMG) (Richards et al., (2015). "Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology." Genet Med. 17(5):405-24) b. Классифицируется как «патогенная природа неясна» в AD и FDMDB или «вариант с неопределенной значимостью» в соответствии с рекомендациями ACMG, и у пациента есть семейный анамнез того же или родственного нейродегенеративного заболевания. 4. Общий балл CDR-FTLD > 0,5 и <1
Критерии исключения:	1. Невозможность предоставить полное согласие или отсутствие законно уполномоченного лица, осуществляющего уход, с адекватным контактом, который может предоставить согласие 2. Противопоказания к МРТ, доставке ИСМ или LP (например, местная инфекция, тромбоцитопения, коагулопатия, повышенное

	внутричерепное давление ([ICP] из-за объемного поражения) 3. Классификация мутации GRN как «непатогенная», «вероятный доброкачественный вариант» или «доброкачественный вариант» в AD и FDMDB 4. Пациенты с ослабленным иммунитетом 5. Пациенты с положительным результатом теста на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) или гепатит С 6. Другие злокачественные новообразования или хронические заболевания ЦНС, не вызванные мутацией GRN 7. Лекарства, которые, по мнению исследователя, могут представлять опасность для пациента, например, иммунодепрессанты или системные кортикостероиды. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) допустимо, если они принимают стабильную дозу в течение 30 дней до скрининга и соглашаются оставаться на той же дозе на протяжении всего испытания. 8. Злокачественная неоплазия (кроме локализованного рака кожи) или документально подтвержденная история синдрома наследственного рака. Субъекты с ранее успешно пролеченным злокачественным новообразованием и достаточным последующим наблюдением для исключения рецидива (на основании заключения онколога) могут быть включены после обсуждения и утверждения спонсором или уполномоченным лицом. 9. Любое сопутствующее заболевание, которое, по мнению исследователя, может вызывать когнитивные нарушения, не связанные с <i>мутациями GRN</i>, включая нейросифилис, гидроцефалию, инсульт, ишемическую болезнь мелких сосудов, неконтролируемый гипотиреоз или дефицит витаминов. 10. Для женщин детородного возраста: положительный результат мочи, подтвержденный сывороточным тестом на беременность во время скринингового визита, положительный результат мочи, подтвержденный сывороточным результатом в 1 день до введения исследуемого препарата, или нежелание проходить дополнительные тесты на беременность во время исследования. 11. Для мужчин и женщин детородного возраста - нежелание использовать признанный с медицинской точки зрения метод двойной барьерной контрацепции (например, презерватив/диафрагму, используемые со спермицидом) или воздерживаться с даты скрининга до 52 недель после введения вектора 12. Любое состояние (например, история какого-либо заболевания,
--	--

	доказательства любого текущего заболевания, любые результаты медосмотра или любые лабораторные отклонения), которое, по мнению исследователя, подвергло бы субъекта чрезмерному риску или помешало бы оценке исследуемого препарата или интерпретации безопасности субъекта или результатов исследования 13. Любое острое заболевание, требующее госпитализации в течение 30 дней после лечения
--	---

Способ введения и процедура

гAAV1.hPGRN в виде однократной дозы вводят в 1 день субъектам посредством субокципитальной инъекции под контролем компьютерной томографии в cisterna magna. В 1 день шприц, содержащий 5,6 мл гAAV1.hPGRN с соответствующим титром готовится исследовательской аптекой, связанной с исследованием, и доставляется в процедурный кабинет.

Перед введением исследуемого лекарственного средства субъекта анестезируют, интубируют, а место инъекции обрабатывают и драпируют с использованием стерильной техники. Для удаления заданного объема СМЖ выполняется LP, после чего ИТ вводится йодированный контраст, чтобы помочь визуализировать соответствующую анатомию cisterna magna. В/в контраст можно вводить до или во время введения иглы в качестве альтернативы ИТ-контрасту. Решение об использовании в/в или ИТ-контраста остается на усмотрение интервенциониста, выполняющего процедуру. Спинальная игла (22-25 G) вводится в cisterna magna под рентгеноскопическим контролем. Для облегчения установки иглы можно использовать иглу интродьюсера большего размера. После подтверждения установки иглы удлинительный набор прикрепляется к спинномозговой игле и заполняется СМЖ. По усмотрению интервенциониста, шприц, содержащий контрастное вещество, может быть подключен к набору удлинителя и введено небольшое количество для подтверждения размещения иглы в cisterna magna. После подтверждения установки иглы шприц, содержащий гAAV1.hPGRN, подключается к набору удлинителей. Содержимое шприца вводят медленно в течение 1-2 минут, получая объем 5,0 мл.

Оценки безопасности, включая сбор данных о нежелательных явлениях (НЯ), физикальное/неврологическое обследование, показатели жизненно важных функций, клиническую лабораторию (химический анализ сыворотки, гематология, коагуляция, LFT, анализ мочи), ЭКГ, исследования нервной проводимости, а также цитологию и химию СМЖ (количество клеток, белок, глюкоза) выполняются в сроки, указанные в расписании исследования.

Никаких статистических сравнений для оценок безопасности не планируется; все результаты носят только описательный характер. Перечисляются данные и составляются сводные таблицы.

Статистические сравнения выполняются для вторичных и исследовательских конечных точек. Измерения в каждый момент времени сравниваются с исходными значениями для каждого субъекта, а также с данными естественного анамнеза здоровых

добровольцев и пациентов с GRN со сравнимыми когортными характеристиками, если они доступны для каждой конечной точки. Все данные представлены в перечнях тематических данных. Категориальные переменные суммируются с использованием частот и процентов, а непрерывные переменные суммируются с использованием описательной статистики (количество неотмеченных наблюдений, среднее значение, стандартное отклонение, медиана, минимум и максимум). Графические дисплеи представлены соответствующим образом.

Ранние клинические проявления нейродегенерации у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью GRN, неоднородны. Эта неоднородность приводит к множеству диагнозов с дополнительными симптомами, появляющимися по мере прогрессирования болезни. Поскольку состояние пациентов обычно быстро ухудшается после появления симптомов, пациентов с любым диагнозом нейродегенерации можно лечить, если у них есть подтвержденная патогенная гетерозиготная мутация GRN. Пациенты могут быть обследованы с использованием глобальной шкалы CDR-FTLD. Эта рейтинговая шкала предназначена для оценки тяжести заболевания у пациентов с диагнозом спектра FTLD. Из-за совпадения симптомов, связанных с FTLD, у людей с другими диагнозами, связанных с GRN, и количества областей, отраженных в глобальной шкале CDR-FTLD (память, ориентировочное суждение и решение проблем, общественные дела, дом и хобби, личный уход, поведение и язык), эту шкалу можно использовать для постановки диагнозов. Общий показатель CDR-FTLD более 0,5 (который включает пациентов с легкими симптомами) и менее или равен 1 позволит лечить пациентов с симптомами на ранней стадии нейродегенерации, при которой преимущества генной терапии, вероятно, будут максимальными. Лечение пациентов на этой ранней стадии позволяет впоследствии выявить изменения или стабилизацию прогрессирования заболевания и отсрочить появление дополнительных симптомов. Тем не менее, требование о минимальном общем балле 0,5 CDR-FTLD в этой популяции исключает участие в диагностировании моторных диагнозов, поскольку шкала не оптимизирована для выявления нарушений моторных фенотипов.

Ожидается, что эта генная терапия не приведет к экспрессии PGRN выше физиологического уровня. Используя дозы rAAV1.hPGRN в доклинических исследованиях NHP, которые выше, чем дозы, которые будут использоваться в исследовании FII, было обнаружено, что PGRN экспрессируется в сыворотке на уровнях, близких к нормальным, после введения rAAV1.hPGRN ICM. Поскольку субъекты, включенные в исследование FII, первоначально имели бы уровни циркулирующего PGRN на уровне около 30% от нормы, ожидается, что уровни циркулирующего сывороточного PGRN могут быть восстановлены до нормального уровня. Анализ крови пациентов проверяется с помощью панелей полного анализа крови (CBC), и пациенты наблюдаются на предмет опухолей с помощью МРТ с гадолиниевым контрастом головного мозга и верхних отделов позвоночника в течение 5 лет в контрольные моменты времени.

В дополнение к измерению безопасности и переносимости в качестве первичных конечных точек, для этого исследования были выбраны вторичные и исследовательские конечные точки эффективности на основе текущей литературы и консультаций с ведущими клиницистами, специализирующимися на изучении нейродегенерации, связанной с GTW. Эти конечные точки позволяют отслеживать клинические исходы и биомаркеры заболевания с целью определения соответствующих конечных точек для последующего регистрационного исследования.

Поскольку нейродегенерация, вызванная мутациями GRN, в конечном итоге приводит к смерти, влияние rAAV1.hPGRN на выживаемость пациентов также является конечной точкой эффективности для этого исследования. Однако продолжительности исследования и размера выборки может быть недостаточно для демонстрации преимущества в отношении выживаемости, поскольку у большинства пациентов ожидаемая продолжительность жизни составляет 7-11 лет с момента появления симптомов.

Оценивается влияние rAAV1.hPGRN на клинические симптомы и повседневное функционирование пациентов. Из-за фенотипической гетерогенности, демонстрируемой целевой популяцией пациентов, используются функциональные и клинические шкалы, отражающие прогрессирование симптомов, выраженных в различных клинических проявлениях. Предлагаемое исследование использует FAB, FRS, MMSE, CGL C, NPI и FBI для измерения изменений во времени. Эти шкалы в первую очередь измеряют когнитивные способности, речь, нейропсихологическое поведение и способности, связанные с повседневными функциями, которые информируют о прогрессировании или стабилизации различных клинических проявлений болезни. UPDRS также включен для регистрации изменений двигательных симптомов. В FИН эти оценки эффективности носят исследовательский характер и предназначены для выявления с течением времени способности rAAV.hPGRN стабилизировать снижение симптомов. Данные FИН о скорости дальнейшего снижения различных клинических параметров у пациентов с разными клиническими проявлениями используются для дальнейшего информирования при выборе подходящих конечных точек и определения клинически значимых изменений для регистрационного исследования.

Каждая клиническая шкала кратко описана ниже:

Клинические шкалы, в первую очередь измеряющие когнитивные функции

CDR-FTLD: CDR-FTLD - это расширенная версия классической шкалы оценки клинической деменции (CDR), которая исторически используется для оценки тяжести нарушений спектра БА. Оценка включает шесть исходных областей CDR (память, ориентация, суждения и решение проблем, общественные дела, дом и хобби, личный уход). Она также включает в себя две дополнительные области языка и поведения, что позволяет повысить чувствительность при обнаружении ухудшения у пациентов с FTLD-спектром. Оценка 0 указывает на нормальное поведение или язык, а оценка 1, 2 или 3 указывает на слабый или серьезный дефицит. Для CDR-FTLD сумма ячеек (CDR-FTLD sb)

представляет собой сумму отдельных доменов и используется для определения общей тяжести деменции.

MMSE: MMSE - это глобальная когнитивная оценка с 11 вопросами, широко используемая в клинической и исследовательской практике. Такие вопросы, как «Какой сейчас год? Время года? Дата? День недели? Месяц?» задаются, и за каждый правильный ответ дается один балл с максимальными баллами за каждый вопрос. Максимальный общий балл - 30, с двумя отсечками - 24 балла и 27. Эти ограничения являются индикаторами когнитивного снижения.

Тестирование вербальной беглости: Хотя это не одна из предложенных исследовательских конечных точек эффективности, тестирование беглости речи проводится на протяжении всего исследования FHN. Скорее всего, это будет проводиться путем представления одной и той же картинки каждому испытуемому и запроса словесного описания. Во время описания скорость речи (слов в минуту) подсчитывается, записывается и в конечном итоге сравнивается со скоростью, характерной для нейротипичных взрослых.

Клинические шкалы, в первую очередь измеряющие моторную функцию

UPDRS: UPDRS - это оценка из 42 пунктов, состоящая из четырех частей, в нескольких областях, связанных с паркинсонизмом, таких как мышление, поведение и настроение, а также повседневная деятельность. Каждый элемент включает шкалу оценок от 0 (указывает на отсутствие поражения) до 4 (указывает на наиболее серьезное поражение). Баллы для каждой части подсчитываются, чтобы указать на тяжесть заболевания, при этом высокий балл 199 указывает на наиболее тяжелую инвалидность.

Клинические шкалы, в первую очередь измеряющие поведение

NPI: NPI используется для выяснения наличия психопатологии у пациентов с заболеваниями головного мозга. Первоначально она была разработана для использования в популяциях БА; однако считается, что она полезна для оценки поведенческих изменений в других условиях. Оценка состоит из 10 поведенческих областей и двух нейровегетативных областей, в которых есть четыре балла: частота, тяжесть, общий дистресс и дистресс лица, осуществляющего уход. Общий балл NPI получается путем сложения баллов поведенческих доменов и вычитания баллов дистресса лица, осуществляющего уход.

FBI: FBI - это оценка из 24 пунктов изменений поведения и личности, связанных конкретно с bvЛВД, и для дифференциации bvЛВД и других деменций. Она проводится как личное собеседование с основным лицом, осуществляющим уход, потому что пациенты с диагнозом bvЛВД обычно не распознают эти типы изменений. Она фокусируется на нескольких аспектах поведения и личности, оценивая каждый вопрос от 0 (нет) до 3 (серьезный/большая часть времени). Общий балл обычно коррелирует с тяжестью заболевания и может использоваться для оценки изменений с течением времени.

Клинические шкалы измеряющие когнитивные и моторные функции

CGI-C: CGI-C - это одна из трех частей краткого, широко используемого оценивания. Оно состоит из трех пунктов, оцененных клиницистами. CGI-C оценивается по 7-балльной шкале в диапазоне от 1 (очень сильно улучшилось) до 7 (очень сильно ухудшилось), начиная с включения в исследование, независимо от того, является ли какое-либо улучшение полностью результатом лечения.

FAB: FAB представляет собой оценку, помогающую дифференцировать деменции с фронтальным дисэксективным фенотипом и типом БА. Это особенно полезно для пациентов со слабоумием ($MMSE > 24$). Оценка состоит из шести частей, которые касаются когнитивной, моторной и поведенческой сфер. Общий балл 18 или выше указывает на улучшение.

FDR: FDR - это краткая оценка стадии для пациентов с подтипом лобно-височной деменции (ЛВД) (т. е. BvЛВД или любым из подтипов PPA). FDR выявляет различия в прогрессировании ЛВД с течением времени. Это краткое интервью проводится с основным лицом, осуществляющим уход, и состоит из 30 вопросов, которые классифицируются как «никогда», «иногда» или «всегда». Затем рассчитывается процентная оценка и она преобразуется в логит-оценку и, в конечном итоге, в оценку тяжести. Оценка степени серьезности варьируется от «очень легкой» до «тяжелой».

Шкала оценки выраженности суицидальных тенденций Колумбийского университета (C-SSRS): Хотя оценка C-SSRS не является конечной точкой исследовательской эффективности для FИН, эта оценка проводится на протяжении всего исследования. C-SSRS представляет собой трехчастную шкалу, измеряющую суицидальные мысли, их интенсивность и суицидальное поведение. Результат этой оценки состоит из рейтинга летальности суицидального поведения, взятого непосредственно из шкалы, балла суицидальных мыслей и рейтинга интенсивности суицидальных мыслей. Оценка идей выше 0 может указывать на необходимость вмешательства в соответствии с руководящими принципами оценки. Рейтинг интенсивности находится в диапазоне от 0 до 25, где 0 означает отсутствие суицидальных идей.

В качестве дополнительной исследовательской конечной точки оценивается выживаемость пациентов. Однако ожидаемая продолжительность жизни пациентов с диагнозом нейродегенерация, вызванная гаплонедостаточностью GRN, составляет 7-11 лет с момента появления симптомов. Таким образом, продолжительность исследования, размер выборки и включение субъектов, находящихся на ранней стадии заболевания, могут быть недостаточными для демонстрации преимущества в отношении выживаемости.

Введение gAAV 1.hPGRN стабилизирует снижение атрофии (потеря нейрональных клеток), прежде всего, в лобных и височных долях коры, а также в объеме всего мозга с течением времени, вызванное гаплонедостаточностью ассоциированной GRN. MPT можно использовать для отслеживания изменений толщины средней лобной коры и теменных областей.

Также оцениваются биохимические биомаркеры. Уровни белка PGRN в СМЖ и плазме измеряются как показания трансдукции AAV и повышаются у пациентов после введения rAAV1.hPGRN. Также отслеживаются уровни легкой цепи нейрофиламентов (NFL), тау, фосфорилированный тау и другие маркеры воспаления в СМЖ. NFL считается общим индикатором потери или повреждения нейронов. Тау и фосфорилированный тау связаны с патологией, наблюдаемой при БА, БП и некоторых формах ЛВД.

Анализ крови пациентов проверяется с помощью панелей общего анализа крови (CBC), а пациенты наблюдаются на предмет опухолей с помощью МРТ с гадолиниевым контрастом головного мозга и верхних отделов позвоночника в течение 5 лет в контрольные моменты времени.

Однократное введение rAAV1.hPGRN безопасно и переносимо после введения. Однократное введение rAAV1.hPGRN улучшает выживаемость и/или снижает прогрессирование заболевания, что оценивается по клиническим симптомам и повседневному функционированию пациентов. Лечение замедляет потерю нейрокогнитивной функции.

(Свободный текст списка последовательностей)

Следующая информация предоставляется для последовательностей, содержащих произвольный текст под числовым идентификатором <223>.

SEQ ID NO	Произвольный текст под <223>
3	<223> Сконструированная кодирующая последовательность PGRN1 человека
4	<223> Сконструированная кодирующая последовательность hPGRN2 <220> <221> CDS <222> (1)..(1779)
5	<223> Синтетическая конструкция
6	<223> Глобин полиА кролика
7	<223> 3' AAVITR
8	<223> 5' AAVITR
9	<223> Энхансер ЦМВ IE человека
10	<223> Промоутер CB
11	<223> Химерный интрон
12	<223> Промоутер UbC
13	<223> Интрон
14	<223> SV40 поздний полиА
15	<223> Ген устойчивости к ампициллину

16	<223> COL EI происхождение
17	<223> Промотор EF-la
18	<223> Fl ori
19	<223> Ген устойчивости к канамицину
20	<223> Промоутер P5
21	<223> Промоутер LacZ
22	<223> EFla.huPGRN.SV40 <220> <221> Повторяющаяся область <222> (1)..(130)
23	<223> Ubc.PI.huPGRN.SV40
24	<223> CB7.Cl.hPGRNl.rBG <220> <221> Прочий_признак <222> (1)..(130) <223> 5'ITR <220> <221> Прочий_признак <222> (198)..(579) <223> Энхансер ЦМВ IE <220> <221> Прочий_признак <222> (582)..(863) <223> промотор бета-актина курицы <220> <221> Прочий_признак <222> (958)..(1930) <223> Химерный интрон <220> <221> Прочий_признак <222> (1942)..(3726) <223> hPGRN <220> <221> Прочий_признак <222> (3787)..(3913) <223> кроличий бета-глобин поли А <220> <221> Прочий_признак <222> (4002)..(4131)

	<223> 3'TTR
25	<223> Ген VP1 AAV1 <220> <221> CDS <222> (1) .. (2208)
26	<223> Синтетическая конструкция
27	<223> AAV2 rep
28	<223> Капсидный ген VP1 AAV5 <220> <221> CDS <222> (1)..(2172)
29	<223> Синтетическая конструкция
30	<223> AAVhu68 VP 1 капсид
31	<220> <221> CDS <222> (1)..(2211)
32	<223> Синтетическая конструкция
33	<223> последовательность-мишень миРНК
34	<223> последовательность-мишень миРНК
35	<223> последовательность-мишень миРНК

Все документы, процитированные в данном документе, включены в данный документ в качестве ссылки. Предварительная заявка на патент США № 62/809329, поданная 22 февраля 2019 г., предварительная заявка на патент США № 62/923812, поданная 21 октября 2019 г., и предварительная заявка на патент США № 62/969108, поданная 2 февраля 2020 г., включены посредством ссылки во всей своей полноте вместе с перечнями их последовательностей. Перечень последовательностей, представленный в данном документе, с именем «18-8663PCT_ST25.txt», а также последовательности и текст в нем включены посредством ссылки. Хотя изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты реализации, следует понимать, что модификации могут быть выполнены без отклонения от сущности изобретения. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный AAV (rAAV), содержащий:
 капсид AAV из аденоассоциированного вируса 1, и
 геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы (ITR) AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина.
2. rAAV по п. 1, отличающийся тем, что кодирующая последовательность кодирует програнулин человека SEQ ID NO: 1.
3. rAAV по п. 1 или 2, отличающийся тем, что кодирующая последовательность програнулина представляет собой SEQ ID NO: 3, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 95-99,9%.
4. rAAV по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что геном вектора содержит промотор, энхансер, интрон, последовательность, кодирующую програнулин человека, и сигнал полиаденилирования.
5. rAAV по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что интрон состоит из донора сплайсинга бета-актина курицы и акцепторного элемента сплайсинга β кролика.
6. rAAV по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что инвертированные концевые повторы (ITR) AAV представляют собой 5'-ITR AAV2 и 3'-ITR AAV2, которые фланкируют кодирующую последовательность програнулина и регуляторные последовательности.
7. rAAV по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что генома вектора содержит (a) промотор EF-1a и поздний SV40 поли A, (b) промотор UbC, интрон и поздний SV40 поли A или (c) промотор CB7, химерный интрон и глобин поли A кролика.
8. rAAV по п. 7, отличающийся тем, что генома вектора содержит последовательность SEQ ID NO: 24.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая водную жидкость, подходящую для интратекального введения, и рекомбинантный AAV (rAAV), подходящий для использования при лечении нейродегенерации, вызванной гаплонедостаточностью GRN, причем указанный rAAV содержит:
 капсид AAV из аденоассоциированного вируса 1, и
 геном вектора, упакованный в капсид AAV, причем указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы (ITR) AAV, кодирующую последовательность для програнулина человека и регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией програнулина.
10. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность кодирует програнулин человека SEQ ID NO: 1.
11. Композиция по п. 9 или 10, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность програнулина представляет собой SEQ ID NO: 3, или

последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 95-99,9% по аминокислотам 18-593 из SEQ ID NO: 3.

12. Композиция по любому из пп. 9-11, отличающаяся тем, что геном вектора содержит промотор, энхансер, интрон, последовательность, кодирующую програнулин человека, и сигнал полиаденилирования.

13. Композиция по любому из пп. 9-12, отличающаяся тем, что интрон состоит из донора сплайсинга бета-актина курицы и акцепторного элемента сплайсинга β кролика.

14. Композиция по любому из пп. 9-13, отличающаяся тем, что инвертированные концевые повторы (ITR) AAV представляют собой 5'-ITR AAV2 и 3'-ITR AAV2, которые фланкируют кодирующую последовательность програнулина и регуляторные последовательности генома вектора.

15. Композиция по любому из пп. 9-14, отличающаяся тем, что генома вектора содержит (а) промотор EF-1a и поздний SV40 поли А, (b) промотор UbC, интрон и поздний SV40 поли А или (с) промотор CB7, химерный интрон и глобин поли А кролика.

16. rAAV по п. 15, отличающийся тем, что геном вектора содержит последовательность SEQ ID NO: 24.

17. Композиция по любому из пп. 9-16, отличающаяся тем, что композиция содержит искусственную спинномозговую жидкость с поверхностно-активным веществом.

18. Композиция по п. 17, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой Pluronic F-68.

19. Рекомбинантный AAV (rAAV) по любому из пп. 1-8 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 9-18 для применения в способе лечения пациента, который страдает нейродегенерацией у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью GRN.

20. Применение рекомбинантного AAV (rAAV) по любому из пп. 1-8 или фармацевтической композиции по любому из пп. 9-18 при производстве лекарственного средства для лечения пациента, который страдает нейродегенерацией у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью GRN.

21. Применение по п. 19 или 20, отличающееся тем, что композиция составлена для введения интратекально дозы 1×10^{10} GC/г массы мозга до $3,33 \times 10^{11}$ GC/г массы мозга rAAV.

22. Применение по любому из пп. 19 или 20, отличающееся тем, что пациентом является взрослый человек, и ему вводят дозу от $1,44 \times 10^{13}$ до $4,33 \times 10^{14}$ GC rAAV.

23. Применение по любому из пп. 19-22, отличающееся тем, что rAAV или композиция вводятся по схеме, дополнительно включающей одно или более из (а) неинвазивного обследования пациента на предмет уменьшения накопленных повреждений сетчатки в качестве предиктора уменьшения мозговых поражений, (b) выполнения магнитно-резонансной томографии для оценки объема мозга и/или (b) измерения концентрации програнулина в СМЖ.

24. Применение по любому из пп. 19-23, отличающееся тем, что гAAV, содержащий кодирующую последовательность для програнулина, доставляется интратекально, посредством интрацеребровентрикулярной доставки или интрапаренхимальной доставки.

25. Применение по любому из пп. 19-23, отличающееся тем, что композицию вводят в виде однократной дозы посредством субзатылочной инъекции под контролем компьютерной томографии (КТ) в *cisterna magna* (intra-cisterna magna).

26. Применение по любому из пп. 19-25, отличающееся тем, что пациент имеет програнулин-лобно-височную деменцию.

27. Способ лечения пациента-человека с нейродегенерацией у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью гранулина (GRN), включающий доставку в центральную нервную систему (ЦНС) рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), имеющего капсид AAV аденоассоциированного вируса 1 (AAV1), причем указанный rAAV дополнительно содержит геном вектора, упакованный в капсид AAV, при этом указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, последовательность, кодирующую програнулин человека, и регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию програнулина.

28. Способ лечения пациента-человека с нейродегенерацией у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью гранулина (GRN), включающий введение в центральную нервную систему (ЦНС) рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), имеющего капсид AAV аденоассоциированного вируса 1 (AAV1), который нацелен на эпендимные клетки, причем указанный rAAV дополнительно содержит геном вектора, упакованный в капсид AAV, при этом указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, последовательность, кодирующую програнулин человека, и регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию програнулина в эпендимных клетках.

29. Способ лечения пациента-человека с поражениями головного мозга, связанными с нейродегенерацией у взрослых, вызванной гаплонедостаточностью гранулина, причем способ включает введение в центральную нервную систему рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), имеющего капсид AAV аденоассоциированного вируса 1 (AAV1), причем указанный rAAV дополнительно содержит геном вектора, упакованный в капсид AAV, при этом указанный геном вектора содержит инвертированные концевые повторы AAV, последовательность, кодирующую человеческий програнулин, и регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию програнулина.

30. Способ по любому из пп. 27-29, отличающийся тем, что пациенту вводят гAAV по любому из пп. 1-8 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 9-18.

31. Способ по любому из пп. 27-30, отличающийся тем, что пациенту вводят интратекально дозу от 1×10^{10} GC/г массы мозга до $3,33 \times 10^{11}$ GC/г массы мозга гAAV.

32. Способ по любому из пп. 27-30, отличающийся тем, что пациентом является взрослый человек, и ему вводят дозу от $1,44 \times 10^{13}$ до $4,33 \times 10^{14}$ GC rAAV.

33. Способ по любому из пп. 27-32, дополнительно включающий одно или более из (а) неинвазивного обследования пациента на предмет уменьшения накопленных повреждений сетчатки в качестве предиктора уменьшения мозговых поражений, (b) выполнения магнитно-резонансной томографии для оценки объема мозга и/или (с) измерения концентрации програнулина в СМЖ.

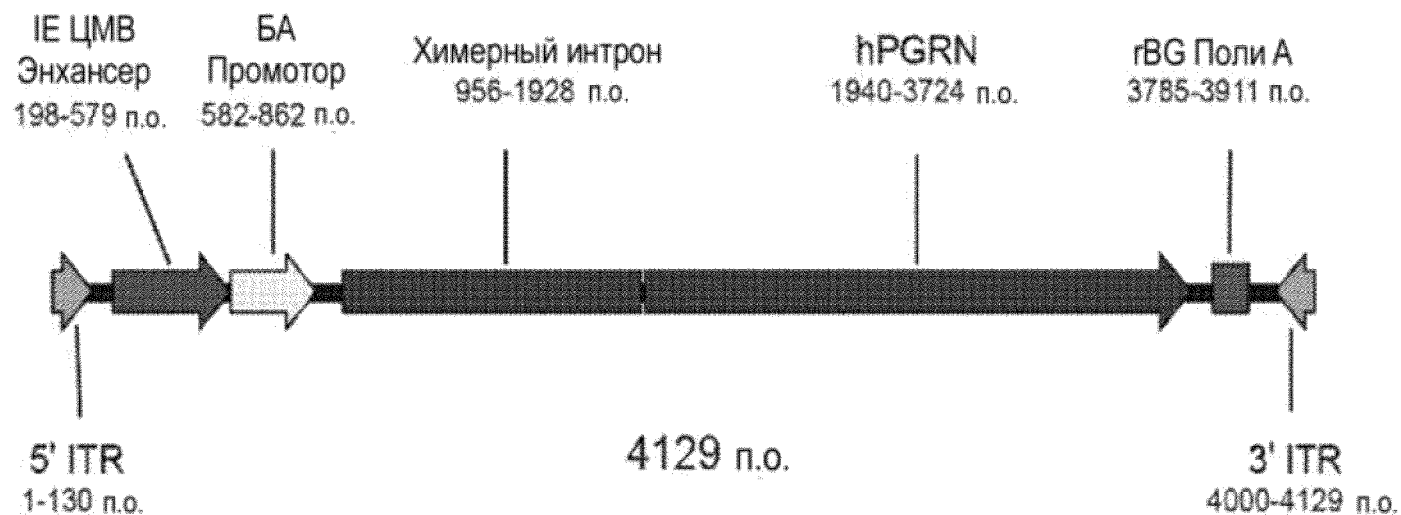
34. Способ по любому из пп. 27-33, отличающийся тем, что rAAV, содержащий кодирующую последовательность програнулина, доставляется интратекально, посредством интрацеребровентрикулярной доставки или интрапаренхимальной доставки.

35. Способ по любому из пп. 27-33, отличающийся тем, что rAAV вводят в виде однократной дозы посредством субзатылочной инъекции под контролем компьютерной томографии (КТ) в cisterna magna (intra- cisterna magna).

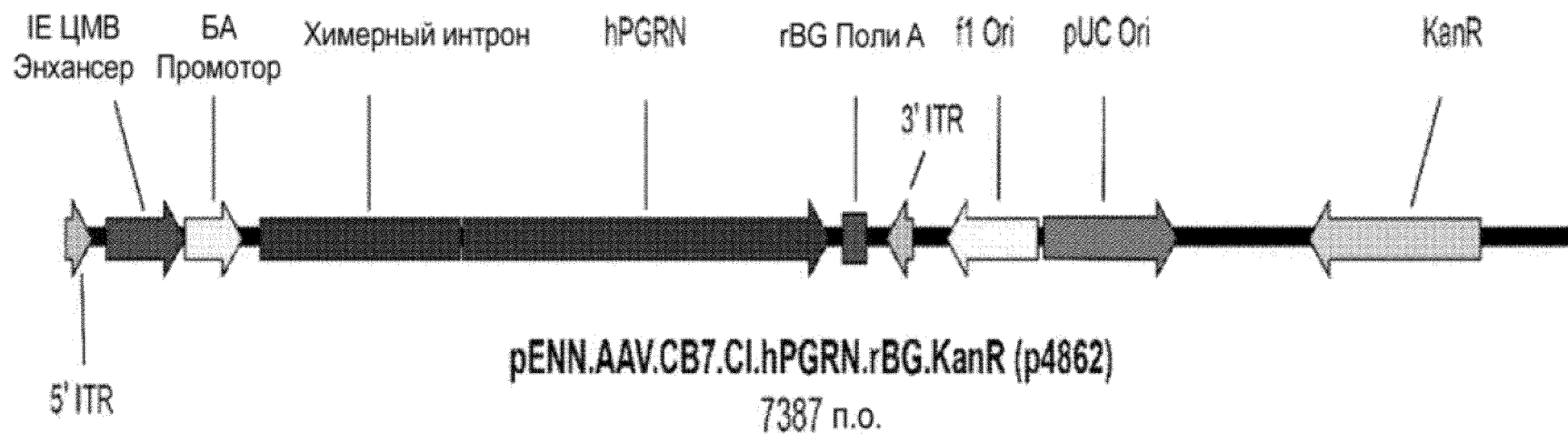
36. Способ по любому из пп. 27-35, отличающийся тем, что у пациента имеется связанная с програнулином лобно-височная деменция (ЛВД).

По доверенности

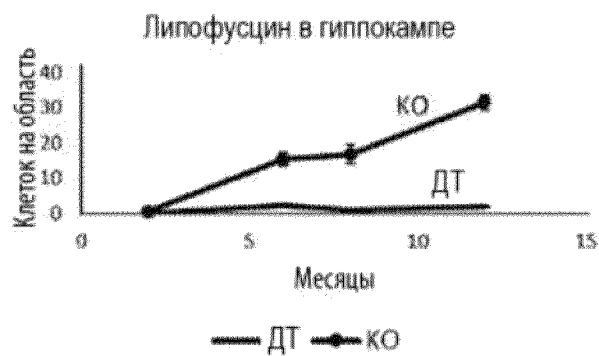
Фиг. 1



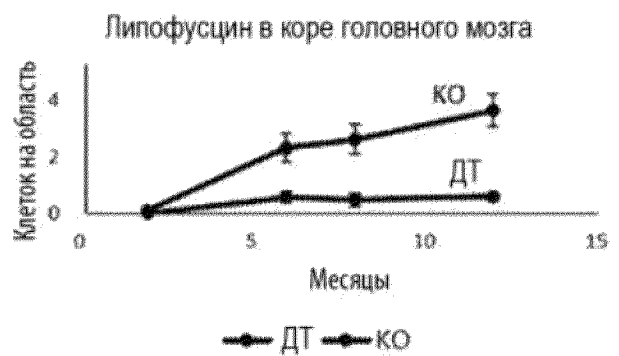
Фиг. 2



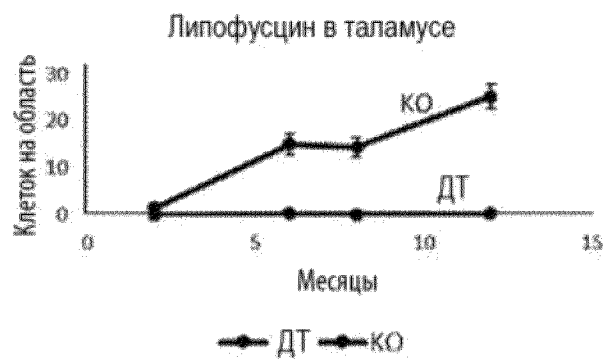
Фиг. 3А



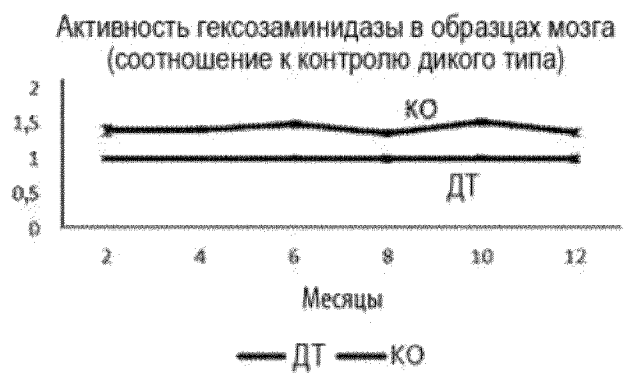
Фиг. 3В



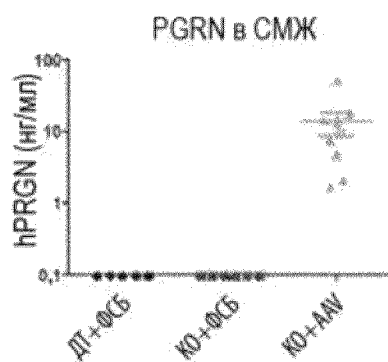
Фиг. 3С



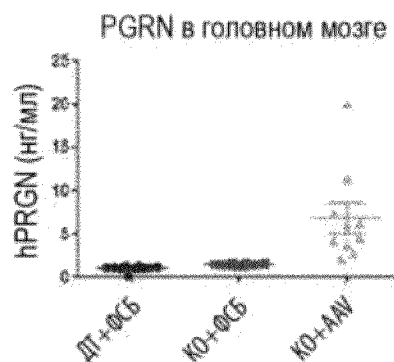
Фиг. 3D



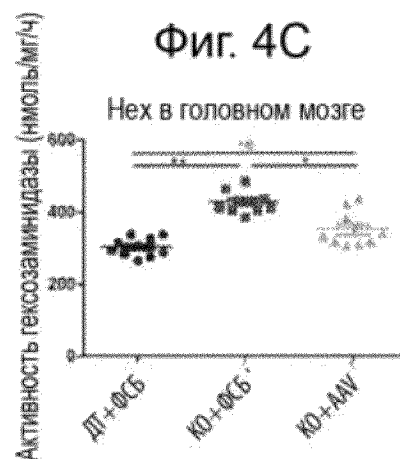
Фиг. 4А



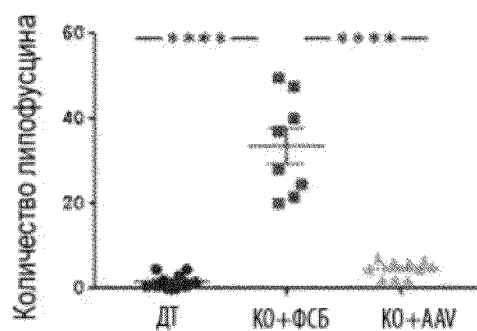
Фиг. 4В



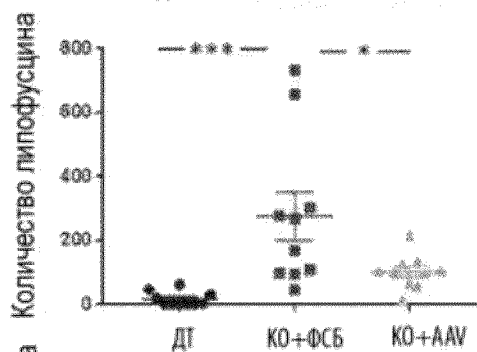
Фиг. 4С



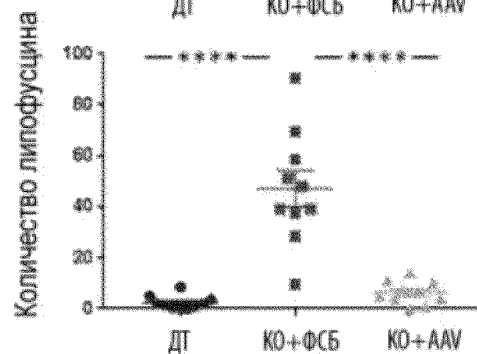
Фиг. 4D



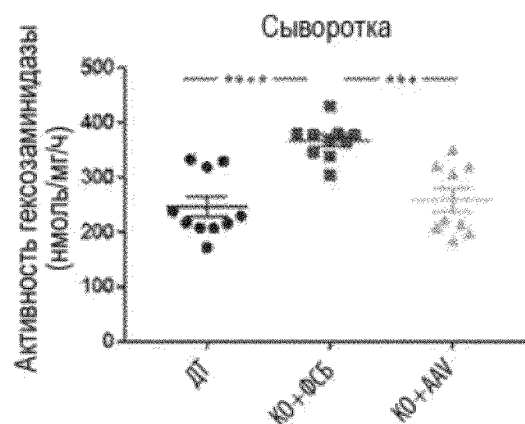
Фиг. 4Е



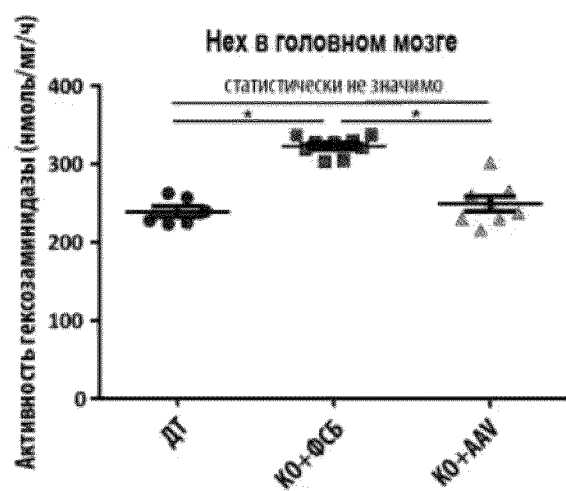
Фиг. 4F



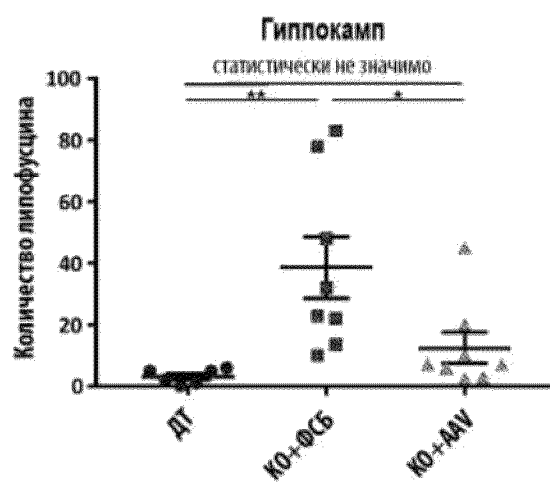
Фиг. 4G



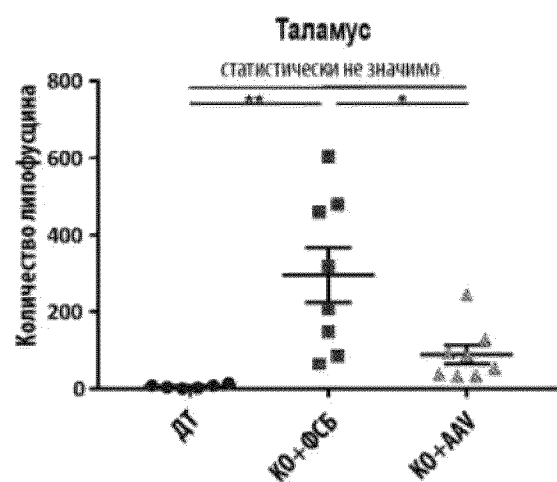
Фиг. 5А



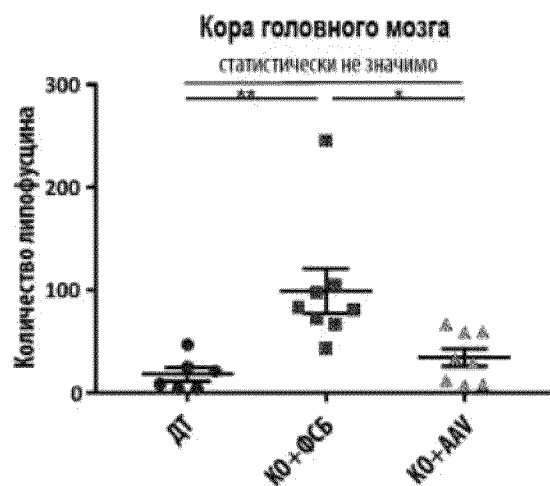
Фиг. 5В



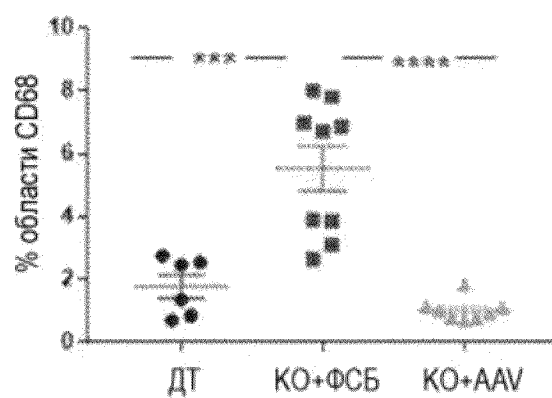
Фиг. 5С



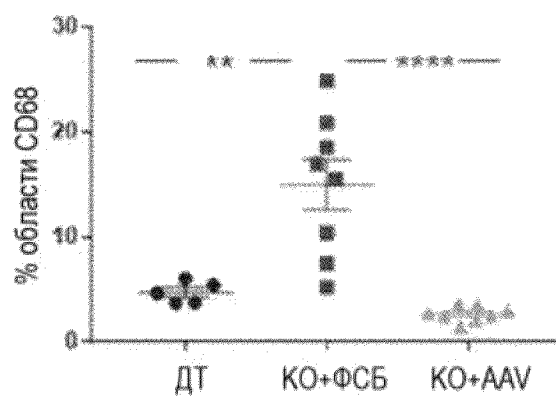
Фиг. 5D



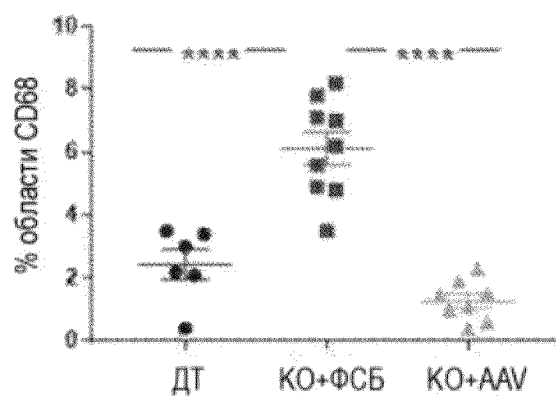
Фиг. 6А



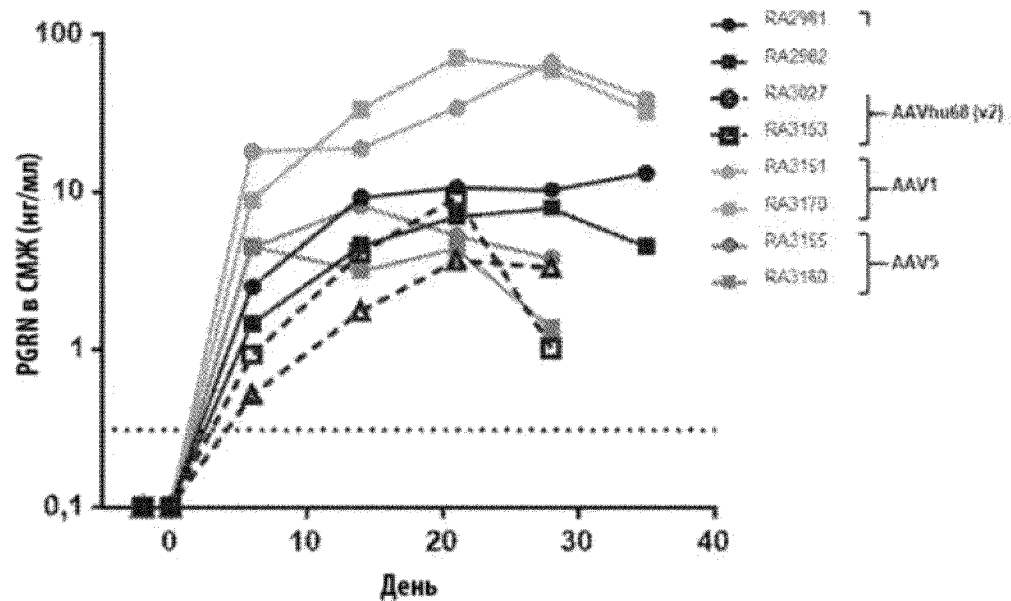
Фиг. 6В



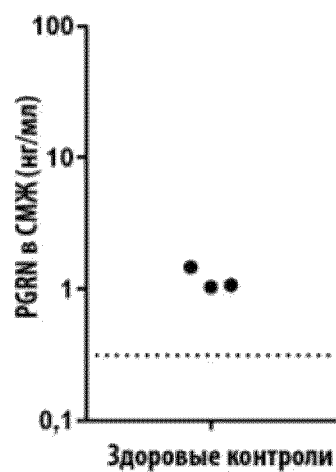
Фиг. 6С



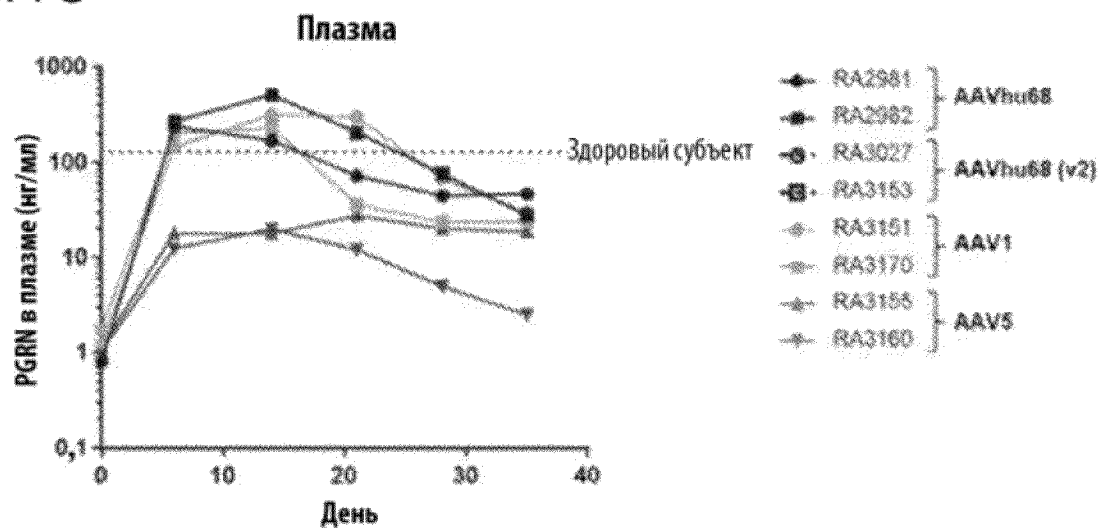
Фиг. 7А



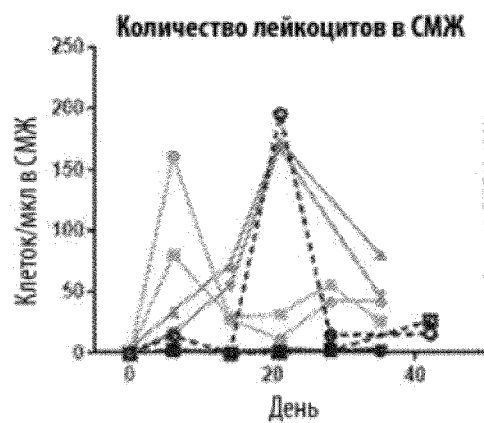
Фиг. 7В



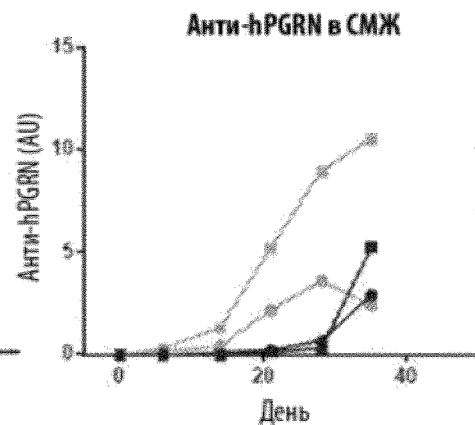
Фиг. 7С



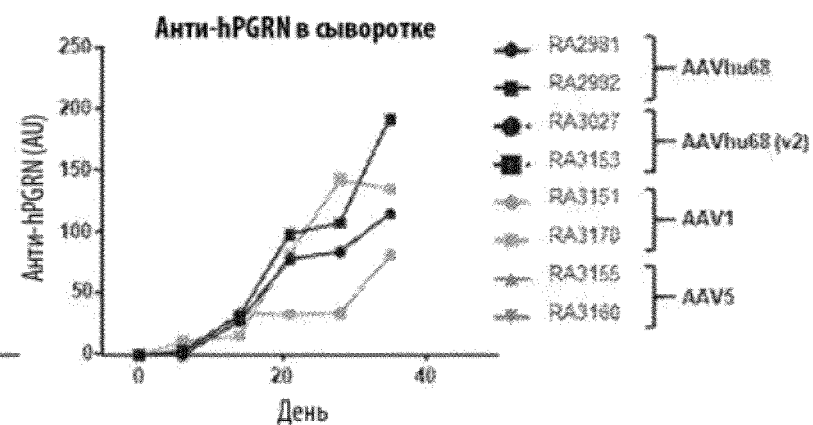
Фиг. 8А



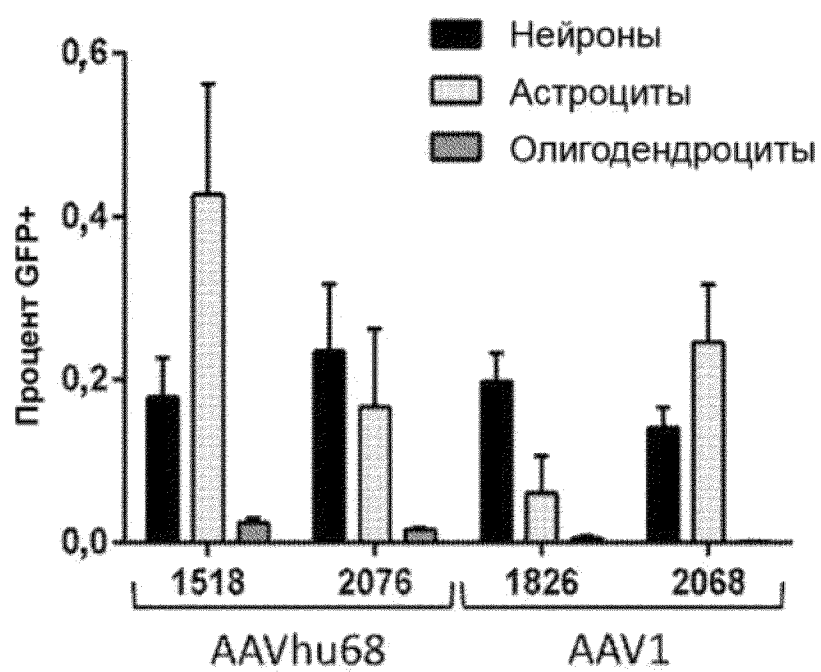
Фиг. 8В



Фиг. 8С

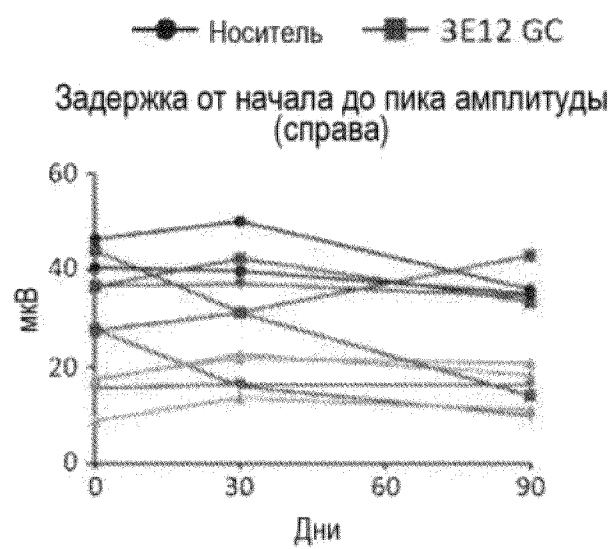


Фиг. 9

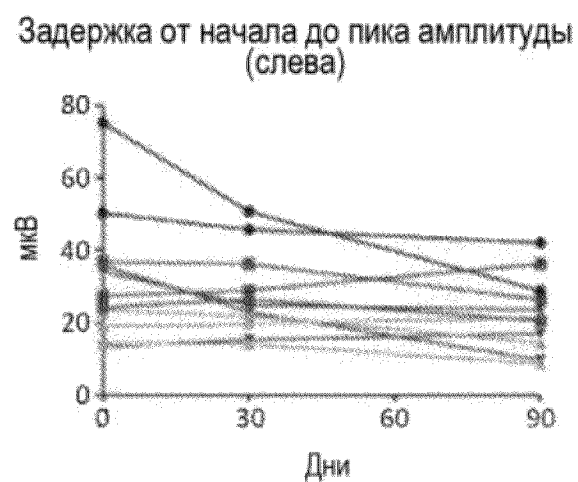


Фиг. 10

		Область						
Клеточный маркер	ID животного	1	2	3	4	5		Среднее значение
NeuN	1518	0,13	н.д.	0,205	0,34	0,167	0,049	0,178
	2076	0,106	0,227	0,258	0,528	0,053	н.д.	0,234
	1826	0,1	0,318	0,195	0,202	0,171	н.д.	0,197
	2068	0,218	н.д.	0,153	0,141	0,128	0,065	0,141
GFAP	1518	0,152	н.д.	0,202	0,914	0,39	0,476	0,427
	2076	0,011	0,064	0,235	0,511	0,011	н.д.	0,166
	1826	0,019	0,013	0,021	0,244	0,007	н.д.	0,061
	2068	0,066	н.д.	0,245	0,13	0,459	0,33	0,246
Olig2	1518	0,02	н.д.	0,03	0,04	0,009	0,023	0,024
	2076	0,02	0,023	0,011	0,013	0,013	н.д.	0,016
	1826	0	0,001	0,008	0,016	н.д.	0,001	0,005
	2068	0,002	0	н.д.	0,001	0,002	0,002	0,001



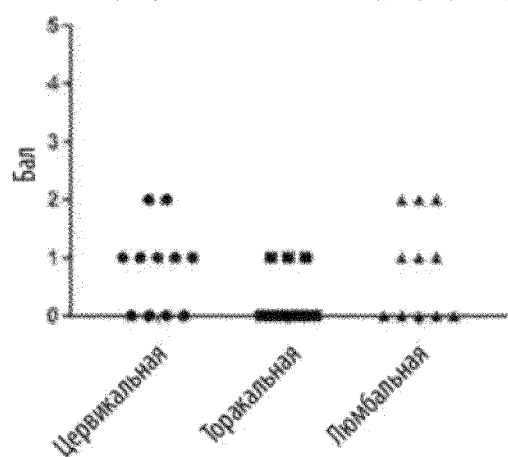
Фиг. 11А



Фиг. 11В

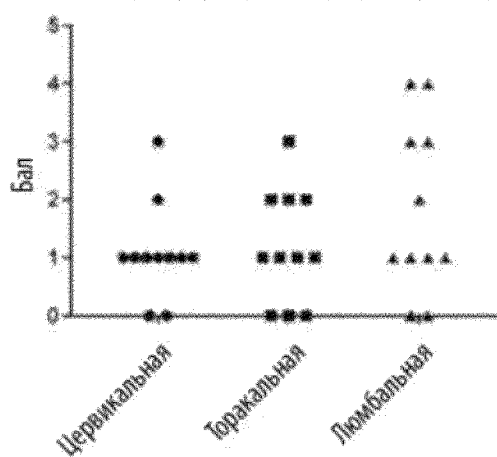
Фиг. 12А

Дегенерация ганглиев задних корешков D90



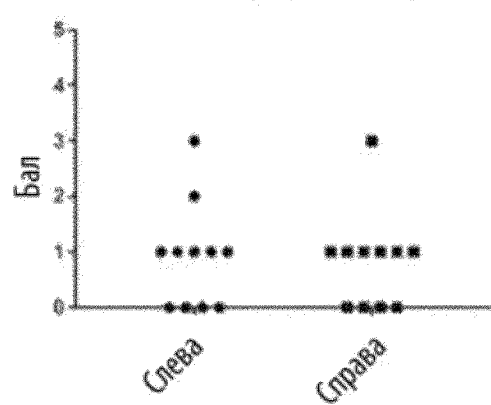
Фиг. 12В

Аксонопатия спинного мозга D90



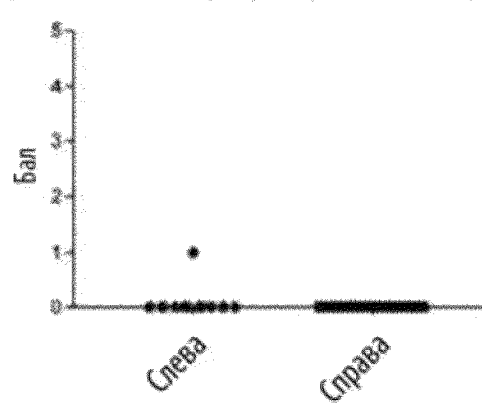
Фиг. 12С

Аксонопатия срединного нерва D90

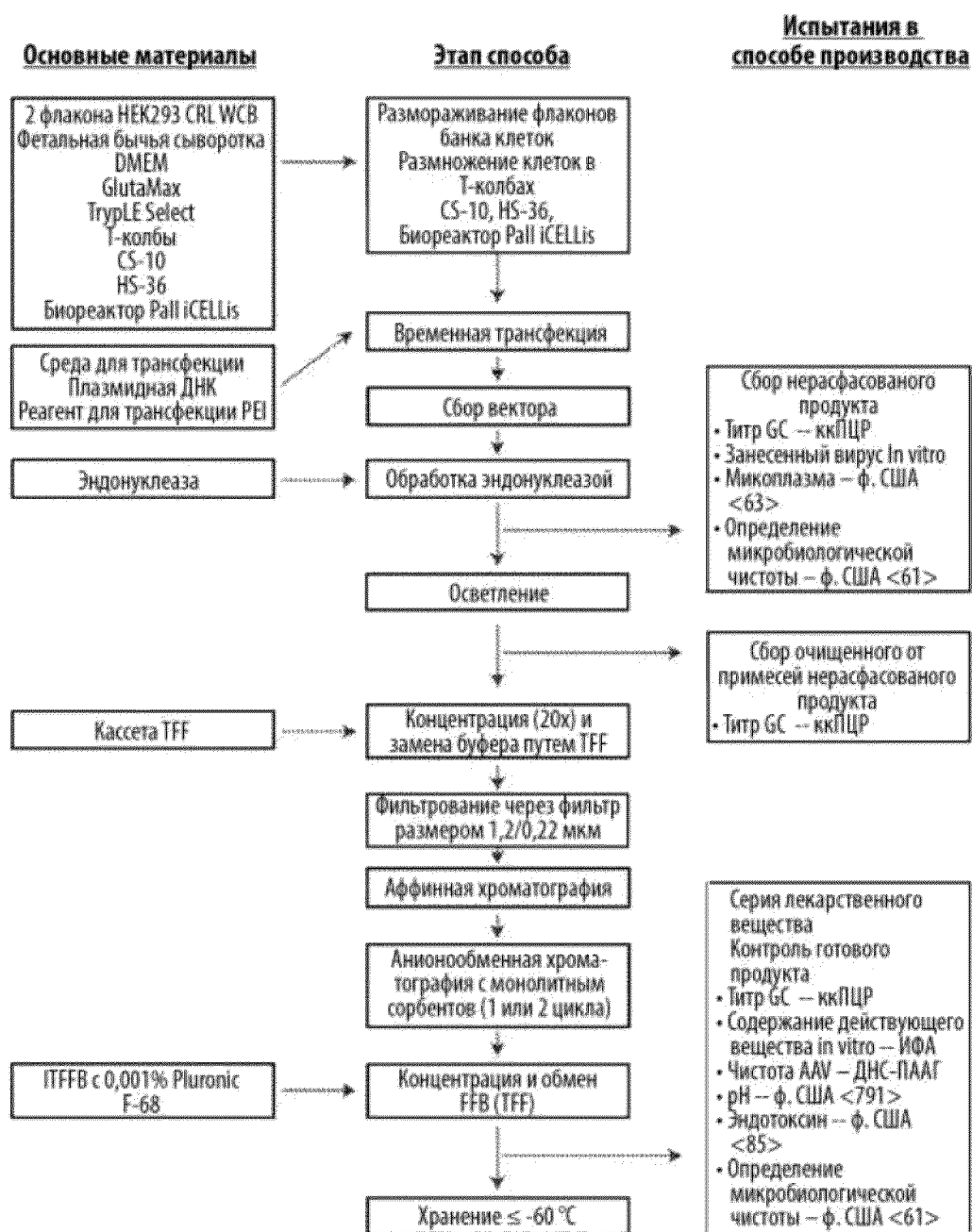


Фиг. 12D

Периаксональный фиброз срединного нерва D90



Фиг. 13



Фиг. 14

