(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192328 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.21

(22) Дата подачи заявки
2020.03.20

(51) Int. Cl. ***A61P 25/28*** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ НАЗАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ГЕНОВ И ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ, ОЛЕАМИДА ИЛИ ГЕМФИБРОЗИЛА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ НАКОПЛЕНИЯ

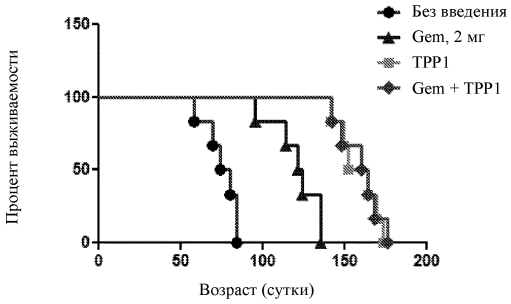
(31) **62/822,310**
(32) **2019.03.22**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/023768**
(87) **WO 2020/197967 2020.10.01**

(71) Заявитель:
РАШ ЮНИВЕРСИТИ МЕДИКАЛ СЕНТЕР (US)

(72) Изобретатель:
Пахан Калипада (US)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Здесь предложены способы лечения лизосомных болезней накопления, включающие введение генов, кодирующих лизосомальный фермент, и фармацевтического агента. Комбинирование генной терапии с фармацевтическими композициями посредством совместного введения не только дополнительно усиливает эффекты, оказываемые ими по отдельности, но также обеспечивает комплексный подход к лечению благодаря разным механизмам действия каждой отдельной композиции.



202192328 A1

202192328 A1

PCT/US2020/023768 **МПК:** ***A61P 25/28*** (2006.01) ***C12N 15/861*** (2006.01) ***A61K 48/00*** (2006.01)

КОМБИНАЦИЯ НАЗАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ГЕНОВ И ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ, ОЛЕАМИДА ИЛИ ГЕМФИБРОЗИЛА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ НАКОПЛЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/822310, поданной 22 марта 2019 г., полностью включенной в данное описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам введения генов, кодирующих лизосомальные ферменты, в комбинации с фармацевтическими агентами для лечения лизосомных болезней накопления, таких как поздняя инфантильная болезнь Баттена и болезнь Краббе.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Лизосомы представляют собой мембраносвязанные органеллы, содержащие ряд ферментов, обеспечивающих расщепление липидов, белков, углеводов и нуклеиновых кислот (De Duve and Wattiaux, 1966). Дефекты и недостаточность почти любых из этих компонентов приводит к накоплению нерасщепленных и/или частично расщепленных веществ в лизосомах, что является основой множества лизосомных болезней накопления (ЛБН) (De Duve and Wattiaux, 1966; Perez-Sala *et al.*, 2009), включая болезнь Баттена (инфантильный, поздний инфантильный и ювенильный нейрональный цероидный липофусциноз), болезнь Краббе и болезнь Тея-Сакса.

Нейрональные цероидные липофусцинозы (НЦЛ) представляют собой группу нейродегенеративных заболеваний, состоящую главным образом из типичных аутосомно-рецессивных лизосомных болезней накопления. НЦЛ могут характеризоваться такими клиническими проявлениями, как прогрессирующие умственные нарушения, когнитивные расстройства, нарушения зрения, припадки и снижение двигательной функции, которые сопровождаются гистологическими изменениями, такими как накопление аутофлуоресцентных веществ в нейронах или клетках других типов (Hachiya *et al.*, 2006). НЦЛ разделяют на несколько групп

(типы 1-10), исходя из возраста появления симптомов, ультраструктурных особенностей накапливаемых веществ и генетических изменений, уникальных для заболеваний каждого конкретного типа (Lane *et al.*, 1996, и Mole *et al.*, 2005).

Инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз (ИНЦЛ) проявляется у детей в возрасте приблизительно 18 месяцев симптомами, включающими слепоту, когнитивные дефекты, припадки и ранний летальный исход (Hawkins-Salsbury *et al.*, 2013). Дефекты гена *cln1*, кодирующего лизосомальный фермент пальмитоилпротеинтиоэстеразу-1 (PPT1), приводят к накоплению различных аутофлуоресцентных веществ-субстратов, таких как липофусцин, как в центральной нервной системе, так и в тканях (там же). Последующие дегенерация нейронов, истончение коры и атрофия головного мозга приводят к уменьшению массы головного мозга приблизительно на 50% по сравнению со здоровыми детьми (*Id.*). Способов лечения в настоящее время не существует.

Поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз (болезнь Янского-Бильшовского, ПИНЦЛ, тип 2) обычно приводит к появлению симптомов в возрасте 2-4 лет, быстро прогрессирует и заканчивается летальным исходом в возрасте от 8 до 15 лет в результате значительного уменьшения числа нейронов и других клеток (Lane *et al.*, 1996, и Sleat *et al.*, 1997). ПИНЦЛ ассоциирован с мутациями в экзоне 13 и интроне 12 гена *cln2* общей протяженностью 6,65 т.п.о., картированного на хромосоме 11p15.5. Ген *cln2* кодирует лизосомальную трипептидилтрипептидазу I (TPP-I или пепстатин-нечувствительную протеазу), белок массой 46 кДа, функционирующий в кислой среде лизосомального компартмента для удаления трипептидов с амино-конца белков (Goebel, 1995, и Vines *et al.*, 1999). Эта мутация гена *cln2* приводит к недостаточности и/или утрате функции белка TPP1, что приводит к накоплению аутофлуоресцентных липопигментов, известных как цероидный липофусцин, внутри лизосом (Goebel, 1995). В настоящее время общепринятых способов лечения или лекарственных средств для лечения данного заболевания не существует, и все подходы являются исключительно поддерживающими или симптоматическими, что указывает на потребность в новых терапевтических подходах (Chang *et al.*, 2008). Тем не менее, существуют различные варианты мутаций *cln2*, и есть сообщения о том, что у пациентов с ПИНЦЛ можно обнаружить остаточную активность TPP-I, что указывает на присутствие некоторого количества копий нормального гена *cln2* у пациентов с ПИНЦЛ (Viglio *et al.*, 2001, и Walus *et al.*, 2010).

Другим НЦЛ является ювенильная болезнь Баттена (ювенильный инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз (ЮИНЦЛ). Ген *cln3* кодирует лизосомальный трансмембранный белок, который может быть вовлечен в функционирование или деградацию синапсов (Dolisca *et al.*, 2013). Мутация *cln3*, ассоциированная с ЮИНЦЛ, характеризуется делецией 1,01 т.п.о. Как и при других НЦЛ, симптомы ЮИНЦЛ появляются у детей в возрасте от 4 до 7 лет и включают постепенную потерю зрения, снижение двигательных и когнитивных функций, припадки и ранний летальный исход.

Болезнь Краббе представляет собой редкую лизосомную болезнь накопления и является результатом повреждения миелиновой оболочки вследствие сфинголипидоза. Данная болезнь возникает вследствие мутации лизосомального фермента β-галактоцереброзидазы, приводящей к накоплению метаболитов, токсичных для клеток, и нарушению различных метаболических путей, что ведет к демиелинизации. Болезнь Краббе может проявляться в инфантильной, поздней инфантильной, ювенильной и даже взрослой формах (Pavuluri *et al.*, 2017).

Болезнь Тея-Сакса является результатом мутаций в гене *hexa*, кодирующем β-гексозаминидазу, фермент, обеспечивающий превращение ганглиозида GM2 в ганглиозид GM3 (Dersh *et al.*, 2016). Этот фермент состоит из двух субъединиц, и мутация приводит к утрате или отсутствию активности фермента, что ведет к накоплению GM2. Идентифицировано более 100 мутаций гена *hexa*, ассоциированных с болезнью Тея-Сакса (*Id.*).

Поскольку лизосомные болезни накопления возникают в результате различных генетических мутаций, ассоциированных с рядом ферментов, возможным вариантом их лечения является генная терапия. Тем не менее, доставка генов именно для лечения нейродегенеративных заболеваний сопряжена с проблемой доставки терапевтических генов в головной мозг. Механизмы доставки генов, основанные на вирусах, хорошо известны, и доставка генов может быть осуществлена, в частности, с использованием аденоассоциированных вирусных векторов благодаря низкой иммуногенности этого вируса (Shaw *et al.*, 2013). Кроме того, назальное введение этих вирусных векторов, содержащих терапевтические гены, позволяет осуществлять доставку в головной мозг. Полагают, что назальная доставка позволяет использовать преимущества транспортных систем «из носа в головной мозг» («nose-to-brain», N2B) (Djupesland, 2013), где есть несколько возможных вариантов обхода гематоэнцефалического барьера для доставки непосредственно в головной мозг. Они включают проникновение лекарственных

средств, абсорбированных в слизистой оболочке полости носа в синус и, в конечном итоге, в сонную артерию, где возможен «противоточный перенос» из венозной крови в головной мозг. Также утверждается, что одним из механизмов N2B-транспорта является лимфатический дренаж из околососудистого пространства обонятельных и тройничных нервов в центральную нервную систему (ЦНС).

Кроме того, комбинирование генной терапии с пероральным введением фармацевтических средств является еще одним действенным терапевтическим подходом, усиливающим эффекты монотерапии. Два фармацевтических агента, являющиеся кандидатами для комбинирования с генной терапией, включают коричную кислоту и олеамид. Коричная кислота является природной жирной кислотой, присутствующей в растениях и оказывающей нейропротекторные эффекты (Prorok *et al.*, 2019). Было обнаружено, что она вовлечена в активацию α-рецептора, активируемого пероксисомными пролифераторами (PPARα), для защиты дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона (там же). Различные производные коричной кислоты известны благодаря их антиоксидантному профилю и способности проходить через гематоэнцефалический барьер, что делает эти агенты идеальными для лечения нейродегенеративных расстройств (Roleira *et al.*, 2010). Олеамид является еще одной жирной кислотой с широким спектром нейрофармакологического действия. Известная эндогенная жирная кислота, олеамид, была впервые обнаружена в спинномозговой жидкости (Nam *et al.*, 2017). Она постоянно присутствует в гиппокампе, где она действует в качестве лиганда PPARα и вовлечена в индукцию сна (Pahan, 2017). Поэтому возможное применение коричной кислоты как природного фармацевтического агента и олеамида как эндогенного лиганда, присутствующего в головном мозге, в комбинации с генной терапией представляется обоснованным.

Кроме того, в нескольких исследованиях были сделаны выводы о том, что при большинстве форм НЦЛ, включая ПИНЦЛ, нейровоспаление и индукция апоптотических путей могут быть связаны с повреждением нейронов (Geraets *et al.*, 2016; Dhar *et al.*, 2002; Puranam *et al.*, 1997; Kohan *et al.*, 2011). Несмотря на то, что воспаление не является инициирующим фактором при ПИНЦЛ, постоянный воспалительный ответ, опосредованный глией, как полагают, способствует прогрессированию заболевания (Cooper *et al.*, 2015; Macauley *et al.*, 2014). Известно, что гемфиброзил, гиполипидемическое лекарственное средство, одобренное FDA, снижает уровень триглицеридов в циркулирующей крови и риск гиперлипидемии (Robins, *et al.*, 2001;

Rubins & Robins, 1992; Rubins *et al.*, 1999). Тем не менее, в ряде недавних исследований было выявлено, что, помимо своих гиполипидемических эффектов, гемфиброзил может также регулировать многие другие сигнальные пути, ответственные за воспаление, переключение Т-хелперных клеток, межклеточные контакты, миграцию, окислительный стресс и лизосомальный биогенез (Ghosh & Pahan, 2012a; Corbett *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*; 2012, Jana *et al.*, 2007; Jana & Pahan, 2012; Dasgupta *et al.*, 2007; Pahan *et al.*, 2002; Roy & Pahan, 2009; Ghosh *et al.*, 2015). Поэтому генная терапия в комбинации с гемфиброзилом также имеет значительный потенциал.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Одно воплощение, описанное здесь, представляет собой способ лечения лизосомной болезни накопления, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, первой композиции, содержащей терапевтически эффективное количество гена, кодирующего лизосомальный фермент, и второй композиции, содержащей терапевтически эффективное количество фармацевтического агента.

В одном аспекте первую композицию вводят интраназально.

В другом аспекте ген доставляют через гематоэнцефалический барьер.

В другом аспекте первую композицию вводят приблизительно один раз в 7-30 суток.

В еще одном аспекте первая композиция содержит вирусный вектор, содержащий ген, кодирующий лизосомальный фермент.

В одном аспекте вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный вектор.

В другом аспекте ген включает *ppt1*, *cln2*, *cln3*, *galc* или *hexa*.

В другом аспекте лизосомальный фермент включает пальмитоилпротеин-тиоэстеразу-1, трипептидилпептидазу 1, галактозилцерамид, баттенин или гексозаминидазу А.

В еще одном аспекте способ включает введение первой композиции, содержащей ген *ppt1*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз.

В одном аспекте способ включает введение первой композиции, содержащей ген *cln2*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз.

В другом аспекте способ включает введение первой композиции, содержащей ген *cln3*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей ювенильный нейрональный цероидный липофусциноз.

В другом аспекте способ включает введение первой композиции, содержащей ген *galc*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей болезнь Краббе.

В еще одном аспекте способ включает введение первой композиции, содержащей ген *hexa*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей болезнь Тея-Сакса.

В одном аспекте фармацевтический агент включает коричную кислоту, олеамид или фибрат.

В другом аспекте фибрат представляет собой гемфиброзил или фенофибрат.

В другом аспекте вторая композиция дополнительно содержит терапевтически эффективное количество полностью транс-ретиноевой кислоты.

В еще одном аспекте терапевтически эффективное количество фармацевтического агента при введении фармацевтического агента в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой меньше, чем при доставке фармацевтического агента в отсутствие полностью транс-ретиноевой кислоты.

В одном аспекте вторую композицию вводят перорально.

В другом аспекте вторую композицию вводят один раз в сутки.

В другом аспекте введение первой композиции и второй композиции оказывает больший терапевтический эффект у субъекта, чем введение первой композиции или второй композиции по отдельности.

В еще одном аспекте лизосомная болезнь накопления выбрана из группы, состоящей из поздней инфантильной болезни Баттена, ювенильной болезни Баттена, болезни Краббе, болезни Тея-Сакса, болезни Ниманна-Пика, болезни Фабри, болезни Фарбера и болезни Гоше.

В одном аспекте первую композицию вводят интраназально и вторую композицию вводят перорально.

В другом аспекте первую композицию вводят по меньшей мере один раз в 7 суток и вторую композицию вводят один раз в сутки.

В другом аспекте вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный вектор.

В другом аспекте ген включает *cln2*.

В другом аспекте вторая композиция содержит гемфиброзил.

В другом аспекте введение первой композиции увеличивало продолжительность жизни приблизительно на 100 суток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: интраназальная доставка аденовирусного человеческого гена Cln2 (Ad-Cln2) увеличивает продолжительность жизни мышей $Cln2^{(-/-)}$, представляющих собой животную модель поздней инфантильной болезни Баттена. Для интраназальной доставки гена мыши $Cln2^{(-/-)}$ получали 5 x 10^6 копий генома Ad-Cln2 в объеме 5 мкл два раза в неделю интраназально (по 2,5 мкл в каждую ноздрю), начиная с возраста двух недель, на протяжении четырех недель. Для введения гемфиброзила (gem) мыши получали gem (растворенный в 0,1% MeC) перорально в дозе 7,5 мг/кг массы тела в сутки, начиная с возраста шести недель. На Фиг. 1 описан процент выживаемости, показанный с использованием графика Каплана-Мейера.

Фиг. 2: интраназальная доставка аденовирусного человеческого гена Cln2 (Ad-Cln2) увеличивает продолжительность жизни мышей $Cln2^{(-/-)}$, представляющих собой животную модель поздней инфантильной болезни Баттена. Для интраназальной доставки гена, мыши $Cln2^{(-/-)}$ получали 5 x 10^6 копий генома Ad-Cln2 в объеме 5 мкл два раза в неделю интраназально (по 2,5 мкл в каждую ноздрю), начиная с возраста двух недель, на протяжении четырех недель. Для введения гемфиброзила (gem) мыши получали gem (растворенный в 0,1% MeC) перорально в дозе 7,5 мг/кг массы тела в сутки, начиная с возраста шести недель. На Фиг. 2 показано среднее время выживания в сутках. В каждой группе использовали по 6 мышей (n равно 6), включающих 3 самца и 3 самки. ***p менее 0,001; NS - незначимо.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Подразумевается, что воплощения, раскрытые здесь, не являются исчерпывающими и не ограничивают объем изобретения конкретными формами, приведенными в последующем описании. То есть, воплощения выбраны и описаны здесь в качестве примеров таким образом, чтобы другие специалисты в данной области техники могли применить изложенные в них идеи.

Настоящее изобретение относится к способам совместного введения генов, кодирующих лизосомальные ферменты, в комбинации с фармацевтическими агентами для лечения лизосомных болезней накопления, таких как поздняя инфантильная болезнь Баттена и болезнь Краббе.

Определения

Если не определено иное, все технические и научные термины, использованные здесь, имеют то же значение, в котором их обычно понимает специалист в данной области техники. В случае противоречий настоящий документ, включая определения, имеет преимущество. Ниже описаны предпочтительные методы и материалы, однако при практическом применении или испытании настоящего изобретения могут быть использованы методы и материалы, подобные описанным здесь или эквивалентные им. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие источники, упомянутые здесь, полностью включены посредством ссылки. Материалы, методы и примеры, раскрытые здесь, приведены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены ограничивать объем.

Подразумевается, что термины «содержать (содержит)», «включать (включает)», «имеющий», «имеет», «может», «содержать (содержит)» и их варианты, как они использованы здесь, представляют собой неограничивающие переходные фразы, термины или слова, не исключающие возможность дополнительных действий или структур. Если контекстом ясно не продиктовано иное, формы единственного числа включают множественное число. Настоящее изобретение также подразумевает другие воплощения, «включающие», «состоящие из» и «состоящие по существу из» воплощений или элементов, представленных здесь, независимо от того, указаны они прямо или нет.

При использовании здесь термин «интраназальный» относится к способам введения, включающим контакт с поверхностями слизистой оболочки полости носа или ингаляцию для всасывания в бронхиальных ходах легких.

При использовании здесь термин «пероральный» относится к способам введения, включающим пероральное, энтеральное, трансбуккальное, сублабиальное и сублингвальное введение через желудочный тракт.

При использовании здесь термин «лечение» или «лечить» означает облегчение симптомов, связанных с расстройством или заболеванием, или остановку дальнейшего прогрессирования или усугубления этих симптомов, или предупреждение или профилактику заболевания или расстройства. Например, в контексте данного изобретения, успешное лечение может включать предупреждение нейродегенеративного заболевания, облегчение симптомов, связанных с нейродегенеративным заболеванием, или остановку прогрессирования заболевания, такого как нейродегенеративное

заболевание. При использовании здесь контролем для оценки лечения относительно такого контроля является субъект, не получавший терапевтического агента.

Для обозначения числовых диапазонов здесь прямо подразумевается каждое промежуточное число диапазона с той же степенью точности. Например, в случае диапазона 6-9 подразумеваются, помимо 6 и 9, числа 7 и 8, а в случае диапазона 6,0-7,0 прямо подразумеваются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

Здесь предложены способы совместного введения субъекту гена, кодирующего лизосомальный фермент, и фармацевтической композиции, включающие введение терапевтически эффективного количества гена и фармацевтического агента, для лечения лизосомных болезней накопления.

Генные композиции

В одном воплощении, описанном здесь, представлены генные композиции, которые могут включать «терапевтически эффективное количество» интересующего терапевтического гена. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному, в необходимых дозах и на протяжении необходимых периодов времени, для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество терапевтического гена может быть определено специалистом в данной области техники и может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела индивида, и от способности композиции вызывать желаемый ответ у индивида. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически полезные эффекты гена превосходят любые токсические или вредные эффекты.

В одном аспекте, описанном здесь, способ доставки композиции, содержащей терапевтический ген, осуществляют посредством интраназальной доставки. Способы доставки композиций, содержащих терапевтические гены, включают любой ряд способов введения в нос, включая доставку жидких или порошковых композиций для назального введения посредством механизмов пассивной или активной доставки. В одном воплощении жидкие композиции могут быть доставлены с использованием множества механизмов, включая образование паров посредством носовой ингаляции, ручные назальные устройства и механические распылители. В другом воплощении композиции для таких механизмов доставки могут быть представлены в форме аэрозолей, содержащих пропеллент, или растворов для ингаляций без пропеллента. В

другом воплощении механические распылители могут быть ручными, газовыми или электрическими, как в случае электрических небулайзеров и аэрозольных ингаляторов. В другом воплощении порошковые композиции могут быть доставлены с использованием механических распылителей, назальных ингаляторов и небулайзеров/аэрозольных ингаляторов.

Цель интраназального введения состоит в конечной доставке терапевтического гена через гематоэнцефалический барьер в головной мозг. Безотносительно какой-либо теории, назальное введение при генной терапии позволяет использовать преимущества транспортных систем «из носа в головной мозг» («nose-to-brain», N2B) (Djupesland, 2013), где есть несколько возможных вариантов обхода гематоэнцефалического барьера для доставки непосредственно в головной мозг. Эти варианты включают проникновение лекарственных средств, абсорбированных в слизистой оболочке полости носа в синус и, в конечном итоге, в сонную артерию, где возможен «противоточный перенос» из венозной крови в головной мозг. Таким образом, в одном аспекте, описанном здесь, ген доставляют через гематоэнцефалический барьер.

В одном воплощении, описанном здесь, генную композицию, содержащую терапевтически эффективное количество гена, вводят от одного раза приблизительно в 1 сутки до одного раза приблизительно в 100 суток, от одного раза приблизительно в 2 суток до одного раза приблизительно в 90 суток, от одного раза приблизительно в 3 суток до одного раза приблизительно в 80 суток, от одного раза приблизительно в 4 суток до одного раза приблизительно в 70 суток, от одного раза приблизительно в 5 суток до одного раза приблизительно в 60 суток, от одного раза приблизительно в 6 суток до одного раза приблизительно в 50 суток, от одного раза приблизительно в 7 суток до одного раза приблизительно в 40 суток, от одного раза приблизительно в 8 суток до одного раза приблизительно в 30 суток или от одного раза приблизительно в 9 суток до одного раза приблизительно в 20 суток. В одном аспекте генную композицию вводят от одного раза приблизительно в 7 суток до одного раза приблизительно в 30 суток. В другом аспекте генную композицию вводят один раз приблизительно в 7 суток.

В одном воплощении, описанном здесь, терапевтический ген доставляют с использованием вирусного вектора. Идеальные вирусные векторы для генной терапии могут успешно инфицировать целевую клетку, проникать в ядро и поддерживать уровни экспрессии, не приводя к токсичности. Вирусные векторы могут состоять из любого

вируса, подходящего для генной терапии, включая ретровирусы или аденовирусы. Другие вирусы, подходящие для вирусных векторов, включают аденоассоциированные вирусы, лентивирусы, поксвирусы, альфавирусы и герпесвирусы. Аденоассоциированные вирусные векторы являются идеальными векторами ввиду их относительно низкой патогенности и непрерывной экспрессии. Таким образом, в одном аспекте, описанном здесь, вирусный вектор включает аденоассоциированный вирусный вектор.

В другом воплощении, описанном здесь, вирусный вектор содержит терапевтический ген, кодирующий лизосомальный фермент. Гены, кодирующие лизосомальный фермент, и связанные с ними белки включают аспартилглюкозаминидазу (*aga*), арилсульфатазу A (*arsa*), арилсульфатазу B (*arsb*), кислую церамидазу (asah1), аутофагический белок 5 (*atg5*), аутофагический белок 7 (*atg7*), пальмитоилпротеинтиоэстеразу 1 или PPT1 (*cln1*), трипептидилпептидазу 1 (*cln2*), баттенин (*cln3)*, трансмембранный белок эндоплазматического ретикулума (*cln6*), транспортный рецептор эндоплазматического ретикулума (*cln8*), цистинозин (*ctns*), катепсин A (*ctsa*), катепсин K (*ctsk*), фосфоинозитидфосфатазу (*fig4*), альфа-L-фукозидазу 1 (*fuca1*), кислую альфа-глюкозидазу (*gaa*), галактозилцерамидазу (*galc*), галактозамин-(N-ацетил)-6-сульфатазу (galns), бета-глюкоцереброзидазу (*gba*), альфа-галактозидазу A (*gla*), бета-галактозидазу 1 (*glb1*), активатор ганглиозида GM2 (*gm2a*), glcNAc-1-фосфотрансферазу (*gnptab*), N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу (*gnptg*), N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазу (*gns*), бета-глюкуронидазу (*gusb*), бета-гексозаминидазу A (*hexa*), бета-гексозаминидазу B (*hexb*), гепаран-альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазу (*hgsnat*), гиалуронидазу-1 (*hyal1*), идуронат-2-сульфатазу (*ids*), альфа-L-идуронидазу (*idua)*, лизосомальный мембранный белок 2 (l*amp2*), лизосомальную кислую липазу (*lipa*), альфа-маннозидазу (*man2b1*), бета-маннозидазу (*manba*), муколипин-1 (*mcoln1*), комплекс мишени рапамицина млекопитающих 1-го типа или комплекс механистической мишени рапамицина 1-го типа (*mtorc1*), альфа-N-ацетилгалактозаминидазу (*naga*), альфа-N-ацетилглюкозаминидазу (*naglu*), нейраминидазу 1 (*neu1*), белок Ниманна-Пика C1 (*npc1*), белок Ниманна-Пика C1 (*npc2*), белок 1, содержащий пататиноподобный фосфолипазный домен (*pnpla2*), пальмитоилпротеинтиоэстеразу 1 (*ppt1*), просапозин (*psap*), N-сульфоглюкозаминсульфогидролазу (*sgsh*), белок сиалин (*slc17a5*), регуляторный белок TOR (*slc389*), натрий/водородный обменник 6 (*slc9A6*), кислую

сфингомиелиназу (*smpd1*), формилглицинобразующий фермент (*sumf1*) или трипептидилпептидазу 1 (*tpp1*). В одном аспекте, описанном здесь, терапевтический ген включает *ppt1*, *cln2*, *cln3*, *galc* или *hexa*.

Лизосомальные ферменты, приводящие к лизосомным болезням накопления, разнообразны. Примеры лизосомальных ферментов, вовлеченных в лизосомные болезни накопления, включают α-N-ацетилгалактозаминидазу, кислую церамидазу, кислую мальтазу, кислую сфингомиелиназу, кислую β-глюкозидазу, адипоцитарную триглицеридлипазу, арилсульфатазу A, арилсульфатазу B, ATG5, ATG7, баттенин, катепсин K, цистинозин, эпидидимальный секреторный белок HE1, галактозамин-6-сульфатсульфатазу, галактозилцерамид, гамма-субъединицу N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы, гликозиласпарагиназу, белок-активатор GM2, гепаран-N-сульфатазу, гексозаминидазу A и B, гиалуронидазу, идуронат-2-сульфатазу, лизосомальную кислую липазу, лизосомальную β-маннозидазу, лизосомальный мембранный белок-2, натрий/водородный обменник, селективный в отношении одновалентного натрия (NHE), mTORC1, муколипин-1, N-α-ацетилглюкозаминидазу, нейраминидазу, пальмитоилпротеинтиоэстеразу-1, PIP(2)-5-фосфатазу, защитный белок/катепсин A, сапозин B, сапозин C, сиалин, SLC38A9, сульфатаза-модифицирующий фактор-1, трипептидилпептидазу 1, α-галактозидазу, α-L-фукозидазу, α-L-идуронидазу, α-маннозидазу или β-глюкозидазу. В одном аспекте, описанном здесь, лизосомальный фермент включает пальмитоилпротеинтиоэстеразу-1, трипептидилпептидазу 1, галактозилцерамид, баттенин или гексозаминидазу A.

Интраназальная доставка терапевтических генов для направленного воздействия на головной мозг идеальна для лечения нейродегенеративных расстройств и лизосомных болезней накопления. Нейродегенеративное расстройство может включать болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Паркинсона, включая заболевания, сопровождающиеся паркинсонизмом, такие как мультисистемная атрофия (МСА), рассеянный склероз (РС), прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), кортикобазальная дегенерация (КБД) или деменция с тельцами Леви (ДТЛ). Нейродегенеративное заболевание может быть вызвано лизосомной болезнью накопления. Болезнь Баттена является наиболее распространенной формой из группы расстройств, называемых нейрональным цероидным липофусцинозом (НЦЛ), включая инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз (ИНЦЛ), поздний инфантильный нейрональный цероидный

липофусциноз (ПИНЦЛ) и ювенильный нейрональный цероидный липофусциноз (ЮИНЦЛ). Лизосомная болезнь накопления может также представлять собой, например, болезнь Тея-Сакса, болезнь Фабри, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Краббе, болезнь Гоше, синдром Хантера, альфа-маннозидоз, аспартилглюкозаминурию, болезнь накопления эфиров холестерина, хронический дефицит гексозаминидазы А, цистиноз, болезнь Данона, болезнь Фарбера, фукозидоз или галактосиалидоз. В одном аспекте лизосомная болезнь накопления включает инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз (ИНЦЛ), поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз (ПИНЦЛ) и ювенильный нейрональный цероидный липофусциноз (ЮИНЦЛ) или болезнь Краббе. В одном аспекте, описанном здесь, лизосомная болезнь накопления включает позднюю инфантильную болезнь Баттена, ювенильную болезнь Баттена, болезнь Краббе, болезнь Тея-Сакса, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Фабри, болезнь Фарбера и болезнь Гоше.

В другом аспекте, описанном здесь, ген *ppt1* кодирует фермент, вовлеченный в инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз. В другом аспекте ген *cln2* кодирует фермент, вовлеченный в поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз. В другом аспекте ген *cln3* кодирует фермент, вовлеченный в ювенильный нейрональный цероидный липофусциноз. В еще одном аспекте ген *galc* кодирует фермент, вовлеченный в болезнь Краббе. В другом аспекте ген *hexa* кодирует фермент, вовлеченный в болезнь Тея-Сакса.

Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции могут содержать «терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» фармацевтического агента. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному, в необходимых дозах и на протяжении необходимых периодов времени, для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество композиции может быть определено специалистом в данной области техники и может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела индивида, и от способности композиции вызывать желаемый ответ у индивида. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически полезные эффекты агента превосходят любые токсические или вредные эффекты. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному, в необходимых дозах и на протяжении

необходимых периодов времени, для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, поскольку профилактическую дозу используют у субъектов до начала заболевания или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

Фармацевтический агент может представлять собой любой активный ингредиент, оказывающий терапевтический эффект для лечения лизосомных болезней накопления. Агенты могут быть природными или синтетическими. Примеры природных агентов включают природные насыщенные жирные кислоты и их производные, например, стеариновую кислоту, пальмитиновую кислоту, коричную кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту и тому подобное. Примеры природных ненасыщенных жирных кислот и их производных включают олеиновую кислоту, олеамид, линолевую кислоту, линоленовую кислоту и рицинолеиновую кислоту. В одном аспекте, описанном здесь, фармацевтический агент представляет собой коричную кислоту или олеамид.

Примеры синтетических агентов в качестве фармацевтического агента включают, например, гиполипидемическое лекарственное средство, такое как фибрат. Неограничивающие примеры фибратов включают гемфиброзил, фенофибрат, клофибрат, безафибрат, ципрофибрат и клинофибрат. Гемфиброзил (5-(2,5-диметилфенокси)-2,2-диметилпентановая кислота) имеется в продаже под товарным знаком Lopid® от Pfizer. Фенофибрат (1-метилэтиловый эфир 2-(4-(4-хлорбензоил)фенокси)-2-метилпропановой кислоты) имеется в продаже под товарным знаком Tricor® от Abbvie. Дополнительные фибраты включают клофибрат (этиловый эфир 2-(4-хлорфенокси)-2-метилпропановой кислоты), безафибрат (2-(4-(2-(4-хлорбензоиламино)этил)фенокси)-2-метилпропановая кислота), ципрофибрат (2-(4-(2,2-дихлорциклопропил)фенокси)-2-метилпропановая кислота) и клинофибрат (2-[4-[1-[4-(2-карбоксибутан-2-илокси)фенил]циклогексил]фенокси]-2-метилбутановая кислота). В одном аспекте, описанном здесь, фармацевтический агент представляет собой фибрат. В одном аспекте, описанном здесь, фармацевтический агент представляет собой гемфиброзил или фенофибрат.

Агент может быть включен в фармацевтические композиции, подходящие для введения субъекту (такому как пациент, который может представлять собой человека или пациента, не являющегося человеком).

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать другие терапевтически эффективные агенты. В одном аспекте, описанном здесь,

фармацевтическая композиция дополнительно содержит терапевтически эффективное количество полностью транс-ретиноевой кислоты. Известно, что полностью транс-ретиноевая кислота вовлечена в когнитивную активность, и предполагают, что она уменьшает окислительный стресс, ассоциированный с болезнью Альцгеймера (Lee *et al.*, 2009). Поэтому введение полностью транс-ретиноевой кислоты с фармацевтическим агентом и терапевтическим геном может дополнительно усилить терапевтический эффект у субъекта, по сравнению с введением полностью транс-ретиноевой кислоты, фармацевтического агента или терапевтического гена по отдельности. В другом аспекте, описанном здесь, терапевтически эффективное количество фармацевтического агента при введении фармацевтического агента в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой меньше, чем при доставке фармацевтического агента в отсутствие полностью транс-ретиноевой кислоты.

Фармацевтические композиции могут содержать фармацевтически приемлемые носители. При использовании здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает нетоксичный инертный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий агент или вспомогательный компонент композиции любого типа. Некоторыми примерами веществ, которые могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей, являются: сахара, такие как, без ограничения, лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как, без ограничения, кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как, без ограничения, карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразная трагакантовая камедь; солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как, без ограничения, масло какао и воски для суппозиториев; масла, такие как, без ограничения, арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как, без ограничения, этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатные буферные растворы; кроме того, по усмотрению специалиста, изготавливающего композицию, в ней могут также присутствовать другие нетоксичные совместимые смазывающие агенты, такие как, без ограничения, лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, разделительные агенты, агенты для нанесения покрытий, подсластители, корригенты и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты.

Способы лечения неврологических заболеваний, таких как поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз, могут включать любой ряд способов введения фармацевтического агента или фармацевтических композиций агента. В одном аспекте, описанном здесь, фармацевтическую композицию вводят с генной композицией.

В другом аспекте, описанном здесь, фармацевтическую композицию вводят перорально. Пероральное введение может включать таблетки, пилюли, драже, твердые и мягкие желатиновые капсулы, гранулы, пеллеты, водные, липидные, масляные или другие растворы, эмульсии, такие как эмульсии типа «масло в воде», липосомы, водные или масляные суспензии, сиропы, эликсиры, твердые эмульсии, твердые дисперсии или диспергируемые порошки. Для изготовления фармацевтических композиций для перорального введения агент может быть смешан с широко известными и используемыми адъювантами и эксципиентами, такими как, например, аравийская камедь, тальк, крахмал, сахара (такие как, например, маннитоза, метилцеллюлоза, лактоза), желатин, поверхностно-активные агенты, стеарат магния, водные или неводные растворители, парафиновые производные, поперечно-сшивающие агенты, диспергирующие агенты, эмульгаторы, смазывающие вещества, консерванты, корригенты (например эфирные масла), усилители растворимости (например бензилбензоат или бензиловый спирт) или усилители биодоступности (например Gelucire™). В фармацевтической композиции агент может также быть диспергирован в композиции микрочастиц, например, наночастиц.

В одном воплощении терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции вводят от одного раза приблизительно в 1 сутки до одного раза приблизительно в 100 суток, от одного раза приблизительно в 2 суток до одного раза приблизительно в 90 суток, от одного раза приблизительно в 3 суток до одного раза приблизительно в 80 суток, от одного раза приблизительно в 4 суток до одного раза приблизительно в 70 суток, от одного раза приблизительно в 5 суток до одного раза приблизительно в 60 суток, от одного раза приблизительно в 6 суток до одного раза приблизительно в 50 суток, от одного раза приблизительно в 7 суток до одного раза приблизительно в 40 суток, от одного раза приблизительно в 8 суток до одного раза приблизительно в 30 суток или от одного раза приблизительно в 9 суток до одного раза приблизительно в 20 суток. В другом воплощении, описанном здесь, фармацевтическую композицию вводят от двух раз приблизительно в 1 сутки до двух раз

приблизительно в 100 суток, от двух раз приблизительно в 2 суток до двух раз приблизительно в 90 суток, от одного раза приблизительно в 3 суток до одного раза приблизительно в 80 суток, от одного раза приблизительно в 4 суток до одного раза приблизительно в 70 суток, от одного раза приблизительно в 5 суток до одного раза приблизительно в 60 суток, от одного раза приблизительно в 6 суток до одного раза приблизительно в 50 суток, от одного раза приблизительно в 7 суток до одного раза приблизительно в 40 суток, от одного раза приблизительно в 8 суток до одного раза приблизительно в 30 суток или от одного раза приблизительно в 9 суток до одного раза приблизительно в 20 суток. В одном аспекте, описанном здесь, фармацевтическую композицию вводят один раз в сутки.

Комбинированная терапия

Комбинирование генной терапии с фармацевтическими композициями посредством совместного введения не только дополнительно усиливает эффекты, оказываемые ими по отдельности, но также обеспечивает комплексный подход к лечению благодаря разным механизмам действия каждой отдельной композиции. Это позволяет не только восстанавливать функцию фермента, но также наращивать популяцию функциональных ферментов. Таким образом, в одном аспекте, описанном здесь, доставка генов приводит к восстановлению функций лизосом, а фармацевтический агент увеличивает количество лизосом. В другом аспекте, описанном здесь, совместное введение первой композиции и второй композиции оказывает больший терапевтический эффект у субъекта, чем введение первой композиции или второй композиции по отдельности. В некоторых аспектах возможны доставка генной композиции с одним интервалом и доставка фармацевтической композиции со вторым интервалом, отличным от первого. В некоторых аспектах частота доставки генной композиции может быть меньше частоты доставки фармацевтической композиции. В качестве неограничивающего примера, возможны доставка генной композиции один раз в неделю и доставка фармацевтической композиции один раз в сутки. Для комбинированной терапии могут также быть использованы другие схемы комбинированного введения.

Настоящее изобретение имеет множество аспектов, иллюстрируемых следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

Исследования проводят для оценки эффектов интраназальной генной терапии в комбинации с фармацевтическими композициями на животных моделях нейродегенеративных расстройств.

Генные и фармацевтические композиции. С использованием аденоассоциированных вирусных векторов изготавливают генные композиции, содержащие ген *ppt1*, *cln2*, *cln3*, *galc* или *hexa.* Используют пероральные композиции с гемфиброзилом, коричной кислотой или олеамидом.

Распыление. В некоторых аспектах для интраназальной доставки используют распыление, но могут также быть использованы другие интраназальные методы, такие как, без ограничения, носовые капли, мази, аэрозольные устройства и аэрозоли под давлением. Для подачи воздуха для распыления используют Buxco Inhalation Tower All-In-One Controller от DSI™ (Фиг. 1A). Камеру для воздействия на все тело снабжают ультразвуковым небулайзером Aeroneb® (Фиг. 1B), в который подается воздух из насоса обводного потока фирмы Buxco. Мыши получают генную композицию через небулайзер в соответствующих дозах (солюбилизированных в 100 мкл двойной дистиллированной воды на мышь) на протяжении 3 мин. Контрольная группа мышей также получает 100 мкл воды через небулайзер.

Пример 1: Инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз

Проведение интраназальной генной терапии с пероральным введением гемфиброзила, коричной кислоты или олеамида у мышей ppt1$^{(-/-)}$ с ИНЦЛ. В различных группах введения используют животных ppt1$^{(-/-)}$, а в качестве контроля дикого типа (WT) используют мышей ppt1$^{(+/+)}$ того же возраста и пола с теми же условиями содержания. Мыши получают композицию для генной терапии и фармацевтическую композицию, выбранную из группы, состоящей из гемфиброзила, коричной кислоты и олеамида, а контрольная группа получает только носитель.

Мыши ppt1$^{(-/-)}$ и контрольные животные получают AAV1-PPT1 (2 мкл, содержащие 2×10^6 копий генома на мышь) интраназально один раз в неделю с пероральным введением коричной кислоты (25 мг/кг массы тела/сутки), олеамида (5 мг/кг массы тела/сутки) или гемфиброзила (8 мг/кг массы тела/сутки) один раз в сутки, после чего фиксируют продолжительность жизни и проводят мониторинг накопления веществ в головном мозге.

Пример 2: Ювенильная болезнь Баттена

Мыши $Cln3^{(-/-)}$ получают AAV1-CLN3 (2 мкл, содержащие 2 x 10^6 копий генома на мышь) интраназально один раз в неделю с пероральным введением коричной кислоты (25 мг/кг массы тела/сутки), олеамида (5 мг/кг массы тела/сутки) или гемфиброзила (8 мг/кг массы тела/сутки) один раз в сутки, после чего фиксируют продолжительность жизни и проводят мониторинг накопления веществ в головном мозге.

Пример 3: Болезнь Краббе

Мыши $Galc^{(-/-)}$ получают AAV1-GALC (2 мкл, содержащие 2 x 10^6 копий генома на мышь) интраназально один раз в неделю с пероральным введением коричной кислоты (25 мг/кг массы тела/сутки), олеамида (5 мг/кг массы тела/сутки) или гемфиброзила (8 мг/кг массы тела/сутки) один раз в сутки, после чего фиксируют продолжительность жизни и проводят мониторинг накопления веществ в головном мозге.

Пример 4: Болезнь Тея-Сакса

Мыши $Hexa^{(-/-)}$ получают AAV1-HEXA (2 мкл, содержащие 2 x 10^6 копий генома на мышь) интраназально один раз в неделю с пероральным введением коричной кислоты (25 мг/кг массы тела/сутки), олеамида (5 мг/кг массы тела/сутки) или гемфиброзила (8 мг/кг массы тела/сутки) один раз в сутки, после чего фиксируют продолжительность жизни и проводят мониторинг накопления веществ в головном мозге.

Пример 5: Поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз (ПИНЦЛ)

Интраназальную доставку генов изучали в качестве эффективного варианта лечения фатальных лизосомных болезней накопления. Была использована мышиная модель позднего инфантильного нейронального цероидного липофусциноза (ПИНЦЛ), редкого нейродегенеративного заболевания, вызываемого мутациями гена *Cln2*, приводящими к дефициту или утрате функции фермента трипептидилпептидазы 1 (TPP1).

Аденовирусный вектор с человеческим геном *Cln2* (Ad-Cln2) доставляли мышам $Cln2^{-/-}$ в возрасте двух недель интраназальным путем введения (5 x 10^6 копий генома Ad-Cln2 в объеме 5 мкл два раза в неделю; по 2,5 мкл в каждую ноздрю). После 4 недель интраназальной генной терапии одну группу мышей (n равно 6) оставляли без введения, а другой группе мышей (n равно 6) перорально вводили гемфиброзил в дозе 7,5 мг/кг массы тела/сутки. Таким образом, одной группе мышей $Cln2^{-/-}$, не получавших Ad-Cln2, также перорально вводили гемфиброзил.

Было обнаружено, что введение гемфиброзила существенно увеличивало продолжительность жизни мышей $Cln2^{-/-}$ (Фиг. 1-2). Тем не менее, интраназальная доставка гена два раза в неделю на протяжении четырех недель сама по себе увеличивала продолжительность жизни мышей $Cln2^{-/-}$ значительно эффективнее, чем гемфиброзил (Фиг. 1-2). Тем не менее, интраназальная доставка гена два раза в неделю на протяжении четырех недель сама по себе увеличивала продолжительность жизни мышей $Cln2^{-/-}$ значительно эффективнее, чем гемфиброзил (Фиг. 1-2). В противоположность этому, пероральное введение гемфиброзила не приводило к дополнительному увеличению продолжительности жизни мышей $Cln2^{-/-}$, получавших Ad-Cln2 интраназально (Фиг. 1-2).

Все публикации, патенты и заявки на патенты, процитированные в данном описании, включены сюда посредством ссылки применительно к тем идеям, в связи с которыми они процитированы.

Конкретные наблюдаемые ответы могут варьировать в соответствии с и в зависимости от конкретного типа используемой композиции и применяемого способа введения, и практическое применение настоящего изобретения подразумевает такие ожидаемые вариации или различия получаемых результатов.

Несмотря на то, что здесь подробно показаны и описаны конкретные воплощения настоящего изобретения, изобретение не ограничено ими. Представленные выше подробные описания приведены исключительно в качестве примеров настоящего изобретения, и их не следует трактовать как составляющие какое-либо ограничение изобретения. Специалистам в данной области техники будут очевидны модификации, и подразумевается, что все модификации, не выходящие за пределы сущности изобретения, включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

Chang, M., Cooper, J. D., Sleat, D. E., Cheng, S. H., Dodge, J. C., Passini, M. A., Lobel, P.,and Davidson, B. L. (2008) *Mol Ther* **16**, 649-656.

Cooper, J. D., Tarczyluk, M. A. and Nelvagal, H. R. (2015) Towards a new understanding of NCL pathogenesis. *Biochim Biophys Acta,* **1852,** 2256-2261.

Corbett, G. T., Gonzalez, F. J. and Pahan, K. (2015) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **112,** 8445-8450.

Dasgupta, S., Roy, A., Jana, M., Hartley, D. M. and Pahan, K. (2007) Gemfibrozil ameliorates relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Mol Pharmacol,* **72,** 934-946.

De Duve, C. and Wattiaux, R. (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol,* **28,** 435-492.

Dersh, D., Iwamoto, Y., and Argon, Y., *Mol Biol Cell* (2016) Dec 1; 27(24): 3813–3827.

Djupesland, P.G. (2013) Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective—a review. *Drug Deliv Transl* Res. **3(1)**, 42–62.

Dhar, S., Bitting, R. L., Rylova, S. N., Jansen, P. J., Lockhart, E., Koeberl, D. D., Amalfitano, A. and Boustany, R. M. (2002) Flupirtine blocks apoptosis in batten patient lymphoblasts and in human postmitotic CLN3- and CLN2-deficient neurons. *Ann Neurol,* **51,** 448-466.

Dolisca, S.B., Mehta, M., Pearce, D.A., Mink, J. W., Maria, B. L., *J Child Neurol* (2013) Sep; **28(9)**: 1074–1100.

Food and Drug Administration-approved lipid-lowering drugs, up-regulate tripeptidyl-peptidase 1 in brain cells via peroxisome proliferator-activated receptor alpha: implications for late infantile Batten disease therapy. *J Biol Chem,* **287,** 38922-38935.

Geraets, R. D., Koh, S., Hastings, M. L., Kielian, T., Pearce, D. A. and Weimer, J. M. (2016) Moving towards effective therapeutic strategies for Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Orphanet J Rare Dis,* **11,** 40.

Goebel, H. H. (1995) *J Child Neurol* **10**, 424-437.

Ghosh, A., Jana, M., Modi, K., Gonzalez, F. J., Sims, K. B., Berry-Kravis, E. and Pahan, K. (2015) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces lysosomal biogenesis in brain cells: implications for lysosomal storage disorders. *J Biol Chem,* **290,** 10309-10324.

Ghosh, A. and Pahan, K. (2012a) Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, induces suppressor of cytokine signaling 3 in glial cells: implications for neurodegenerative disorders. *J Biol Chem,* **287,** 27189-27203.

Hachiya, Y., Hayashi, M., Kumada, S., Uchiyama, A., Tsuchiya, K., and Kurata, K. (2006) Acta Neuropathol **111**, 168-177.

Hawkins-Salsbury, J.A., Cooper, J.D., and Sands, M.S., (2013) *Biochim Biophys Acta* 1832(**11**): 1906–1909.

Jana, M. and Pahan, K. (2012) Gemfibrozil, a lipid lowering drug, inhibits the activation of primary human microglia via peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Neurochem Res,* **37,** 1718-1729.

Kohan, R., Cismondi, I. A., Oller-Ramirez, A. M., Guelbert, N., Anzolini, T. V., Alonso, G., Mole, S. E., de Kremer, D. R. and de Halac, N. I. (2011) Therapeutic approaches to the challenge of neuronal ceroid lipofuscinoses. *Curr Pharm Biotechnol,* **12,** 867-883.

Lane, S. C., Jolly, R. D., Schmechel, D. E., Alroy, J., and Boustany, R. M. (1996) *Neurochem* **67**, 677-683.

Lee, H. P., Casadesus, G., Zhu, X., Lee, H., Perry, G., Smith, M.A., Gustaw-Rothenberg, K. and Lerner, A. (2009) E*xpert Rev Neurother*. 9(**11**): 1615–1621.

Macauley, S. L., Wong, A. M., Shyng, C. *et al.* (2014) An anti-neuroinflammatory that targets dysregulated glia enhances the efficacy of CNS-directed gene therapy in murine infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurosci,* **34,** 13077-13082.

Mole, S. E., Williams, R. E., and Goebel, H. H. (2005) *Neurogenetics* **6**, 107-126.

Nam, H.Y., Na, E. J., Lee, E., Kwon, Y., and K. H.J., *Front Pharmacol.* (2017); **8**: 817.

Pahan, K., *Improvement of Brain Function by a Lipid-Lowering Factor,* (2017) https://www.rush.edu/sites/default/files/2017RushNeuroscienceReview.pdf#page=20

Pahan, K. (2006) Lipid-lowering drugs. *Cell Mol Life Sci,* **63,** 1165-1178.

Pahan, K., Jana, M., Liu, X., Taylor, B. S., Wood, C. and Fischer, S. M. (2002) Gemfibrozil, a lipidlowering drug, inhibits the induction of nitric-oxide synthase in human astrocytes. *J Biol Chem,* **277,** 45984-45991.

Pavuluri, P., Vadakedath, S., Gundu, R., Uppulety, S., and Kandi, V., *Cureus* (2017) Jan; **9**(1): e949.

Prorok, T., Malabendu, J., Patel, D., and Pahan, K., *Neurochem Research* (2019) https://doi.org/10.1007/s11064-018-02705-0.

Puranam, K., Qian, W. H., Nikbakht, K., Venable, M., Obeid, L., Hannun, Y. and Boustany, R. M. (1997) Upregulation of Bcl-2 and elevation of ceramide in Batten disease. *Neuropediatrics,* **28,** 37-41.

Robins, S. J., Collins, D., Wittes, J. T. *et al.* (2001) Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA,* **285,** 1585-1591.

Roleira, F.M.; Siquet, C.; Orru, E.; Garrido, E.M.; Garrido, J.; Milhazes, N.; Podda, G.;

Paiva-Martins, F.; Reis, S.; Carvalho, R.A.; *et al.* Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5816–5825.

Roy, A. and Pahan, K. (2009) Gemfibrozil, stretching arms beyond lipid lowering. *Immunopharmacol Immunotoxicol,* **31,** 339-351.

Rubins, H. B. and Robins, S. J. (1992) Effect of reduction of plasma triglycerides with gemfibrozil on high-density-lipoprotein-cholesterol concentrations. *J Intern Med,* **231,** 421-426.

Rubins, H. B., Robins, S. J., Collins, D. *et al.* (1999) Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med,* **341,** 410-418.

Shaw, Alan R. & Feinberg, Mark B., *Clinical immunology* (4th ed., 2013).

Sleat, D. E., Donnelly, R. J., Lackland, H., Liu, C. G., Sohar, I., Pullarkat, R. K., and Lobel, P. (1997) Science **277**, 1802-1805.

Vines, D. J., and Warburton, M. J. (1999) *FEBS Lett* **443**, 131-135.

Viglio, S., Marchi, E., Wisniewski, K., Casado, B., Cetta, G., and Iadarola, P. (2001) *Electrophoresis* **22**, 2343-2350.

Walus, M., Kida, E., and Golabek, A. A. (2010) *Hum Mutat* **31**, 710-721.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения лизосомной болезни накопления, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, первой композиции, содержащей терапевтически эффективное количество гена, кодирующего лизосомальный фермент, и второй композиции, содержащей терапевтически эффективное количество фармацевтического агента.

2. Способ по п. 1, где первую композицию вводят интраназально.

3. Способ по п. 1, где ген доставляют через гематоэнцефалический барьер.

4. Способ по п. 1, где первую композицию вводят приблизительно один раз в 7-30 суток.

5. Способ по п. 1, где первая композиция содержит вирусный вектор, содержащий ген, кодирующий лизосомальный фермент.

6. Способ по п. 6, где вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный вектор.

7. Способ по п. 1, где ген включает *ppt1*, *cln2*, *cln3*, *galc* или *hexa*.

8. Способ по п. 1, где лизосомальный фермент включает пальмитоилпротеинтиоэстеразу-1, трипептидилпептидазу 1, галактозилцерамид, баттенин или гексозаминидазу А.

9. Способ по п. 7, включающий введение первой композиции, содержащей ген *ppt1*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз.

10. Способ по п. 7, включающий введение первой композиции, содержащей ген *cln2*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз.

11. Способ по п. 7, включающий введение первой композиции, содержащей ген *cln3*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей ювенильный нейрональный цероидный липофусциноз.

12. Способ по п. 7, включающий введение первой композиции, содержащей ген *galc*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей болезнь Краббе.

13. Способ по п. 7, включающий введение первой композиции, содержащей ген *hexa*, для лечения лизосомной болезни накопления, включающей болезнь Тея-Сакса.

14. Способ по п. 1, где фармацевтический агент включает коричную кислоту, олеамид или фибрат.

15. Способ по п. 14, где фибрат представляет собой гемфиброзил или фенофибрат.

16. Способ по п. 1, где вторая композиция дополнительно содержит терапевтически эффективное количество полностью транс-ретиноевой кислоты.

17. Способ по п. 1, где терапевтически эффективное количество фармацевтического агента при введении фармацевтического агента в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой меньше, чем при доставке фармацевтического агента в отстутсвие полностью транс-ретиноевой кислоты.

18. Способ по п. 1, где вторую композицию вводят перорально.

19. Способ по п. 1, где вторую композицию вводят один раз в сутки.

20. Способ по п. 1, где введение первой композиции и второй композиции оказывает больший терапевтический эффект у субъекта, чем введение первой композиции или второй композиции по отдельности.

21. Способ по п. 1, где лизосомная болезнь накопления выбрана из группы, состоящей из поздней инфантильной болезни Баттена, ювенильной болезни Баттена, болезни Краббе, болезни Тея-Сакса, болезни Ниманна-Пика, болезни Фабри, болезни Фарбера и болезни Гоше.

22. Способ по п. 1, где первую композицию вводят интраназально и вторую композицию вводят перорально.

23. Способ по п. 1 или п. 22, где первую композицию вводят по меньшей мере один раз в 7 суток, и вторую композицию вводят один раз в сутки.

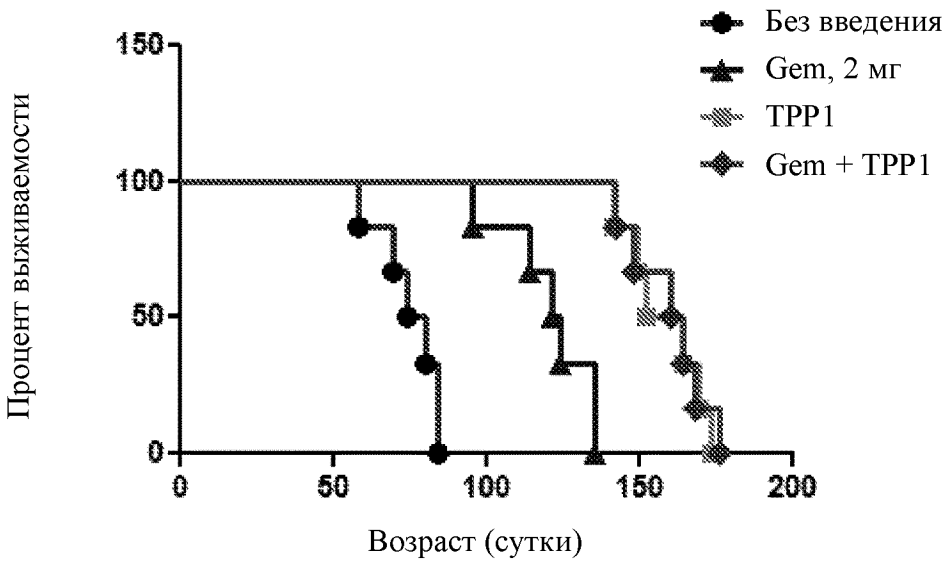
24. Способ по п. 23, где вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный вектор.

25. Способ по п. 23, где ген включает *cln2*.

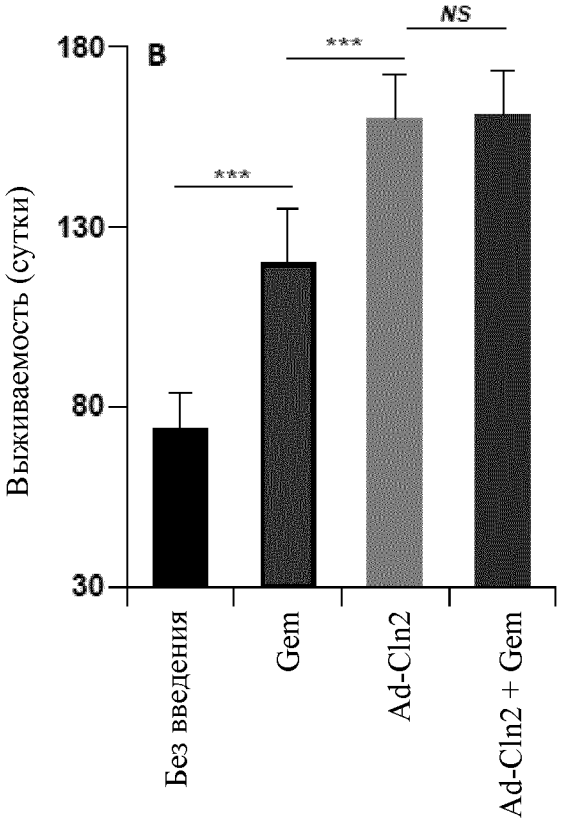
26. Способ по п. 23, где вторая композиция содержит гемфиброзил.

27. Способ по п. 25, где введение первой композиции увеличивало продолжительность жизни приблизительно на 100 суток.

Фиг. 1


Без введения
Gem, 2 мг
TPP1
Gem + TPP1
Процент выживаемости
150
100
50
0
0
50
100
150
200
Возраст (сутки)

Фиг. 2


B
NS
***
***
180
130
80
30
Выживаемость (сутки)
Без введения
Gem
Ad-Cln2
Ad-Cln2 + Gem