

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192351 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.05

(22) Дата подачи заявки
2020.02.26

(51) Int. Cl. C12N 15/864 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ, ПОЛЕЗНЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ КРАББЕ

(31) 62/810,708; 62/817,482; 62/877,707;
62/916,652

(32) 2019.02.26; 2019.03.12; 2019.07.23;
2019.10.17

(33) US

(86) PCT/US2020/019794

(87) WO 2020/176562 2020.09.03

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

(72) Изобретатель:
Уилсон Джеймс М., Ордо Жюльетт,
Катц Натан (US)

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

(57) В данном документе предлагается композиция, составленная для интратекальной доставки вектора рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего капсид AAVhu68, несущий ген галактозилцерамидазы (GALC) человека, для введения пациентам с болезнью Краббе. Также данное изобретение предлагает новые генные последовательности и их применение.

A1

202192351

202192351

A1

КОМПОЗИЦИИ, ПОЛЕЗНЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ КРАББЕ
УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Аденоассоциированный вирус (AAV), член семейства Parvovirus, представляет собой небольшой икосаэдрический вирус без оболочки с геномами одноцепочечной линейной ДНК (оцДНК) длиной около 4,7 тысяч нуклеотидов (т.н.). Геном дикого типа содержит инвертированные концевые повторы (ITR) на обоих концах цепи ДНК и две открытые рамки считывания (ORF): гер и сар. Рер состоит из четырех перекрывающихся генов, кодирующих гер белки, необходимые для жизненного цикла AAV, и сар содержит перекрывающиеся нуклеотидные последовательности капсидных белков: VP1, VP2 и VP3, которые самостоятельно собираются, образуя капсид икосаэдрической симметрии.

Векторы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), полученные из дефектного по репликации парвовируса человека, были описаны как подходящие носители для доставки генов. Обычно функциональные гены гер и ген сар удаляются из вектора, что приводит к некомпетентному к репликации вектору. Эти функции предоставляются во время системы продуцирования векторов, но отсутствуют в окончательном векторе.

На сегодняшний день существует несколько различных хорошо охарактеризованных AAV, полученных от человека или нечеловеческих приматов (NHP). Было обнаружено, что AAV разных серотипов проявляют разную эффективность трансфекции и проявляют тропизм к разным клеткам или тканям. В WO 2005/033321 описано множество различных кладов AAV, включая клад F, который идентифицирован в данном документе как имеющий всего три члена: AAV9, AAVhu31 и AAVhu32. Структурный анализ AAV9 представлен в М. А. DiMattia et al., J. Virol. (June 2012) vol. 86 no. 12 6947-6958. В этой статье сообщается, что AAV9 имеет 60 копий (всего) трех переменных белков (vps), которые кодируются геном сар и имеют перекрывающиеся последовательности. К ним относятся VP1 (87 кДа), VP2 (73 кДа) и VP3 (62 кДа), которые присутствуют в прогнозируемом соотношении 1:1:10 соответственно. Вся последовательность VP3 находится внутри VP2, а вся последовательность VP2 находится внутри VP1. VP1 имеет уникальный N-концевой домен. Уточненные координаты и структурные факторы доступны под номером доступа 3UX1 из базы данных RCSB PDB.

Несколько различных вариантов AAV9 были сконструированы для того, чтобы не нацеливать или нацеливаться на разные ткани. См., например, N. Pulicheria, «Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer», Molecular Therapy, Vol, 19, no. 6, p. 1070-1078 (June 2011). Также сообщалось о разработке вариантов AAV9 для доставки гена через гематоэнцефалический барьер. См., например, B.E. Deverman et al, Nature Biotech, Vol. 34, No. 2, p 204-211 (опубликованные на сайте 1 февраля 2016 года) и Caltech press release, A. Wetherston, www.neurology-central.com/2016/02/10/successful-delivery-of-genes-through-the-blood-brain-barrier/, accessed

10/05/2016. См., также, WO 2016/0492301 и США 8734809.

Недавно AAVhu68, который был идентифицирован после амплификации гена капсида из природного источника, был идентифицирован как новый капсид AAV. См., например, WO 2018/160582. Этот AAV находится внутри клада F, как и AAV9.

Болезнь Краббе (глобоидноклеточная лейкодистрофия; GLD) представляет собой аутосомно-рецессивную лизосомную болезнь накопления (LSD), вызываемую мутациями в гене, кодирующем гидролитический фермент галактозилцерамидазу (GALC) (Wenger D.A., et al. (2000) *Mol Genet Metab.* 70(1):1-9). Этот фермент отвечает за деградацию некоторых галактолипидов, включая галактозилцерамид (церамид) и галактозилсфингозин (психозин), которые находятся почти исключительно в миелиновой оболочке. При болезни Краббе дефицит GALC вызывает токсическое накопление психозина (но не галактозилцерамида) в лизосомах (Svennerholm et al., 1980). Накопление психозина особенно токсично для миелин-продуцирующих олигодендроцитов в ЦНС и шванновских клеток в ПНС, что приводит к быстрой и повсеместной гибели этих типов клеток. Распад миелина как в ЦНС, так и в ПНС сопровождается реактивным астроцитарным глиозом и инфильтрацией гигантских многоядерных макрофагов («глобоидных клеток») (Suzuki K. (2003) *J Child Neurol.* 18(9):595-603). Галактозилцерамид не накапливается в отсутствие активности GALC, главным образом из-за гидролиза другим ферментом, ганглиозид- β -галактозидазой GM1 (Kobayashi T., et al. (1985) *J Biol Chem.* 260(28):14982-7) и гибели олигодендроцитов, способствующей остановке синтеза галактозилцерамида (Svennerholm L., et al. (1980) *J Lipid Res.* 21(1):53-64).

Единственным модифицирующим заболевание лечением, доступным в настоящее время для болезни Краббе, является трансплантация кроветворных стволовых клеток (ТКСК), которая часто обеспечивается трансплантацией пуповинной крови (UCBT), аллогенными стволовыми клетками периферической крови или аллогенным костным мозгом. Использование ТКСК для лечения пациентов с инфантильной болезнью Краббе, у которых обычно проявляются симптомы до первого дня рождения, было лишь незначительным. При выполнении после появления явных симптомов при детской болезни Краббе, ТКСК обеспечивает лишь минимальное неврологическое улучшение и существенно не улучшает выживаемость (Escobar M.L., et al. (2005) *N Engl J Med.* 352(20):2069-81). ТКСК может быть эффективным при выполнении у пациентов с предсимптоматическими симптомами, но даже в этом случае двигательные исходы плохие (Escobar M.L., et al. (2005) *N Engl J Med.* 352(20):2069-81; Wright M.D., et al. (2017) *Neurology.* 89(13):1365-1372; van den Broek B.T.A., et al. (2018) *Blood Adv.* 2(1):49-60). Младенцы, которым выполняли трансплантацию в возрасте до 30 дней, имели лучшую выживаемость и функциональные результаты по сравнению с детьми, которым выполняли трансплантацию позже (Allewelt H., et al. (2018) *Biol Blood Marrow Transplant.* 24(11):2233-2238). Сообщается, что пресимптоматическая трансплантация приводит к значительно лучшим результатам с прогрессирующей центральной миелинизацией, нормальным восприимчивым языком, ослаблением тяжести симптомов и большей выживаемостью по

сравнению с пациентами с младенческой болезнью Краббе, которые либо не получали лечения, либо лечились после появления симптомов (Escobar M.L., et al. (2005) *N Engl J Med.* 352(20):2069-81; Duffner P.K., et al. (2009) *Genet Med.* 11(6):450-4; Wright M.D., et al. (2017) *Neurology.* 89(13):1365-1372). Даже в этом случае большинство детей, получавших лечение до появления симптомов, остаются значительно ниже среднего по росту и массе тела, и имеют прогрессирующую задержку крупной моторики, варьирующуюся от легкой спастичности до неспособности ходить самостоятельно (Escobar M.L., et al. (2005) *N Engl J Med.* 352(20):2069-81; Duffner P.K., et al. (2009) *Genet Med.* 11(6):450-4). У некоторых детей также есть остаточные нарушения, включая приобретенную микроцефалию, потребность в гастростомии и дизартрию (Duffner P.K., et al. (2009) *Genet Med.* 11(6):450-4). Более того, ТКСК, по-видимому, влияет только на патологию специфического заболевания ЦНС. Клинические признаки, связанные с патологией ПНС, такие как периферическая невропатия, остаются неизменными при ТКСК. Эти результаты подчеркивают ограничения ТКСК, особенно в формах с ранним началом, когда быстрое прогрессирование заболевания опережает время, необходимое для приживления гемопоэтических стволовых клеток, миграции в ЦНС, дифференциации и обеспечения терапевтического эффекта за счет секреции GALC и кросс-коррекции (т.е. процесс, с помощью которого фермент, секретируемый корректирующими клетками, поглощается клетками с дефицитом GALC).

В данной области техники остается потребность в улучшенных способах лечения пациентов с болезнью Краббе.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложена композиция, содержащая рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), который содержит капсид AAV, нацеленный на клетки центральной нервной системы, и геном вектора, содержащий (i) кодирующую последовательность галактозилцерамидазы, кодирующую зрелый белок галактозилцерамидазы, имеющий аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют экспрессию белка, и (ii) инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV, при этом геном вектора упакован в капсид AAV. В некоторых вариантах реализации, капсид AAV представляет собой капсид AAVhu68. В одном варианте реализации, последовательность нуклеиновой кислоты AAVhu68 vp1 имеет последовательность SEQ ID NO: 9, или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%. В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность кодирует зрелый белок SEQ ID NO: 10 и экзогенный сигнальный пептид, подходящий для клеток центральной нервной системы человека. В некоторых вариантах реализации, регуляторные последовательности содержат: промотор бета-актина, интрон и/или глобин полиА кролика. В некоторых вариантах реализации, композиция содержит rAAV, имеющий геном вектора CB7.CI.hGALC.rBG.

В некоторых вариантах реализации предложен рекомбинантный

аденоассоциированный вирус, который содержит капсид AAV, нацеленный на клетки центральной нервной системы, и геном вектора, содержащий (i) кодирующую последовательность галактозилцерамидазы, кодирующую зрелый белок галактозилцерамидазы, имеющий аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют экспрессию зрелого белка галактозилцерамидазы, и (ii) инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV. В некоторых вариантах реализации, капсид AAV представляет собой капсид AAVhu68. В одном варианте реализации, последовательность нуклеиновой кислоты AAVhu68 vp1 имеет последовательность SEQ ID NO: 9, или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%. В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность кодирует зрелый белок SEQ ID NO: 10 и экзогенный сигнальный пептид, подходящий для клеток центральной нервной системы человека. В некоторых вариантах реализации, регуляторные последовательности содержат: промотор бета-актина, интрон и/или глобин полиА кролика. В некоторых вариантах реализации, геном вектора представляет собой CB7.CI.hGALC.RBG.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, которая содержит запас гAAV, который полезен для лечения болезни Краббе. В некоторых вариантах реализации предусмотрено использование композиции, содержащей дозу гAAV, для приготовления лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации предложенная композиция полезна для лечения дисфункции периферических нервов и/или для лечения болезни Краббе. В некоторых вариантах реализации гAAV вводится в качестве совместной терапии с терапией гемопоэтическими стволовыми клетками, трансплантацией костного мозга и/или субстрат-редуцирующей терапии.

В некоторых вариантах реализации плазида, содержащая кодирующую последовательность галактозилцерамидазы, кодирующую сигнальный пептид, и зрелый белок галактозилцерамидазы человека, имеющий аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 10 (аминокислоты от 43 до 685). В некоторых вариантах реализации, плазида содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9, или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%.

В некоторых вариантах реализации предлагается применение композиции для лечения болезни Краббе, коррекции дисфункции периферических нервов, которая вызывает дыхательную недостаточность и потерю двигательной функции, вызванных болезнью Краббе, или задержки начала или частоты приступов, вызванных болезнью Краббе, включая введение пациенту композиции, содержащей дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), причем указанный гAAV содержит: (a) капсид AAV, который нацелен на клетки центральной нервной системы; и (b) геном вектора, содержащий последовательность, кодирующую галактозилцерамидазу, кодирующую зрелый белок галактозилцерамидазы, имеющий аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют

экспрессию белка, причем указанный геном вектора дополнительно содержит инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV, при этом геном вектора упакован в капсид AAV. В некоторых вариантах реализации у пациента имеется поздняя детская болезнь Краббе (LIKD). В некоторых вариантах реализации у пациента имеется ювенильная болезнь Краббе (JKD). В некоторых вариантах реализации у пациента имеется подростковая/взрослая болезнь Краббе. В некоторых вариантах реализации, гAAV вводят в качестве совместной терапии с терапией гемопоэтическими стволовыми клетками (ТКСК), трансплантата костного мозга и/или субстрат-редуцирующей терапии. В некоторых вариантах реализации, гAAV доставляется интратекальным, интрацеребровентрикулярным или интрапаренхимальным введением.

В некоторых вариантах реализации предлагаемая композиция составлена для интратекального, интрацеребровентрикулярного, интрапаренхимального введения. В некоторых вариантах реализации композицию вводят в виде однократной дозы посредством субтатылочной инъекции под контролем компьютерной томографии (КТ) в cisterna magna (intra-cisterna magna).

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлено выравнивание последовательностей капсида AAV9 (SEQ ID NO: 4) и AAVhu68 (SEQ ID NO: 2). Две аминокислоты, которые различаются между капсидами AAV9 и AAVhu68, расположены в областях VP1 (67, 157) и VP2 (157) капсида. *Сокращения:* AAV9, аденоассоциированный вирус серотипа 9; AAVhu68; аденоассоциированный вирус серотипа hu68; VP1, вирусный белок 1; VP2, вирусный белок.

На Фиг. 2 представлена схема генома вектора CB7.CI.hGALC.rBG. На линейной карте изображен геном вектора, который разработан для экспрессии GALC человека под контролем повсеместно распространенного промотора CB7. CB7 состоит из гибрида энхансера ЦМВ IE и промотора β -актина курицы (CB). Сокращения: ЦМВ IE, цитомегаловирус немедленной ранней стадии; GALC, галактозилцерамидаза; ITR, инвертированные концевые повторы; ПолиА, полиаденилирование; rBG, β -глобин кролика.

На Фиг. 3 представлена векторная карта для pENN.AAV.CB7.CI.RBG (p1044) со встроенным сконструированным геном cGALC (cGALCco).

На Фиг. 4А показано развитие нейропатологических и поведенческих фенотипов мыши Twitcher (twi/twi). У мышей наблюдается накопление цитотоксического психозина с последующей инфильтрацией белого вещества ПНС и ЦНС фагоцитарными глобоидными клетками. После начального периода миелинизации в ПНС наблюдается демиелинизация, а затем в ЦНС в меньшей степени из-за гибели миелин-образующих шванновских клеток и олигодендроцитов соответственно. Поведенческие фенотипы проявляются на около 20

PND, состоящие из тремора, подергивания, слабости задних конечностей с последующим параличом и потерей массы тела, требующей эвтаназии на около 40 PND. По материалам (Nicaise A.M., et al. (2016) J Neurosci Res. 94(11):1049-61). Сокращения: ЦНС, центральная нервная система; PND, день постнатального периода; ПНС, периферическая нервная система; twi, аллель с потерей функции twitcher.

На Фиг. 4В показан дизайн исследования для оценки генной терапии AAV.CB7.cGALC со.rBG с использованием мышинной модели Twitcher.

На Фиг. 5 показаны кривые выживаемости после внутривенного или интрацеребровентрикулярного введения rAAVhu68.hGALC пресимптомным мышам Twitcher. Внутривенное введение высоких доз rAAVhu68.hGALC ($1,00 \times 10^{11}$ GC [эквивалентно $1,00 \times 10^{14}$ GC/кг]) новорожденным мышам Twitcher на 0 PND привело к средней выживаемости 49 дней (N=6). В 5 раз меньшая доза rAAVhu68.hGALC ($2,00 \times 10^{10}$ GC), вводимая ICV новорожденным мышам Twitcher на 0 PND, привела к средней выживаемости 61,5 дней (N=10). Выживаемость мышей Twitcher, которым вводили rAAVhu68.hGALC, сравнивали с выживаемостью мышей Twitcher соответствующего возраста, которым вводили ICV носитель (ФСБ) в качестве контроля (N=8). Сокращения: GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; IV, внутривенно; N, количество животных; PND, день постнатального периода.

На Фиг. 6 показаны кривые выживаемости после интрацеребровентрикулярной доставки GALC пресимптоматическим мышам Twitcher с использованием различных капсидов AAV. ICV введение вектора AAVhu68 (rAAVhu68.hGALC) в дозе $2,00 \times 10^{10}$ GC на 0 PND давало медиану выживаемость 61,5 дня (N=10). ICV введение векторов AAV1, AAV3b или AAV5 в дозе $2,00 \times 10^{10}$ GC на 0 PND привело к средней выживаемости менее 60 дней (AAV1: 57 дней [N=6], AAV3b: 51 день [N=9], AAV5: 51 день [N=6]), в то время как контрольные мыши Twitcher, которым вводили только носитель ICV (ФСБ) на 0 PND, показали медиану выживаемость 43 дня (N=8). Сокращения: AAV3b, AAV серотипа 3b; AAV5, серотипа 5 AAV; AAV1, AAV серотипа 1; и AAVhu68, AAV серотипа hu68 (rAAVhu68.hGALC); GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; N, количество животных; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PND, день постнатального периода.

На Фиг. 7 показаны кривые выживаемости после внутривенного или интрацеребровентрикулярного введения rAAVhu68.hGALC пресимптомным мышам Twitcher. Пресимптомным мышам Twitcher (twi/twi) ICV вводили rAAVhu68.hGALC в дозе $2,00 \times 10^{10}$ GC (N=10), $5,00 \times 10^{10}$ GC (N=12) или $1,00 \times 10^{11}$ GC (N=12) на 0 PND. Дозы на грамм массы мозга (0,15 г для новорожденных мышей) были эквивалентны $1,30 \times 10^{11}$ GC/г, $3,30 \times 10^{11}$ GC/г и $6,70 \times 10^{11}$ GC/г, соответственно. В качестве контроля ICV вводили ФСБ совпадающим по возрасту бессимптомным мышам Twitcher twi/twi (N=8) и сопоставимым по возрасту здоровым мышам (twi/+ или +/+; N=14) на 0 PND. На 35 PND нейромоторную функцию оценивали по времени падения (в секундах) для мышей, бегающих на ускоряющем стержне, первоначально вращающемся со скоростью 5 об/мин и увеличивающемся до 40 об/мин в течение 120 секунд. ** p < 0,01 определено

односторонним дисперсионным анализом с последующим тестом множественного сравнения Данна. *Сокращения:* ANOVA, дисперсионный анализ; GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; N, количество животных; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PND, день постнатального периода; об/мин, оборотов в минуту.

На Фиг. 8 показаны кривые выживаемости после интрацеребровентрикулярного введения различных доз rAAVhu68.hGALC пресимптомным мышам Twitcher. Контрольные мыши Twitcher (twi/twi), которым ICV вводили носитель (ФСБ), показали среднюю выживаемость 43 дня (N=8). Мыши Twitcher (twi/twi), которым ICV вводили rAAVhu68.hGALC на 0 PND, показали среднюю выживаемость 61,5 дня при дозе $2,00 \times 10^{10}$ GC (N=10), 99 дней при дозе $5,00 \times 10^{10}$ GC (N=12) и 130 дней в дозе $1,00 \times 10^{11}$ GC (N=12). Дозы rAAVhu68.hGALC на грамм массы мозга (0,15 г для новорожденных мышей) были эквивалентны $1,30 \times 10^{11}$ GC/г, $3,30 \times 10^{11}$ GC/г и $6,70 \times 10^{11}$ GC/г, соответственно. *Сокращения:* GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; N, количество животных; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PND, день постнатального периода.

На Фиг. 9 показана нейромоторная функция после интрацеребровентрикулярного введения rAAVhu68.hGALC мышам Twitcher с симптомами. Новорожденным пресимптомным мышам Twitcher (twi/twi) ICV вводили rAAVhu68.hGALC в дозе $1,00 \times 10^{11}$ GC (N=12) на 0 PND. Мышам Twitcher с ранними симптомами (twi/twi) ICV вводили rAAVhu68.hGALC в дозе $1,00 \times 10^{11}$ GC (N=12) или $2,00 \times 10^{11}$ GC (N=11) на 12 PND. Мышам Twitcher с более поздними симптомами (twi/twi) ICV вводили rAAVhu68.hGALC в более высокой дозе $2,00 \times 10^{11}$ GC (N=16) на 21 PND. Не затронутые мыши соответствующего возраста (twi/+ и +/+; N=27) и пораженные мыши Twitcher (twi/twi; N=15) получали ICV носитель (ФСБ), в качестве контроля на 12 PND. На 35 PND нейромоторную функцию оценивали по времени падения (в секундах) для мышей, бегающих на ускоряющем стержне, первоначально вращающемся со скоростью 5 об/мин и увеличивающемся до 40 об/мин в течение 120 секунд. ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ определено односторонним дисперсионным анализом с последующим тестом множественного сравнения Данна. *Сокращения:* ANOVA, дисперсионный анализ; GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; N, количество животных; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PND, день постнатального периода; об/мин, оборотов в минуту.

На Фиг. 10 показаны кривые выживаемости после интрацеребровентрикулярного введения rAAVhu68.hGALC мышам Twitcher с симптомами. Мыши Twitcher с ранними симптомами (twi/twi), получавшие ICV rAAVhu68.hGALC на 12 PND в дозе $1,00 \times 10^{11}$ GC (N=12) или $2,00 \times 10^{11}$ GC (N=11), имели медиану выживаемость 71 день или 81 день соответственно. Мыши Twitcher с более поздними симптомами (twi/twi), получавшие ICV rAAVhu68.hGALC на 21 PND в дозе $2,00 \times 10^{11}$ GC (N=16), имели среднюю выживаемость 51,5 дня. Для сравнения, контрольные мыши Twitcher (twi/twi; исторический контроль; N=8 из исследования 1 [0 PND] и N=4 из исследования 2 [PND 12]), которым ICV вводили носитель (ФСБ) на 0 PND или 12 PND показали медиану выживаемости менее 50 дней.

Сокращения: GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; N, количество животных; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PND, день постнатального периода.

На Фиг. 11A и Фиг. 11B показаны клинические показатели и нейромоторная функция после интрацеребровентрикулярного введения rAAVhu68.hGALC мышам Twitcher с симптомами. Мышам Twitcher с ранними симптомами (twi/twi; N=9) вводили ICV rAAVhu68.hGALC в дозе $2,00 \times 10^{11}$ GC на 12 PND. Соответствующие по возрасту мыши Twitcher с ранними симптомами (twi/twi; N=9), здоровые гетерозиготы Twitcher (twi/+; N=10) и мыши дикого типа (N=8) получали ICV ФСБ в качестве контроля на 12 PND (На Фиг. 11A). Начиная с 22 PND, каждую мышь оценивали ежедневно до вскрытия на 40 PND на способность сжимать, походку, тремор, кифоз и качество шерсти с использованием клинической оценки. Каждому животному присваивали совокупный балл, который затем нормализовали обработкой AAV на время исследования. Более высокие баллы указывают на худшее клиническое состояние. (На Фиг. 11B) На 35 PND нейромоторную функцию оценивали по времени падения (в секундах) для мышей, бегающих на ускоряющем стержне, первоначально вращающимся со скоростью 5 об/мин и которая затем увеличивается до 40 об/мин в течение 120 секунд. ** $p < 0,05$ определено односторонним дисперсионным анализом с последующим тестом множественного сравнения Данна. *Сокращения:* GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; N, количество животных; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PND, день постнатального периода; об/мин, оборотов в минуту.

На Фиг. 12 показана гистология седалищного нерва после интрацеребровентрикулярного введения rAAVhu68.hGALC мышам Twitcher с симптомами. Мышам Twitcher с ранними симптомами (twi/twi; N=9) вводили ICV rAAVhu68.hGALC в дозе $2,00 \times 10^{11}$ GC на 12 PND. Соответствующим по возрасту мышам Twitcher с ранними симптомами (twi/twi; N=9) и здоровым мышам дикого типа (N=8) вводили ICV ФСБ в качестве контроля на 12 PND. Двадцать восемь дней спустя, на 40 PND, мышей вскрывали и получали образцы седалищного нерва. Окрашивание с помощью реакции с люксолом синим и PAS проводили на срезах ткани для визуализации миелина (темное окрашивание) и глобоидных клеток (светлое окрашивание), соответственно. *Сокращения:* GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; N, количество животных; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PAS, Шифф-йодная кислота; PND, день постнатального периода.

На Фиг. 13A - Фиг. 13C показана активность GALC через 28 дней после интрацеребровентрикулярного введения rAAVhu68.hGALC мышам Twitcher с симптомами на 12 день постнатального периода. Мышам Twitcher с ранними симптомами (twi/twi; N=9) вводили ICV rAAVhu68.hGALC в дозе $2,00 \times 10^{11}$ GC на 12 PND. Соответствующим по возрасту мышам Twitcher с ранними симптомами (twi/twi; N=9) и здоровым мышам дикого типа (N=8) ICV вводили ФСБ в качестве контроля на 12 PND. Двадцать восемь дней спустя, на 40 PND, мышей вскрывали и получили образцы мозга, печени и сыворотки. Анализ на основе флуорофора использовали для количественной

оценки уровней активности фермента GALC (относительные ЕФ). *Сокращения:* ЕФ, единицы флуоресценции; GALC, галактозилцерамидаза; GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; N, количество животных; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PND, день постнатального периода.

На Фиг. 14А и Фиг. 14В показаны промежуточные кривые выживаемости после комбинированной терапии rAAVhu68.hGALC и трансплантации костного мозга. Мышей Twitcher (twi/twi) лечили только BMT (N=13, 10 PND), только rAAVhu68.hGALC (N=12, 0 PND или N=13, 12 PND; ICV; $1,00 \times 10^{11}$ GC), rAAVhu68.hGALC, за которым следует BMT (N=7; 0 PND и 10 PND, соответственно) или BMT, за которым следует rAAVhu68.hGALC (N=7; 10 PND и 12 PND, соответственно). Мыши Twitcher (twi/twi), которым вводили ФСБ, служили только историческим контролем (N=8, исследование 1, 0 PND; N=4, исследование 2, 12 PND). Показаны промежуточные результаты выживаемости, и эксперимент все еще продолжается. *Сокращения:* ТКМ, трансплантация костного мозга; GC, копии генома; ICV, интрацеребровентрикулярно; N, количество животных; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PND, день постнатального периода.

На Фиг. 15 показано развитие нейropатологических и поведенческих фенотипов у собаки с болезнью Краббе (Wenger D.A., et al. (1999) J Hered. 90(1):138-42; Bradbury A., et al. (2016) Neuroradiol J. 29(6):417-424; Bradbury A.M., et al. (2016b) 94(11):1007-17; Bradbury A.M., et al. (2018) Hum Gene Ther. 29(7):785-801). Пунктирные линии показывают, что данные для более ранних временных точек для указанного фенотипа не были описаны. *Звездочка означает демиелинизацию, наблюдаемую при гистологическом исследовании. *Сокращения:* BAER, слуховой вызванный потенциал ствола мозга; ЦНС, центральная нервная система; МРТ, магнитно-резонансная томография; NCV, скорость проводимости нерва; ПНС, периферическая нервная система.

На Фиг. 16 показан дизайн фазы 1/2 первого клинического испытания с участием людей. Каждому из трех субъектов вводят дозу в когорте 1 (низкая доза) и когорте 2 (высокая доза) с последующим обязательным обзором совета безопасности после субъектов № 3 и № 6. После 30-дневного интервала после включения первого субъекта в когорту 1 и когорту 2 следующие два субъекта в каждой когорте включаются одновременно. Впоследствии 6 субъектов в когорте 3 (MTD) были зарегистрированы одновременно без ступенчатого дозирования. *Сокращения:* FИ, исследование первого применения препарата у человека; LTFU, долгосрочное последующее наблюдение; MTD, максимально переносимая доза.

На Фиг. 17 показано дерево решений для оценки безопасности предлагаемого испытания Фазы 1/2. *Критерии приостановки исследования включают любое событие, при котором более одного субъекта испытывают НЯ 3-ей или выше степени, связанное с исследуемым продуктом или процедурой инъекции ICM, по оценке исследователя. ** Медицинская проверка проводится Медицинским наблюдателем совместно с главным исследователем. *** Когорта 3 субъектов набирается одновременно. Дозирование на уровне MTD не меняется с 4-недельным периодом наблюдения за безопасностью между

каждым субъектом, и не требуется обзора совета по безопасности после включения первых трех субъектов в когорту 3. Сокращения: НЯ, нежелательное явление; ICM, intra-cisterna magna; МПД, максимально переносимая доза; SRT, триггер контроля безопасности.

На Фиг. 18А, Фиг. 18В и Фиг. 18С показана таблица с расписанием событий для испытания фазы 1/2.

На Фиг. 19 показано приживление мозга донорских клеток GFP+ в мозжечок мышей дикого типа и мышей Twitcher (Краббе) через 8 недель после ТГСК.

На Фиг. 20 показано сравнение активности GALC в сыворотке у мышей twitcher, которым вводили rAAVhu68, имеющий либо сконструированную последовательность GALC (cGALCco), либо нативную последовательность GALC собаки (cGALnat). Повышенная выживаемость наблюдалась у мышей twitcher, которым вводили rAAVhu.cGALCco, по сравнению с rAAVhu68, имеющим нативную последовательность.

На Фиг. 21 показана линейная векторная карта транс плазмиды pAAV2/hu68.KanR (p0068). *Сокращения:* AAV2, аденоассоциированный вирус серотипа 2; AAVhu68, аденоассоциированный вирус серотипа hu68; п.н., пары нуклеотидов; Cap, капсид; KanR, устойчивость к канамицину; Ori, начало репликации; Rep, репликаза.

На Фиг. 22А и Фиг. 22В показана аденовирусная плаزمид-помощник pAdDeltaF6 (KanR). (На Фиг. 22А) Получение вспомогательной плазмиды pAdΔF6 из родительской плазмиды pBHG10 через промежуточные pAdΔF1 и pAdΔF5. (На Фиг. 22В) Ген устойчивости к ампициллину в pAdΔF6 был заменен геном устойчивости к канамицину для генерации pAdΔF6 (Kan).

На Фиг. 23 показан дизайн исследования для оценки генной терапии AAV.CB7.cGALCco.rBG у собак с болезнью Краббе.

На Фиг. 24А - Фиг. 24С показана выживаемость и секреция фермента в CSF после ICM введения AAVhu68.cGALC собакам с болезнью Краббе. (На Фиг. 24А) Кривые выживаемости (продолжение). (На Фиг. 24В и Фиг. 24С) Активность GALC в спинномозговой жидкости, измеренная с использованием флуоресцентного субстрата (Marker Gene Technologies, Inc., Cat. № M2774).

На Фиг. 25А - Фиг. 25D показаны скорости нервной проводимости (NCV) в двигательных нервах большеберцовой кости (фиг. 25А) и лучевые сенсорные нервы (фиг. 25В), седалищные двигательные нервы (фиг. 25С) и локтевые двигательные нервы (фиг. 25D) у собак с болезнью Краббе после введения AAVhu68.cGALC. Периодические записи NCV замедляются (фиг. 25А) или необнаруженные (фиг. 25В) сигналы у собак с болезнью Краббе, обрабатываемых плацебо, в то время как все четыре животных, обработанных rAAVhu68.cGALC, имели нормализованные скорости, сходные с таковыми у контрольной собаки дикого типа того же возраста.

На Фиг. 25Е показаны результаты неврологического обследования собак с имитацией болезни Краббе, обработанных rAAVhu68.cGALC.

На Фиг. 26А - Фиг. 26С показаны результаты гистологии срезов мозга собак с

болезнью Краббе, подвергнутых обработке плацебо, и собак с болезнью Краббе, получавших AAVhu68.cGALC. (На Фиг. 26А) Окрашивание миеллина люксоловым синим. (На Фиг. 26В) иммуноокрашивание IBA1 (микроглиальный маркер) и (Фиг. 26С) количественная оценка.

На Фиг. 27 показаны кривые массы тела для собак дикого типа (обработанных носителем) и собак с болезнью Краббе, которые получали либо носитель, либо AAVhu68.cGALC.

На Фиг. 28А и Фиг. 28В показан мониторинг безопасности спинномозговой жидкости и сенсорных нейронов у собак с болезнью Краббе получавших плацебо и собак дикого типа, а также собак с болезнью Краббе, которым вводили AAVhu68.cGALC. (На Фиг. 28А) плеоцитоз СМЖ. (На Фиг. 28В) Гистология ганглиев задних корешков у собаки с болезнью Краббе, получавшей AAVhu68.cGALC.

На Фиг. 29А показаны измерения МРТ на собаках с болезнью Краббе и дикого типа, которым вводили плацебо, и собаках с болезнью Краббе, которым вводили AAVhu68.cGALC. На Фиг. 29В показаны результаты совокупной оценки для измерений МРТ на Фиг. 29А.

На Фиг. 30 продемонстрирована блок-схема производственного способа для векторного производства. *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 конечного состава; GC - копии генома; НЕК293, клетки почки эмбриона человека 293; ITFFB, интратекальный буфер для приготовления конечного состава; PEI, полиэтиленмин; ДНС-ПААГ, электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; TFF, тангенциальная поточная фильтрация; USP, Фармакопея США; WCB, рабочий банк клеток.

На Фиг. 31 продемонстрирована блок-схема производственного способа для векторной композиции. *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 1А (ген); ИФА, иммуноферментный анализ; FDP, готовое лекарственное средство; GC, копии генома; НЕК293, клетки почки эмбриона человека 293; ITFFB, интратекальный буфер для готового состава; KanR, устойчивость к канамицину (ген); MS, 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%; UEPX, ультраэффективная жидкостная хроматография; ф. США, Фармакопея США.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), который экспрессирует белок галактозилцерамидазы (GALC) человека, а также композиции,

содержащие rAAV, и их применение. В некоторых вариантах реализации rAAV.hGALC впервые обеспечивает модифицирующее заболевание лечение для симптоматических инфантильных пациентов с болезнью Краббе (ранняя инфантильная болезнь Краббе, EIKD). В некоторых вариантах реализации rAAV.hGALC обеспечивает лечение бессимптомных инфантильных пациентов. В некоторых вариантах реализации rAAV.hGALC обеспечивает терапию, которая может корректировать периферические нервы, которые вызывают дыхательную недостаточность и потерю двигательной функции. В некоторых вариантах реализации rAAV.hGALC предоставляет дополнительные возможности для лечения пациентов с более поздним началом, для которых соотношение польза-риск не в пользу трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТКСК), которая в настоящее время является единственной болезнью-модифицирующей терапией.

Используемый в данном документе термин «rAAV.GALC» относится к rAAV, имеющему капсид AAV, который содержит упакованный в него геном вектора, содержащий, как минимум, кодирующую последовательность для белка галактозилцерамидазы (фермента). rAAVhu68.GALC относится к rAAV, в котором капсидом AAV является капсид AAVhu68, который определен в данном документе. Приведенные ниже примеры также иллюстрируют другие капсиды AAV.

Термин «сGALC» относится к кодирующей последовательности, которая экспрессирует GALC собаки, который используется в приведенных ниже примерах для исследований на собаках. GALC собак имеет сигнальный пептид длиной 26 п.н. и общую длину белка 669 аминокислот.

Термин «hGALC» относится к кодирующей последовательности GALC человека.

Изоформа 1 hGALC является канонической последовательностью и имеет длину 685 аминокислот. Эта аминокислотная последовательность воспроизводится в SEQ ID NO: 6. Зрелый белок расположен около при аминокислотах от 43 до около 685, а сигнальный пептид расположен в положениях с 1 по 42, хотя есть некоторые предположения, что иницирующий Met находится в положении 17, а не в положении 1. Хотя известны множественные изоформы GALC (изоформы 1-5) и описано более трех десятков естественных вариантов, авторы настоящего изобретения обнаружили, что особенно желателен вариант, содержащий мутацию треонина (T) в аланин (A) в положении 641. Эта последовательность представлена в SEQ ID NO: 10. Этот вариант представляет собой последовательность белка, кодируемую кодирующей последовательностью галактозилцерамидазы человека (hGALC), проиллюстрированной в примерах в геномах rAAV и векторов, представленных в настоящем документе. Галактозилцерамидаза (GALC) также известна как галактоцереброзидаза, и эти названия используются как синонимы. В некоторых вариантах реализации этот вариант можно использовать в заместительной ферментной терапии или комбинированной терапии.

Используемый в данном документе термин «CB7.CI.hGALC.rBG» относится к геному вектора (например, как изображено на фиг. 2), который содержит кодирующую

последовательность для GALC человека под контролем повсеместно распространенного промотора CB7 и включает по меньшей мере энхансер ЦМВ IE (цитомегаловирус немедленного раннего развития), химерный интрон и последовательность полиА β -глобина кролика (rBG), все из которых окружены 5'ITR и 3'ITR. В некоторых вариантах реализации CB7.CI.hGALC.rBG включает кодирующую последовательность GALC, кодирующую зрелый белок GALC, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации CB7.CI.hGALC.rBG содержит кодирующую последовательность для GALC, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9, или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%. В еще одном варианте реализации, геном вектора CB7.CI.hGALC.rBG содержит SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах реализации, CB7.CI.hGALC.rBG содержит кодирующую последовательность зрелого белка SEQ ID NO: 10 и экзогенный сигнальный пептид.

В некоторых вариантах реализации предполагается слитый белок, который содержит по меньшей мере зрелый GALC с удаленным полностью или частично нативным сигнальным пептидом (аминокислоты 1-17 или аминокислоты 1-42) и замещенным экзогенным сигнальным пептидом. Такой слитый белок может содержать экзогенный сигнальный пептид и по меньшей мере зрелый белок GALC человека (например, аминокислоту 43-695 из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации слитый белок содержит экзогенный сигнальный пептид, подходящий для клеток человека в ЦНС, т.е. сигнальный пептид, который заменен на нативный сигнальный пептид для улучшения продукции, внутриклеточного транспорта и/или секреции белка (т.е. hGALC) в клетках, присутствующих в ЦНС человека. Экзогенные сигнальные пептиды, подходящие для клеток человека в ЦНС, включают, но не ограничиваются ими, те, которые изначально присутствуют в иммуноглобулине (например, IgG), цитокине (например, IL-2, IL12, IL18 или тому подобное), инсулине, альбумине, β -глюкуронидазе, щелочной протеазе, факторе фон Виллебранда (VWF) или секреторных сигнальных пептидах фибронектина (см. также, например, www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia).

Настоящее изобретение также охватывает последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют белок (белки) GALC, представленный в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, или слитые белки, содержащие зрелую GALC). В некоторых вариантах реализации кодирующая последовательность представляет собой последовательность кДНК, кодирующую белок. Однако также включены соответствующие последовательности РНК.

В некоторых вариантах реализации кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность кДНК SEQ ID NO: 5, или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%, или ее фрагмент. Подходящие фрагменты включают кодирующую последовательность для зрелого белка (от около нуклеотида 127 до около нуклеотида 2058) или кодирующую последовательность для зрелого белка с фрагментом

сигнального пептида (например, от около нуклеотида 54 до около нуклеотида 2058). В некоторых вариантах реализации кодирующая последовательность имеет последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую зрелый hGALC SEQ ID NO: 5 (нуклеотиды 127-2058), или слитый белок, содержащий тот же самый и экзогенный лидер, или последовательность, идентичную ему на 95-99,9%. В некоторых вариантах реализации кодирующая последовательность имеет последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую зрелый hGALC SEQ ID NO: 5 (нуклеотиды 127-2058) или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%, или ее фрагмент, содержащий фрагмент лидерной последовательности и зрелый hGALC. В некоторых вариантах реализации кодирующая последовательность кодирует полноразмерный белок GALC человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность кодирует лидерную группу hGALC (нуклеиновые кислоты от 1 до 126) и зрелый белок (кодированный нуклеиновыми кислотами 127-2058) из SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах реализации кассета экспрессии содержит одну или более последовательностей-мишеней микроРНК, которые подавляют экспрессию hGALC в ганглии дорсального корешка (drg) (см., например, Международную патентную заявку № PCT/US19/67872, поданную 12 февраля 2020 г., которая включена в данный документ в качестве ссылки).

В данном контексте болезнь Краббе, также известная как лейкодистрофия глобоидных клеток (GLD), представляет собой лизосомную болезнь накопления, вызванную мутацией, влияющей на активность галактозилцерамидазы (GALC), фермента, ответственного за деградацию миелиновых галактолипидов. Описано несколько типов болезни Краббе, которые зависят от тяжести ферментативного дефицита. От наиболее тяжелого до наименее тяжелого ферментативного дефицита относятся: болезнь Краббе в раннем детстве (EIKD), начало которой определяется возрастом ≤ 6 месяцев; болезнь Краббе в позднем детстве (LIKD) с началом от 7 до 12 месяцев; ювенильная болезнь Краббе (JKD) с началом от 13 месяцев до 10 лет; и болезнь Краббе с дебютом у подростков/взрослых.

В некоторых вариантах реализации эффективное количество вектора rAAV.GALC увеличивает уровни фермента GALC в CSF в пределах от около 30% до около 100% от нормальных уровней. В других вариантах реализации эффективное количество вектора rAAV.GALC увеличивает уровни фермента GALC в плазме в пределах от около 30% до около 100% от нормальных уровней. В некоторых вариантах реализации наблюдаются более низкие количества повышенных уровней CSF или GALC в плазме, но наблюдается улучшение одного или более симптомов, связанных с болезнью Краббе, как описано в настоящем документе.

«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. ITR могут быть выбраны 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.

AAVhu68

Как описано в примерах ниже, предоставленный в данном документе rAAV содержит капсид AAVhu68. См. также WO 2018/160582, который включен в настоящий документ посредством ссылки. AAVhu68 находится внутри клады F. AAVhu68 (SEQ ID NO: 2) отличается от другого вируса клады F AAV9 (SEQ ID NO: 4) двумя кодируемыми аминокислотами в положениях 67 и 157 vp1. Напротив, другой AAV клады F (AAV9, hu31, hu31) имеет Ala в положении 67 и Ala в положении 157.

rAAVhu68 состоит из капсида AAVhu68 и генома вектора. В одном варианте реализации, композиция, содержащая rAAVhu68, содержит сборку гетерогенной популяции белков vp1, гетерогенную популяцию белков vp2 и гетерогенную популяцию белков vp3. В контексте данного документа для обозначения капсидных белков vp, термин «гетерогенный» или любые его грамматические вариации относятся к популяции, состоящей из элементов, которые не совпадают, например, имеющих мономеры (белки) vp1, vp2 или vp3 с различными модифицированными аминокислотными последовательностями. SEQ ID NO: 2 представляет кодируемую аминокислотную последовательность белка vp1 AAVhu68. 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: 2. Эти

субпопуляции включают, как минимум, определенные остатки дезамидированного аспарагина (N или Asn). Например, определенные субпопуляции содержат по меньшей мере одно, два, три или четыре положения высоко дезамидированного аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 2 и, возможно, дополнительно содержащий другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты и другим необязательным модификациям. В данном документе описаны различные комбинации этих и других модификаций.

В контексте данного документа термин «субпопуляция» белков *vp* относится к группе белков *vp*, которая имеет по меньшей мере одну определенную, общую характеристику и которая состоит по меньшей мере от одного члена группы до менее чем всех членов контрольной группы, если не указано иное.

Например, «субпопуляция» белков *vp1* представляет собой по меньшей мере один (1) белок *vp1* и менее чем все белки *vp1* в собранном капсиде AAV, если не указано иное. «Субпопуляция» белков *vp3* может составлять от одного (1) белка *vp3* до менее чем все белки *vp3* в собранном капсиде AAV, если не указано иное. Например, белки *vp1* могут быть субпопуляцией белков *vp*; белки *vp2* могут быть отдельной субпопуляцией белков *vp*, а *vp3* - еще одной субпопуляцией белков *vp* в собранном капсиде AAV. В другом примере белки *vp1*, *vp2* и *vp3* могут содержать субпопуляции, имеющие разные модификации, например, по меньшей мере один, два, три или четыре сильнодезамидированных аспарагина, например, по парам аспарагин-глицин.

Если не указано иное, под сильнодезамидированным понимается по меньшей мере 45% дезамидированного, по меньшей мере 50% дезамидированного, по меньшей мере 60% дезамидированного, по меньшей мере 65% дезамидированного, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 97%, 99%, до около 100% дезамидированного в контрольном положении аминокислоты по сравнению с предсказанной аминокислотной последовательностью в контрольном положении аминокислоты (например, по меньшей мере 80% аспарагинов в аминокислоте 57 SEQ ID NO: 2 может быть дезамидирован, исходя из общего количества белков *vp1* или 20% аспарагина в аминокислоте 409 SEQ ID NO: 2 может быть дезамидирован исходя из общего количества белков *vp1*, *vp2* и *vp3*). Такие проценты могут быть определены с использованием методов 2D-гель, масс-спектрометрии или других подходящих методик.

Как предусмотрено в данном документе, каждый дезамидированный N из SEQ ID NO: 2 может независимо быть аспарагиновой кислотой (Asp), изоаспарагиновой кислотой (изоAsp), аспартатом и/или взаимопревращающей смесью Asp и изоAsp или их комбинациями. Может присутствовать любое подходящее соотношение α - и изоаспарагиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах реализации соотношение может составлять от 10:1 до 1:10 аспарагиновая кислота:изоаспарагиновая кислота, около 50:50 аспарагиновая кислота:изоаспарагиновая кислота, или около 1:3 аспарагиновая кислота:изоаспарагиновая кислота, или другое выбранное соотношение. В некоторых

вариантах реализации один или более глутаминов (Q) в SEQ ID NO: 2 деамидатов в глутаминовую кислоту (Glu), то есть α -глутаминовую кислоту, γ -глутаминовую кислоту (Glu) или смесь α - и γ -глутаминовую кислоту, которая может взаимно превращаться через обычный промежуточный глутаринимид. Может присутствовать любое подходящее соотношение α - и γ -глутаминовой кислоты. Например, в некоторых вариантах реализации соотношение может составлять от 10:1 до 1:10 от α к γ , около 50:50 α : γ , или около 1:3 α : γ , или другое выбранное соотношение.

Таким образом, гAAVhu68 включает субпопуляции внутри капсида гAAVhu68 белков vp1, vp2 и/или vp3 с дезамидированными аминокислотами, включая как минимум одну субпопуляцию, содержащую по меньшей мере один сильно дезамидированный аспарагин. Кроме того, другие модификации могут включать изомеризацию, в частности, по выбранным положениям остатков аспарагиновой кислоты (D или Asp). В других вариантах реализации модификации могут включать амидирование в положении Asp.

В некоторых вариантах реализации капсид AAVhu68 содержит субпопуляции vp1, vp2 и vp3, имеющие от по меньшей мере 4 до около 25 положений дезамидированных аминокислотных остатков, из которых по меньшей мере от 1 до 10% дезамидированы по сравнению с кодируемой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2. Большинство из них могут быть N остатками. Однако остатки Q также могут быть дезамидированы.

В некоторых вариантах реализации капсид AAVhu68 дополнительно характеризуется одним или более из следующего. Капсидные белки AAVhu68, которые включают: белки AAVhu68 vp1, полученные экспрессией из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 из SEQ ID NO: 2, белки vp1, полученные из SEQ ID NO: 1, или белки vp1, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 из SEQ ID NO: 2; белки AAVhu68 vp2, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность, по меньшей мере около из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 2, белков vp2, продуцируемых из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды с 412 по 2211 из SEQ ID NO: 1 или белки vp2, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам с 412 по 2211 из SEQ ID NO: 1, который кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из около аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 2, и/или белки AAVhu68 vp3, полученные экспрессией из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность, по меньшей мере около из аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 2, белки vp3, полученные из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды 607-2211 SEQ ID NO: 1, или белки vp3, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70%

идентичной по меньшей мере нуклеотидам 607-2211 SEQ ID NO: 1, который кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере из около аминокислот 203-736 из SEQ ID NO: 2.

Дополнительно или альтернативно предоставляется капсид AAV, который включает гетерогенную популяцию белков vp1, необязательно содержащую валин в положении 157, гетерогенную популяцию белков vp2, необязательно содержащую валин в положении 157, и гетерогенную популяцию белков vp3, причем по меньшей мере субпопуляция белков vp1 и vp2 включает валин в положении 157 и необязательно дополнительно содержит глутаминовую кислоту в положении 67 на основе нумерации капсида vp1 в SEQ ID NO: 2. Дополнительно или альтернативно предоставляется капсид AAVhu68, который включает гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере около из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 2, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты 203-736 из SEQ ID NO: 2, при этом: белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями.

Белки AAVhu68 vp1, vp2 и vp3 обычно экспрессируются как альтернативные варианты сплайсинга, кодируемые той же последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует полноразмерную аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 2 (аминокислоты 1-736). Необязательно, последовательность, кодирующую vp1, используют отдельно для экспрессии белков vp1, vp2 и vp3. Альтернативно, эта последовательность может быть коэкспрессирована с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, которые кодируют аминокислотную последовательность AAVhu68 vp3 SEQ ID NO: 2 (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: 1) или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислоты 203-736 SEQ ID NO: 2. Дополнительно или альтернативно, последовательность, кодирующая vp1, и/или последовательность, кодирующая vp2, может коэкспрессироваться с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность AAVhu68 vp2 SEQ ID NO: 2 (от около аминокислоты 138 до 736) без vp1-уникальной области (от около аминокислоты 1 до около 137) или цепи, комплементарной ей, соответствующей мРНК или тРНК (от

нуклеотида 412 до 22121 из SEQ ID NO: 1) или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислоту около 138-736 SEQ ID NO: 2.

Как описано в данном документе, rAAVhu68 имеет капсид rAAVhu68, продуцируемый в продуцирующей системе, экспрессирующей капсиды из нуклеиновой кислоты AAVhu68, которая кодирует аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 2, и необязательно дополнительные последовательности нуклеиновых кислот, например, кодирующих белок vp3, 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 rAAVhu68 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: 2 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: 1, 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: 2 (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: 1). В некоторых вариантах реализации также представлена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность AAVhu68 vp2 SEQ ID NO: 2 (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 412 по 2211 из SEQ ID NO: 1).

Однако другие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 могут быть выбраны для применения в производстве капсидов rAAVhu68. В некоторых вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или последовательность, по меньшей мере на 70-99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей

мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или последовательность, по меньшей мере на 70-99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную от около нуклеотида 412 до около нуклеотида 2211 в SEQ ID NO: 1, которая кодирует капсидный белок ν p2 (от около аминокислоты 138 до 736) SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты от около 607 до около 2211 SEQ ID NO: 1 или последовательность, по меньшей мере на 70-99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную от около нуклеотида 607 до около нуклеотида 2211 в SEQ ID NO: 1, которая кодирует капсидный белок ν p3 (от около аминокислоты 203 до 736) SEQ ID NO: 2.

В компетенции специалиста в данной области техники находится разработка последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих этот капсид гAAVhu68, включая ДНК (геномную или кДНК) или РНК (например, мРНК). В некоторых вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая капсидный белок AAVhu68 ν p1, представлена в SEQ ID NO: 1. В других вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты, идентичная на 70%-99,9% SEQ ID NO: 1, может быть выбрана для экспрессии капсидных белков AAVhu68. В некоторых других вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты идентична по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% идентична или по меньшей мере на 99%-99,9% идентична SEQ ID NO: 1. Такие последовательности нуклеиновых кислот могут быть кодон-оптимизированы для экспрессии в выбранной системе (т.е. тип клетки), которая может быть сконструирована различными способами. Эта оптимизация может быть выполнена с использованием методов, доступных в интерактивном режиме (например, GeneArt), опубликованных методов или компании, которая предоставляет услуги по оптимизации кодонов, например, DNA2.0 (Менло-Парк, Калифорния). Один способ оптимизации кодонов описан, например, в международной патентной публикации США № WO 2015/012924, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. См. также, например, патентную публикацию США № 2014/0032186 и патентную публикацию США № 2006/0136184. Соответственно, изменяется вся длина открытой рамки считывания (ORF) для продукта. Однако в некоторых вариантах реализации может быть изменен только фрагмент ORF. Используя один из этих методов, можно применить частоты к любой данной полипептидной последовательности и получить фрагмент нуклеиновой кислоты кодирующей области с оптимизированными кодонами, которая кодирует полипептид. Доступен ряд вариантов

для выполнения фактических изменений кодонов или для синтеза оптимизированных для кодонов кодирующих областей, разработанных, как описано в данном документе. Такие модификации или синтез могут быть выполнены с использованием стандартных и рутинных молекулярно-биологических манипуляций, хорошо известных специалистам в данной области. В одном подходе серию комплементарных олигонуклеотидных пар из 80-90 нуклеотидов каждая по длине и охватывающая длину желаемой последовательности синтезируют стандартными методами. Эти пары олигонуклеотидов синтезируются таким образом, что при ренатурации они образуют двухцепочечные фрагменты из 80-90 пар оснований, содержащие когезионные концы, например, каждый олигонуклеотид в паре синтезируется с удлинением на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более оснований за пределами области, комплементарной другому олигонуклеотиду в паре. Одноцепочечные концы каждой пары олигонуклеотидов предназначены для ренатурации с одноцепочечным концом другой пары олигонуклеотидов. Пары олигонуклеотидов подвергаются ренатурации, и приблизительно пяти-шести из этих двухцепочечных фрагментов затем дают возможность ренатурации вместе через когезионные одноцепочечные концы, а затем они лигируют вместе и клонируют в стандартный бактериальный вектор для клонирования, например, вектор TOPO®, доступный от Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния. Затем конструкцию секвенируют стандартными методами. Готовят несколько из этих конструкций, состоящих из 5-6 фрагментов из 80-90 пар оснований, сшитых вместе, т.е. фрагменты около из 500 пар оснований, так что вся желаемая последовательность представлена в серии плазмидных конструкций. Затем вставки этих плазмид разрезают соответствующими рестрикционными ферментами и лигируют вместе с образованием конечной конструкции. Затем конечную конструкцию клонируют в стандартный бактериальный вектор клонирования и секвенируют. Дополнительные методы будут тотчас же очевидны для квалифицированного специалиста. Кроме того, синтез генов легко доступен из коммерческих источников.

В некоторых вариантах реализации аспарагин (N) в парах N-G в белках гAAVhu68 vp1, vp2 и vp3 сильно дезамидирован. В случае капсидного белка гAAVhu68 4 остатка (N57, N329, N452, N512) обычно демонстрируют уровни дезамидирования >70% и в большинстве случаев >90% в различных партиях. Дополнительные остатки аспарагина (N94, N253, N270, N304, N409, N477 и Q599) также демонстрируют уровни дезамидирования до ~ 20% в различных партиях. Первоначально уровни дезамидирования были определены с использованием расщепления трипсином и подтверждены расщеплением химотрипсином.

В некоторых вариантах реализации капсид гAAVhu68 содержит субпопуляции капсидных белков AAV vp1, vp2 и/или vp3, имеющие по меньшей мере четыре положения аспарагина (N) в белках капсида гAAVhu68, которые сильно дезамидированы. В некоторых вариантах реализации от около 20 до 50% пар N-N (за исключением триплетов N-N-N) проявляют дезамидирование. В некоторых вариантах реализации первый N дезамидирован. В некоторых вариантах реализации второй N дезамидирован. В

некоторых вариантах реализации дезамидирование составляет от около 15% до около 25% дезамидирования. Дезамидирование в Q в положении 259 SEQ ID NO: 2 составляет от около 8% до около 42% капсидных белков AAVhu68 vp1, vp2 и vp3 белка AAVhu68.

В некоторых вариантах реализации капсид rAAVhu68 дополнительно характеризуется амидированием в D297 белков vp1, vp2 и vp3. В некоторых вариантах реализации от около 70% до около 75% D в положении 297 белков vp1, vp2 и/или vp3 в капсиде AAVhu68 амидированы на основе нумерации SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один Asp в vp1, vp2 и/или vp3 капсида изомеризован в D-Asp. Такие изомеры обычно присутствуют в количестве менее около 1% от Asp в одном или более положениях остатков 97, 107, 384, исходя из нумерации SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации rAAVhu68 имеет капсид AAVhu68, содержащий белки vp1, vp2 и vp3, субпопуляции которых содержат комбинации одного, двух, трех, четырех или более дезамидированных остатков в положениях, указанных в таблице ниже. Дезамидирование в rAAV может быть определено с помощью 2D гелелектрофореза, и/или масс-спектрометрии, и/или методов моделирования белков. Онлайн-хроматография может быть выполнена с использованием колонки Acclaim PepMap и системы Thermo UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific), соединенной с Q Exactive HF с источником NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Данные MC получают с использованием зависящего от данных метода топ-20 для Q Exactive HF, динамически выбирая наиболее распространенные еще не секвенированные ионы-предшественники из обзорных сканирований (200-2000 m/z). Секвенирование выполняется посредством фрагментации столкновительной диссоциации с более высокой энергией с целевым значением ионов $1e5$, определенным с помощью прогнозирующего автоматического управления усилением, а выделение предшественников выполнялось с окном 4 m/z. Обзорные изображения были получены с разрешением 120000 при m/z 200. Разрешение для спектров HCD может быть установлено на 30000 при m/z 200 с максимальным временем инъекции ионов 50 мс и нормализованной энергией столкновения 30. Уровень RF S-линзы может быть установлен на 50, чтобы обеспечить оптимальную передачу m/z области, занятой пептидами из гидролизата. Ионы-предшественники могут быть исключены с одним, неназначенным или шестью и более высокими зарядовыми состояниями из выбора фрагментации. Программное обеспечение BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific) может использоваться для анализа полученных данных. Для картирования пептидов поиск выполняется с использованием базы данных FASTA с однократной записью белков с карбамидометилизацией, установленным как фиксированная модификация; и окисление, дезамидирование и фосфорилирование, заданные как переменные модификации, точность определения массы 10 ч.м., высокая протеазная специфичность и уровень достоверности 0,8 для спектров MC/MC. Примеры подходящих протеаз могут включать, например, трипсин или химотрипсин. Масс-спектрометрическая идентификация дезамидированных пептидов относительно проста,

поскольку дезамидирование добавляет к массе интактной молекулы +0,984 Да (разница масс между группами -ОН и -NH₂). Процент дезамидирования конкретного пептида определяется массовой площадью дезамидированного пептида, деленной на сумму площади дезамидированного и нативного пептидов. Принимая во внимание количество возможных сайтов дезамидирования, изобарные частицы, которые дезамидированы в разных сайтах, могут совместно мигрировать в одном пике. Следовательно, фрагментные ионы, происходящие из пептидов с множественными потенциальными сайтами дезамидирования, можно использовать для определения местоположения или дифференциации множества сайтов дезамидирования. В этих случаях относительные интенсивности в пределах наблюдаемых изотопных структур можно использовать для конкретного определения относительного содержания различных изомеров дезамидированного пептида. Этот метод предполагает, что эффективность фрагментации для всех изомерных частиц одинакова и не зависит от места дезамидирования. Специалисту в данной области будет понятно, что можно использовать ряд вариаций этих иллюстративных способов. Например, подходящие масс-спектрометры могут включать, например, квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр (QTOF), такой как Waters Xevo или Agilent 6530, или орбитальный прибор, такой как Orbitrap Fusion или Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Подходящие системы жидкостной хроматографии включают, например, систему Acquity UPLC от Waters или Agilent systems (серии 1100 или 1200). Подходящее программное обеспечение для анализа данных может включать, например, MassLynx (Waters), Pinpoint и Pepfinder (Thermo Fischer Scientific), Mascot (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Еще другие методы могут быть описаны, например, в X. Jin et al, Hu Gene Therapy Methods, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267, опубликовано в Интернете 16 июня 2017 г.

Дезамидирование На основе предсказанного AAVHu68 (SEQ ID NO: 2)	Средний% на основе белков VP1/VP2/VP3 в капсиде AAVhu68	
Дезамидированный остаток+1 (соседний AA)	Широкий диапазон процентов (%)	Узкие диапазоны (%)
N57 (N-G)	78-100%	80-100, 85-97
N66 (N-E)	0-5	0, 1-5
N94 (N-H)	0-15,	0, 1-15, 5-12, 8
N113 (N-L)	0-2	0, 1-2
~N253	10-25	15-22

(N-N)		
Q259 (Q-I)	8-42	10-40, 20-35
~N270 (N-D)	12-30	15-28
~N304 (N-N) (положение 303 также N)	0-5	1-4
N319 (N-I)	0-5	0, 1-5, 1-3
N329 * (N-G)*(положение 328 также N)	65-100	70-95, 85-95, 80-100, 85-100,
N336 (N-N)	0-100	0, 1-10, 25-100, 30-100, 30-95
~N409 (N-N)	15-30	20-25
N452 (N-G)	75-100	80-100, 90-100, 95-100,
N477 (N-Y)	0-8	0, 1-5
N512 (N-G)	65-100	70-95, 85-95, 80-100, 85-100,
~N515 (N-S)	0-25	0, 1-10, 5-25, 15-25
~Q599 (Asn-Q-Gly)	1-20	2-20, 5-15
N628 (N-F)	0-10	0, 1-10, 2-8
N651 (N-T)	0-3	0, 1-3
N663 (N-K)	0-5	0, 1-5, 2-4
N709 (N-N)	0-25	0,1-22, 15-25
N735	0-40	0. 1-35, 5-50, 20-35

В некоторых вариантах реализации капсид AAVhu68 характеризуется наличием капсидных белков, в которых по меньшей мере 45% остатков N дезамидированы, по меньшей мере в одном из положений N57, N329, N452 и/или N512 на основе нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% или по меньшей мере 90% остатков N в одном или более из этих положений N-G (т.е. N57, N329, N452 и/или N512, исходя из нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2) дезамидированы. В этих и других вариантах реализации капсид AAVhu68 дополнительно характеризуется наличием популяции белков, в которых от около 1% до около 20% остатков N имеют дезамидирование в одном или более положениях: N94, N253, N270, N304, N409, N477 и/или Q599, в зависимости от нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации AAVhu68 содержит по меньшей мере субпопуляцию белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дезамидированы в одном или более положениях N35, N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, N735, исходя из нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или их комбинации. В некоторых вариантах реализации белки капсида могут содержать одну или более амидированных аминокислот.

Наблюдаются и другие модификации, большинство из которых не приводит к превращению одной аминокислоты в другой аминокислотный остаток. Необязательно, по меньшей мере один Lys в vp1, vp2 и vp3 капсида ацетилирован. Необязательно по меньшей мере один Asp в vp1, vp2 и/или vp3 капсида изомеризован в D-Asp. Необязательно, по меньшей мере один S (Ser, серин) в vp1, vp2 и/или vp3 капсида фосфорилирован. Необязательно, по меньшей мере один T (Thr, треонин) в vp1, vp2 и/или vp3 капсида фосфорилирован. Необязательно, по меньшей мере один W (trp, триптофан) в vp1, vp2 и/или vp3 капсида окислен. Необязательно, по меньшей мере один M (Met, метионин) в vp1, vp2 и/или vp3 капсида окислен. В некоторых вариантах реализации белки капсида имеют одно или более фосфорилирований. Например, некоторые капсидные белки vp1 могут фосфорилироваться в положении 149.

В некоторых вариантах реализации капсид rAAVhu68 включает гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, причем белки vp1 содержат глутаминовую кислоту (Glu) в положении 67 и/или валин (Val) в положении 157; гетерогенная популяция белков vp2, необязательно содержащая валин (Val) в положении 157; и гетерогенная популяция белков vp3. Капсид AAVhu68 содержит по меньшей мере одну субпопуляцию, в которой не менее 65% аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин, расположенных в положении 57 белков vp1, и не менее 70% аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в положениях 329, 452 и/или 512 белков vp1, v2 и vp3 дезамидированы на основе нумерации остатков в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, при этом дезамидирование приводит к замене аминокислоты.

Как обсуждается в данном документе более подробно, дезамидированные аспарагины могут быть дезамидированы до аспарагиновой кислоты, изоаспарагиновой кислоты, взаимопревращающей пары аспарагиновая кислота/изоаспарагиновая кислота или их комбинаций. В некоторых вариантах реализации rAAVhu68 дополнительно характеризуется одним или более из: (a) каждый из белков vp2 независимо является продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере белок vp2 SEQ ID NO: 2; (b) каждый из белков vp3 независимо является продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере белок vp3 SEQ ID NO: 2; (c) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белки vp1, представляет собой SEQ ID NO: 1, или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%), идентичную SEQ ID NO: 1, который кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Необязательно эту последовательность используют отдельно для экспрессии белков vp1, vp2 и vp3. Альтернативно, эта последовательность может быть коэкспрессирована с одной или более последовательностями нуклеиновой кислоты, которые кодируют аминокислотную последовательность AAVhu68 vp3 SEQ ID NO: 2 (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: 1) или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислоты 203-736 SEQ ID NO: 2. Дополнительно или альтернативно, последовательность, кодирующая vp1, и/или последовательность, кодирующая vp2, может коэкспрессироваться с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность AAVhu68 vp2 SEQ ID NO: 2 (от около аминокислоты 138 до 736) без vp1-уникальной области (от около аминокислоты 1 до около 137) или цепи, комплементарной ей, соответствующей мРНК или тРНК (от нуклеотида 412 до 2211 из SEQ ID NO: 1) или последовательность от по меньшей мере 70% до по меньшей мере 99% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислоту около 138-736 SEQ ID NO: 2.

Дополнительно или альтернативно, капсид rAAVhu68 включает по меньшей мере субпопуляцию белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дезамидированы в одном или более положениях N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N512, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709 на основе нумерации SEQ ID NO: 2 или их комбинаций; (e) капсид rAAVhu68

включает субпопуляцию белков vp1, vp2 и/или vp3, которые содержат от 1% до 20% дезамидирования в одном или более положениях N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, на основе нумерации SEQ ID NO: 2 или их комбинаций; (f) капсид rAAVhu68 включает субпопуляцию vp1, в которой от 65% до 100% N в положении 57 белков vp1, исходя из нумерации SEQ ID NO: 2, дезамидированы; (g) капсид rAAVhu68 включает субпопуляцию белков vp1, в которой от 75% до 100% N в положении 57 белков vp1 дезамидированы; (h) капсид rAAVhu68 включает субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которых от 80% до 100% N в положении 329, исходя из нумерации SEQ ID NO: 2, дезамидированы; (i) капсид rAAVhu68 включает субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которых от 80% до 100% N в положении 452, исходя из нумерации SEQ ID NO: 2, дезамидированы; (j) капсид rAAVhu68 включает субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которых от 80% до 100% N в положении 512, исходя из нумерации SEQ ID NO: 2, дезамидированы; (k) rAAV содержит около 60 общих капсидных белков в соотношении от примерно 1 vp1 до примерно от 1 до 1,5 vp2 и от 3 до 10 vp3 белков; (l) rAAV содержит около 60 общих капсидных белков в соотношении от около 1 vp1 до около 1 vp2 и от 3 до 9 vp3 белков.

В некоторых вариантах реализации AAVhu68 модифицирован для изменения глицина в паре аспарагин-глицин, чтобы уменьшить дезамидирование. В других вариантах реализации аспарагин заменен на другую аминокислоту, например, глутамин, который деамидируется с более медленной скоростью; или к аминокислоте, в которой отсутствуют амидные группы (например, глутамин и аспарагин содержат амидные группы); и/или к аминокислоте, в которой отсутствуют аминокислотные группы (например, лизин, аргинин и гистидин содержат амидные группы). В контексте настоящего описания аминокислоты, не содержащие боковых амидных или аминокислотных групп, относятся, например, к глицину, аланину, валину, лейцину, изолейцину, серину, треонину, цистину, фенилаланину, тирозину или триптофану, и/или пролину. Модификации, такие как описанные, могут быть в одной, двух или трех парах аспарагин-глицин, обнаруженных в кодируемой аминокислотной последовательности AAVhu68. В некоторых вариантах реализации такие модификации не производятся во всех четырех парах аспарагин-глицин. Таким образом, предоставляется способ уменьшения дезамидирования rAAVhu68 и/или сконструированных вариантов rAAVhu68, имеющих более низкие скорости дезамидирования. Кроме того, одна или более других амидных аминокислот могут быть заменены на неамидную аминокислоту для уменьшения дезамидирования rAAVhu68.

Эти аминокислотные модификации могут быть выполнены обычными методами генной инженерии. Например, может быть получена последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая модифицированные кодоны vp AAVhu68, в которой от одного до трех кодонов, кодирующих глицин в положении 58, 330, 453 и/или 513 в SEQ ID NO: 2 (пары аспарагин-глицин) модифицированы для кодирования аминокислоты, отличной от глицина. В некоторых вариантах реализации последовательность нуклеиновой кислоты,

содержащая модифицированные кодоны аспарагина, может быть сконструирована в одной-трех парах аспарагин-глицин, расположенных в положении 57, 329, 452 и/или 512 в SEQ ID NO: 2, так что модифицированный кодон кодирует аминокислоту, отличную от аспарагина. Каждый модифицированный кодон может кодировать другую аминокислоту. Альтернативно, один или более измененных кодонов могут кодировать одну и ту же аминокислоту. В некоторых вариантах реализации эти модифицированные последовательности нуклеиновой кислоты AAVhu68 можно использовать для создания мутантного гAAVhu68, имеющего капсид с более низким дезамидированием, чем нативный капсид hu68. Такой мутант гAAVhu68 может иметь пониженную иммуногенность и/или повышать стабильность при хранении, особенно при хранении в форме суспензии. В данном контексте «кодон» относится к трем нуклеотидам в последовательности, кодирующей аминокислоту.

Используемый в данном документе термин «кодированная аминокислотная последовательность» относится к аминокислоте, которая предсказывается на основе трансляции известного кодона ДНК указанной последовательности нуклеиновой кислоты, транслируемой в аминокислоту. В следующей таблице показаны кодоны ДНК и двадцать общих аминокислот, показывающие как однобуквенный код (SLC), так и трехбуквенный код (3LC).

Аминокислота	SLC	3 LC	Кодоны ДНК
Изолейцин	I	Ile	ATT, ATC, ATA
Лейцин	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Валин	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
Фенилаланин	F	Phe	TTT, TTC
Метионин	M	Met	ATG
Цистеин	C	Cys	TGT, TGC
Аланин	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
Глицин	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
Пролин	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
Треонин	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
Серин	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Тирозин	Y	Tyr	TAT, TAC
Триптофан	W	Trp	TGG
Глутамин	Q	Gln	CAA, CAG
Аспарагин	N	Asn	AAT, AAC

Гистидин	H	His	CAT, CAC
Глутаминовая кислота	E	Glu	GAA, GAG
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GAT, GAC
Лизин	K	Lys	AAA, AAG
Аргинин	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Стоп-кодона	Стоп		TAA, TAG, TGA

Капсиды gAAVhu68 могут быть полезны в некоторых вариантах реализации. Например, такие капсиды можно использовать для получения моноклональных антител и/или создания реагентов, полезных в анализах для мониторинга уровней концентрации AAVhu68 у пациентов, получающих генную терапию. Способы получения полезных антител к AAVhu68, мечения таких антител или пустых капсидов и подходящие форматы анализа известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации в настоящем документе представлена последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или последовательность по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99%, которая кодирует аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID NO: 2 с модификацией (например, дезамидированной аминокислотой), как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации аминокислотная последовательность vp1 воспроизводится в SEQ ID NO: 2.

Используемый в данном документе термин «клада», относящийся к группам AAV, относится к группе AAV, которые филогенетически связаны друг с другом, как определено с использованием алгоритма объединения соседних пар по значению начальной загрузки по меньшей мере 75% (по меньшей мере 1000 повторов) и измерение расстояния с поправкой Пуассона не более 0,05 на основании выравнивания аминокислотной последовательности AAV vp1. Алгоритм объединения соседних пар описан в литературе. См., например, M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, New York (2000)). Доступны компьютерные программы, которые можно использовать для реализации этого алгоритма. Например, программа MEGA v2.1 реализует модифицированный метод Нея-Гожбори. Используя эти методы и компьютерные программы, а также последовательность капсидного белка AAV vp1, специалист в данной области может легко определить, содержится ли выбранный AAV в одной из указанных в данном документе клад, в другой клад или вне этих клад. См., например, G Gao, et al, *J Virol*, 2004 Jun; 78(10): 6381-6388, который идентифицирует клад A, B, C, D, E и F, номера доступа GenBank от AY530553 до AY530629. См. также

WO 2005/033321.

Используемый в данном документе термин «капсид AAV9» представляет собой самоорганизующийся капсид AAV, состоящий из множества белков ν p AAV9. Белки AAV9 ν p обычно экспрессируются как альтернативные варианты сплайсинга, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, который кодирует аминокислотную последовательность ν p1 SEQ ID NO: 4 (номер доступа GenBank: AAS99264. Эти варианты сплайсинга приводят к белкам разной длины SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации «капсид AAV9» включает AAV, аминокислотная последовательность которого на 99% идентична AAS99264 или на 99% идентична SEQ ID NO: 4. См. также US7906111 и WO 2005/033321. В контексте настоящего описания «варианты AAV9» включают варианты, описанные, например, в WO2016/049230, США 8927514, США 2015/0344911 и США 8734809.

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.

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 настоящий 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, JD Thomson et al., Nucl. Acids. Res., «A comprehensive comparison of multiple sequence alignments», 27(13):2682-2690 (1999).

Векторы гAAV

Как указано выше, последовательности и белки AAVhu68 полезны для продукции гAAV, а также могут быть использованы в рекомбинантных векторах AAV, которые могут быть векторами антисмысловой доставки, векторами генной терапии или векторами вакцин. Кроме того, сконструированные капсиды AAV, описанные в настоящем документе, например, содержащие мутантные аминокислоты в положениях 67, 157 или обоих, относительно нумерации капсидного белка vp1 в SEQ ID NO: 2, можно использовать для создания векторов гAAV для доставки ряда подходящих молекул нуклеиновых кислот к клеткам и тканям-мишеням.

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.

В частности, в настоящем изобретении предлагается гAAV, содержащий кодирующую последовательность галактозилцерамидазы человека (GALC). В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность представляет собой сконструированную кодирующую последовательность GALC. В некоторых вариантах реализации, кодирующая последовательность представляет собой последовательность гена cGALC (cGALCco) SEQ ID NO: 9.

Кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторными компонентами таким образом, что позволяет транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию трансгена в клетке ткани-мишени. В некоторых вариантах реализации, регуляторные последовательности содержат: промотор бета-актина, интрон и глобин полиА кролика. В некоторых вариантах реализации, регуляторные последовательности содержат SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах реализации, регуляторные последовательности содержат SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах реализации, регуляторные последовательности содержат SEQ ID NO: 16.

Последовательности AAV вектора обычно включают цис-действующие 5' и 3'

последовательности инвертированных концевых повторов (см., например, В. 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 К. 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, ассоциированные 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 матричного 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].

Эти гAAV особенно хорошо подходят для доставки генов в терапевтических целях и для иммунизации, включая индукцию защитного иммунитета. Кроме того, композиции по настоящему изобретению также можно использовать для получения желаемого генного продукта *in vitro*. Для получения *in vitro* желаемый продукт (например, белок) может быть получен из желаемой культуры после трансфекции клеток-хозяев с помощью гAAV, содержащего молекулу, кодирующую желаемый продукт, и культивирования культуры клеток в условиях, допускающих экспрессию. Затем экспрессированный продукт может быть очищен и выделен, если желательно. Подходящие методы трансфекции, культивирования, очистки и выделения клеток известны специалистам в данной области.

техники.

Получение вектора гAAV

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 гена в вирионы ITR являются единственными компонентами AAV, необходимыми в *цис*-системе в той же конструкции, что и молекула нуклеиновой кислоты, содержащая кассету(ы) 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-хозяин 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 rAAVhu68. Такая клеточная культура содержит нуклеиновую кислоту, которая экспрессирует капсидный белок rAAVhu68 в клетке-хозяине; молекулу нуклеиновой кислоты, подходящую для упаковки в капсид rAAVhu68, 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 AAVhu68. В одном варианте реализации, клеточная культура состоит из клеток млекопитающих (например, эмбриональных клеток 293 почки человека, среди прочего) или клеток насекомых (например, бакуловируса).

Соответственно, функции гер обеспечиваются AAV, который происходит из того же источника, что и ITR, которые присутствуют в векторном геноме, или из другого источника, который упаковывает геном вектора в капсид AAV (например, AAVhu68). В некоторых вариантах реализации, белок гер происходит из AAV2. Однако в других вариантах реализации в другом варианте реализации белок гер представляет собой гетерологичный белок гер, отличный от AAVhu68гер, например, но не ограничиваясь ими, белок гер AAV1, белок гер AAV2, белок гер AAV3, белок гер AAV4, белок гер AAV5, белок гер AAV6, белок гер AAV7, белок гер AAV8; или гер 78, гер 68, гер 52, гер 40, гер68/78 и гер40/52; или его фрагмент; или другой источник. Любая из этих последовательностей капсида AAVhu68 или мутантного AAV может находиться под контролем экзогенных регуляторных контрольных последовательностей, которые направляют их экспрессию в продуцирующей клетке.

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. 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-adenovirus 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.

В некоторых вариантах реализации, процесс производства rAAV.hGALC 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.

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., и ее приоритетных документах, патентных заявках США № 62/322071, поданных 13 апреля 2016 года и 62/226357, поданных 11 декабря, 2015 года и озаглавленный «Scalable Purification Method for AAV9»,

которая включена в данный документ в качестве ссылки. Методы очистки AAV8, международная патентная заявка № PCT/US2016/065976, поданная 9 декабря 2016 г., и ее приоритетные документы патентные заявки США №№ 62/322098, поданные 13 апреля 2016 г., и 62/266341, поданные 11 декабря 2015 г. и rh10, международная патентная заявка № PCT/US16/66013, поданная 9 декабря 2016 г., и ее приоритетные документы, патентная заявка США № 62/322055, поданная 13 апреля 2016 г., и 62/266347, озаглавленная «Scalable Purification Method for AAVrh10», также поданная 11 декабря 2015 г., а также в отношении AAV1, международной патентной заявки № PCT/US2016/065974, поданной 9 декабря 2016 г., и ее приоритетных документов патентные заявки США №№ 62/322083, поданные 13 апреля 2016 г. и 62/26 351, для «Scalable Purification Method for AAV1», поданной 11 декабря 2015 г., все включены в настоящий документ посредством ссылки.

Для расчета содержания пустых и полных частиц объема 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 (ddPCR). Например, были описаны способы определения титров одноцепочечного и самокомплементарного генома вектора AAV с помощью ddPCR. 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 rAAVhu68, имеющих упакованные геномные последовательности, от не имеющих геном промежуточных rAAVhu68 включает подвергание суспензии, содержащей рекомбинантные вирусные частицы rAAVhu68 и промежуточные капсиды rAAVhu68, быстрой жидкостной хроматографии, в которой вирусные частицы rAAVhu68 и промежуточные rAAVhu68 связываются с сильной анионообменной смолой, уравновешенной при pH 10,2, и подвергаются солевого градиенту, при мониторинге элюата на предмет поглощения ультрафиолетового излучения при около 260 и около 280. Хотя pH менее оптимален для rAAVhu68, он может находиться в диапазоне от около 10,0 до 10,4. В этом методе полные капсиды AAVhu68 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/hu68/9 (Life Technologies), которая эффективно захватывает серотип AAV2/hu68. В этих ионных условиях значительный процент остаточной клеточной ДНК и белков проходит через колонку, в то время как частицы AAV эффективно захватываются.

Композиции и применения.

В настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие по меньшей мере один стоковый rAAV.hGALC (например, стоковый rAAVhu68 или стоковый мутантный 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 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, нанокapsулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и т.п., могут использоваться для введения композиций по данному изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, векторные геномы, доставляемые вектором rAAV, 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 $\times 100$ обозначают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового ядра, а последняя цифра $\times 10$ обозначает процентное содержание полиоксиэтилена. В одном варианте реализации выбран полуксамер 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. Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают, но не ограничиваются ими, прямую доставку в желаемый орган (например, печень (необязательно через печеночную артерию), легкое, сердце, глаз, почки), пероральный, ингаляционный, интраназальный, интратекальный, интратрахеальный, внутриартериальный, внутриглазный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный и другие исходные пути введения. При желании способы введения можно комбинировать.

Дозировки вирусного вектора зависят 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. Дозировка регулируется 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 продукта 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.

Композиции вируса с дефектом репликации могут быть составлены в виде единиц дозирования, чтобы содержать количество вируса с дефектом репликации, которое находится в диапазоне от около $1,0 \times 10^9$ GC до около $1,0 \times 10^{16}$ GC (для лечения среднего субъекта с массой тела 70 кг), включая все целые числа 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 одном варианте реализации для применения людям доза может

находиться в диапазоне от $1,4 \times 10^{13}$ до примерно 4×10^{14} GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона.

Эти указанные выше дозы можно вводить в различных объемах носителя, вспомогательного вещества или буферной композиции, в диапазоне от около 25 до около 1000 микролитров, или в более высоких объемах, включая все числа в диапазоне, в зависимости от размера обрабатываемой области, используемый титр вируса, способ введения и желаемый эффект метода. В одном варианте реализации, объем носителя, вспомогательного вещества или буфера составляет по меньшей мере около 25 мкл. В одном варианте реализации, объем составляет около 50 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 75 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 100 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 125 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 150 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 175 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 200 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 225 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 250 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 275 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 300 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 325 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 350 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 375 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 400 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 450 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 500 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 550 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 600 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 650 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет около 700 мкл. В другом варианте реализации, объем составляет от около 700 до 1000 мкл.

Терапевтически эффективные интратекальные/интрацистеральные дозы rAAV.hGALC варьируются от около 1×10^{11} до $7,0 \times 10^{14}$ GC (базовые дозы), что эквивалентно 10^9 - 5×10^{10} GC/г массы мозга пациента. В качестве альтернативы пациентам указанной возрастной группы можно вводить следующие терапевтически эффективные базовые дозы:

Новорожденные: от около 1×10^{11} до около 3×10^{14} GC;

3-9 месяцев: от около 6×10^{12} до около 3×10^{14} GC;

9 месяцев - 6 лет: от около 6×10^{12} до около 3×10^{14} GC;

3-6 лет: от около $1,2 \times 10^{13}$ до около 6×10^{14} GC;

6-12 лет: от около $1,2 \times 10^{13}$ до около 6×10^{14} GC;

12+ лет: от $1,4 \times 10^{13}$ до около $7,0 \times 10^{14}$ GC;

18+ лет (взрослый): от $1,4 \times 10^{13}$ до около $7,0 \times 10^{14}$ GC.

В некоторых вариантах реализации, доза может находиться 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 может находиться в диапазоне от около 3×10^{10} GC/г массы мозга до

около 3×10^{11} GC/г массы мозга. В некоторых вариантах реализации, доза может находиться в диапазоне от около 5×10^{10} GC/г массы мозга до около $1,85 \times 10^{11}$ GC/г массы мозга. Для масштабирования между младенцами и подростками/взрослыми масса мозга в некоторых случаях оценивается от около 600 г до около 800 г для детей в возрасте от 4 до 12 месяцев; от около 800 г до около 1000 г для детей от девяти месяцев до 18 месяцев, от около 1000 до около 1100 г для детей от 18 месяцев до трех лет; от 1100 г до около 1300 г для подростков или взрослых людей, или около 1300 г для взрослого человека.

В одном варианте реализации, вирусные конструкции могут быть доставлены в дозах от по меньшей мере около 1×10^9 GC до около 1×10^{15} или от около 1×10^{11} до 5×10^{13} GC. Подходящие объемы для доставки этих доз и концентраций могут быть определены специалистом в данной области 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 регулируется для уравнивания терапевтического эффекта с любыми побочными эффектами, и такие дозировки могут варьироваться в зависимости от терапевтического применения, для которого используется рекомбинантный вектор.

Вышеописанные рекомбинантные векторы можно доставлять в клетки-хозяева в соответствии с опубликованными методами. rAAV, 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, 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 других путей доставки.

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*.

В одном примере состав может содержать, например, забуференный физиологический раствор, содержащий один или более из следующих компонентов: хлорид натрия, гидрокарбонат натрия, декстроза, сульфат магния (например, сульфат магния $7\text{H}_2\text{O}$), хлорид калия, хлорид кальция (например, хлорид кальция $2\text{H}_2\text{O}$), двухосновный фосфат натрия и их смеси в воде. Соответственно, для интратекальной доставки осмолярность находится в диапазоне, совместимом с цереброспинальной жидкостью (например, от около 275 до около 290); см., например, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview. Необязательно, для интратекальной доставки коммерчески доступный разбавитель может использоваться в качестве суспендирующего агента или в комбинации с другим суспендирующим агентом и другими необязательными вспомогательными веществами. See, e.g., Elliotts B® solution [Lukare Medical].

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.

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

Необязательно, композиции по данному изобретению 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.

Композиции по данному изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, такой как определено выше. Соответственно, описанные в данном

документе композиции содержат эффективное количество одного или более AAV, суспендированных в фармацевтически подходящем носителе и/или смешанных с подходящими вспомогательными веществами, предназначенными для доставки субъекту посредством инъекции, осмотического насоса, интратекального катетера или для доставки другим устройством или путем. В одном примере композиция составлена для интратекальной доставки.

Используемые в данном документе термины «интратекальная доставка» или «интратекальное введение» относятся к способу введения лекарственных средств посредством инъекции в позвоночный 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*.

Используемые в данном документе термины «интратекальная доставка» или «интратекальное введение» относятся к способу введения лекарственных средств посредством инъекции в позвоночный 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*.

Используемые в данном документе термины «внутрицистермальная доставка» или «внутрицистермальное введение» относятся к способу введения лекарственных средств непосредственно в спинномозговую жидкость *cisterna magna cerebellomedularis*, более конкретно, через субокципитальную пункцию или прямую инъекцию в *cisterna magna* или через постоянно установленную трубку.

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.

Векторы и композиции gAAV.GALC, представленные в данном документе, полезны для коррекции состояний, связанных с недостаточными уровнями ферментативной активности GALC. В некоторых вариантах реализации векторы и композиции gAAV.GALC, представленные в данном документе, применимы для лечения дисфункции периферических нервов, вызванной дефицитом GALC, полезны при лечении дыхательной недостаточности и/или потери моторной функции, вызванной дефицитом GALC, полезны при лечении болезни Краббе, и/или полезны при лечении симптомов, связанных с болезнью Краббе, у пациентов.

В некоторых вариантах реализации композицию, содержащую эффективное количество rAAV.hGALC, вводят пациенту в возрасте менее 6 месяцев, страдающему болезнью Краббе в раннем детстве (EIKD). В некоторых вариантах реализации возраст пациента составляет менее 6 месяцев, и пациент имеет недостаточность ферментов GALC, которая менее серьезна, чем EIKD.

В некоторых вариантах реализации композицию, содержащую эффективное количество rAAV.hGALC, вводят пациенту в возрасте старше 6 месяцев, например, в возрасте от 7 месяцев до около 12 месяцев, который страдает болезнью Краббе в позднем детстве (LIKD). В некоторых вариантах реализации пациент старше 6 месяцев или от около 7 месяцев до 12 месяцев и имеет дефицит ферментов GALC, который менее серьезен, чем LIKD.

В некоторых вариантах реализации возраст пациента превышает год (например, от 13 месяцев до 10 лет) и он страдает ювенильной болезнью Краббе (JKD). В некоторых вариантах реализации возраст пациента составляет от 13 месяцев до 10 лет, и он имеет дефицит ферментов GALC, который менее серьезен, чем JKD.

В некоторых вариантах реализации изобретения возраст пациента превышает 10 лет (например, от 10 лет до 12 лет или от 10 лет до 18 лет или старше), и он страдает болезнью Краббе в подростковом или взрослом возрасте.

В любом из вариантов реализации, описанных выше, терапия rAAV.hGALC, представленная в данном документе, может вводиться в качестве совместной терапии с терапией замещения гемопоэтических стволовых клеток, трансплантацией костного мозга (ТКМ) и/или терапией восстановления субстрата (SRT). В некоторых вариантах реализации за терапией rAAV.hGALC (например, EIKD) следует совместная терапия, такая как ТКСК или ТКМ, или заместительная ферментная терапия. В некоторых вариантах реализации терапия приводит к быстрой продукции фермента после введения вектора, в том числе в течение 1 недели после лечения.

В некоторых вариантах реализации заместительная ферментативная терапия включает введение белка GALC человека SEQ ID NO: 10. В других вариантах реализации другие варианты белка hGALC (например, такие как с канонической последовательностью, идентифицированной в данном документе, или сконструированный белок) могут быть использованы в заместительной ферментной терапии. Комбинации различных белков hGALC могут использоваться в заместительной ферментной терапии. В таких вариантах реализации белок hGALC может быть продуцирован *in vitro* с использованием подходящей системы продуцирования. см., например, C. Lee et al, 2005/10/01, Enzyme replacement therapy results in substantial improvements in early clinical phenotype in a mouse model of globoid cell leukodystrophy, FASEB journal, The FASEB Journal 19(11):1549-51, October 2005]. Белки hGALC могут быть составлены для доставки (например, суспендированы в физиологически совместимом солевом растворе) любым подходящим путем, включая, но не ограничиваясь этим, внутривенный, внутривентрикулярный или интратекальный путь. Подходящие дозы могут находиться в

диапазоне от 1 мг/кг до 20 мг/кг или от 5 мг/кг до 10 мг/кг и могут вводиться повторно один раз в неделю или более или менее часто, при необходимости (например, один раз через день, один раз каждые две недели и т. д.). Используя введение СМЖ вектора hAAVhu68.GALC, уровни GALC в головном мозге и сыворотке могут быть супрафизиологическими без токсичности, и может наблюдаться улучшение нейромоторной функции и миелинизация в ЦНС и ПНС. Когда за введением СМЖ новорожденным следует трансплантация костного мозга в модели постнатального кондиционированного животного, выживаемость может быть увеличена (например, до > 300 дней) при отсутствии явных признаков. У бессимптомного пациента с болезнью Краббе однократная инъекция AAV.cGALC в *cisterna magna* может обеспечить фенотипическую коррекцию, увеличение выживаемости, нормализацию нервной проводимости и/или улучшение МРТ головного мозга.

В некоторых вариантах реализации терапия rAAV.hGALC предоставляется после ТКСК или ТКМ (например, LKID или JKD). Однако в некоторых вариантах реализации rAAV.hGALC обеспечивает достаточные уровни GALC, которые не требуются для ТКСК или ТКМ.

Целью лечения является функциональная замена дефектного GALC пациента с помощью генной терапии, направленной на ЦНС и ПНС на основе rAAV. Эффективность терапии для пациентов с EIKD или LKID может быть измерена путем оценки улучшения одного или более симптомов EIKD или LKID: плач и раздражительность, спастичность, сжатые руки, потеря улыбки, плохой контроль головы и трудности с кормлением; умственное и двигательное ухудшение, гипер- или гипотоничность, судороги, слепота, глухота и увеличение выживаемости (при EIKD без лечения смерть обычно наступает в возрасте до 2 лет; при LKID выживаемость может увеличиваться до 3-5 лет). Кроме того, для этих и других пациентов с болезнью Краббе эффективность лечения может быть оценена по: уменьшению дисмиелинизации и демиелинизации, затрагивающей как периферические нервы, так и белое вещество ЦНС (глубокое белое вещество мозга и зубчатое белое вещество/белое вещество мозжечка), которое можно контролировать с помощью изображений (например, магнитно-резонансная томография (МРТ)); снижение скорости аномальной нервной проводимости (NCV) и/или вызванных слуховых потенциалов ствола мозга (BAEP); повышенный уровень GALC может наблюдаться в спинномозговой жидкости и/или плазме; и/или снижение накопления психозина.

Предложена композиция, содержащая рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), который содержит капсид AAV, который нацелен на клетки центральной нервной системы и который содержит упакованный в нем геном вектора, содержащий кодирующую последовательность галактозилцерамидазы, кодирующую зрелый белок галактозилцерамидазы, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют экспрессию белка, указанный геном вектора дополнительно содержит инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, полезная для лечения болезни Краббе, которая содержит гAAVhu68, имеющий геном вектора CB7.CI.hGALC.rBG. В одном варианте реализации геном вектора имеет кодирующую последовательность (SEQ ID NO: 19).

В определенных вариантах реализации использование композиции предусмотрено в способе коррекция дисфункции периферических нервов, вызванной дефицитом GALC, и/или способе лечения дыхательной недостаточности и потери двигательной функции, вызванной дефицитом GALC. В некоторых вариантах реализации способ включает введение композиции, содержащей дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), который содержит: (а) капсид AAV, который нацелен на клетки центральной нервной системы и который имеет геном вектора (b) упакованный в нем; и (b) геном вектора, содержащий последовательность, кодирующую галактозилцерамидазу, кодирующую зрелый белок галактозилцерамидазы, имеющий аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют экспрессию белка, причем геном вектора дополнительно содержит инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV.

В некоторых вариантах реализации предлагаемую в данном документе композицию гAAV.hGALC доставляют интратекально для лечения пациента с болезнью Краббе в раннем детстве. В некоторых вариантах реализации предлагаемую в данном документе композицию доставляют интратекально для лечения пациента с ювенильной болезнью Краббе (LIKD). В некоторых вариантах реализации предлагаемую в данном документе композицию гAAV.hGALC доставляют интратекально для лечения пациента с ювенильной болезнью Краббе. В некоторых вариантах реализации предлагаемую в данном документе композицию гAAV.hGALC доставляют интратекально для лечения пациента с болезнью Краббе в подростковом или взрослом возрасте. В некоторых вариантах реализации композицию гAAV.hGALC вводят в качестве совместной терапии с трансплантацией кроветворных стволовых клеток (ТКСК), трансплантацией костного мозга и/или субстрат-редуцирующей терапией. В некоторых вариантах реализации композицию гAAV.hGALC вводят в виде однократной дозы посредством субзатылочной инъекции под контролем компьютерной томографии (КТ) в cisterna magna (intra-cisterna magna).

Введение гAAV.hGALC стабилизирует прогрессирование заболевания, измеряемое по выживаемости, предотвращая потерю стадий развития и двигательных навыков, потенциально способствуя приобретению новых стадий, предотвращая возникновение и уменьшая частоту приступов. Таким образом, в некоторых вариантах реализации предусмотрены способы мониторинга лечения, в которых конечные точки измеряются, например, через 30 дней, 90 дней и/или 6 месяцев, а затем, например, каждые 6 месяцев в течение 2-летнего краткосрочного периода наблюдения. В некоторых вариантах реализации частота измерений снижается до одного раза в 12 месяцев в течение

длительного периода. Учитывая тяжесть заболевания в целевой популяции, субъекты могли достичь двигательных навыков при зачислении, развить и впоследствии потерять другие двигательные навыки или еще не показать признаков развития двигательных навыков. Таким образом, оценки отслеживают возраст достижения и возраст потери для всех стадий. В некоторых вариантах реализации этапы включают, например, одно или более из следующего: сидение без поддержки, ползание на четвереньках, стояние с посторонней помощью, ходьба с посторонней помощью, одиночное стояние и/или самостоятельная ходьба. В некоторых вариантах реализации лечение приводит к отсроченному началу судорожной активности и/или снижению частоты приступов. В некоторых вариантах реализации в способах мониторинга лечения субъекта используются клинические шкалы для количественной оценки воздействия лечения на развитие и изменения адаптивного поведения, познания, языка, двигательной функции и/или качества жизни, связанного со здоровьем. Шкалы и области включают, например, Шкалы развития младенцев и детей ясельного возраста Бейли (оценивают развитие младенцев и детей ясельного возраста в пяти областях: когнитивное, языковое, моторное, социально-эмоциональное и адаптивное поведение), Шкалы адаптивного поведения Вайнленда (издание III) (оценивают адаптивное поведение от рождения до взрослого возраста (0-90 лет) в пяти областях: общение, повседневные жизненные навыки, социализация, моторные навыки и дезадаптивное поведение), Моторные шкалы развития Пибоди - второе издание (измеряют взаимосвязанные моторные функции от рождения до пятилетнего возраста; оценки сосредоточены на шести областях: рефлекс, неподвижность, передвижение, манипулирование объектами, хватание и зрительно-моторная интеграция), опросник качества жизни для младенцев (ITQOL) (измеряемая родителями мера связанного со здоровьем качества жизни, разработанные для детей от 2 месяцев до 5 лет), а также шкалы Маллена для раннего обучения (оценивают язык, моторику и способность восприятия у младенцев и детей ясельного возраста до 68 месяцев). В некоторых вариантах реализации эффекты лечения отслеживаются или измеряются путем оценки изменений миелинизации, функциональных исходов, связанных с миелинизацией, и потенциальных биомаркеров заболевания. В некоторых вариантах реализации центральная и периферическая демиелинизация замедляется или прекращается в прогрессировании после лечения субъекта. Центральную демиелинизацию можно отслеживать с помощью измерений анизотропии областей белого вещества с помощью диффузно-тензорной магнитно-резонансной томографии (ДТ-МРТ) и отслеживания волокон кортикоспинальных моторных трактов, изменения в которых являются индикаторами состояния и прогрессирования заболевания. Периферическая демиелинизация может быть измерена косвенно с помощью исследований скорости нервной проводимости (NCV) на двигательных нервах (глубокие малоберцовые, большеберцовые и локтевые нервы) и сенсорных нервах (икроножные и срединные нервы) для отслеживания колебаний, указывающих на изменение уровней биологически активного миелина (то есть F-волна и латентный период в дистальном направлении, амплитуда или наличие или отсутствие

ответа).

В некоторых вариантах реализации предложен способ мониторинга лечения после введения gAAV.hGALC, в котором субъект оценивается на задержку потери зрения или отсутствие потери зрения у тех субъектов, у которых до лечения не развилось значительной потери зрения. Таким образом, измерение вызванных зрительных потенциалов (ЗВП) используется для объективного измерения ответов на зрительные стимулы как индикатора центрального нарушения или потери зрения. В некоторых вариантах реализации субъекта наблюдают на предмет потери слуха после лечения с использованием, например, теста слухового вызванного потенциала ствола мозга (BAER). В некоторых вариантах реализации предлагается способ мониторинга лечения после введения gAAV.hGALC, при котором измеряются уровни психозина у субъекта.

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 «содержать», «содержит», «включающий», «содержащий» и «включающий» 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 отклонение в 10% ($\pm$ 10%) от приведенной ссылки, если не указано иное.

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

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. В некоторых вариантах реализации геном вектора может содержать две или более кассет экспрессии. В других вариантах реализации термин «трансген» может использоваться взаимозаменяемо с «кассетой экспрессии». 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 настоящем документе.

Аббревиатура «sc» относится к самокомплементарным. «Самокомплементарный

AAV» относится к конструкции, в которой кодирующая область, несущая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты AAV, была сконструирована для образования внутримолекулярной двухцепочечной ДНК-матрицы. После инфицирования, вместо того, чтобы ждать опосредованного клетками синтеза второй цепи, две комплементарные половины scAAV будут ассоциироваться с образованием одной единицы двухцепочечной ДНК (дцДНК), готовой к немедленной репликации и транскрипции. См., например, D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254. Самокомплементарные AAV описаны, например, в патентах США № 6596535; 7125717; и 7456683, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

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.

«Вирус с дефектом репликации» или «вирусный вектор» относится к синтетической или искусственной вирусной частице, в которой кассета экспрессии, содержащая интересующий ген, упакована в вирусный капсид или оболочку, где любые вирусные геномные последовательности также упакованы внутри вирусного капсида или оболочка являются дефицитными по репликации, *т. е.* они не могут генерировать новые вирионы, но сохраняют способность инфицировать клетки-мишени. В одном варианте реализации геном вирусного вектора не включает гены, кодирующие ферменты, необходимые для репликации (геном можно сконструировать так, чтобы он был «беспроегрешным» - содержащий только интересующий ген, фланкированный сигналами, необходимыми для амплификации и упаковки искусственного генома), но эти гены могут поставляться в процессе производства. Следовательно, он считается безопасным для использования в генной терапии, поскольку репликация и инфицирование новыми вирионами не могут происходить, кроме как в присутствии вирусного фермента, необходимого для репликации.

Во многих случаях частицы gAAV называют устойчивыми к ДНКазе. Однако в дополнение к этой эндонуклеазе (ДНКазе) другие эндо- и экзонуклеазы также могут быть использованы на стадиях очистки, описанных в данном документе, для удаления загрязняющих нуклеиновых кислот. Такие нуклеазы могут быть выбраны для разложения

одноцепочечной ДНК и/или двухцепочечной ДНК и РНК. Такие стадии могут содержать одну нуклеазу или смеси нуклеаз, направленных на разные мишени, и могут быть эндонуклеазами или экзонуклеазами.

Термин «устойчивый к нуклеазам» указывает на то, что капсид AAV полностью собрался вокруг кассеты экспрессии, которая предназначена для доставки гена в клетку-хозяина и защищает эти упакованные геномные последовательности от деградации (переваривания) во время стадий инкубирования нуклеаз, предназначенных для удаления загрязняющих нуклеиновых кислот, которые могут присутствовать в процессе производства.

Используемый в данном документе термин «эффективное количество» относится к количеству композиции rAAV, которая доставляет и экспрессирует в клетках-мишенях некоторое количество продукта гена из генома вектора. Эффективное количество можно определить на основе модели на животном, а не на пациенте-человеке. В данном документе описаны примеры подходящей мышиной модели.

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 настоящей заявке.

ПРИМЕРЫ

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

Сокращения	Описание
A	Абсорбция
aa	Аминокислоты
AAV	Аденоассоциированный вирус
AAVhu68	Аденоассоциированный вирус серотипа hu68
Ad5	Аденовирус серотипа 5
НЯ	Нежелательные явления
AEX	Анионный обмен
AmpR	Устойчивость к ампициллину (ген)
ANOVA	Дисперсионный анализ
AUC	Аналитическое ультрацентрифугирование
BA	Промотор куриного β-актина
BAER	Слуховой вызванный потенциал ствола мозга
BBB	Барьер кровь-мозг
BCA	Бицинхониновая кислота
BDS	Нерасфасованная лекарственная субстанция
BMCB	Главный банк бактериальных клеток
п.о.	Пар оснований
BRF	Досье на серию
BCA	Бычий сывороточный альбумин
BSC	Ламинарный бокс биологической защиты
BWCB	Рабочий банк бактериальных клеток
cap	Капсид (ген)

Сокращения	Описание
CBC	Полный анализ крови
CBER	Центр оценки и исследований биологических препаратов
CFR	Свод федеральных правил
KOE	Колониеобразующие единицы
CI	Химерный интрон
CMC	Химическое производство и контроли
CMO	Организация контрактного производства
ЦМВ IE	Среднеранний энхансер цитомегаловируса
ЦНС	Центральная нервная система
COA	Сертификат анализа
CRL	Лаборатории Чарльза Ривера
CRO	Контрактная исследовательская организация
СМЖ	Спинномозговая жидкость
КТ	Компьютерная томография
CTL	Цитотоксический Т-лимфоцит
кцПЦР	Капельная цифровая полимеразная цепная реакция
DLS	Динамическое рассеяние света
DMEM	Среда Игла, модифицированная Дульбекко
DMF	Регистрационное досье на зарегистрированный лекарственный препарат для медицинского применения
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
DO	Растворенный кислород
DP	Лекарственный продукт
DRG	Ганглии спинного корня
DS	Лекарственное средство
DSMB	Совет по мониторингу данных и безопасности
E1A	Ранняя область 1A (ген)
ЭКГ	ЭКГ
ЭДТК	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ИФА	Иммуноферментный анализ
ELISpot	Иммуноспот, связанный с ферментом
ERT	Ферментно-заместительная терапия
EU	Единицы эндотоксина
F	Женский
F/U	Последующее врачебное наблюдение
ФБС	Фетальная бычья сыворотка
FDA	Управление по контролю за продуктами и лекарственными средствами
FDP	Конечный лекарственный продукт
FFB	Буфер для окончательной композиции
FIH	Исследование первого применения препарата у человека
GALC	Галактозилцерамидаза (ген, человек)
Galc	Галактозилцерамидаза (ген, мышь)
GALC	Галактозилцерамидаза (белок)
GC	Копии генома
НЛП	Надлежащая лабораторная практика
НПП	Надлежащая производственная практика
НСДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота клетки-хозяина
HCP	Белок клетки-хозяина

Сокращения	Описание
HEK293	Клеточная линия эмбриональной почки человека 293
ICH	Международная конференция по гармонизации
ICM	Intra-Cisterna Magna
ICV	Внутрицеребровентрикулярный
IDS	Идуронат-2-сульфатаза
IFN- γ	Интерферон гамма
IT	Инtrateкально
ITFFB	Инtrateкальный буфер для окончательной композиции
ITR	Инвертированный концевой повтор
IU	Инфекционное отделение
В/в	Внутривенно
KanR	Устойчивость к канамицину (ген)
LAL	Лизат амебоцитов мечехвоста
LFT	Функциональные тесты печени
LOD	Предел обнаружения
LTFU	Долгосрочное наблюдение
M	Мужчина
MBR	Сводный протокол сопровождения партии препарата
MCB	Главный банк клеток
МЭД	Минимальная эффективная доза
MPT	Магнитно-резонансная томография
мРНК	Рибонуклеиновая кислота мессенджер
MC	Масс-спектрометрия
MTD	Максимальная переносимая доза
N	Количество субъектов или животных
N/A	Не применимо
NAbs	Нейтрализующие антитела
NBS	Скрининг новорожденных
NCV	Скорость нервной проводимости
NGS	Секвенирование следующего поколения
NHP	Нечеловеческий примат
NHS	Исследование естественного развития болезни
OL	Открытый
PAS	Шифф-йодная кислота
ФСБ	Фосфатно-солевой буферный раствор
PEI	Полиэтиленимин
PES	Полиэфирсульфон
PND	Послеродовой день
POC	Доказательство концепции
ПолиА	Полиаденилирование
QA	Проведение контроля качества
КК	Контроль качества
кПЦР	Количественная полимеразная цепная реакция
rAAV	Рекомбинантный аденоассоциированный вирус
rcAAV	Аденоассоциированный вирус, способный к репликации
rBG	Кролик β -Глобин
рДНК	Рибосомальная дезоксирибонуклеиновая кислота
rep	Репликаза (ген)
РНК	Рибонуклеиновая кислота

Сокращения	Описание
Об/мин	Число оборотов в минуту
SA	Простое
SAE	Серьезные побочные эффекты
SD	Среднеквадратичное отклонение
SDS	Додецилсульфат натрия
SDS-PAGE	Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
СОП	Стандартная операционная процедура
SRT	Триггер проверки безопасности
оцДНК	Одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
TBD	Будет определен
TCID ₅₀	50% инфекционная доза тканевой культуры
TE	Трис-ЭДТК
TFF	Фильтрация в тангенциальном потоке
twi	Аллель потери функции Twitcher
СЭЖХ	Сверхэффективная жидкостная хроматография
США	Соединенные Штаты
USP	Фармакопея США
VEP	Визуально вызванный потенциал
VP1	Вирусный белок 1
VP2	Вирусный белок 2
VUS	Варианты неизвестной значимости
WCB	Рабочий банк клеток
ВОЗ	Всемирная организация здоровья
ДТ	Дикий тип

ПРИМЕР 1 - Рекомбинантный AAVhu68.hGALC

гAAVhu68.hGALC представляет собой AAV, который несет сконструированную последовательность, кодирующую GALC человека. Капсид AAVhu68 из гAAVhu68.hGALC на 99% идентичен по аминокислотному уровню AAV9. Две аминокислоты, которые различаются между AAV9 [SEQ ID NO: 4] и капсидом AAVhu68 [SEQ ID NO: 2] расположены в областях VP1 (67 и 157) и VP2 (157) капсида и обозначены на Фиг. 1. См. также WO 2018/160852, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

гAAVhu68.hGALC продуцируется тройной плазмидной трансфекцией клеток HEK293 *cis*- плазмидой AAV, кодирующей кассету трансгена, фланкированной ITR AAV, *trans*- плазмидой AAV, кодирующей гены *rep* AAV2 и *cap* AAVhu68 (pAAV2/hu68.KanR), и вспомогательной плазмиды аденовируса (pAdΔF6.KanR).

A. Элементы последовательности плазмиды генома вектора AAV

Линейная карта генома вектора представлена на Фиг. 2. Генома вектора содержит следующие элементы последовательности:

Инвертированный концевой повтор (ITR): ITR являются идентичными обратными комплементарными последовательностями, полученными из AAV2 (130 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.

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

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.

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 кассете 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.

Кодирующая последовательность: Сконструированная кДНК гена *GALC* человека кодирует белок галактозилцерамидазы человека, лизосомальный фермент, ответственный за гидролиз и деградацию галактолипидов миелина (2055 п.о.; 685 аминокислот [aa], GenBank: EAW81361.1).

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.

В. Транс-плазмида: pAAV2/1.KanR (p0068)

Транс- плазмида AAV2/hu68 pAAV2/hu68.KanR (p0068) представлена на Фиг. 21.

Транс- плазмида AAV2/hu68 представляет собой pAAV2/hu68.KanR (p0068). Плазмида pAAV2/hu68.KanR имеет длину 8030 п.о. и кодирует четыре белка репликазы AAV2 (Rep) дикого типа, необходимых для репликации и упаковки генома вектора AAV. Плазмида pAAV2/hu68.KanR также кодирует три белка капсида (Cap) ДТ вириона AAVhu68, которые собираются в вирионную оболочку серотипа hu68 AAV для размещения генома вектора AAV.

Для создания *транс*-плазмиды pAAV2/hu68.KanR был удален ген *cap* AAV9 из плазмиды pAAV2/9n (p0061-2) (который кодирует гены *rep* AAV2 дикого типа и *cap* AAV9 на остоле плазмиды, полученном из вектора pBluescript KS) и он был заменен на ген *cap* AAVhu68. Ген устойчивости к ампициллину (AmpR) также был заменен геном устойчивости к канамицину (KanR), давая pAAV2/hu68.KanR (p0068). Эта стратегия клонирования переместила последовательность промотора p5 AAV (которая обычно

управляет экспрессией гер) с 5'-конца гер на 3'-конец сар, оставляя после себя усеченный промоутер р5 выше гер. Этот усеченный промотор служит для подавления экспрессии гер и, следовательно, для максимального увеличения продукции вектора (Фиг. 21).

Все составные части плазмиды были проверены прямым секвенированием.

С. Плазида помощника аденовируса: pAdDeltaF6 (KanR)

Плазида помощник аденовируса pAdDeltaF6 (KanR) представлена на Фиг. 22В)

Плазида pAdDeltaF6 (KanR) имеет размер 15770 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. (Фиг. 22А). Наконец, ген устойчивости к ампициллину был заменен геном устойчивости к канамицину для создания pAdeltaF6 (KanR) (Фиг. 22В). 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 и составы получают в соответствии с блок-схемами, показанными на Фиг. 30 и Фиг. 31, соответственно.

ПРИМЕР 2 - Доставка AAVhu68.hGALC в мышиную модель twitcher с GALC-дефицитом

В описанных ниже исследованиях использовали модель мыши Twitcher для определения возможности доставки вектора гAAVhu68 (Фиг. 2), кодирующего сконструированную последовательность GALC человека (SEQ ID NO: 9) в СМЖ для достижения терапевтических уровней экспрессии GALC и восстановления уровней нескольких биомаркеров заболевания. Обзор исследований на мышах Twitcher представлен на Фиг. 4В.

Мышь Twitcher представляет собой естественную инбредную модель болезни Краббе, которая была идентифицирована как спонтанная мутация в лаборатории Джексона в 1976 году (Kobayashi T., et al. (1980) Brain Research. 202(2):479-483). Больные мыши являются гомозиготными по аллелю потери функции twitcher (twi), который состоит из мутации G в A в гене Galsc. Эта мутация вызывает ранний стоп-кодон (W339X). Усеченный белок GALC имеет остаточную ферментативную активность, близкую к 0%, что аналогично уровням активности GALC, наблюдаемым у пациентов с детской формой болезни Краббе. Гетерозиготные мыши-носители (twi/+) фенотипически нормальны.

Прогрессирование заболевания у мышей Twitcher хорошо задокументировано (Фиг. 4А), а также хорошо задокументированы различные фенотипы нейропатологических и поведенческих дефектов, обусловленные инфантильной болезнью Краббе, как представлено в Таблице 5. Как и у инфантильных пациентов с синдромом

Краббе, дефицит GALC у мышей приводит к накоплению промежуточного цитотоксического липида, психозина. Мыши Twitcher также обнаруживают массивную инфильтрацию ПНС и белого вещества ЦНС фагоцитарными, наполненными психозином глобоидными клетками, которые, как считается, происходят из клонов макрофагов и/или микроглии (Tanaka K., et al. (1988) Brain Research. 454(1):340-346; Levine S.M., et al. (1994) Intl J Dev Neuro. 12(4):275-288). Это приводит к демиелинизации, которая является одним из основных признаков болезни у пациента с болезнью Краббе. После начального периода нормальной миелинизации пораженные мыши Twitcher теряют миелин в ПНС в возрасте 10 дней из-за гибели миелин-образующих шванновских клеток (Jacobs JM, et al. (1982) J Neurol Sci. 55 (3): 285-304) и в 20-дневном возрасте в ЦНС из-за гибели миелин-образующих олигодендроцитов. Вероятно, из-за этой задержки демиелинизация более серьезна в периферических нервах, чем в ЦНС этих мышей (Suzuki K. & Suzuki K. (1983) The American journal of pathology. 111(3):394-397). Наконец, мыши Twitcher демонстрируют стойкое и быстрое неврологическое ухудшение после появления симптомов, которое аналогично наблюдается у инфантильных пациентов с болезнью Краббе при появлении симптомов. Поведенческие симптомы у этих мышей включают двигательные фенотипы, напоминающие те, что наблюдаются у людей, включая тремор, подергивание и слабость задних ног, которые проявляются в около 20-дневном возрасте. Мыши в конечном итоге достигают человеческой конечной точки, характеризующейся серьезной потерей массы тела и параличом, примерно к 40-дневному возрасту (Wenger DA (2000) Molec Мед Today. 6(11):449-451).

Инфантильные пациенты Краббе демонстрируют клинические признаки, аналогичные мышам Twitcher. Таким образом, мышинная модель Twitcher подходит для оценки эффективности (восстановление активности ферментов для улучшения выживаемости, двигательной функции и патологии мозга и нервов) rAAVhu68.hGALC для подтверждения показаний Краббе у младенцев. Исследования с использованием мышей Twitcher, описанные ниже, продемонстрировали эффективность rAAVhu68.hGALC для экспрессии активного фермента GALC в соответствующих тканях, восстановления выживаемости, улучшения двигательной функции и улучшения гистопатологии ЦНС и ПНС после однократного введения ICV (наиболее эффективный путь введения в мышинных моделях, где ICM технически невозможно).

Пресимптомные новорожденные мыши Twitcher

Целью этого исследования было установить оптимальный ROA, серотип капсида и диапазон доз для достижения максимальной эффективности на мышинной модели Twitcher. Для этих исследований были отобраны новорожденные мыши без симптомов, чтобы добиться максимального изменения в наблюдении за лечением болезни.

Чтобы установить оптимальный ROA, в/в путь через инъекцию в височную вену сравнивался с ICV путем, потому что оба пути могут трансдуцировать ЦНС и ПНС у новорожденных животных. Пресимптомным мышам Twitcher (twi/twi) вводили rAAVhu68.hGALC либо внутривенно в дозе $1,00 \times 10^{11}$ GC, либо ICV в 5-кратно меньшей

дозе $2,00 \times 10^{10}$ GC на 0 PND. Доза для внутривенного введения была выбрана, поскольку она соответствует $1,00 \times 10^{14}$ GC/кг, высокой дозе, необходимой для достижения трансдукции ЦНС, и была выбрана доза в 5 раз ниже для ICV, поскольку прямое введение в СМЖ облегчает трансдукцию ЦНС при более низких дозах. В качестве контроля пресимптомным мышам Twitcher соответствующего возраста вводили ICV носитель (ФСБ). Животных умерщвляли по достижении человеческой конечной точки, определяемой потерей массы тела $> 20\%$ от максимальной массы тела и/или параличом задних ног, и регистрировали выживаемость. Внутривенное введение rAAVhu68.hGALC в более высокой дозе ($1,00 \times 10^{11}$ GC) обеспечивало некоторое улучшение выживаемости по сравнению с необработанными контролями. Однако, по сравнению с внутривенным введением, rAAVhu68.hGALC, введенное с помощью ICV, в 5-кратной более низкой дозе ($2,00 \times 10^{10}$ GC) давало более высокую выживаемость (Фиг. 5). Поэтому ICV ROA был выбран для последующих исследований.

Для определения наилучшего капсида AAV для доставки в нервную систему генома вектора, кодирующего GALC человека, были протестированы четыре различных капсида AAV. Капсиды включали AAV серотипа 3b (AAV3b), AAV серотипа 5 (AAV5), AAV серотипа 1 (AAV1) и AAV серотипа hu68 (rAAVhu68.hGALC). Каждый вектор AAV вводили ICV в дозе $2,00 \times 10^{10}$ GC, что представляло собой низкую дозу и ROA, ранее установленные для эффективного продления выживаемости у пресимптоматических мышей Twitcher, при этом позволяя короткую продолжительность исследования (Фиг. 5). В качестве контроля группа бессимптомных мышей Twitcher получала только ICV носитель (ФСБ) на 0 PND. В то время как все четыре капсида увеличивали выживаемость по сравнению с контрольными группами, обработанными носителем, капсид AAVhu68 (rAAVhu68.hGALC) давал более высокую выживаемость по сравнению с AAV3b, AAV5 и AAV1 (Фиг. 6). Поэтому для последующих исследований был выбран капсид AAVhu68 (rAAVhu68.hGALC).

Для определения диапазона доз rAAVhu68.hGALC вводили ICV в дозе $2,00 \times 10^{10}$ GC, $5,00 \times 10^{10}$ GC или $1,00 \times 10^{11}$ GC новорожденным бессимптомным мышам Twitcher на 0 PND. В качестве контроля мышам Twitcher соответствующего возраста с пресимптоматическим синдромом (twi/twi) и здоровым гетерозиготам (twi/+), и мышам дикого типа вводили ICV носитель (ФСБ) на 0 PND.

На 35 PND подвижность и координацию мышей оценивали с помощью стержневого анализа (Фиг. 7). Поворотный стержень - это ускоряющий стержень, по которому бегают мыши, и время ожидания между началом анализа и точкой, в которой мыши падают со стержня, хорошо коррелирует с моторной координацией. Временная точка 35 PND была выбрана потому, что это момент времени, в который пораженные мыши Twitcher демонстрируют измеримые двигательные дефициты до достижения конечной точки гуманной эвтаназии. Тест с вращающимся стержнем выявил частичное восстановление моторики и координации после введения rAAVhu68.hGALC. Степень восстановления оказалась зависимой от дозы, и значительно более длительные латентные

периоды падения наблюдались для наивысшей дозы гAAVhu68.hGALC $1,00 \times 10^{11}$ GC ($p < 0,01$) (Фиг. 7).

После анализа с вращающимся стержнем отслеживали выживаемость для всех групп лечения. Дозозависимое увеличение в выживаемости наблюдалось у пресимптоматических мышей Twitcher (twi/twi), которым вводили гAAVhu68.hGALC на 0 PND по сравнению с мышами Twitcher ((twi/twi), которым вводили носитель. Наибольшая средняя выживаемость (130 дней) наблюдалась у мышей, которым вводили наивысшую дозу гAAVhu68.hGALC $1,00 \times 10^{11}$ GC (Фиг. 8).

В совокупности эти РОС эксперименты для определения оптимальной ROA, капсида и диапазона доз демонстрируют эффективность гAAVhu68.hGALC в сохранении нейромоторной функции и продлении выживаемости при введении мышам Twitcher до появления симптомов.

Симптоматические мыши Twitcher

Целью этого исследования было изучить эффективность гAAVhu68.hGALC при введении на ранней стадии патологии заболевания до появления поведенческих симптомов (12 PND; упоминается как «ранне-симптоматический») или во время более поздней фазы заболевания, когда у мышей проявляются поведенческие симптомы (PND 21; упоминается как «более поздне-симптоматический»), потому что мы хотели резюмировать контекст, подобный пациентам, включенным в исследования после появления симптомов. Более того, у мышей 0 PND созревание мозга эквивалентно созреванию недоношенного плода, тогда как 12 PND и PND 21 соответствуют 2-месячному и 9-месячному возрасту соответственно (www.translatingtime.org), что более точно воспроизводит предполагаемую инфантильную популяцию для FHN.

Мышам Twitcher с ранними симптомами вводили гAAVhu68.hGALC с помощью ICV в дозе $1,00 \times 10^{11}$ GC или $2,00 \times 10^{11}$ GC на 12 PND, в то время как другой группе мышей Twitcher с более поздними симптомами вводили гAAVhu68.hGALC с помощью ICV в более высокой дозе $2,00 \times 10^{11}$ GC на PND 21. Для введения была выбрана более низкая доза $1,00 \times 10^{11}$ PND, поскольку было обнаружено, что она является наиболее эффективной дозой для увеличения выживаемости мышей Twitcher (описано выше). Более высокая доза гAAVhu68.hGALC, равная $2,00 \times 10^{11}$ GC, также использовалась для лечения мышей на PND 21, поскольку предполагалось, что более высокая доза может потребоваться для мышей с более тяжелой демиелинизацией. В качестве контроля мышам Twitcher с ранними симптомами (twi/twi) и здоровым гетерозиготным мышам (twi/+) вводили только ICV носитель (ФСБ) на 12 PND, а исторические данные исследования 1 использовали для сравнения с мышами Twitcher (twi/twi), которым вводили $1,11 \times 10^{11}$ GC при 0 PND.

На 35 PND подвижность и координацию мышей оценивали с помощью теста с вращающимся стержнем, который представляет собой момент времени, в который мыши Twitcher (twi/twi) демонстрируют измеримые двигательные дефициты. Тест с вращающимся стержнем выявил частичное восстановление моторики и координации,

когда rAAVhu68.hGALC вводили пресимптоматическим мышам Twitcher на 0 PND в дозе $1,00 \times 10^{11}$ GC ($p < 0,01$) или мышам Twitcher с ранними симптомами на 12 PND в дозе либо $1,00 \times 10^{11}$ GC ($p < 0,001$), либо $2,00 \times 10^{11}$ GC ($p < 0,01$). Не наблюдалось значительного восстановления моторики и координации, когда дозу rAAVhu68.hGALC $2,00 \times 10^{11}$ GC вводили мышам Twitcher с более поздними симптомами на 21 PND (Фиг. 9).

После анализа с вращающимся стержнем отслеживали выживаемость для всех групп лечения. По сравнению с контрольными группами мышей Twitcher, получавшими носитель, более длительная выживаемость наблюдалась после введения rAAVhu68.hGALC как у мышей Twitcher с ранними симптомами на 12 PND, так и у мышей Twitcher с более поздними симптомами на 21 PND. Однако максимальная выживаемость была достигнута, когда мышам Twitcher с ранними симптомами вводили rAAVhu68.hGALC в высокой дозе $2,00 \times 10^{11}$ GC на 12 PND (Фиг. 10).

В совокупности улучшение выживаемости и нейромоторной функции мышей Twitcher позволило предположить, что rAAVhu68.hGALC может быть более эффективным, если его вводить на более ранних стадиях заболевания.

Фармакологическое исследование на симптоматических мышях Twitcher

Целью этого исследования была оценка фармакологических, функциональных и гистопатологических показателей после введения rAAVhu68.hGALC. Поскольку в предыдущих исследованиях животных умерщвляли в гуманной конечной точке, чтобы облегчить анализ выживания, это препятствовало сбору фармакологических и гистологических данных в совпадающие по возрасту моменты времени у мышей Twitcher и контрольных мышей, получавших носитель. Таким образом, это исследование изучило эти конечные точки.

Мышам Twitcher с ранними симптомами (twi/twi) вводили ICV rAAVhu68.hGALC в дозе $2,00 \times 10^{11}$ GC на 12 PND. Соответствующие по возрасту здоровые гетерозиготы Twitcher (twi/+) и мыши дикого типа получали ФСБ, которым его вводили ICV, в качестве контроля на 12 PND. Для достижения максимальной эффективности была выбрана доза rAAVhu68.hGALC $2,00 \times 10^{11}$ GC для РОС, а 12 PND был выбран в качестве дня дозирования, потому что он происходит вскоре после начала демиелинизации ПНС у животного с созреванием мозга, эквивалентным младенцу в 2 месячном возрасте (www.translatingtime.org), что отражает предполагаемую младенческую популяцию для исследования FHN.

Начиная с 22 PND, за всеми мышами ежедневно наблюдали на наличие клинических признаков. 22 PND был выбран в качестве первой временной точки для этой оценки, потому что это один из первых дней, когда у мышей Twitcher наблюдаются поведенческие фенотипы. Клинические признаки оценивали с использованием неопубликованной оценки сжимающей способности, походки, тремора, кифоза и качества шерсти, как показано в Таблице 1. Эти оценки эффективно оценивают клинический статус мышей Twitcher на основе симптомов, которые они обычно проявляют. Баллы выше 0 указывают на клиническое ухудшение.

Таблица 1. Клиническая оценка мышей

Категория оценки	Наблюдение	Балл
Сжимание задних конечностей	Отсутствие сжимания	0
	Непостоянное сжимание	1
	Постоянное сжимание	2
Походка	Нормальная	0
	Немного ненормальная походка, но мышь двигается легко и самопроизвольно	1
	Заметно ненормальная походка, снижение спонтанной подвижности	2
	Сильное затруднение при движении вперед, волочение задних лап	3
Тремор	Отсутствует	0
	Минимальный тремор, видимый только тогда, когда мышцы неподвижны	1
	Умеренный тремор, заметный в покое и при движении. Подергивание	2
	Заметный тремор и подергивание, очевидные как в покое, так и во время движения.	3
Искривление позвоночника	Отсутствует	0
	Легкий кифоз (искривленный позвоночник), но мышь способна полностью выпрямить позвоночник.	1
	Мышь не способна полностью выпрямить позвоночник; поддержание стойкого легкого кифоза	2
	Поддержание выраженного кифоза при ходьбе или сидении	3
Качество меха	Нормальное	0
	Любые отклонения от нормы (шерсть, алопеция и т. д.)	1

Используя эту оценку, мыши Twitcher с ранними симптомами (twi/twi), которым вводили rAAVhu68.hGALC на 12 PND, показали клинические баллы, близкие к 0, что было сопоставимо с баллами гетерозиготных Twitcher дикого типа и незатронутых Twitcher (twi/+). Напротив, мыши Twitcher (twi/twi) соответствующего возраста,

получавшие носитель, имели более высокие оценки на протяжении большей части времени, что указывает на клиническое ухудшение (Фиг. 11А).

В качестве дополнительного функционального анализа тест вращающегося стержня выполняли на 35 PND для оценки нейромоторных фенотипов. Мыши Twitcher с ранними симптомами (twi/twi), которым вводили rAAVhu68.hGALC на 12 PND, демонстрировали латентность падения, сравнимую с таковыми у гетерозигот Twitcher дикого типа и незатронутых Twitcher (twi/+), в то время как мыши Twitcher соответствующего возраста, получавшие носитель (twi/twi) показали значительно более короткие задержки при падении ($p < 0,05$), что указывает на ухудшение нейромоторной функции (Фиг. 11В).

Чтобы определить, коррелируют ли наблюдаемые преимущества введения rAAVhu68.hGALC с функциональными конечными точками с гистологическими улучшениями, всем мышам проводили аутопсию на 40 PND и гистологически исследовали седалищный нерв задней конечности. 40 PND был выбран в качестве точки времени вскрытия, потому что это приблизительный возраст, когда нелеченные или получавшие носитель мыши Twitcher достигают гуманной конечной точки, и это момент времени, когда невропатология наиболее серьезна. Седалищный нерв был выбран для гистологии, потому что его периферические нервы более подвержены демиелинизации у мышей Twitcher, чем ЦНС. Кроме того, отсутствие коррекции ПНС с помощью ТКСК у пациентов остается серьезной проблемой у младенцев, поэтому представляет интерес изучение влияния введения rAAVhu68.hGALC на ПНС.

Срезы седалищных нервов обрабатывали для визуализации миелина (темное окрашивание) и глобоидных клеток (светлое окрашивание) (Фиг. 12). На 40 PND седалищный нерв контрольных животных дикого типа, обработанных носителем, был обогащен миелином и, как правило, лишен инфильтратов глобоидных клеток. Однако у мышей Twitcher с симптомами (twi/twi), получавших носитель, наблюдалась тяжелая субтотальная демиелинизация седалищного нерва, сопровождающаяся утолщением нерва и инфильтрацией глобоидных клеток. Напротив, миелин сохранялся в седалищном нерве мышей Twitcher с симптомами (twi/twi), которым вводили rAAVhu68.hGALC на 12 PND, хотя и не в той степени, которая обычно наблюдается у мышей дикого типа того же возраста. Меньшее количество глобоидных клеток также наблюдалось в нерве мышей Twitcher, получавших rAAVhu68.hGALC, по сравнению с мышами Twitcher, получавшими носитель. Эти данные коррелировали с функциональными конечными точками, предполагая, что улучшение клинических показателей и нейромоторной функции у мышей Twitcher с симптомами, которым вводили rAAVhu68.hGALC во время ранней фазы прогрессирования заболевания, может быть связано либо с обращением, либо с задержкой начала невропатологии основного заболевания.

Наконец, образцы мозга, печени и сыворотки были получены от мышей дикого типа и мышей Twitcher (twi/twi) в день вскрытия (40 PND) для количественной оценки уровней активности трансгенного продукта GALC. GALC определяли количественно с

использованием анализа активности GALC на основе флуорофора, чтобы подтвердить, что после введения rAAVhu68.hGALC вектор AAV транслировался и экспрессировался функциональный фермент. В качестве контроля для этого анализа использовали животных дикого типа, а гетерозиготы Twitcher (twi/+) были исключены, поскольку уровни активности GALC у этих мышей снижены, несмотря на отсутствие наблюдаемого фенотипа. Мозг был исследован, потому что нервная система является тканью-мишенью для доставки GALC, а печень и сыворотка были исследованы для оценки трансдукции в системах периферических органов.

Через двадцать восемь дней после ICV введения rAAVhu68.hGALC в дозе $2,00 \times 10^{11}$ GC в мозге, печени и сыворотке Twitcher наблюдались супрафизиологические уровни активности GALC (twi/twi), которые были выше, чем уровни, наблюдаемые в тех же тканях, обработанных носителем мышей Twitcher (TWI/TWI) и контролях дикого типа (Фиг. 13А - Фиг. 13С).

В совокупности данные продемонстрировали, что введение rAAVhu68.hGALC мышам Twitcher с ранними симптомами приводит к супрафизиологическим уровням активности GALC, которые коррелируют с менее тяжелыми клиническими симптомами, нейромоторной дисфункцией, демиелинизацией ПНС и невропатологией глобоидных клеток.

Эффект трансплантации костного мозга в сочетании с введением rAAVhu68.hGALC

В этом исследовании изучали потенциальную пользу двойной терапии rAAVhu68.hGALC и трансплантации костного мозга (ТКМ). Мы исследовали эту комбинированную терапию из-за выраженного нейровоспалительного компонента болезни Краббе. Теоретически существует синергетический эффект, поскольку ТКСК обеспечивает дополнительный источник фермента GALC в ЦНС (из макрофагов/микроглиальных клеток, полученных из трансплантированных клеток и нейронов, транслированных rAAVhu68.hGALC), в то время как rAAVhu68.hGALC обеспечивает коррекцию ПНС, на которую не влияет ТКСК. Кроме того, в этом исследовании были изучены различные схемы комбинированного лечения, чтобы оценить, может ли rAAVhu68.hGALC быть эффективным у 1) пациентов, которые сначала получали ТКСК с помощью программ NBS, а затем генную терапию, и/или 2) пациентов, которые сначала получали генную терапию, а затем ТКСК, если допустимо.

Результаты исследования комбинированной терапии представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Исследование комбинированной терапии AAV и ТКМ на мышах

Группа	Генотип	N	Лечение # 1	Момент времени	Лечение # 2	Момент времени	Обоснование
1	twi/twi	13	ТКМ	10 PND	-	-	Оценить эффективность монотерапии ТКМ
2	twi/twi	7	rAAVhu68	0 PND	ТКМ	10	Оценить

			.hGALC			PND	эффективность лечения rAAVhu68.hGALC с последующей ТКМ как можно раньше у новорожденных мышей с предсимптоматическими симптомами.
3	twi/twi	7	TKM	10 PND	rAAVhu68.hGALC	12 PND	Оценить эффективность ТКМ с последующим лечением rAAVhu68.hGALC ; В пилотных экспериментах было обнаружено, что 10 PND является самой ранней точкой времени для ТКМ, поскольку кондиционирование бусульфаном токсично для мышей с массой тела менее 4 г.
4	twi/twi	TB D	rAAVhu68.hGALC	12 PND	TKM	28 PND	Оценить эффективность лечения rAAVhu68.hGALC с последующей ТКМ у мышей с ранними симптомами на более поздней стадии прогрессирования заболевания.
5	twi/twi	12	rAAVhu68.hGALC	0 PND*	-	-	Контроль: монотерапия rAAVhu68.hGALC у пресимптоматических мышей.
6	twi/twi	13	rAAVhu68.hGALC	12 PND*	-	-	Контроль: монотерапия rAAVhu68.hGALC у мышей с

							ранними симптомами.
7	twi/twi	12	ФСБ	*	-	-	Контроль: Обработка только носителем

гAAVhu68.hGALC вводили в дозе $1,00 \times 10^{11}$ GC.

Все мыши, получающие ТКМ, также подвергались миелоаблативному кондиционированию бусульфаном за 1-2 дня до процедуры ТКМ для уменьшения количества эндогенных клеток костного мозга.

*Для этих групп использовали исторические контроли. Группа 5 - исторический контроль из Исследования 1. Группа 6 - исторический контроль из Исследования 2. Группа 7 - исторический контроль, состоящий из N=8 мышей из Исследования 1 (0 PND) и N=4 мышей из Исследования 2 (12 PND).

Сокращения: AAV, аденоассоциированный вирус; ТКМ, трансплантация костного мозга; GC - копии генома; ФСБ, фосфатно-солевой буфер; PND, послеродовые сутки; TBD, будет определено позднее.

Доза гAAVhu68.hGALC, равная $1,00 \times 10^{11}$ GC, была использована, потому что мы ожидаем лучшего ответа из-за комбинированной терапии, которая допускает более низкую дозу гAAVhu68.hGALC, чем использовалась в предыдущих исследованиях монотерапии гAAVhu68.hGALC. Эффективность гAAVhu68.hGALC оценивается с точки зрения выживаемости, массы тела и неврологических наблюдений (например, наличия тремора и аномального рефлекса сжатия).

Данные по выживаемости для групп 1-3 показаны на Фиг. 14А - Фиг. 14В. До сих пор наилучшая выживаемость была достигнута при комбинации лечения пресимптоматических мышей Twitcher (twi/twi) с введением ICV гAAVhu68.hGALC на 0 PND с последующей ТКМ на 10 PND (Группа 2). Выживаемость была увеличена до > 300 дней при отсутствии явных признаков. Эти мыши, по-видимому, находились в лучшем физическом состоянии на основании ранее описанной клинической оценки (Таблица 1), демонстрируя легкий тремор без заметных аномалий походки и без сжатия (анализ все еще продолжается; данные не показаны). Мыши, которые получали ТКМ перед гAAVhu68.hGALC (Группа 3), в настоящее время все еще живы (N=3/7), но у них наблюдается выраженный тремор, некоторые нарушения походки и меньшая масса тела. Однако режим кондиционирования бусульфаном в сочетании с ТКМ токсичен для мышей моложе 10 дней, и мыши в группах 2 и 3 демонстрировали повышенную смертность либо до, либо вскоре после ТКМ, независимо от порядка комбинированной терапии. Группе 4 вводили инъекции, чтобы имитировать клинически значимую ситуацию с генной терапией, назначаемой пациентам с ранними симптомами, с последующей ТКМ.

В совокупности эти данные предполагают, что сочетание лечения гAAVhu68.hGALC с последующей ТКМ может обеспечить большую эффективность, чем каждое лечение по отдельности в мышинной модели болезни Краббе.

ПРИМЕР 3 - Определение минимальной эффективной дозы (МЭД) гAAVhu68.GALC в модели мышей Twitcher.

Исследование МЭД проводили на мышах Twitcher с использованием серии токсикологического вектора, изготовленной для фармакологически-токсикологического

исследования нечеловеческих приматов. Исследование включает не менее двух временных точек и оценивает четыре уровня доз для определения МЭД, фармакологии и гистопатологии (эффективности и безопасности). Уровни доз были выбраны на основе экспериментального исследования диапазона доз и максимально возможной дозы при масштабировании для людей. Животным вводили ICV в PND12, чтобы имитировать пациентов с ранними симптомами. Некоторых животных умерщвляли через месяц после инъекции (когда обработанные носителем мыши достигали гуманной конечной точки) для получения фармакологических показателей и показателей эффективности по сравнению с контрольными животными соответствующего возраста (дизайн аналогичен исследованию 3). За оставшимися мышами наблюдали до достижения гуманной конечной точки для оценки влияния лечения на выживаемость. Персонал, проводящий оценку при жизни (масса тела, клиническая оценка и анализ на вращающемся стержне), не имел информации о лечении и генотипе мышей.

Группа #	Лечение (Доза)	Затронутые мыши (twi/twi) (N)	Мыши ДТ (+/+) (N)	Оценка при жизни	Умерщвление: исходные 12-14 PND	Умерщвление: 40-42 PND после инъекции (N)	Умерщвление: Гуманная конечная точка (N)
1	никто	6	-	никто	6(twi/twi);	N/A	N/A
2	никто	-	6		6 (+/+)		
3	Носитель (Искусственная СМЖ ITFFB)	16	-	Ежедневные наблюдения Масса тела 3 раза в неделю Клиническая оценка 3 раза в неделю Вращающийся стержень на PND35-37	N/A	8 (twi/twi)	8 (twi/twi)
4	Носитель (Искусственная СМЖ ITFFB)	-	10		N/A	5 (+/+)	5 (+/+)
5	rAAVhu68. hGALC 2,00×10 ¹¹ GC	16	-		N/A	8	8
6	rAAVhu68. hGALC 6,80×10 ¹⁰	16	-		N/A	8	8

	GC						
7	rAAVhu68. hGALC 2,00×10 ¹⁰ GC	16	-		N/A	8	8
8	rAAVhu68. hGALC 6,80×10 ⁹ GC	16	-		N/A	8	8

Сокращения: СМЖ, спинномозговая жидкость; N, количество животных; ДТ, дикий тип, ITFFV, буфер для конечной композиции для интратекального введения (ITFFB)

Таблица 4. График исследования

МЭД определяли после анализа выживаемости, клинической оценки, массы тела, нейромоторной функции с использованием теста с вращающимся стержнем, уровней активности GALC в органах-мишенях и коррекции невропатологии в ЦНС и ПНС (т.е. улучшения миелинизации, снижения инфильтрации глобоидных клеток).

План исследования и график исследования представлены ниже в Таблице 3 и Таблице 4.

Таблица 3. Дизайн исследования МЭД на мышах

День исследования	Образец/Процедура	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6	Группа 7	Группа 8
PND1- PND7	Идентификация	Множественные пометы							
	генотипиро	Множественные пометы							
PND12- 14	ICV инъекция	-	-	16 (twi/tw	10 +/+	16 (twi/t	16 (twi/t	16 (twi/t	16 (twi/t
	Вскрытие	6 (twi/t	6 +/+	-	-	-	-	-	-
PND12- 14 - окончание	Ежедневное наблюдение и мониторинг	-	-	16 (twi/tw i)	10 +/+	16 (twi/t wi)	16 (twi/t wi)	16 (twi/t wi)	16 (twi/t wi)
PND21-	Отлучение от груди	-	-	16	10	16	16	16	16

День исследо- вания	Образец/ Процедура								
		Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6	Группа 7	Группа 8
28	Подтверждение	-	-	16	10	16	16	16	16
	Идентификация	-	-	16	10	16	16	16	16
Отлучение от груди - окончание	3 раза в неделю обследование массы тела и	-	-	16	10	16	16	16	16
PND 35-37	Вращающийся	-	-	16	10	16	16	16	16
	Поднижнечелюстное	-	-	16	10	16	16	16	16
PND40-42	Вскрытие	-	-	8	5	8	8	8	8
Наблюдение после выжив	Гуманная конечная точка вскрытия	-	-	8	5	8	8	8	8

ПРИМЕР 4 - Эффективность AAV-опосредованной генной терапии для лечения собак с болезнью Краббе - инъекция rAAVhu68.CB7.CI.cGALCco.rBG через cisterna magna.

Мышь Twitcher является информативной моделью заболевания, но имеет некоторые ограничения. У мышей наблюдается только легкое поражение ЦНС, в отличие от инфантильных пациентов с болезнью Краббе, у которых наблюдаются более серьезные признаки ЦНС демиелинизации или атрофии головного мозга. Кроме того, небольшой размер мыши создает экспериментальные проблемы. Путь ICV должен использоваться у мышей, потому что их небольшой размер затрудняет надежную инъекцию вектора AAV через предполагаемый клинический путь (ICM). Достаточные количества серийных образцов спинномозговой жидкости и крови также не могут быть получены от мышей для всех желаемых фармакологических анализов. Поэтому лечение с помощью rAAVhu68.GALC было оценено на более крупном животном, собачьей модели болезни Краббе, которая может преодолеть эти технические ограничения и подтвердить масштабируемость нашего терапевтического подхода.

Как и мышь Twitcher, собака с болезнью Краббе представляет собой естественную модель аутосомно-рецессивного заболевания, возникшую в результате спонтанной мутации А в С в гене GALC, которая вызывает миссенс-мутацию (Y158S). Мутантный белок GALC имеет остаточную ферментативную активность, близкую к 0%, что аналогично уровням активности GALC, наблюдаемым у пациентов с детской формой болезни Краббе. В то время как гетерозиготные собаки не проявляют симптомов, гомозиготные по мутации собаки страдают.

Собаки с болезнью Краббе имеют тяжелый фенотип, сходный с инфантильной болезнью Краббе, как показано в Таблице 5. В то время как развитие фенотипа собаки с болезнью Краббе менее хорошо охарактеризовано, чем у мышей Twitcher, пораженные собаки с болезнью Краббе демонстрируют демиелинизацию и накопление глобоидных клеток, которые влияют как на ЦНС, так и на периферические нервы. Примерно в возрасте 4-6 недель у них развиваются слабость задних конечностей, дисметрия грудных конечностей и тремор. Подобно инфантильным пациентам с болезнью Краббе, собаки с болезнью Краббе имеют стойкое и быстрое неврологическое ухудшение после появления симптомов. В конечном итоге эти симптомы прогрессируют до гуманной конечной точки, характеризующейся тяжелой атаксией, параличом тазовых конечностей, истощением, недержанием мочи и сенсорным дефицитом около к 15-недельному возрасту (Fletcher T.F. & Kurtz H.J. (1972) *Am J Pathol.* 66(2):375-8; Wenger D.A. (2000) *Molec Med Today.* 6(11):449-451; Bradbury A.M., et al. (2018) *Hum Gene Ther.* 29(7):785-801).

Таблица 5. Мышиные и собачьи модели болезни Краббе и сравнение с ранним младенческим представлением у человека

	Мутация	Уровни активности GALC	Представление признаков и эволюция	Патология
Мышь Twitcher	Мышь: G.A1017 (W339X)	<10% от нормы	Подергивание, слабость задних конечностей на 18-22 день Сильная потеря массы тела и паралич через 40-45 дней.	ПНС > ЦНС
Собака с болезнью Краббе	Собака: A.C 473 (Y158S)	<10% от нормы	Дисметрия грудных конечностей, слабость задних конечностей, тремор на 4-6 неделях Паралич тазовых конечностей, тяжелая атаксия, истощение,	ПНС и ЦНС

			недержание мочи, сенсорный дефицит на около 15 неделе	
Болезнь Краббе у человека в раннем детстве	Различные, наиболее частые - делеция в 30 т.п.н., начинающаяся около интрона 10 (502T/del).	<10% от нормы	Раздражительность, спастичность, дисфагия до 6 месяцев Регресс и отсутствие приобретения новых способностей, глухота, слепота, судороги, смерть до 2 лет	ПНС и ЦНС

Сокращения: А, аденин; С, цитозин; ЦНС, центральная нервная система; G, гуанин; GALC, галактозилцерамидаза; kb, т.о.; ПНС, периферическая нервная система; W339X, триптофан заменен стоп-кодом в положении 339; Y158S, замена тирозина на серин в положении 158.

Целью этого исследования было оценить масштабируемость нашего терапевтического подхода путем оценки эффективности вектора AAV, подобного гAAVhu68.hGALC, на модели крупного заболевания животных. Для этого мы использовали естественную собачью модель болезни Краббе, которую вводили предполагаемым клиническим путем (ICM) вектора, подобного гAAVhu68.hGALC, который кодирует сконструированную версию GALC собаки (AAVhu68.CB7.CI.cGALCco.gBG) (Фиг. 3). Версия GALC собаки была выбрана в качестве трансгена, чтобы ограничить риск преувеличенного иммунного ответа на чужеродный трансген, но другие элементы вектора были эквивалентными гAAVhu68.hGALC (включая распространенный промотор CB7 и капсид AAVhu68).

План исследования представлен на Фиг. 23. Собакам (всего N=7) вводили ICM в возрасте 2-3 недель либо вектор AAV, экспрессирующий GALC, в дозе $3,00 \times 10^{13}$ GC (N=4 пораженных собаки), либо носитель (искусственная СМЖ; N=2 больных собаки; N=1 здоровая однопометная дикого типа). Возраст животных был выбран, чтобы обеспечить лечение собак как можно раньше до появления поведенческих симптомов, поскольку было обнаружено, что гAAVhu68.hGALC более эффективен у пресимптоматических мышей Twitcher по сравнению с симптоматическими мышами, получавшими лечение в более поздние моменты времени (см. Пример 2).

Обозначения групп

Обозначение группы	1	2	3
Количество животных в группе	1	3	1
Пол	М или Ж	М или Ж	М или Ж
Лечение	искусственная СМЖ	AAVhu68.CB7.CI. сGALCco.rBG	искусственная СМЖ
ROA	ICM	ICM	ICM
День вскрытия	70 День или гуманные конечные точки	Одна собака была умерщвлена в тот же момент, что и 1 группа, и две были умерщвлены на 180 день.	180 День

После введения дозы за животными наблюдали ежедневно (наблюдения со стороны клетки), еженедельно взвешивали и каждые две недели записывали на видео. Им также делали МРТ головного мозга и, периодически, полное физическое обследование, неврологическое обследование, записи нервной проводимости и записи ВАЕР. Целью этих обследований было оценить целостность ЦНС и ПНС. Показатели эффективности включали миелинизацию головного мозга (оцениваемую с помощью МРТ через 8 недель после инъекции, ВАЕР и гистологию в конечной точке), миелинизацию периферических нервов (оцениваемую с помощью NCV и гистологии в конечной конечной точке), неврологическое обследование и физикальное обследование (масса тела, походка, рефлексы, проприоцепция, видеосъемка собак, играющих на открытой площадке раз в две недели). Кроме того, оценивались фармакология, безопасность и биораспределение вектора, поскольку введенный вектор был сопоставим с rAAVhu68.hGALC, и использовалась предполагаемый клинический ROA (введение ICM). Оценка нервной проводимости измеряла целостность нервов как косвенное измерение целостности миелина. Запись ВАЕР аналогична NCV, за исключением того, что она проверяет проводимость и целостность миелина в слуховых путях ЦНС (т. е. ствола мозга). Показатели безопасности включают периодический анализ крови (CBC), химический анализ сыворотки и коагуляцию в 0 день перед инъекцией и в 14, 28, 56, 70, 120 и 180 дни (каждый раз ± 2 дня). СМЖ также обрабатывали для анализа липидомных биомаркеров и подсчета клеток, когда объем позволял исследовать коррекцию заболевания (липидомия, концентрация психозина) и подсчет лейкоцитов (плеоцитоз) в качестве показателя безопасности. На 56 день собак обследовали с помощью МРТ (T1 и T2-взвешенные) для наблюдения миелинизации в ЦНС. Ферментативная активность GALC оценивалась как в СМЖ, так и в сыворотке на исходном уровне в указанные ниже моменты времени для измерения количества активного терапевтического фермента, секретируемого в ЦНС и ПНС. Дни исследования для каждого анализа были выбраны, чтобы минимизировать

седативный эффект у животных при сборе полных данных в соответствующие моменты времени, которые соответствуют известному прогрессированию болезни Краббе у собак (Фиг. 15).

Кровь и СМЖ были собраны для анализа безопасности и биомаркеров. Полный список тканей был взят для гистопатологии, чтобы определить, снижает ли введение rAAVhu68.hGALC демиелинизацию и нейровоспаление. Трансдукцию и экспрессию rAAVhu68.hGALC оценивали по биораспределению. Показания активности фермента GALC (Фиг. 24В и Фиг. 24С) показали, что все обработанные собаки с болезнью Краббе имели быструю секрецию ферментов в СМЖ.

У собак с болезнью Краббе без симптомов однократная инъекция *cisterna magna* rAAVhu68.cGALC при $3,00 \times 10^{13}$ GC обеспечивала фенотипическую коррекцию (Фиг. 25Е), увеличение выживаемости (Фиг. 24А), нормализацию нервной проводимости (Фиг. 25А - Фиг. 25D), нормальный анализ крови и улучшенную МРТ головного мозга (Фиг. 29А и Фиг. 29В), демонстрируя масштабируемость подхода. Гистология головного мозга показала улучшение миелинизации (Фиг. 26А) и снижение нейровоспаления (окрашивание IBA1 в белом веществе мозжечка) (Фиг. 26В) у собак rAAVhu68.cGALC с болезнью Краббе относительно контроля. Ни у одной из собак, которым в этом исследовании первоначально вводили дозу GALC-экспрессирующего вектора или носителя, не было побочных эффектов. Собаки с болезнью Краббе, которым вводили rAAVhu68.cGALC, демонстрировали нормальный рост (Фиг. 27), а через шесть месяцев токсичности не наблюдалось на основании отсутствия плеоцитоза СМЖ (Фиг. 28А) и гистопатологических поражений (Фиг. 28В). Собака, обработанная носителем, должна была быть умерщвлена на 8 и 12 неделе из-за прогрессирования болезни Краббе, включая тяжелый перерез задних конечностей, недержание мочи, тремор головы и атаксию, препятствующую передвижению. Спустя более 45 недель после инъекции все собаки, обработанные векторами, выглядели яркими, бдительными и без симптомов, и все они имели продолжительности жизни больше, чем максимальная продолжительность жизни собак с болезнью Краббе.

График исследования и конечные точки представлены ниже в Таблице 6.

Таблица 6				
День исследования	Образец/Процедура	группа 1	группа 2	группа 3
0 PND-7	Генотипирование	1	3	1
PND 14-21 День	Носитель ICM	1	-	1
	ICM AAVHu68.CB7.cGALC	-	3	-

исследования 0	СМЖ (200 мкл для анализа ферментативной активности и 200 мкл для анализа липидов)	1	3	1
	Сыворотка до 200 мкл для анализа ферментов и иммунологии на исходном уровне	1	3	1
	Общий анализ крови/химический анализ/коагуляция (приоритет в зависимости от объема крови: 1=химический анализ, 2=общий анализ крови, 3=коагуляция)	1	3	1
День исследования 0	Ежедневное наблюдение в клетке	1	3	1
	Еженедельная масса тела	1	3	1
14 день (± 1 день)	СМЖ (200 мкл для анализа ферментативной активности, от 300 до 500 мкл для подсчета клеток и	1	3	1
	Сыворотка до 300 мкл для анализа ферментов и иммунологии	1	3	1
	Общий анализ крови/химический анализ/коагуляция (приоритет в зависимости от объема крови: 1=химический анализ, 2=общий анализ крови, 3=коагуляция)	1	3	1
28 день (± 2 дня)	СМЖ (200 мкл для анализа ферментативной активности, 200 мкл для анализа липидов, от 300 до 500 мкл для подсчета клеток и цитологии)	1	3	1
	Сыворотка до 400 мкл для анализа ферментов и иммунологии	1	3	1
	Общий анализ крови/химический анализ/коагуляция (приоритет в зависимости от объема крови: 1=химический анализ, 2=общий анализ крови, 3=коагуляция)	1	3	1
	Физическое и неврологическое обследование	1	3	1
	NCV	1	3	1
56 день (± 2 дня)	МРТ головного мозга 1,5 тесла с T1 и T2-взвешиванием	1	3	1

70 день (± 3 дня ИЛИ гуманная конечная точка Группа 1, если необходимо, до D70)	СМЖ (200 мкл для анализа ферментативной активности, 200 мкл для анализа липидов, от 300 до 500 мкл для подсчета клеток и цитологии)	1	3	1
	Сыворотка до 400 мкл для анализа ферментов и иммунологии	1	3	1
	Общий анализ крови/химия/коагуляция	1	3	1
	Физическое и неврологическое обследование	1	3	1
	NCV	1	3	1
	BAER	1	3	1
70 день (± 3 дня ИЛИ гуманная конечная точка Группа 1, если необходимо, до D70)	Вскрытие	1	1	-
120 День (± 3 дня)	СМЖ (200 мкл для анализа ферментативной активности, 200 мкл для анализа липидов, от 300 до 500 мкл для подсчета клеток и цитологии)	-	2	1
	Сыворотка до 400 мкл для анализа ферментов и иммунологии	-	2	1
	Общий анализ крови/химия/коагуляция	-	2	1
	Физическое и неврологическое обследование	-	2	1
	NCV	-	2	1
180 День (± 3 дня)	СМЖ (200 мкл для анализа ферментативной активности, 200 мкл для анализа липидов, от 300 до 500 мкл для подсчета клеток и цитологии)	-	2	1
	Сыворотка до 400 мкл для анализа ферментов и иммунологии	-	2	1

	Общий анализ крови/химия/коагуляция	-	2	1
	Физическое и неврологическое обследование	-	2	1
	NCV	-	2	1
	BAER	-	2	1
	Вскрытие	-	2	1

ПРИМЕР 5 - Токсикологическое исследование на нечеловеческих приматах.

Токсикологическое исследование проводили с использованием той же серии векторов gAAVhu68.hGALC, что и в исследовании МЭД на мышах, и проводили в NHP, поскольку они лучше воспроизводят размер и анатомию ЦНС человека и могут лечиться с использованием клинического ROA (ICM). Ожидается, что сходство по размеру, анатомии и ROA приведет к репрезентативному распределению векторов и профилям трансдукции, что позволяет более точно оценить токсичность, чем это возможно для мышей или собак. Кроме того, в NHP можно проводить более строгие неврологические обследования, чем на моделях на грызунах или собаках, что позволяет более точно определять токсичность для ЦНС.

Введение вектора ICM приводит к немедленному распределению вектора в компартменте СМЖ. Дозы масштабируются по массе мозга, что приблизительно соответствует размеру отделения СМЖ. Преобразование дозы основано на массе мозга новорожденной мыши 0,15 г (Gu Z., et al. (2012) PLoS One. 7 (7): e41542.), 0,4 г для ювенильно-взрослой мыши (Gu Z., et al. (2012) PLoS One. 7 (7): e41542.), 90 г для ювенильной и взрослой макаки-резус (Herndon JG, et al. (1998) Neurobiol Aging. 19 (3): 267-72), 60 г для собаки, 800 г для детей в возрасте от 4 до 12 месяцев и 1300 г для взрослых людей (Dekaban AS (1978) Ann Neurol. 4 (4): 345-56). Дозы для токсикологического исследования NHP, исследования МЭД на мышах и эквивалентные дозы для человека показаны в Таблице 7.

Таблица 7. Векторные дозы для исследования МЭД на мышах, токсикологического исследования NHP и эквивалентные дозы для собак и человека:

Доза (GC/г массы мозга)	Исследование МЭД (GC) у ювенильных мышей	Токсикологическое исследование у ювенильных NHP (GC)	Собака (GC)	Человек (GC)
$5,00 \times 10^{11}$	$2,00 \times 10^{11}$	$4,50 \times 10^{13}$	$3,00 \times 10^{13}$	$4,00 \times 10^{14}$
$1,70 \times 10^{11}$	$6,80 \times 10^{10}$	$1,50 \times 10^{13}$	-	$1,40 \times 10^{14}$
$5,00 \times 10^{10}$	$2,00 \times 10^{10}$	$4,50 \times 10^{12}$	-	$4,00 \times 10^{13}$

$1,70 \times 10^{10}$	$6,80 \times 10^9$	-	-	$1,40 \times 10^{13}$
-----------------------	--------------------	---	---	-----------------------

Сокращения: GC - копии генома; МЭД - минимальная эффективная доза; NHP, нечеловеческий примат.

Молодые макаки-резус отбирали в зависимости от цели заболевания, чтобы анатомически они были похожи на предлагаемую популяцию исследования фазы 1/2. Дозы для токсикологического исследования NHP отражали дозы, которые использовали в клиническом исследовании фазы 1/2, и выбирали с учетом: 1) результатов фармакологических исследований и 2) перевода дозы из фармакологических исследований на NHP и человека с учетом максимально возможной дозы.

Соответственно, 180-дневное исследование безопасности GLP проводили на взрослых макаках-резус для изучения токсичности rAAVhu68.CB7.CI.cGALCco.rBG (rAAVhu68.hGALC) после введения ICM. Был выбран 180-дневный период оценки, поскольку он дает достаточно времени, чтобы секретируемый трансгенный продукт достиг стабильных уровней плато после введения ICM AAV. Дизайн исследования представлен в Таблице 8 и Таблице 9. Ювенильные макаки-резус (приблизительно в возрасте 1,5 лет) получали либо $4,50 \times 10^{12}$ GC всего, либо $1,50 \times 10^{13}$ GC всего (или носитель). Уровни доз выбраны так, чтобы они были эквивалентны тем, которые оцениваются в исследовании МЭД при пересчете на массу мозга (предполагая, что 0,4 г для взрослых особей мышей, 90 г для макак-резусов. Высокая доза эквивалентна дозе, оцененной на модели собаки с болезнью Краббе (исходя из массы мозга 60 г). Были выполнены базовые неврологические обследования, клиническая патология (подсчет клеток с дифференциалами, клиническая химия и панель коагуляции), химический анализ CSF и цитология CSF. После введения вектора (или носителя) за животными ежедневно наблюдали на предмет признаков дистресса и аномального поведения.

Оценки клинической патологии крови и CSF и неврологические обследования выполняли еженедельно в течение 30 дней после введения вектора или носителя, а затем каждые 30 дней. На исходном уровне и в каждую последующую 30-дневную точку времени ответы анти-AAVhu68 NAb и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) на AAVhu68 и продукт GALC оценивали с помощью иммуноспотного анализа (ELISpot) с интерфероном гамма (IFN- γ).

Через 90 или 180 дней после введения rAAVhu68.hGALC или носителя животных умерщвляли и собирали ткани для всестороннего микроскопического гистопатологического исследования. Гистопатологическое исследование сосредоточено на тканях ЦНС (головной, спинной мозг и ганглии задних корешков) и печени, поскольку они являются наиболее сильно трансдуцированными тканями после введения ICM векторов rAAVhu68. Кроме того, лимфоциты собирали из большого круга кровообращения (МКПК), селезенки и лимфатических узлов, дренирующих ЦНС, чтобы оценить присутствие Т-клеток, реактивных как к капсиду, так и к продукту трансгена, в этих органах во время вскрытия. Ткани собирали и архивировали на случай, если какая-либо находка требует дальнейшего анализа биораспределения переносчиков.

Таблица 8. Токсикологическое исследование GLP макаки-резуса (обозначения групп)

Обозначение группы	1	2	3	4	5	6	7	8
rAAVhu6 8.hGALC /ITFFB	ITFFB	rAAV	rAAV	rAAV	ITFFB	rAAV	rAAV	rAAV
Доза (GC)	N/A	$4,5.0 \times 10^{12}$	$1,5 \times 10^{13}$	$4,5.0 \times 10^{13}$	NA	$4,5.0 \times 10^{12}$	$1,5 \times 10^{13}$	$4,5.0 \times 10^{13}$
Количество во макак	1	3	3	3	1	3	3	3
Пол	Любой	Оба	Оба	Оба	Любой	Оба	Оба	Оба
ROA	ICM	ICM	ICM	ICM	ICM	ICM	ICM	ICM
День вскрытия	90 ± 4	90 ± 4	90 ± 4	90 ± 4	180 ± 5	180 ± 5	180 ± 5	180 ± 5

Сокращения: Ж, самка; GLP, надлежащая лабораторная практика; ICM, intracisterna magna; М, самец; NA, не применимо; ROA, путь введения.

Таблица 9. График исследования для макаки-резуса

Время исследования	Образец/Процедура	Группа 1 ^a	Группа 2 ^a	Группа 3 ^a	Группа 4 ^a	Группа 5 ^a	Группа 6 ^a	Группа 7 ^a	Группа 8 ^a
Исходный уровень - за 28 дней до дозирования	Масса тела, температура, частота дыхания, частота пульса	1	3	3	3	1	3	3	3
	Неврологический мониторинг	1	3	3	3	1	3	3	3
	Биомаркер - кровь (исходный уровень)	1	3	3	3	1	3	3	3
	Клиническая патология (исходный уровень) ^b	1	3	3	3	1	3	3	3
	NAb (исходный уровень)	1	3	3	3	1	3	3	3
	Иммунология - ELISPOT (исходный уровень) (МКПК)	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор Экскреция (моча, кал)	1	3	3	3	1	3	3	3
	Тестирование скорости нервной проводимости	1	3	3	3	1	3	3	3
День исследования 0	Масса тела, температура, частота дыхания, частота пульса	1	3	3	3	1	3	3	3
	Клиническая патология ^b	1	3	3	3	1	3	3	3
	СМЖ ^c	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК СМЖ	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК Кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
	ITFFB ICM	1	--	--	--	1	--	--	--

	AAV.hGALC, 4,5.0×10 ¹² GC, ICM	--	3	--	--	--	3	--	--
	AAV.hGALC, 1,5×10 ¹³ GC, ICM	--	--	3	--	--	--	3	--
	AAV.hGALC, 4,5×10 ¹³ GC, ICM	--	--	--	3	--	--	--	3
День исследова ния 5 (± 2 дня)	Вектор Экскреция (моча, кал)	1	3	3	3	1	3	3	3
День исследова ния 7 (± 1 день)	Масса тела, температура, частота дыхания, частота пульса	1	3	3	3	1	3	3	3
	Клиническая патология ^b	1	3	3	3	1	3	3	3
	СМЖ ^c	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК СМЖ	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК Кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
День исследова ния 14 (± 2 дня)	Масса тела, температура, частота дыхания, частота пульса	1	3	3	3	1	3	3	3
	Неврологическ ий мониторинг	1	3	3	3	1	3	3	3
	Биомаркер - кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
	Клиническая патология ^b	1	3	3	3	1	3	3	3
	СМЖ ^c	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК СМЖ	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК Кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
День исследова ния 28 (± 3 дня)	Масса тела, температура, частота дыхания, частота пульса	1	3	3	3	1	3	3	3
	Неврологическ	1	3	3	3	1	3	3	3

	ий мониторинг								
	Биомаркер - кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
	Клиническая патология ^b	1	3	3	3	1	3	3	3
	СМЖ ^c	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК Кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК СМЖ	1	3	3	3	1	3	3	3
	Иммунология - ELISPOT (МКПК)	1	3	3	3	1	3	3	3
	NAb	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор Экскреция (моча, кал)	1	3	3	3	1	3	3	3
	Тестирование скорости нервной проводимости	1	3	3	3	1	3	3	3
День исследования 60 (± 3 дня)	Масса тела, температура, частота дыхания, частота пульса	1	3	3	3	1	3	3	3
	Неврологический мониторинг	1	3	3	3	1	3	3	3
	Биомаркер - кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
	Клиническая патология ^b	1	3	3	3	1	3	3	3
	СМЖ ^c	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК СМЖ	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК Кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
	NAb	1	3	3	3	1	3	3	3
	Иммунология - ELISPOT (МКПК)	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор Экскреция (моча, кал)	1	3	3	3	1	3	3	3
	Тестирование скорости нервной проводимости	1	3	3	3	1	3	3	3
День исследования	Масса тела, температура,	1	3	3	3	1	3	3	3

ния 90 (± 4 дня)	частота дыхания, частота пульса								
	Неврологическ ий мониторинг	1	3	3	3	1	3	3	3
	Биомаркер - кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
	Клиническая патология ^b	1	3	3	3	1	3	3	3
	СМЖ ^c	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК СМЖ	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор ФК Кровь	1	3	3	3	1	3	3	3
	NAb	1	3	3	3	1	3	3	3
	Иммунология - ELISPOT (МКПК)	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вектор Экскреция (моча, кал)	1	3	3	3	1	3	3	3
	Тестирование скорости нервной проводимости	1	3	3	3	1	3	3	3
	Вскрытие	1	3	3	3	--	--	--	--
День исследова ния 120 (± 4 дня)	Масса тела, температура, частота дыхания, частота пульса	--	--	--	--	1	3	3	3
	Неврологическ ий мониторинг	--	--	--	--	1	3	3	3
	Биомаркер - кровь	--	--	--	--	1	3	3	3
	Клиническая патология ^b	--	--	--	--	1	3	3	3
	СМЖ ^c	--	--	--	--	1	3	3	3
	NAb	--	--	--	--	1	3	3	3
	Иммунология - ELISPOT (МКПК)	--	--	--	--	1	3	3	3
	Вектор Экскреция (моча, кал)	--	--	--	--	1	3	3	3
	Тестирование скорости нервной проводимости	--	--	--	--	1	3	3	3

День исследования 150 (± 4 дня)	Масса тела, температура, частота дыхания, частота пульса	--	--	--	--	1	3	3	3
	Неврологический мониторинг	--	--	--	--	1	3	3	3
	Биомаркер - кровь	--	--	--	--	1	3	3	3
	Клиническая патология ^b	--	--	--	--	1	3	3	3
	СМЖ ^c	--	--	--	--	1	3	3	3
	NAb	--	--	--	--	1	3	3	3
	Иммунология - ELISPOT (МКПК)	--	--	--	--	1	3	3	3
	Вектор Экскреция (моча, кал)	--	--	--	--	1	3	3	3
	Тестирование скорости нервной проводимости	--	--	--	--	1	3	3	3
День исследования 180 (± 5 дней)	Масса тела, температура, частота дыхания, частота пульса	--	--	--	--	1	3	3	3
	Неврологический мониторинг	--	--	--	--	1	3	3	3
	Биомаркер - кровь	--	--	--	--	1	3	3	3
	Клиническая патология ^b	--	--	--	--	1	3	3	3
	СМЖ ^c	--	--	--	--	1	3	3	3
	NAb	--	--	--	--	1	3	3	3
	Вектор ФК СМЖ	--	--	--	--	1	3	3	3
	Вектор ФК Кровь	--	--	--	--	1	3	3	3
	Иммунология - ELISPOT (МКПК)	--	--	--	--	1	3	3	3
	Вектор Экскреция (моча, кал)	--	--	--	--	1	3	3	3

	Тестирование скорости нервной проводимости	--	--	--	--	1	3	3	3
	Вскрытие	--	--	--	--	1	3	3	3

^aКоличество животных, которых оценивали.

^b Включает полный анализ крови и дифференциальные анализы (гематология), клинический химический анализ и панель коагуляции.

^cВключает клиническую патологию и биомаркеры.

Сокращения: NAb, нейтрализующие антитела; МКПК, моноклеарные клетки периферической крови; СМЖ, спинномозговая жидкость; клиническая патология, клиническая патология; ФК фармакокинетика.

ПРИМЕР 6 - Лечение болезни Краббе с помощью rAAVhu68.hGALC

Исследование FИH представляет собой исследование увеличения дозы в фазе 1/2 однократного введения ICM rAAVhu68.hGALC педиатрическим пациентам с инфантильной формой болезни Краббе, вызванной гомозиготными или сложными гетерозиготными мутациями в гене GALC. В этом исследовании FИH участвуют и проходят лечение не менее 12 субъектов, за которыми наблюдают в течение 2 лет, с продолжением долгосрочного наблюдения (LTFU) в общей сложности в течение 5 лет после введения дозы в соответствии с рекомендованными LTFU для аденовирусных векторов, описанными в проекте «Руководства FDA для промышленности: Долгосрочное наблюдение после приема препаратов для генной терапии человека »(июль 2018 г.). Основная цель - оценить безопасность и переносимость rAAVhu68.hGALC. Второстепенные цели этого исследования - оценить влияние rAAVhu68.hGALC на оценки, связанные с заболеванием, включая выживаемость, нейрокогнитивные измерения, соответствующие возрасту, и двигательные и/или лингвистические оценки, соответствующие возрасту. Эти конечные точки выбираются после консультации со специалистами по болезням и клиницистами и на основе наблюдений за развитием болезни у нелеченных пациентов с инфантильной болезнью Краббе.

Необязательно, может быть оценена комбинированная терапия ТКСК и генной терапии AAV.

FИH - это открытое многоцентровое исследование с увеличением дозы rAAVhu68.hGALC для оценки конечных точек безопасности, переносимости и исследовательской эффективности у детей с инфантильной формой болезни Краббе. Фаза увеличения дозы оценивает безопасность и переносимость однократного введения ICM двух уровней доз rAAVhu68.hGALC со ступенчатым последовательным дозированием субъектов. Уровни доз rAAVhu68.hGALC определялись на основании данных токсикологического исследования GLP NHP и исследования на мышах (МЭД) и состояли из низкой дозы (вводимой когорте 1) и высокой дозы (вводимой когорте 2). Ожидается, что оба уровня доз принесут терапевтический эффект, при том понимании, что при переносимости более высокая доза, как ожидается, будет благоприятной.

Последовательная оценка низкой дозы, за которой следует высокая доза, позволяет идентифицировать максимально переносимую дозу (МПД) тестируемых доз. Наконец, расширяющаяся когорта (когорты 3) получает МПД rAAVhu68.hGALC (Фиг. 16). Быстрая продукция фермента GALC после введения вектора (через 1 неделю после лечения) обеспечивает расширенное терапевтическое окно.

Поскольку инфантильная болезнь Краббе характеризуется быстрым течением заболевания при появлении симптомов, и, учитывая, что у некоторых новорожденных появляются признаки заболевания при рождении, предлагаемый дизайн исследования позволяет одновременный набор субъектов через 30 дней после введения дозы первому пациенту в когорте 1 (низкая доза) и когорте 2 (высокая доза) на основании оценки пользы-риска для этого субъекта, проведенной исследователем. Обоснование этого состоит в том, что риск пропустить окно лечения из-за прогрессирования заболевания у пациента перевешивает потенциальную пользу от длительного наблюдения с точки зрения безопасности перед введением дозы следующему пациенту. Такой сценарий, при котором у пациентов наблюдается значительное прогрессирование заболевания в течение нескольких недель, был назван возможной причиной плохих результатов трансплантации, наблюдаемых у пациентов с EIKD, идентифицированных с помощью NBS в Нью-Йорке (Wasserstein M.P., et al. (2016) *Genet Med.* 18 (12): 1235-1243), подчеркивая необходимость быстрого направления пациентов на лечение. Независимый совет по безопасности проводит обзор безопасности всех накопленных данных по безопасности между когортами и после полного набора второй когорты, чтобы дать рекомендации относительно дальнейшего проведения исследования. Совет по безопасности также проводит проверку каждый раз, когда наблюдается триггер проверки безопасности (SRT). 1-месячный интервал дозирования между первым и вторым субъектом в каждой когорте позволяет оценить НЯ, указывающие на острые иммунные реакции, иммуногенность или другие ограничивающие дозу токсические эффекты, а также провести клинический анализ любой сенсорной нейропатии, которая может проявляться в соответствии с ожидаемым во времени развитием сенсорной невропатологии, вторичной по отношению к трансдукции DRG, которая происходит в течение 2-4 недель в доклинических исследованиях.

Дополнительные субъекты включаются в расширенную когорту, которая получает МПД. Набор этих дополнительных субъектов не требует 4-недельного окна наблюдения между субъектами (Фиг. 16). Не обязательно, эта когорта получает комбинированное лечение с помощью ТКСК и rAAVhu68.hGALC.

За всеми лечеными субъектами наблюдают в течение 2 лет для оценки профиля безопасности и характеристики фармакодинамики и эффективности rAAVhu68.hGALC. Субъекты наблюдаются в течение дополнительных 3 лет (всего 5 лет после введения дозы) в течение периода LTFU исследования для оценки долгосрочных клинических результатов, что соответствует проекту «Руководства FDA для промышленности: Долгосрочное наблюдение после приема препаратов для генной терапии человека» (июль 2018 г.).

Таблица 10. Сводка протокола первого клинического испытания на людях

Название протокола(ов):	Открытое многоцентровое исследование фазы 1/2 с повышением дозы для оценки безопасности и переносимости единичных доз гAAVhu68.hGALC, вводимых в Cisterna Magna (ICM) педиатрических субъектов с инфантильной глобоидно-клеточной лейкодистрофией (болезнь Краббе)
Количество субъектов:	До 12 оцениваемых субъектов
Цели:	<i>Первичная:</i> Оценить безопасность и переносимость гAAVhu68.hGALC через 24 месяца после приема разовой дозы ICM путем оценки: - Нежелательных явлений (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (НЯ) - Показателей жизнедеятельности и медицинских осмотров - Неврологических осмотров - Электрокардиограмм (ЭКГ) - Исследования сенсорной нервной проводимости (для оценки токсичности DRG) - Лабораторных исследований (химический анализ сыворотки, гематология, исследования коагуляции, функциональные тесты печени (LFT), общий анализ мочи, биохимия и цитология CSF) - Иммуногенности вектора и трансгенного продукта <i>Вторичная (поисковые показатели эффективности):</i> Оценить фармакодинамику и биологическую активность гAAVhu68.hGALC в течение 2 лет после введения разовой дозы ICM на основе следующих конечных точек: - Уровней GALC в СМЖ и сыворотке Оценить эффективность гAAVhu68.hGALC через 2 года после приема однократной дозы ICM, измеренную по: - Выживаемости - Прогрессированию заболевания, оцениваемому по возрасту достижения, возрасту потери и процентной доле детей, сохраняющих или достигающих соответствующих возрасту уровней развития

	Прогрессированию заболевания, оцениваемого по возрасту достижения, возрасту потери и проценту субъектов, поддерживающих двигательные уровни развития (согласно критериям ВОЗ), и проценту субъектов, у которых прогрессирует стадия заболевания. <i>Поисковая:</i> Дополнительно оценить эффективность гAAVhu68.hGALC через 2 года после приема однократной дозы ICM, измеренную по: Возрасту начала и частоте приступов по оценке дневника припадков Клиническим исходам оцененным с помощью шкалы Бейли (BSID-III) или шкалы Маллена раннего обучения (в зависимости от возраста испытуемого), шкалы адаптивного поведения Вайнленда (издание III), моторных шкал Пибоди, опросника качества жизни младенцев и детей ясельного возраста. Дополнительно оценить фармакодинамические эффекты гAAVhu68.hGALC через 24 месяца после приема однократной дозы ICM, измеренную по: Миелинизации центральной нервной системы по данным МРТ и ДТ-МРТ Измерению скорости нервной проводимости (NCV) глубоких малоберцовых, большеберцовых, локтевых, икроножных, срединных нервов (для оценки периферической нейропатии сенсорных и моторных нервов) Визуально вызванным зрительным потенциалам (VEP) Слуховым вызванным реакциям ствола мозга (BAER) Биомаркерам заболеваний в СМЖ и плазме/сыворотке, включая психозин и другие.
Дизайн исследования:	Фаза 1/2, ФИН, многоцентрового, открытого, одноэтапного исследования с повышением дозы гAAVhu68.hGALC, вводимого путем однократной инъекции ICM у педиатрических субъектов с инфантильной болезнью Краббе. Безопасность и переносимость,

фармакодинамику и клиническую эффективность оценивали в течение 2 лет, и всех субъектов наблюдали в течение 5 лет после введения rAAVhu68.hGALC для долгосрочной оценки безопасности и переносимости, фармакодинамики, прогрессии заболевания и клинических исходов. Дизайн исследования проиллюстрирован на Фиг. 16. Исследование состоит из фазы скрининга для определения пригодности каждого потенциального субъекта в период от около -35 до -1 дня. После подтверждения соответствия субъекта критериям отбора и желания родителей/опекунов принять участие в исследовании их ребенка, субъект проходит базовую оценку, которая включает магнитно-резонансную томографию головного мозга (МРТ), люмбальную пункцию (LP) для сбора спинномозговой жидкости (СМЖ), забор крови, сбор мочи, показатели жизнедеятельности, ЭКГ, физический осмотр, неврологический осмотр и клинические обследования. Оценка исходного уровня проводится в -1 день и 0 день, и право на участие подтверждается на исходном уровне до введения rAAVhu68.hGALC. Во время фазы лечения пациенты поступают в больницу утром 0 дня. Субъекты получают однократную дозу ICM rAAVhu68.hGALC в 0 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, 3 месяца и через 6 месяцев после введения дозы, а затем каждые 6 месяцев в течение первых 2 лет после приема, как представлено на Фиг. 18А-18С. 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 rAAVhu68.hGALC в виде одной инъекции ICM:

Когорта 1 (низкая доза): Три подходящих субъекта (субъекты от №1 до №3) последовательно включаются в исследование и вводят низкую дозу rAAVhu68.hGALC с 4-недельным периодом наблюдения за безопасностью между первым и вторым 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 rAAVhu68.hGALC. Когорта 2 (высокая доза): Если принято решение о продолжении, трех подходящих субъектов (субъекты № 4 - № 6) последовательно регистрируют и вводят высокую дозу rAAVhu68.hGALC с 4-недельным периодом наблюдения за безопасностью между четвертым и пятым субъектом. Если SRT не наблюдаются, комиссия по безопасности оценивает все доступные данные по безопасности, включая данные по безопасности для субъектов в когорте 1, через 4 недели после введения третьему субъекту когорты 2 rAAVhu68.hGALC. Когорта 3 (МПД): В ожидании положительной рекомендации совета по безопасности в исследование включают 6 дополнительных субъектов (субъекты № 7 - № 12), которым вводят однократную дозу ICM rAAVhu68.hGALC в МПД. Дозирование для субъектов в этой когорте не меняется с 4-недельным периодом наблюдения за безопасностью между каждым субъектом, и обзор совета по безопасности не требуется после введения дозы для первых трех субъектов в этой когорте. В совокупности мы ожидаем, что общее количество участников будет 9 в когорте как с высокими, так и с низкими дозами, и всего 12 субъектов (по всем дозам).
Критерии включения	1. Возраст на момент приема препарата старше 1 месяца 2. Диагноз болезнь Краббе подтвержден низкой активностью GALC, высоким уровнем психозина и генетической документацией гомозиготных или сложных гетерозиготных делеций или мутаций GALC 3. Субъекты, включенные в когорт 1 или когорт 2, задокументировали начало симптомов в возрасте до 9 месяцев. 4. Субъекты, включенные в когорт 3, должны иметь <i>одно</i> из следующего: а) задокументированное проявление симптомов в возрасте до 9 месяцев ИЛИ б) быть предсимптомным И иметь брата или сестру с

	подтвержденным диагнозом болезни Краббе, у которых симптомы появились в возрасте до 9 месяцев, ИЛИ были идентифицированы с помощью NBS и имели диагноз IKD на основании Консенсусных рекомендаций по NBS, диагностике и лечению (Kwon JM и др. (2018) Orphanet J Rare Dis. 13(1):30)
Критерий исключения	1. Субъекты когорты 1 и когорты 2: Предыдущая ТКСК с признаками остаточных клеток донорского происхождения 2. Заболевание у субъектов на терминальной стадии заболевания, проявляющееся любым из следующих симптомов: глухота слепота сильная слабость с потерей примитивных рефлексов 3. Субъекты с более чем одним из следующих симптомов: аномальные зрачковые рефлексы резкое движение глаз трудности с визуальным отслеживанием 4. Любой клинически значимый нейрокогнитивный дефицит, не связанный с болезнью Краббе или вторичная причина, которые, по мнению исследователя, могут затруднить интерпретацию результатов исследования. 5. Пациенты с положительным результатом теста на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) или гепатит С 6. 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. 7. Любые противопоказания к процедуре введения ИСМ, в том числе противопоказания к рентгеноскопии. 8. Противопоказания к МРТ или люмбальной пункции. 9. Участие в любом другом клиническом исследовании

	исследуемого лекарственного средства в течение 4 недель до скрининга или в течение 5 периодов полураспада исследуемого продукта, использованного в этом клиническом исследовании, в зависимости от того, какой из этих периодов длиннее
Новое исследуемое лекарственное средство	rAAVhu68.hGALC
Способ введения и процедура	rAAVhu68.hGALC вводят в виде однократной дозы госпитализированным субъектам в 0 день посредством субзатылочной инъекции под контролем компьютерной томографии в cisterna magna. В 0 день шприц, содержащий 5,6 мл rAAVhu68.hGALC 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 rAAVhu68.hGALC, подключается к набору удлинителей. Содержимое шприца вводят медленно в течение 1-2 минут, получая объем 5,0 мл.
Оценки безопасности	Оценка безопасности, включая сбор данных о нежелательных явлениях (НЯ) и серьезных нежелательных явлениях (СНЯ), физикальное и неврологическое обследование, показатели жизненно важных функций, клинические лабораторные тесты (химический анализ сыворотки, гематология, коагуляция, LFT, анализ мочи), ЭКГ, исследования нервной проводимости и цитология СМЖ и химия (подсчет клеток, белка, глюкозы) выполняются во время, указанное в графике исследования (Фиг. 18A-18C). Исследователь несет основную ответственность за постоянный медицинский анализ данных по безопасности (НЯ, СНЯ, лабораторные данные и т. Д.) на протяжении всего исследования и до включения каждого субъекта в исследование на стадии увеличения дозы. Совет по безопасности рассматривает данные о безопасности через определенные промежутки времени на протяжении всего исследования и дает спонсору рекомендации относительно дальнейшего проведения исследования. Оценки безопасности после первых трех субъектов в когорте 1 и после первых трех субъектов в когорте 2 проводят, как описано на Фиг. 17.

Статистические методы

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 здорового контроля соответствующего возраста и данными естественного анамнеза у пациентов с болезнью Краббе 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, СО, медиана, минимум и максимум). Графические дисплеи представлены соответствующим образом.

Обоснование выборки пациентов

Группа исследования - пациенты детского возраста

ФИН фокусируется на инфантильных субъектах с проявлением симптомов до 9 месяцев, которые представляют собой группу населения с наиболее высокими неудовлетворенными потребностями, поскольку ТКСК этим пациентам не показана. Кроме того, у этих пациентов наблюдается исключительно разрушительное течение болезни с быстрым и очень предсказуемым спадом, однородным по проявлению как моторных, так и когнитивных нарушений (Bascou N., et al. (2018) *Orphanet J Rare Dis.* 13(1):126). Фактически, пациенты с симптомами до 9 месяцев имеют течение болезни, напоминающее болезнь Краббе в раннем детстве, с быстрым и тяжелым прогрессированием когнитивных и двигательных нарушений и невозможностью приобрести какие-либо функциональные навыки после начальных признаков и симптомов заболевания. Ожидается, что большинство этих пациентов умрут в течение первых нескольких лет жизни (2-летняя выживаемость колеблется от 26 до 50% (Duffner PK, et al. (2011) *Pediatr Neurol.* 45(3):141-8; Beltran-Quintero M.L., et al. (2019) *Orphanet J Rare Dis.* 14(1):46). Фенотип младенцев с началом в возрасте от 9 до 12 месяцев более вариателен: некоторые из них демонстрируют тяжелый ранний детский фенотип болезни Краббе, в то время как другие имеют менее тяжелую картину заболевания с (почти) нормальными когнитивными функциями и заметно лучшими адаптивными и мелкими моториками, что затрудняет прогнозирование фенотипа вновь диагностированного пациента с началом от 9 до 12 месяцев (Bascou N., et al. (2018) *Orphanet J Rare Dis.* 13(1):126). Следовательно, популяция ограничена субъектами с появлением симптомов в возрасте <9 месяцев, предсказуемое и быстрое снижение в здоровье которых поддерживает надежный дизайн исследования и оценку функциональных результатов в течение разумного периода наблюдения. Ожидается, что для этой группы лечение стабилизирует прогрессирование заболевания и предотвратит потерю навыков, таких как приобретенные стадии развития и двигательные способности, продлит выживаемость, задержит или предотвратит развитие судорог.

Несмотря на общую основную патофизиологию, фенотип Краббе у взрослых и течение заболевания заметно мягче по сравнению с разрушительной формой инфантильной болезни Краббе, поэтому демонстрация стабилизации заболевания у взрослых не дает оснований полагать, что терапия при детской болезни Краббе будет эффективна. Важно отметить, что начало болезни Краббе у взрослых очень вариативно, прогрессирование медленнее и вариативнее со снижением, которое происходит от многих лет до десятилетий (Jardim LB, et al. (1999) *Arch Neurol.* 56(8):1014-7; Debs R., et al. (2013) *J Inherit Metab Dis.* 36(5):859-68). Было бы очень сложно разработать клиническое исследование, которое однозначно продемонстрировало бы эффективность исследуемой терапии в контексте длительного естественного течения болезни. Тот факт, что ТКСК

обеспечивает вариант лечения, способный стабилизировать или даже улучшить проявления заболевания, является еще одним важным соображением (Sharp ME, et al. (2013) JIMD Rep. 10:57-9; Laule C., et al. (2018) Journal of Neuroimaging. 28(3):252-255). Наконец, NBS не получил широкого распространения в США и недоступен в Европе, а неоднозначная, неспецифическая клиническая картина означает, что болезнь Краббе у взрослых по-прежнему недооценивается, и, таким образом, доступ к таким пациентам остается чрезвычайно редким (Wasserstein MP, et al. al. (2016) Genet Med. 18(12):1235-1243).

Группа исследования - исключение субъектов с тяжелым заболеванием

Учитывая природу болезни Краббе с повреждением ЦНС, которое считается в значительной степени необратимым, и очень быстрое прогрессирование заболевания в детской популяции, ожидается, что rAAVhu68.hGALC предоставит наибольший потенциал для пользы у пациентов с отсутствием или от легкой до средней степени заболевания, у которых нет признаков, которые однозначно связаны с последними стадиями заболевания, включая глухоту, слепоту, сильную слабость с потерей примитивных рефлексов (Escolar ML, et al. (2006) Pediatrics. 118(3):e879-89). Кроме того, аномальные зрачковые рефлексы, резкое движение глаз или трудности с визуальным отслеживанием чаще встречаются при очень запущенной стадии заболевания, чем у пациентов с умеренными признаками и симптомами, и обычно не наблюдаются на ранних стадиях заболевания (Escolar ML, et al. (2006) Pediatrics. 118(3):e879-89). Следовательно, наличие более чем одного из этих признаков считается показателем запущенного заболевания и исключает участие в исследовании. Из-за тяжелой инвалидности эти пациенты вряд ли получат существенную пользу от терапии, кроме стабилизации заболевания на низком уровне клинической функции, и соответственно должны быть исключены, профиль польза/риск не будет благоприятным, и они будут демонстрировать минимальные эффекты при различных клинических и инструментальных оценках заболевания, которые не позволят оценить эффективность rAAVhu68.hGALC. В этой популяции также может быть более высокий риск проблем безопасности, не связанных с лечением, из-за запущенного состояния последствий заболевания, и такие пациенты должны быть исключены из этого исследования.

Пациенты с клиническими приступами не исключаются из исследования, за исключением случаев, когда, по мнению исследователя, у ребенка есть другие признаки запущенного заболевания, и лечение будет маловероятным. Это связано с тем, что 1) припадки не связаны однозначно с запущенным заболеванием; 2) припадки являются конечной точкой исследования, и исключение пациентов с припадками может смещать исследование в сторону популяции, которая менее склонна к припадкам.

Исследуемая популяция - включение пресимптоматических субъектов

Пресимптоматические инфантильные пациенты с болезнью Краббе исключаются из части исследования с увеличением дозы (когорта 1 и когорта 2), в которой оценивается только rAAVhu68.hGALC. Для этих пациентов, по крайней мере, в США, ТКСК считается

терапевтическим вариантом и способом выбора, даже если он служит только для замедления прогрессирования заболевания. Преобладающее мнение US KOL состоит в том, что тестирование недоказанной исследовательской терапии будет считаться неэтичным в этой популяции, потому что чрезвычайно узкое терапевтическое окно фактически лишит пациента доступа к лечению, которое, как показано, дает хотя бы частичную пользу (т. е. если генная терапия окажется безуспешной, вряд ли будет время «спастись» с помощью ТКСК). Таким образом, rAAVhu68.hGALC следует зарезервировать для пациентов с явно неудовлетворенной потребностью (т.е. пациентов с инфантильной болезнью Краббе с признаками и симптомами, которые не подходят для ТКСК).

Наши доклинические исследования подтверждают более высокую эффективность комбинированной генной терапии и ТКСК по сравнению с любым подходом, поэтому комбинированная терапия ТКСК и rAAVhu68.hGALC оценивается как расширенная когорта в исследовании FII (когорта 3). Симптоматические и предсимптоматические пациенты, которые соответствуют критериям, изложенным в этом документе, имеют право на включение в исследование, поскольку эта когорта оценивает безопасность и эффективность rAAVhu68.hGALC в контексте ТКСК и прогрессирует только в том случае, если доклинические данные дают основания полагать, наличие улучшенной эффективности, чем только по сравнению с ТКСК.

Исследуемая популяция - Обоснование нижнего возрастного предела

Учитывая, что появление симптомов может происходить перинатально или даже внутриутробно, лечение проводится как можно раньше, чтобы максимизировать потенциальную пользу, таким образом, минимальный возраст исследования был выбран как 1 месяц на момент дозирования, поскольку текущие согласованные руководящие принципы рекомендуют ТКСК до достижения возраста 1 месяца у подходящих пациентов (Kwon JM, et al. (2018) Orphanet J Rare Dis. 13(1):30). Требование к субъектам быть в возрасте 1 месяца или старше позволяет субъектам и их семьям рассмотреть другие формы стандартного лечения до того, как они будут допущены к участию в этом исследовании.

Еще одно соображение при выборе нижнего возрастного предела - убедиться, что лечение и, в частности, процедура ИСМ может быть безопасно проведена у такого молодого пациента. После тщательного изучения изображений, полученных от младенцев в возрасте 1-2 недель, опытный интервенционный радиолог из Пенсильванского университета подтвердил, что нет никаких особых анатомических проблем с проведением введения ИСМ под контролем КТ у 1-месячного ребенка при условии, что обоснование для лечения поддерживается.

Конечные точки

В дополнение к измерению безопасности и переносимости в качестве первичных конечных точек, для этого исследования были выбраны вторичные и исследовательские фармакодинамические конечные точки и конечные точки эффективности на основе

текущей литературы и консультаций с ведущими клиницистами, специализирующимися на болезни Краббе. Ожидается, что эти конечные точки продемонстрируют значимые функциональные и клинические результаты в этой популяции. Конечные точки измеряются через 30 дней, 90 дней и 6 месяцев, а затем каждые 6 месяцев в течение 2-летнего краткосрочного периода наблюдения, за исключением тех, которые требуют седации и/или люмбальной пункции, как показано на Фиг. 18А-18С. Во время фазы долгосрочного продления частота измерений снижается до одного раза в 12 месяцев. Эти временные точки были выбраны для облегчения тщательной оценки безопасности и переносимости гAAVhu68.hGALC. Ранние временные точки и 6-месячный интервал также были выбраны с учетом быстрой скорости прогрессирования заболевания у нелеченных инфантильных пациентов с болезнью Краббе. Это позволяет проводить тщательную оценку фармакодинамики и показателей клинической эффективности у леченных субъектов в течение периода наблюдения, для которого существуют необработанные данные сравнения. Субъекты продолжают контролироваться на предмет безопасности и эффективности в течение в общей сложности 5 лет после введения гAAVhu68.hGALC в соответствии с проектом «Руководства FDA для промышленности: Долгосрочное наблюдение после приема препаратов для генной терапии человека »(июль 2018 г.).

Прогрессирование заболевания и клинические исходы

Ввиду быстрой и однородной скорости прогрессирования заболевания в детской популяции (Duffner PK, et al. (2011) *Pediatr Neurol.* 45(3):141-8; Basco N., et al. (2018) *Orphanet J Rare Dis.* 13 (1): 126) 2-летнее наблюдение для оценки первичных исходов считается достаточным для оценки воздействия гAAVhu68.hGALC с течением времени. Кроме того, LTFU через 5 лет после лечения очень информативен для оценки долгосрочных результатов и того, является ли лечение эффективным для продления выживаемости и стабилизации пациентов на уровне функции, аналогичном или превосходящем результаты, наблюдаемые у пресимптоматических пациентов после ТКСК.

Введение гAAVhu68.hGALC стабилизирует прогрессирование заболевания, измеряемое по выживаемости, предотвращая потерю стадий развития и двигательных навыков, потенциально способствуя приобретению новых стадий, предотвращая возникновение и уменьшая частоту приступов. Смерть обычно наступает в течение первых 3 лет жизни у большинства пациентов с диагнозом «ранняя инфантильная болезнь Краббе», при этом медиана смертности увеличивается до 5 лет в популяции позднего младенчества, в которую входят пациенты с проявлением симптомов в период от 7 до 12 месяцев (Duffner P.K., et al. (2012) *Pediatr Neurol.* 46(5):298-306). Ограничивая критерии включения пациентами с началом в возрасте 9 месяцев или ранее, популяция имеет более тяжелый, ранний инфантильный фенотип и течение болезни (Basco N., et al. (2018) *Orphanet J Rare Dis.* 13(1):126). Учитывая быстрое снижение случаев нелеченой детской болезни Краббе, лечение гAAVhu68.hGALC увеличивает продолжительность жизни в течение последующих периодов наблюдения. Развитие моторных функций зависит от

возраста и стадии заболевания на момент включения в исследование (Bascou N., et al. (2018) *Orphanet J Rare Dis.* 13(1):126; Beltran-Quintero M.L., et al. (2019) *Orphanet J Rare Dis.* 14(1):46). Учитывая тяжесть заболевания в целевой популяции, субъекты могли достичь двигательных навыков при зачислении, развить и впоследствии потерять другие двигательные навыки или еще не показать признаков развития двигательных навыков. Таким образом, оценки отслеживают возраст достижения и возраст потери для всех стадий. Достижение моторных функций определяется для шести общих стадий на основе критериев Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), приведенных в Таблице 11.

Таблица 11. Критерии деятельности ВОЗ для основных стадий развития моторики

Общая стадия в развитии моторики	Критерии эффективности многоцентрового эталонного исследования роста
Сидение без опоры	Ребенок сидит прямо, голова приподнята, не менее 10 секунд. Ребенок не использует руки или кисти для уравнивания тела или поддержки положения.
Ползание на четвереньках	Ребенок попеременно движется вперед или назад на четвереньках. Живот не касается опорной поверхности. Бывают непрерывные и последовательные движения, не менее трех подряд.
Стояние с помощью	Ребенок стоит в вертикальном положении на обеих ногах, держась обеими руками за устойчивый предмет (например, мебель), не опираясь на него. Тело не задевает устойчивый предмет, а ноги выдерживают большую часть массы тела. Таким образом, ребенок стоит с посторонней помощью не менее 10 секунд.
Прогулка с помощником	Ребенок находится в вертикальном положении с прямой спиной. Ребенок делает шаги вбок или вперед, держась за устойчивые предметы (например, мебель) одной из рук. Одна нога движется вперед, а другая поддерживает часть массы тела. Таким образом ребенок делает не менее пяти шагов.
Стояние в одиночку	Ребенок стоит в вертикальном положении на обеих ногах (не на носках) с прямой спиной. Ноги выдерживают 100% массы тела ребенка. Нет контакта с человеком или предметами. Ребенок стоит в одиночестве не менее 10 секунд.
Гуляние в одиночестве	Ребенок самостоятельно делает не менее пяти шагов в вертикальном положении с прямой спиной. Одна нога движется вперед, а другая поддерживает большую часть массы тела. Нет

Общая стадия в развитии моторики	Критерии эффективности многоцентрового эталонного исследования роста
	контакта с человеком или предметом.

Адаптировано из (Wijnhoven TM, et al. (2004) Food Nutr Bull. 25(1 Suppl):S37-45).

Сокращения: ВОЗ, Всемирная организация здравоохранения.

Учитывая, что у субъектов с инфантильной болезнью Краббе симптомы могут развиваться в течение первых недель или месяцев жизни, а достижение первой стадии моторного развития ВОЗ (сидение без поддержки) обычно не проявляется до 4-месячного возраста (медиана: 5,9 месяцев), этой конечной точки может не хватать чувствительности для оценки степени терапевтического эффекта, особенно у субъектов, у которых во время лечения были более явные симптомы. По этой причине также включена оценка соответствующих возрасту стадий развития, которые могут быть применены к младенцам (Sharp ME, et al. (2013) JIMD Rep. 10:57-9). Одним из недостатков является то, что опубликованный инструмент предназначен для использования клиницистами и родителями и упорядочивает навыки, близкие к типичным возрастным стадиям развития, без привязки к нормальным диапазонам. Однако данные могут быть информативными для суммирования удержания, приобретения или потери стадий развития с течением времени относительно нелеченных детей с инфантильной болезнью Краббе или типичного времени приобретения у нейротипичных детей.

Хотя судороги не являются характерным симптомом для младенческой популяции, около у 30-60% младенческих пациентов в конечном итоге разовьются судороги на более поздних стадиях заболевания (Duffner PK, et al. (2011) Pediatr Neurol. 45(3):141-8). Отсроченное начало судорожной активности позволяет нам определить, может ли лечение rAAVhu68.hGALC предотвратить или отсрочить начало приступов в этой популяции или снизить частоту приступов. Родителей просят вести дневники приступов, в которых можно отслеживать начало, частоту, продолжительность и тип приступов. Эти записи обсуждаются и интерпретируются врачом при каждом посещении.

В качестве исследовательских мер используются клинические шкалы для количественной оценки воздействия rAAVhu68.hGALC на развитие и изменения адаптивного поведения, познания, языка, двигательной функции и качества жизни, связанного со здоровьем. Каждая предложенная мера использовалась либо в популяции Краббе, либо в родственной популяции.

Масштаб и соответствующие области кратко описаны ниже:

Шкалы Бейли для развития младенцев и детей ясельного возраста (издание III): Оценивают развитие младенцев и детей ясельного возраста в пяти областях: когнитивное, языковое, моторное, социально-эмоциональное и адаптивное поведение. Все домены проходят испытание.

Шкалы адаптивного поведения Вайнленда (издание III): Оценивают адаптивное

поведение от рождения до взрослой жизни (0-90 лет) в пяти областях: общение, повседневные жизненные навыки, социализация, двигательные навыки и неадаптивное поведение. Улучшения с версии 2 до версии 3 включают вопросы, позволяющие лучше понять нарушения развития.

Шкалы развития моторных навыков Пибоди - второе издание: Измеряют взаимосвязанные двигательные функции детей от рождения до пяти лет. Оценки сосредоточены на шести областях: рефлекс, неподвижность, движение, манипулирование объектами, хватание и зрительно-моторная интеграция.

Опросник качества жизни младенцев (ITQOL): Показатель качества жизни, связанный со здоровьем, по сообщениям родителей, разработанный для детей от 2 месяцев до 5 лет.

Шкалы Маллена раннего обучения: Оценивают языковые, моторные и перцептивные способности у младенцев и детей от ясельного возраста до 68 месяцев.

Биомаркеры болезней

Чтобы оценить влияние rAAVhu68.hGALC на патологию заболевания, измеряются изменения миелинизации, функциональные исходы, связанные с миелинизацией, и потенциальные биомаркеры заболевания. Центральная и периферическая демиелинизация, являющаяся основным признаком заболевания, замедляется или прекращается при введении rAAVhu68.hGALC. Центральную демиелинизацию отслеживают с помощью измерений анизотропии областей белого вещества с помощью диффузно-тензорной магнитно-резонансной томографии (DT-MRI) и отслеживания волокон кортикоспинальных моторных трактов, изменения в которых являются индикаторами состояния и прогрессирования заболевания (McGraw P., et al. (2005) Radiology. 236(1):221-30; Escolar M.L., et al. (2009) AJNR Am J Neuroradiol. 30(5):1017-21). Периферическую демиелинизацию измеряют косвенно с помощью исследований скорости нервной проводимости (NCV) на двигательных нервах (глубокие малоберцовые, большеберцовые и локтевые нервы) и сенсорных нервах (икроножные и срединные нервы) для отслеживания колебаний, указывающих на изменение уровней биологически активного миелина (то есть F-волна и латентный период в дистальном направлении, амплитуда или наличие или отсутствие ответа).

По данным одного исследования, у 61,2% населения в какой-то момент болезни наблюдается нарушение зрения (Duffner PK, et al. (2011) Pediatr Neurol. 45(3):141-8). Как и в случае припадков, потеря зрения не является распространенным симптомом. Это дает возможность оценить способность rAAVhu68.hGALC задерживать или предотвращать потерю зрения у тех субъектов, у которых не было значительной потери зрения до лечения. Таким образом, измерение вызванных зрительных потенциалов (ЗВП) используется для объективного измерения ответов на зрительные стимулы как индикатора центрального нарушения или потери зрения. Потеря слуха также является обычным явлением во время прогрессирования заболевания, и ранние признаки слуховых аномалий измеряются с помощью тестирования ствола мозга на слуховые вызванные реакции

(BAER).

GALC отвечает за гидролиз психозина. Дефицит GALC при болезни Краббе приводит к накоплению психозина как центрально, так и периферически. Повышенные уровни психозина были предложены как индикатор болезни Краббе (Escolar ML, et al. (2017) *Mol Genet Metab.* 121(3):271-278). Хотя есть данные, подтверждающие его использование для выявления ранних и тяжелых случаев инфантильной болезни Краббе, интерпретация колебаний уровней психозина с течением времени и после лечения может быть затруднена, поскольку уровни психозина также могут снижаться на поздних стадиях заболевания. Таким образом, одно только свидетельство снижения уровня психозина не будет достаточным свидетельством лечебного эффекта, если оно не сопровождается стабилизацией клинического заболевания.

(Свободный текст списка последовательностей)

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

SEQ ID NO: (содержит произвольный текст)	Произвольный текст под <223>
1	<223> Капсид AAVhu68 vp1
2	<223> Синтетическая конструкция
3	<223> Капсид AAV9 VP1 <220> <221> CDS <222> (1)..(2208) <223> Капсид AAV9 VP1
4	<223> Синтетическая конструкция
5	<223> Кодированная последовательность GALC человека <220> <221> сиг_пептид <222> (1)..(126) <220> <221> CDS <222> (1)..(2058)
6	<223> Синтетическая конструкция
7	<223> Сконструированная GALC собаки <220> <221> CDS <222> (1)..(2007)
8	<223> Синтетическая конструкция
9	<223> Сконструированная кодирующая последовательность GALC человека <220> <221> CDS <222> (1)..(2055) <220> <221> сиг_пептид <222> (1)..(126) <220> <221> мат

	<222> (108)..(2055)
10	<223> Синтетическая конструкция
11	<223> AAV2-5' ITR
12	<223> Промоутер CMV IE
13	<223> Промоутер CB
14	<223> Промоутер CB7
15	<223> Химерный интрон
16	<223> Глобин полиА кролика
17	<223> AAV2-3' ITR
18	<223> Генома вектора с GALC собаки
19	<223> CB7.CI.hG ALC.rBG <220> <221> Прочий_признак <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> Прочий_признак <222> (198)..(579) <223> Энхансер CMV IE <220> <221> Прочий_признак <222> (582)..(863) <223> Промоутер CB <220> <221> Прочий_признак <222> (836)..(839) <223> ТАТА <220> <221> Прочий_признак <222> (958)..(1930) <223> Химерный интрон <220> <221> Прочий_признак <222> (1948)..(4002) <223> hGALCco <220>

	<221> Прочий_признак <222> (4042)..(4168) <223> Глобин поли А кролика <220> <221> Прочий_признак <222> (4257)..(4386) <223> 3' ITR
20	<223> Ген VP1 AAV1 <220> <221> CDS <222> (1)..(2208)
21	<223> Синтетическая конструкция
22	<223> Капсидный ген VP1 AAV5 <220> <221> CDS <222> (1)..(2172)
23	<223> Синтетическая конструкция
24	<223> Капсид AAV3B VP1
25	<223> Промоутер UbC
26	<223> SV40 поздний полиА
27	<223> Промоутер EF-1a

Все документы, процитированные в данном документе, включены в данный документ в качестве ссылки, как и последовательности и текст Списка последовательностей (помеченный «18-8584PCT_ST25.txt»), поданный в данном документе. Предварительная заявка на патент США № 62/810708, поданная 26 февраля 2019 г., Предварительная заявка на патент США № 62/817482, поданная 12 марта 2019 г., Предварительная заявка на патент США № 62/877707, поданная 23 июля 2019 г., и Предварительная заявка на патент США № 62/916652, поданная 17 октября 2019 г., полностью включена посредством ссылки вместе с перечнями последовательностей. 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. Композиция, содержащая рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), причем указанный rAAV содержит:

- (a) капсид AAV, нацеленный на клетки центральной нервной системы; и
- (b) геном вектора, содержащий (i) последовательность, кодирующую галактозилцерамидазу, кодирующую сигнальный пептид, и по меньшей мере зрелый белок галактозилцерамидазы человека, имеющий аминокислотную последовательность аминокислот 43-685 из SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют экспрессию белка и (ii) инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV, при этом геном вектора упакован в капсид AAV.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что капсид AAV представляет собой капсид AAVhu68.

3. Композиция по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность кодирует полноразмерный сигнальный пептид галактозилцерамидазы человека и зрелый белок галактозилцерамидазы человека SEQ ID NO: 10 (аминокислоты 1-685).

4. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты из последовательности, кодирующей экзогенный пептид, и нуклеотиды 127-2055 из SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%, или нуклеотидную последовательность нуклеотидов 1-2055 из SEQ ID NO: 9, или последовательности, идентичные ей на 95-99,9%.

5. Композиция по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность кодирует зрелый белок галактозилцерамидазы человека SEQ ID NO: 10 (аминокислоты 43-685) и экзогенный сигнальный пептид, подходящий для клеток в центральной нервной системе человека.

6. Композиция по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что регуляторные последовательности содержат: промотор бета-актина, интрон и глобин полиА кролика.

7. Композиция по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что регуляторные последовательности содержат SEQ ID NO: 13.

8. Композиция по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что регуляторные последовательности содержат SEQ ID NO: 15.

9. Композиция по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что регуляторные последовательности содержат SEQ ID NO: 16.

10. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что геном вектора содержит CB7.C1.hGALC.RBG, имеющий последовательность нуклеотидов 198-4168 SEQ ID NO: 19.

11. Композиция по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что генома вектора дополнительно содержит 5'-ITR AAV2, кодирующую последовательность и регуляторные

последовательности и 3'-ITR AAV2.

12. Композиция по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит водную жидкость, подходящую для интратекальной доставки пациенту.

13. Композиция по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что композиция содержит искусственную спинномозговую жидкость и поверхностно-активное вещество.

14. Композиция по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что композиция составлена для интратекальной доставки и содержит от $1,4 \times 10^{13}$ до 4×10^{14} GC rAAV.

15. Композиция по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что композиция составлена для доставки в *intra-cisterna magna* и содержит от $1,4 \times 10^{13}$ до 4×10^{14} GC rAAV.

16. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус, содержащий (а) капсид AAV, нацеленный на клетки центральной нервной системы; и (b) геном вектора, содержащий (i) последовательность, кодирующую галактозилцерамидазу, кодирующую сигнальный пептид и зрелый белок галактозилцерамидазы человека, имеющий аминокислотную последовательность аминокислот 43-685 из SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют экспрессию сигнального пептида и зрелого белка галактозилцерамидазы человека, и (ii) инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV, при этом геном вектора упакован в капсид AAV.

17. rAAV по п. 16, отличающийся тем, что капсид AAV представляет собой капсид AAVhu68.

18. rAAV по п. 16 или 17, отличающийся тем, что кодирующая последовательность имеет последовательность, кодирующую экзогенный сигнальный пептид, и нуклеотиды 127-2055 из SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%, или нуклеотидную последовательность нуклеотидов 1-2055 из SEQ ID NO: 9, или последовательности, идентичные ей на 95-99,9%.

19. rAAV по любому из пп. 16-18, отличающийся тем, что кодирующая последовательность кодирует зрелый белок аминокислот 43-685 из SEQ ID NO: 10 и экзогенный сигнальный пептид.

20. rAAV по любому из пп. 16-19, отличающийся тем, что регуляторные последовательности содержат: промотор бета-актина курицы, интрон и глобин полиА кролика.

21. rAAV по любому из пп. 16-20, отличающийся тем, что регуляторные последовательности содержат SEQ ID NO: 13.

22. rAAV по любому из пп. 16-21, отличающийся тем, что регуляторные последовательности содержат SEQ ID NO: 15.

23. rAAV по любому из пп. 16-22, отличающийся тем, что регуляторные последовательности содержат SEQ ID NO: 16.

24. rAAV по любому из пп. 16-23, отличающийся тем, что геном вектора содержит

CB7.CI.hGALC.RBG, имеющий последовательность нуклеотидов 198-4168 SEQ ID NO: 19.

25. rAAV по любому из пп. 16-24, отличающийся тем, что геном вектора содержит 5'-ITR AAV2, кодирующую последовательность и регуляторные последовательности и 3'-ITR AAV2.

26. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус, содержащий капсид AAVhu68 и геном вектора CB7.CI.hGALC.RBG.

27. Композиция, содержащая дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) по любому из пп. 16-26, причем композиция полезна для лечения болезни Краббе.

28. Применение композиции, содержащей дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) по любому из пп. 16-26, при приготовлении лекарственного средства.

29. Композиция по п. 27 или применение по п. 28, отличающиеся тем, что композиция полезна для лечения дисфункции периферических нервов и/или для лечения болезни Краббе.

30. Композиция по п. 27 или применение по п. 28, отличающиеся тем, что rAAV вводят в качестве совместной терапии с терапией гемопоэтическими стволовыми клетками или трансплантацией костного мозга.

31. Композиция по п. 27 или применение по п. 28, отличающиеся тем, что rAAV вводят в качестве совместной терапии с субстрат-редуцирующей терапией.

32. Плазмида, содержащая последовательность, кодирующую галактозилцерамидазу, кодирующую сигнальный пептид и зрелый белок галактозилцерамидазы человека, имеющий аминокислотную последовательность аминокислот 43-685 из SEQ ID NO: 10.

33. Плазмида по п. 32, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9 или последовательность идентичную ей на 95-99,9%.

34. Способ лечения болезни Краббе, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), причем указанный rAAV содержит: (а) капсид AAV, который нацелен на клетки центральной нервной системы; и (b) геном вектора, содержащий последовательность, кодирующую галактозилцерамидазу, кодирующую сигнальный пептид и зрелый белок галактозилцерамидазы человека, имеющий аминокислотную последовательность аминокислот 43-685 из SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют экспрессию белка, при этом указанный геном вектора дополнительно содержит инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV, при этом геном вектора упакован в капсид AAV.

35. Способ коррекции дисфункции периферических нервов, которые вызывают

дыхательную недостаточность и потерю двигательной функции, вызванную болезнью Краббе, причем указанный способ включает введение пациенту композиции, содержащей дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), при этом указанный rAAV содержит: (а) капсид AAV, нацеленный на клетки центральной нервной системы; и (b) геном вектора, содержащий последовательность, кодирующую галактозилцерамидазу, кодирующую сигнальный пептид и зрелый белок галактозилцерамидазы человека, имеющий аминокислотную последовательность аминокислот 43-685 из SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют экспрессию белка, при этом указанный геном вектора дополнительно содержит инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV, при этом геном вектора упакован в капсид AAV.

36. Способ отсрочки начала или частоты приступов, вызванных болезнью Краббе, причем указанный способ включает введение пациенту композиции, содержащей дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), при этом указанный rAAV содержит: (а) капсид AAV, который нацелен на клетки центральной нервной системы; и (b) геном вектора, содержащий последовательность, кодирующую галактозилцерамидазу, кодирующую сигнальный пептид и зрелый белок галактозилцерамидазы человека, имеющий аминокислотную последовательность аминокислот 43-685 из SEQ ID NO: 10 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют экспрессию белка, при этом указанный геном вектора дополнительно содержит инвертированные концевые повторы AAV, необходимые для упаковки генома вектора в капсид AAV, при этом геном вектора упакован в капсид AAV.

37. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что пациент страдает инфантильной болезнью Краббе (EIKD).

38. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что пациент страдает поздней инфантильной болезнью Краббе (LIKD).

39. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что пациент страдает ювенильной болезнью Краббе (JKD).

40. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что у пациента болезнь Краббе начинается в подростковом/взрослом возрасте.

41. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что капсид AAV представляет собой капсид AAVhu68.

42. Способ по любому из пп. 34-41, отличающийся тем, что кодирующая последовательность имеет последовательность, кодирующую экзогенный пептид, и нуклеотиды 127-2055 из SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей на 95-99,9%, или нуклеотидную последовательность нуклеотидов 1-2055 из SEQ ID NO: 9, или последовательности, идентичные ей на 95-99,9%.

43. Способ по любому из пп. 34-41, отличающийся тем, что кодирующая последовательность кодирует зрелый белок галактозилцерамидазы человека аминокислот 43-685 из SEQ ID NO: 10 и экзогенный сигнальный пептид.

44. Способ по любому из пп. 34-43, отличающийся тем, что регуляторные последовательности содержат: промотор бета-актина, интрон и глобин полиА кролика.

45. Способ по любому из пп. 34-44, отличающийся тем, что гAAV вводят в качестве совместной терапии с трансплантацией кроветворных стволовых клеток (ТКСК) или трансплантацией костного мозга.

46. Способ по 45, отличающийся тем, что трансплантацию ТКСК или костного мозга проводят перед введением гAAV.

47. Способ по любому из пп. 34-46, отличающийся тем, что гAAV вводят в качестве совместной терапии с субстрат-редуцирующей терапией.

48. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что композиция составлена для интратекального, интрацеребровентрикулярного или интрапаренхимального введения.

49. Способ по любому из пп. 34-47, отличающийся тем, что гAAV доставляют интратекальным, интрацеребровентрикулярным или интрапаренхимальным введением.

50. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что композиция составлена для введения в виде однократной дозы посредством субзатылочной инъекции под контролем компьютерной томографии (КТ) в cisterna magna (intra-cisterna magna).

51. Способ по любому из пп. 34-47, отличающийся тем, что композицию вводят в виде однократной дозы посредством субзатылочной инъекции под контролем компьютерной томографии (КТ) в cistema magna (intra-cistema magna).

52. Композиция по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что композиция составлена для введения дозы от 1×10^{10} GC/г массы мозга до 5×10^{11} GC/г массы мозга гAAV интратекально.

53. Способ по любому из пп. 34-47, отличающийся тем, что композицию вводят в дозе от 1×10^{10} GC/г массы мозга до 5×10^{11} GC/г массы мозга гAAV интратекально.

54. Композиция по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что композиция составлена для введения дозы от $1,4 \times 10^{13}$ до 4×10^{14} GC гAAV.

55. Способ по любому из пп. 34-47, отличающийся тем, что композицию вводят пациенту-человеку и вводят дозу от $1,4 \times 10^{13}$ до 4×10^{14} GC гAAV.

По доверенности

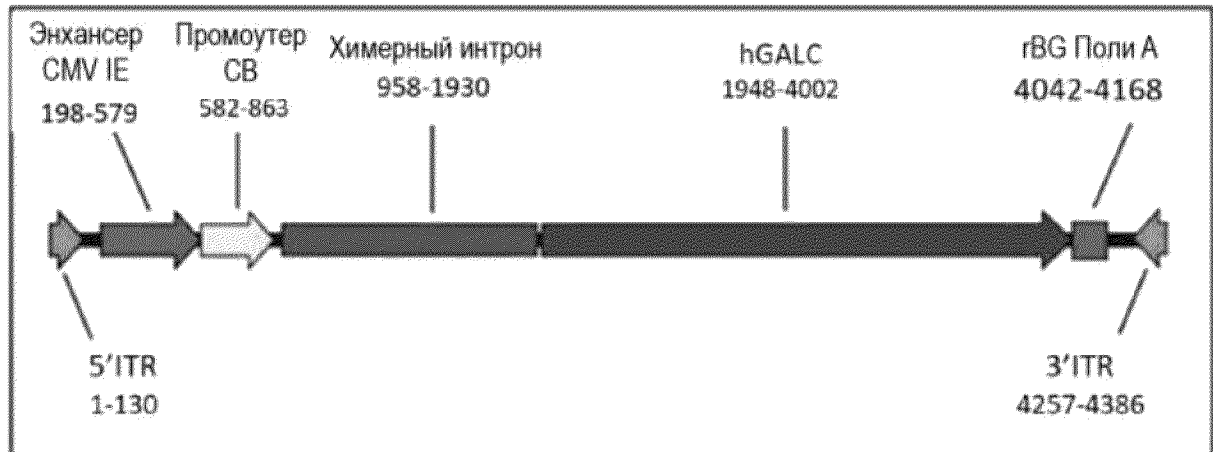
Фиг. 1

```

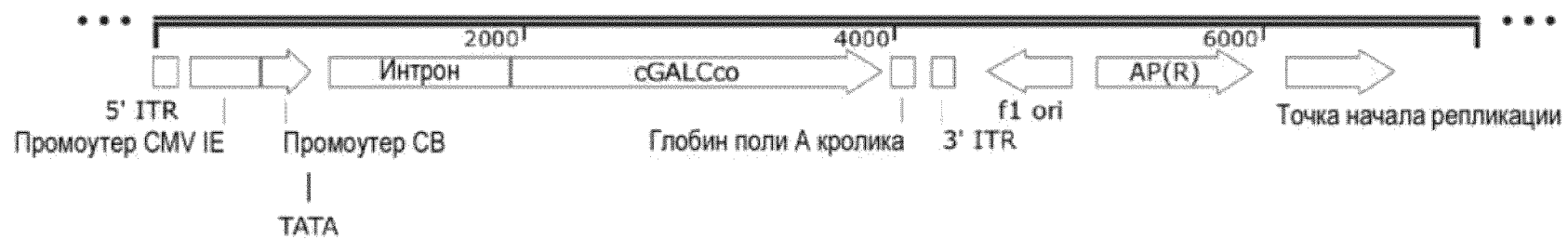
1 50
AAV9 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGY
AAVhu68(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGY
51 100
AAV9 (51) KYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAVhu68 (51) KYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
101 150
AAV9 (101) QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSP
AAVhu68 (101) QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSP
151 200
AAV9 (151) QEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGS
AAVhu68 (151) QEPDSSVGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGS
201 250
AAV9 (201) LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVITTSTRTWALP
AAVhu68 (201) LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVITTSTRTWALP
251 300
AAV9 (251) TYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR
AAVhu68 (251) TYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR
301 350
AAV9 (301) LINNNWGFPRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDY
AAVhu68 (301) LINNNWGFPRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDY
351 400
AAV9 (351) QLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYF
AAVhu68 (351) QLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYF
401 450
AAV9 (401) PSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKT
AAVhu68 (401) PSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKT
451 500
AAV9 (451) INSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSE
AAVhu68 (451) INSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSE
501 550
AAV9 (501) FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGR
AAVhu68 (501) FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGR
551 600
AAV9 (551) DNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
AAVhu68 (551) DNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
601 650
AAV9 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIK
AAVhu68 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIK
651 700
AAV9 (651) NTPVPADPPTAFNKOKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
AAVhu68 (651) NTPVPADPPTAFNKOKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
701 736
AAV9 (701) YTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAVhu68 (701) YTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

```

Фиг. 2

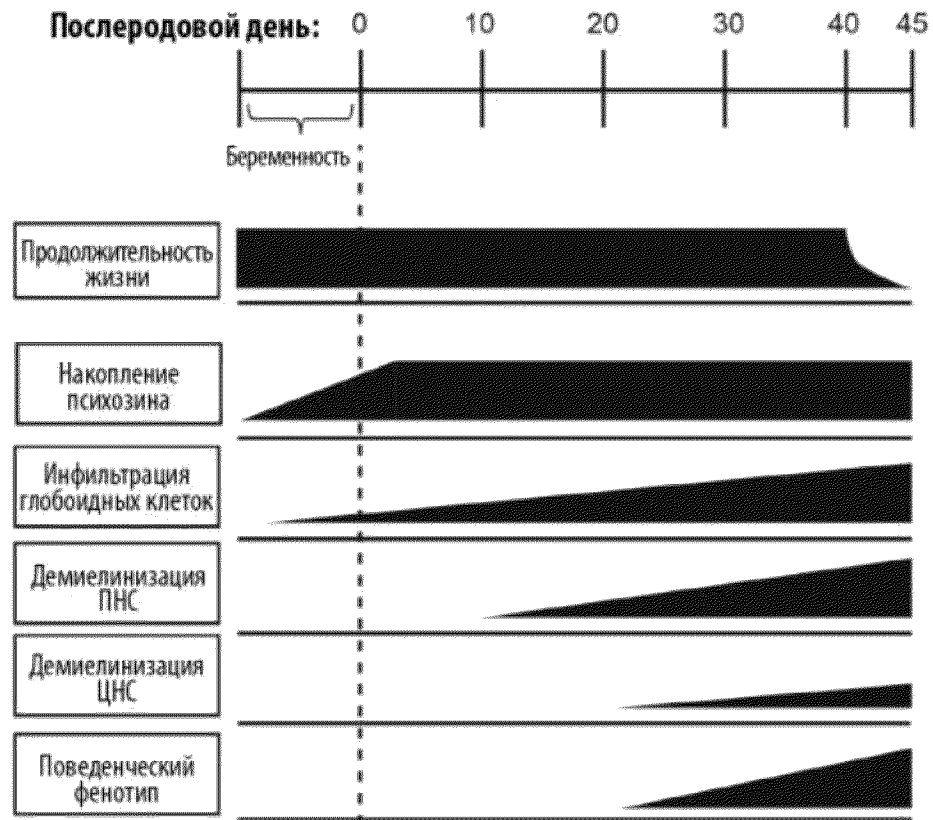


Фиг. 3



pENN.AAV.CB7.Cl.RBG (p1044) Q

Фиг. 4А



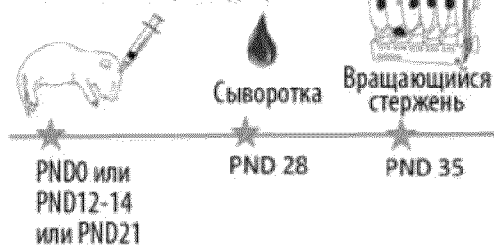
Фиг. 4В

Новорожденный или молодой **ICV**

AAVhu68.CB.hGALco или ФСБ

2×10^{10} до 1×10^{11} GC в 2 мкл (новорожденный)

$1-2 \times 10^{11}$ GC в 4 мкл (молодой)



Мозг (гисто, активность ферментов),

sp cord, нерв (гисто)

печень (активность ферментов)

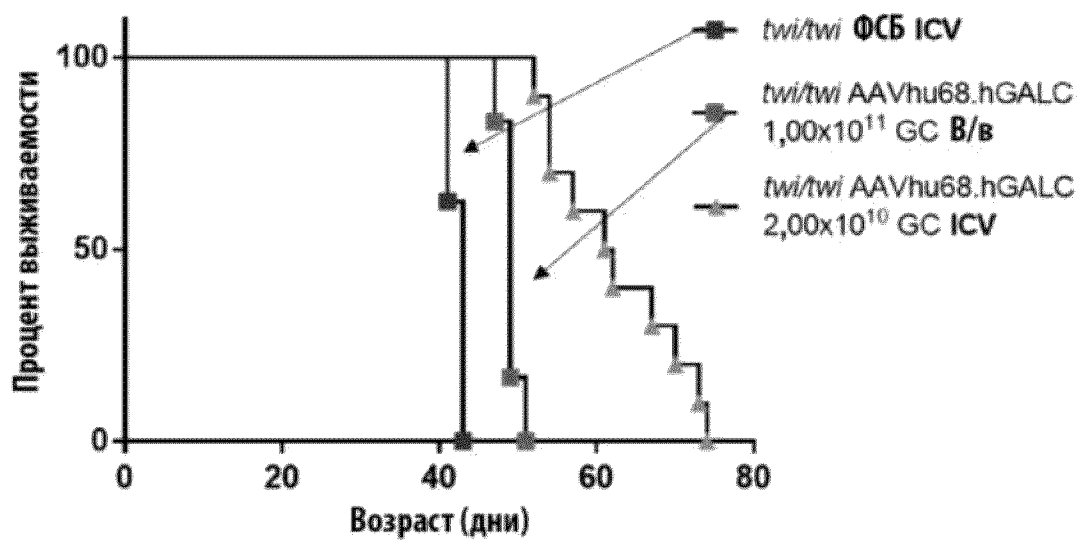


Ежедневные наблюдения
Масса тела

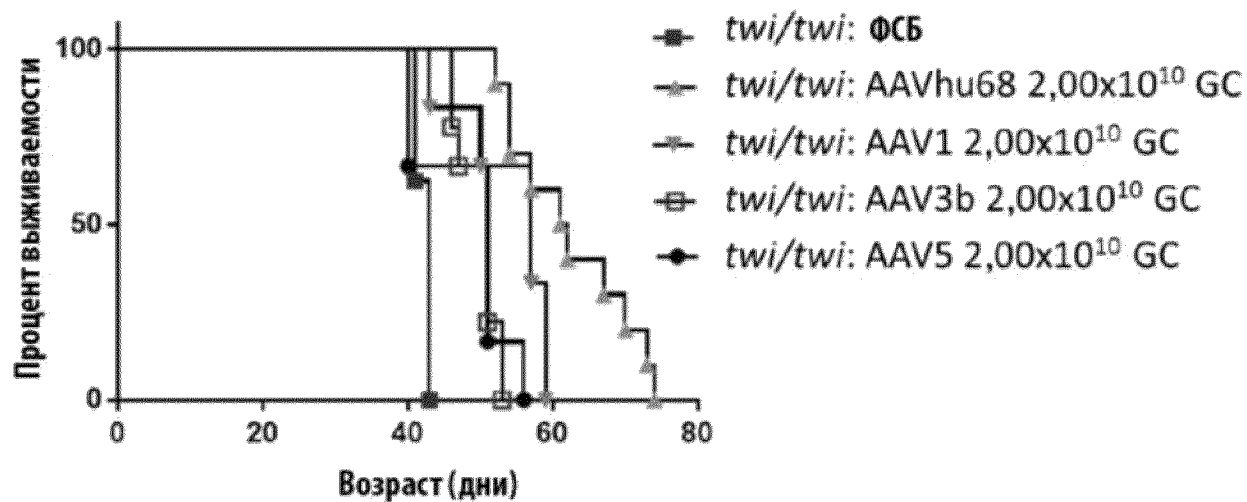
Когорта 1:
Вскрытие
PND 40

Когорта 2:
Выживаемость

Фиг. 5

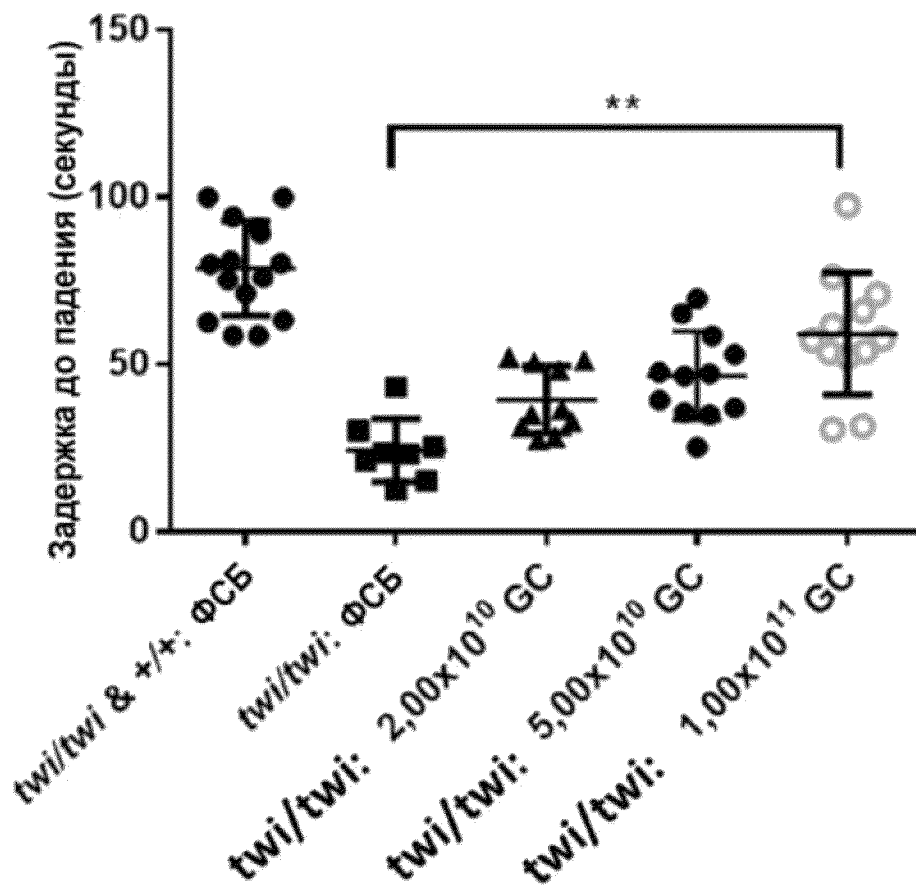


Фиг. 6

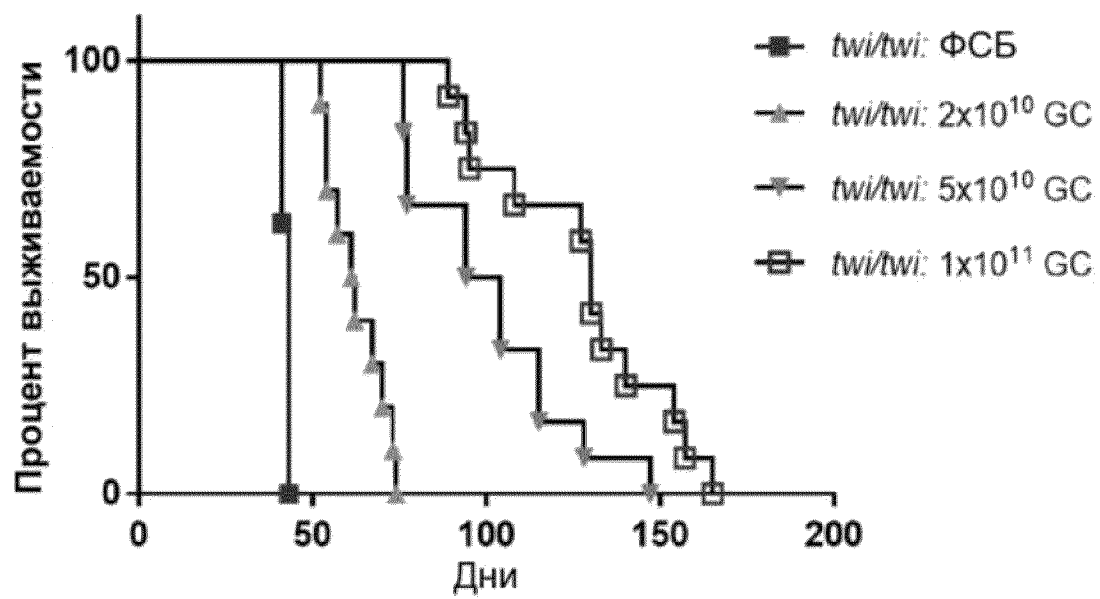


Фиг. 7

Вращающийся стержень PND 35 - Пресимптоматическое лечение

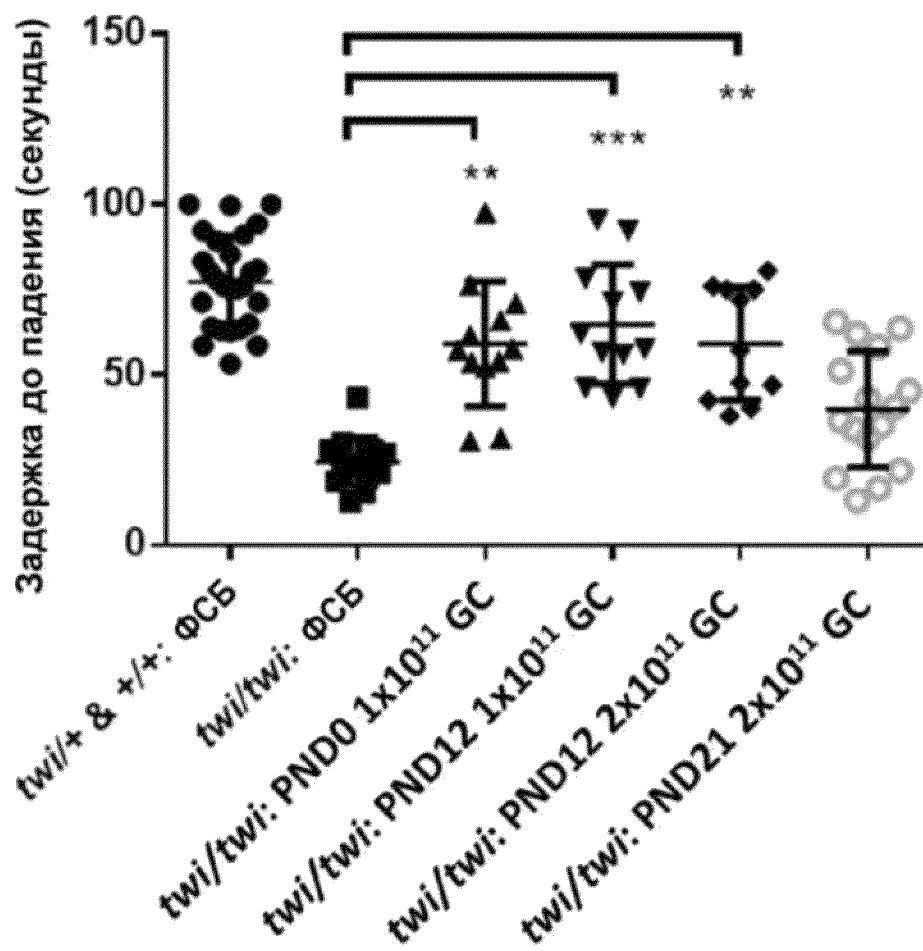


Фиг. 8

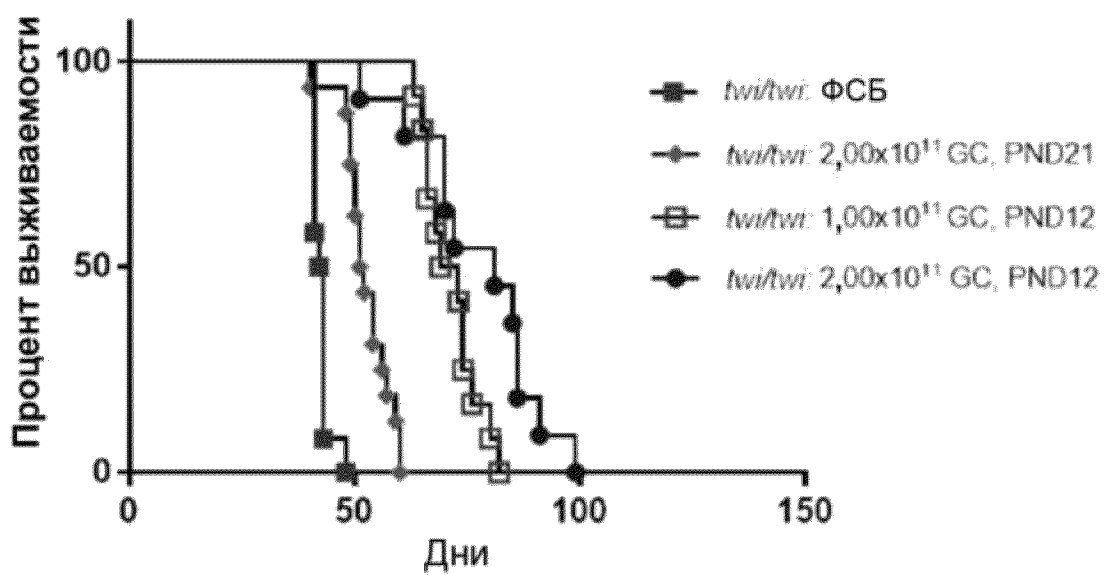


Фиг. 9

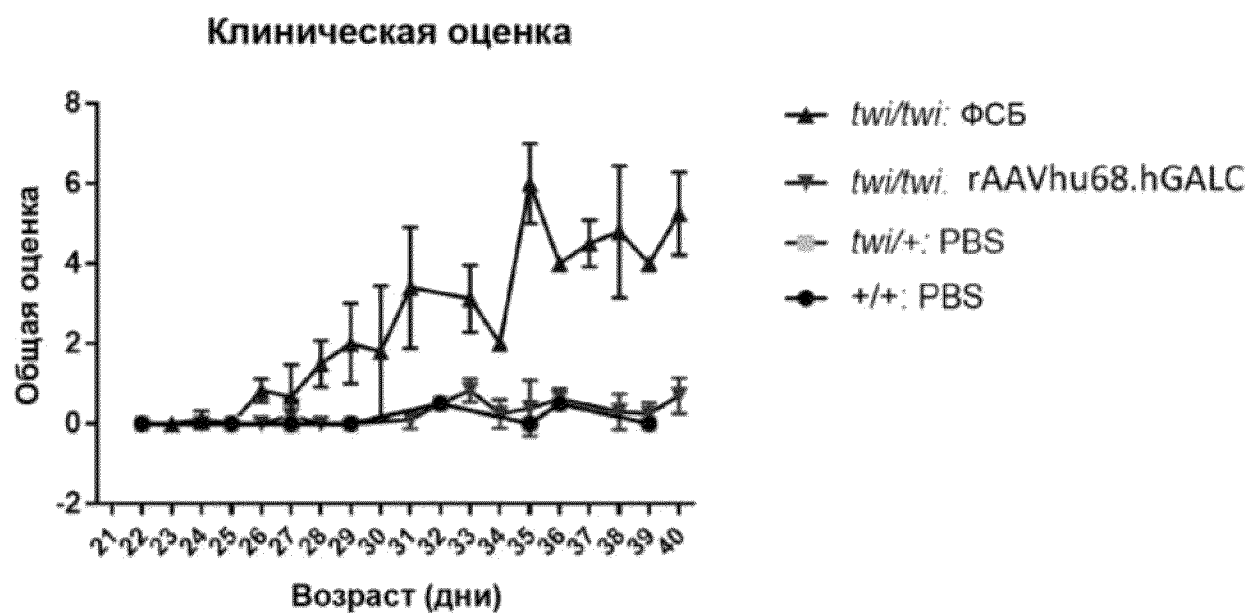
Вращающийся стержень PND 35 - Симптоматическое лечение



Фиг. 10



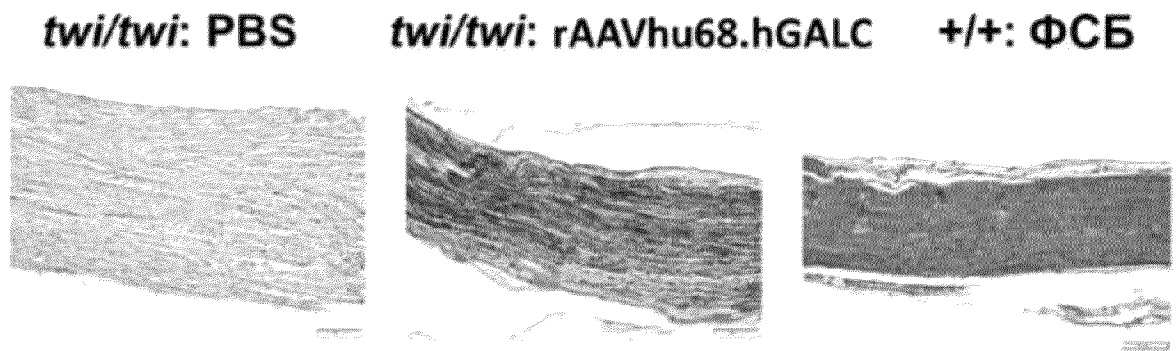
Фиг. 11А



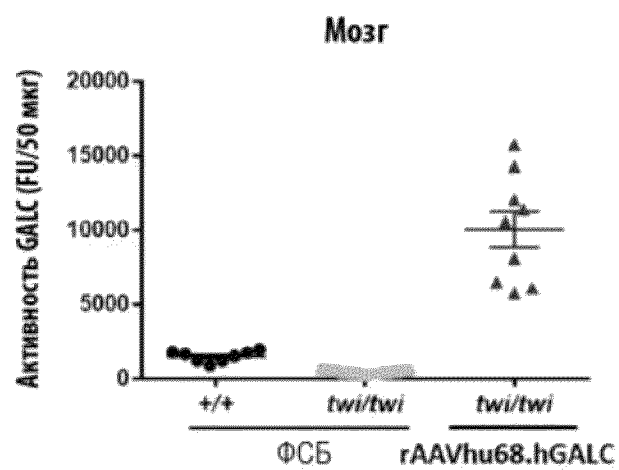
Фиг. 11В



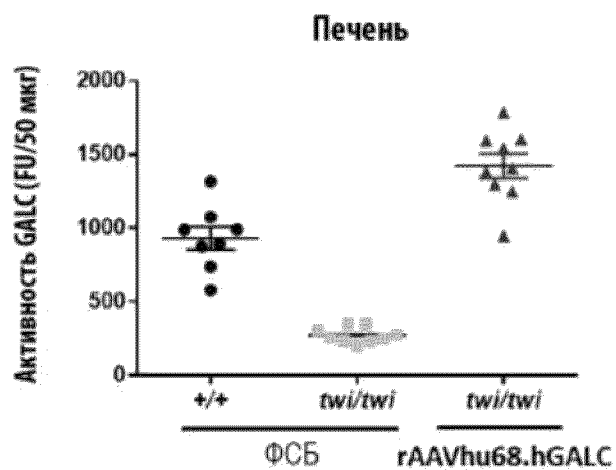
Фиг. 12



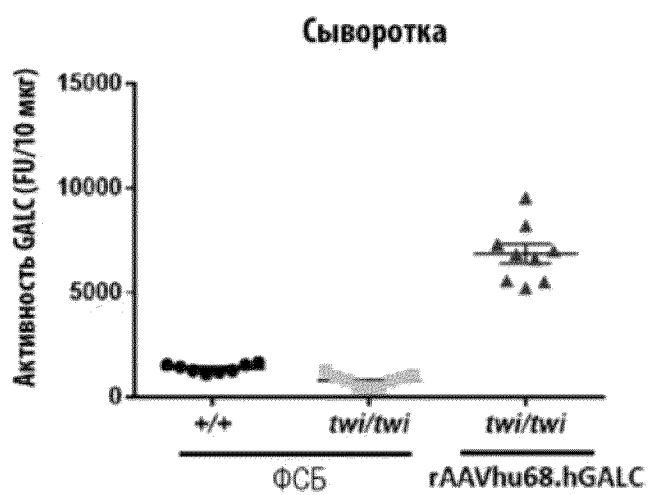
Фиг. 13А



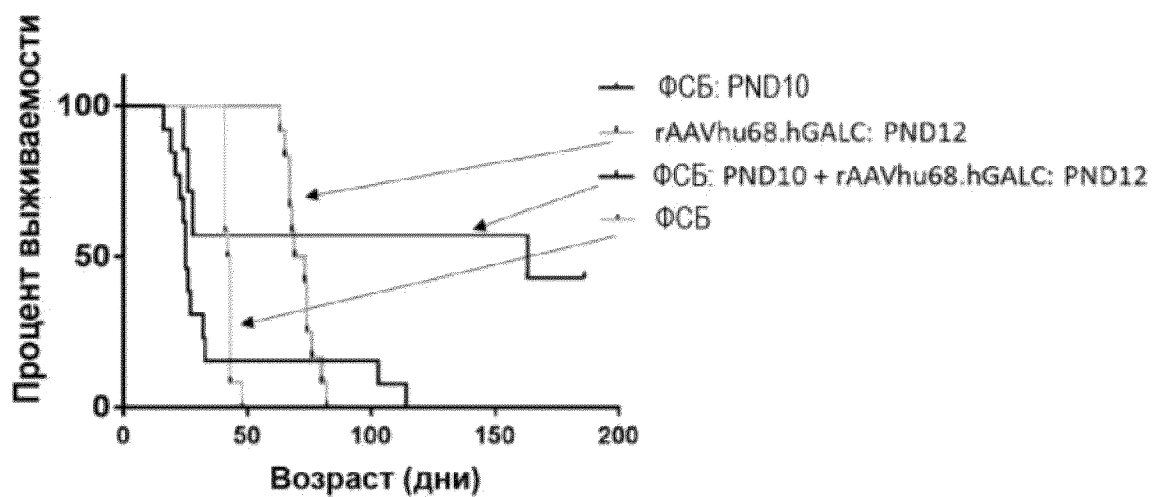
Фиг. 13В



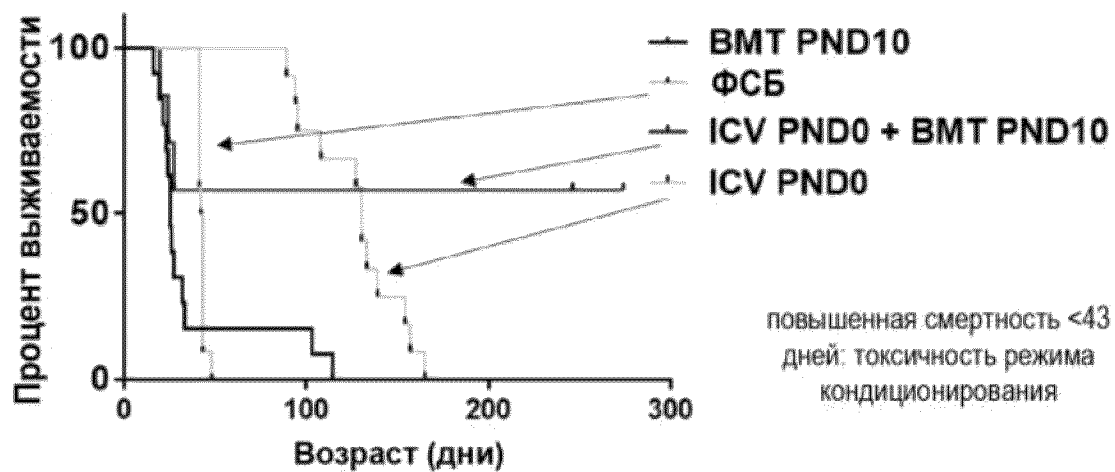
Фиг. 13С



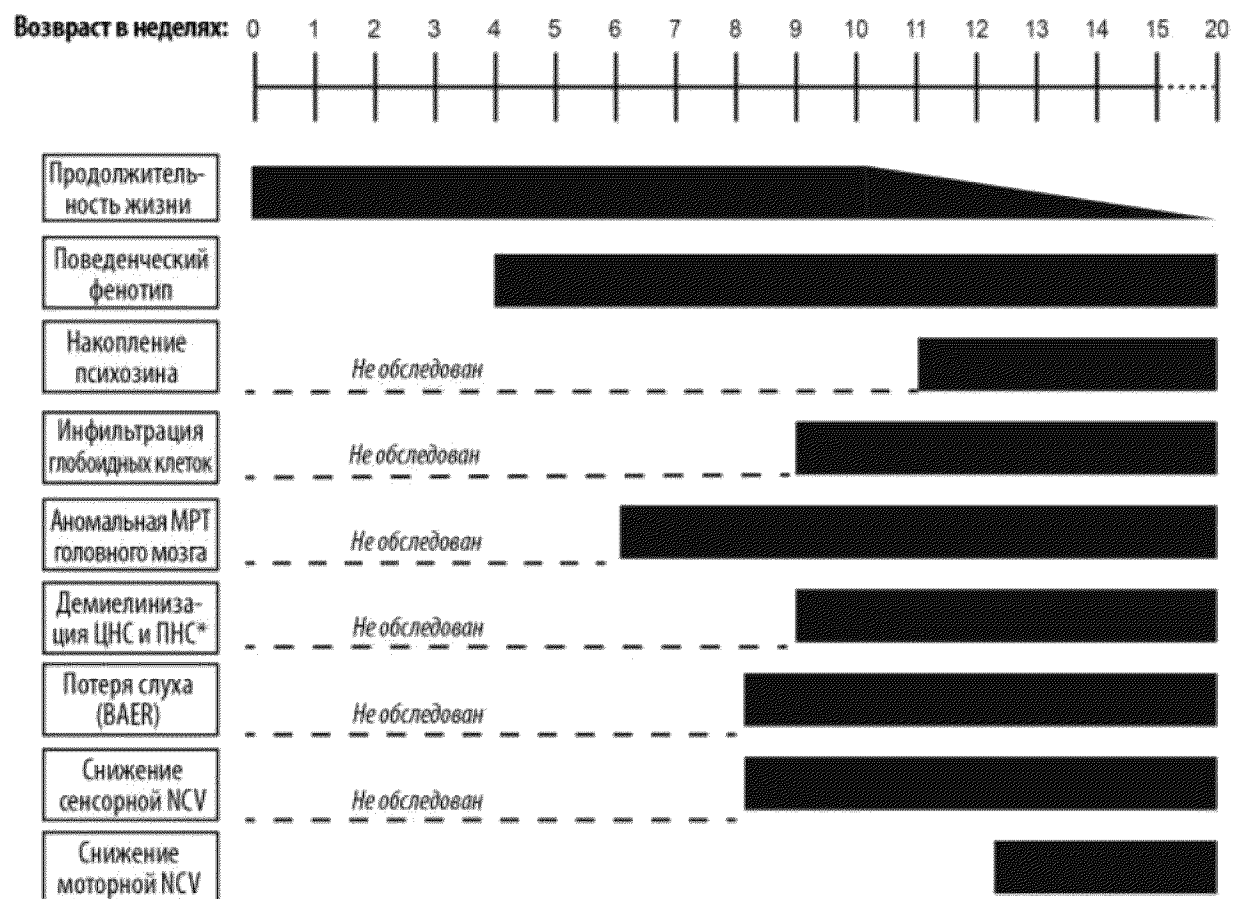
Фиг. 14А



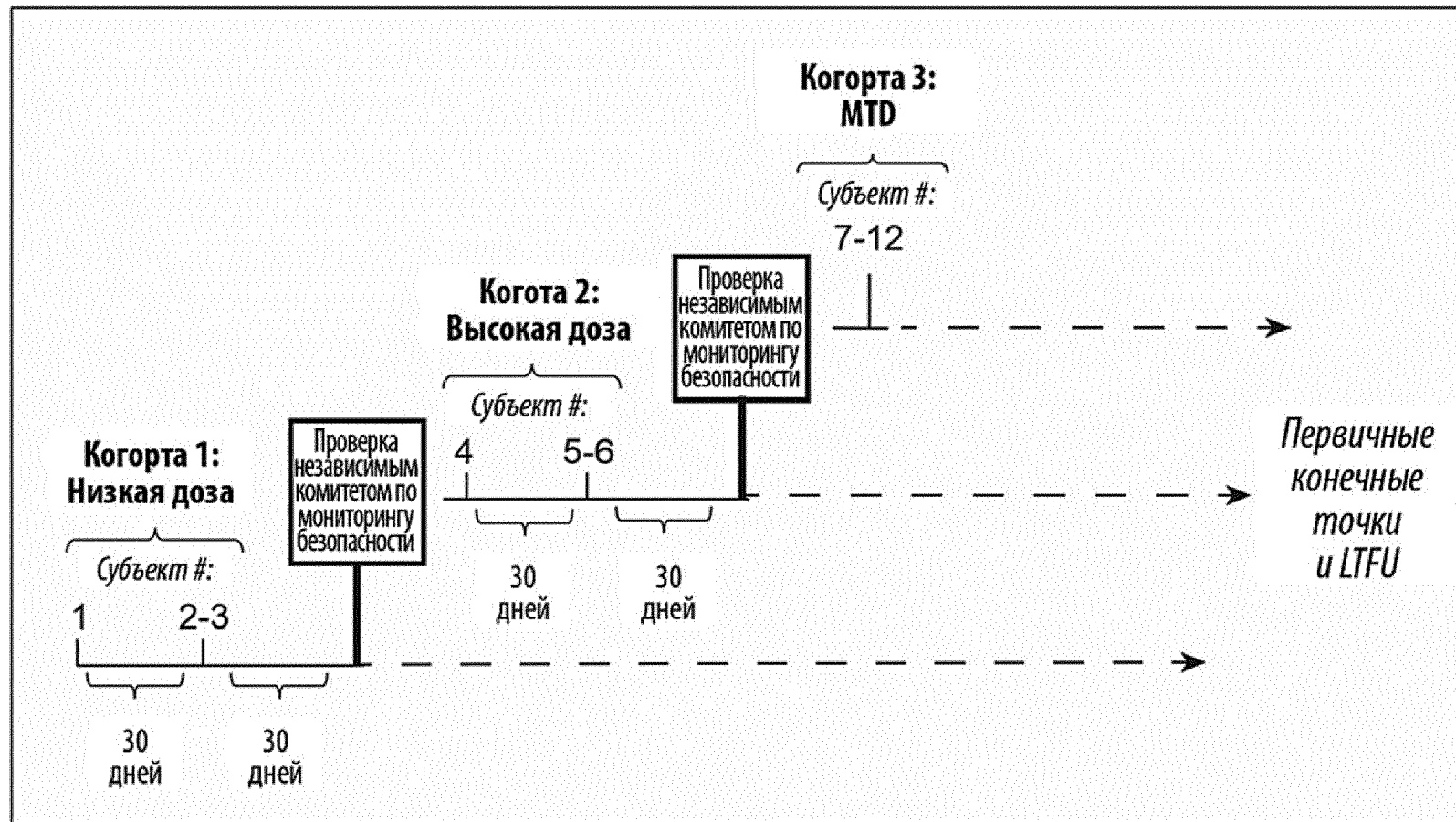
Фиг. 14В



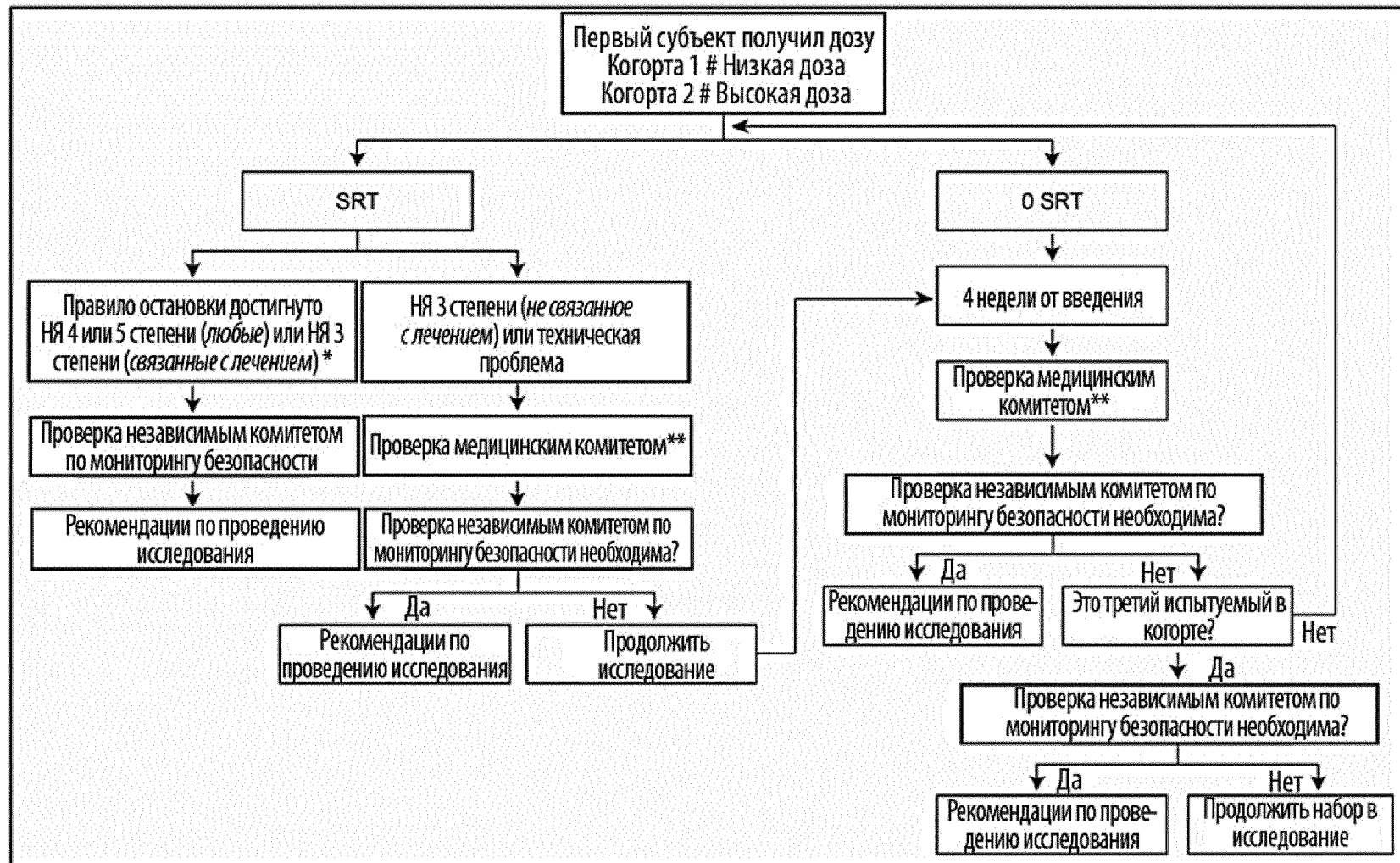
Фиг. 15



Фиг 16



Фиг. 17



Фиг. 18А

Процедура	Скрининг	Введение вектора				Последующее врачебное наблюдение													
Номер посещения исследования	1	2				3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
День исследования ^a	От -35 до -1, исключительно	День -1 перед введением дозы	День 0 ИСМ ^b	День 1 после введения дозы ^b	День 2 (при необходимости) ^b	7	14 ±1	30 ±2	60 ±3	90 ±3	120 ±3	180 ±3	240 ±3	300 ±3	360 ±3	450 ±5	540 ±5	630 ±5	720 ±5
Общая процедура и оценки																			
Информированное согласие	X																		
Медицинский анамнез	X																		
Генетическое и/или ферментное тестирование, если необходимо и которое не покрывается страховкой пациента	X																		
Сопутствующие лек. средства	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Оценка нежелательного явления	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Подтверждение права на участие	X	X																	
Общая анестезия																			
Осмотр анестезиолога	X	X	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	→
Общая анестезия/седация (для дозирования и При необходимости LP и/или MPT)			X					X				X			X				X
Введение вектора (ИСМ)																			
Введение вектора			X																
Оценка безопасности и биожидкостей																			
Взятие анализа крови	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X			X				X
Гематология, химия, коагуляция, LFT	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X			X				X
Общий анализ мочи	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X			X				X
НерВ/НерС/Серология на ВИЧ	X																		
Биомаркеры сыворотки (GALC и психозин)	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X			X				X
Векторная ДНК в сыворотке и моче	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X			X				X
Сывороточные AAVhu68 nAB	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X			X				X
ELISPOT (капсид и GALC)	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X			X				X
Лабораторные оценки СМЖ																			
Люмбальная пункция (для сбора СМЖ)	X		X					X				X			X				X
Цитология и химия СМЖ	X		X					X				X			X				X
Биомаркер заболевания в СМЖ (GALC)	X		X					X				X			X				X

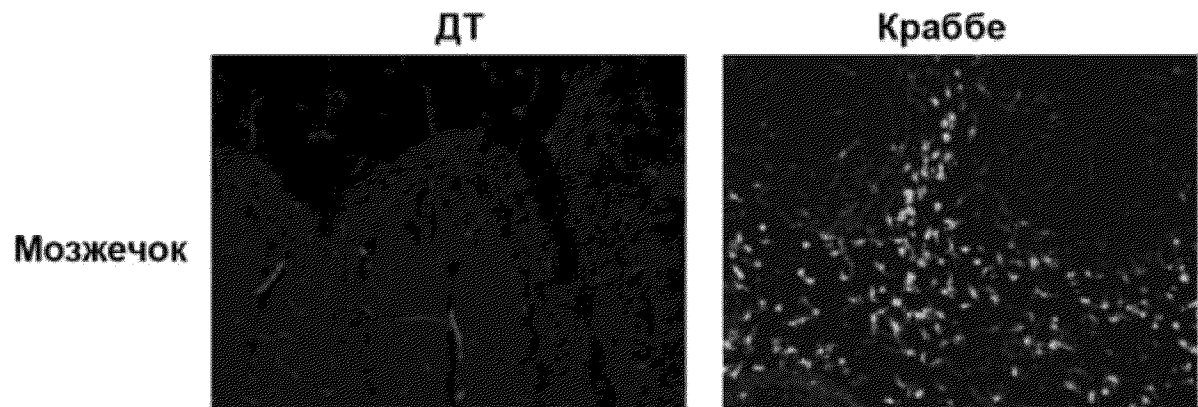
Фиг. 18В

Процедура	Скрининг	Введение вектора				Последующее врачебное наблюдение													
Номер посещения исследования	1	2				3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
День исследования ^a	От -35 до -1, исключительно	День -1 перед введением дозы	День 0 ИСМ ^b	День 1 после введения дозы ^b	День 2 (при необходимости) ^b	7	14 ±1	30 ±2	60 ±3	90 ±3	120 ±3	180 ±3	240 ±3	300 ±3	360 ±3	450 ±5	540 ±5	630 ±5	720 ±5
СМЖ AAVhu68 nAB	X		X					X				X			X				X
Векторная ДНК в СМЖ	X		X					X				X			X				X
Безопасность и клинические оценки ^c																			
Физический осмотр (включая длину и ширину)	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Неврологический осмотр	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Жизненно важные признаки ^d	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ЭКГ ^e	X			X	X			X		X		X			X				X
Вайнленд-III ^e	X							X		X		X			X				X
BSID-III ^e	X							X		X		X			X				X
Маллен ^e	X							X		X		X			X				X
Пибоди	X							X		X		X			X				X
ITQoL	X							X		X		X			X				X
Исследования сенсорной нервной проводимости	X							X		X		X			X				X
Оценка этапов развития	X							X		X		X			X				X
Тренинг по заполнению дневника приступов	X																		
Просмотр дневника приступов						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Визуальные оценки																			
MPT	X		X					X				X			X				X
DT-MPT			X					X				X			X				X
Измерение скорости нервной проводимости	X							X				X			X				X
VEP	X							X				X			X				X
BAERs	X							X				X			X				X
X = посещение клиники																			
^a Процедуры могут проводиться в течение нескольких дней во время периода скрининга и в течение 1-5 дней в течение периода наблюдения. Решение относительно продолжительности каждого посещения будет приниматься на усмотрение главного исследователя и должно основываться на усталости субъекта и родителя(ей)/опекуна(ов), доступности субъекта, родителя(ей)/опекуна(ов), или требуемого персонала места проведения исследований и/или общей нагрузки на субъекта и родителя(ей)/опекуна(ов). Не ожидается, что субъекты будут оставлены на ночь во время периодов скрининга и последующего наблюдения, если это не будет сочтено необходимым.																			
^b Основные показатели жизнедеятельности и неврологическая функция, то есть стандартные медсестринские неврологические осмотры, будут контролироваться часто, включая оценку каждые 15 минут (+/- 5 минут) в течение 1 часа, каждые 30 минут в течение 2 часов, каждые 1 час в течение 2 часов и затем каждые 2 часа в течение оставшихся 24 часов после процедуры. Требуется пребывание в больнице в течение 24 часов после введения дозы; однако при необходимости субъект может быть госпитализирован на 2 дня.																			
^c Выживаемость будет оцениваться на протяжении всего исследования с помощью отчета родителей/опекунов.																			
^d Во время визитов, когда выполняется ЭКГ и измеряются показатели жизненно важных функций, в первую очередь следует выполнять ЭКГ.																			
^e Оценка Вайнленд-III должна выполняться до оценки BSID-III и оценки Маллен, чтобы определить, какая из последних оценок будет проводиться. Все три оценки следует проводить в начале визита, поскольку они длительны и могут вызвать утомление. При необходимости родителям/опекунам/субъекту следует дать время для отдыха после этих оценок.																			

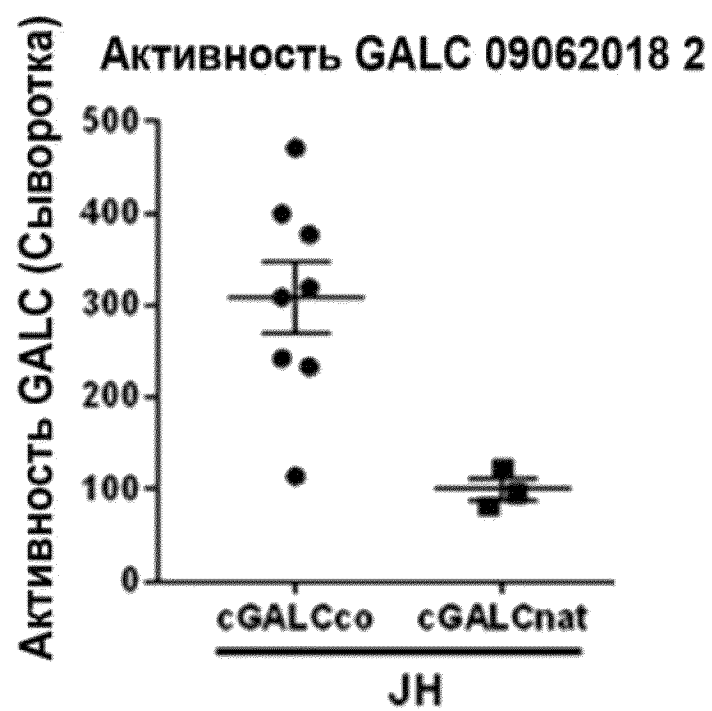
Фиг. 18С

Процедура	Скрининг	Введение вектора				Последующее врачебное наблюдение													
Номер посещения исследования	1	2				3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
День исследования ^a	От -35 до -1, исключительно	День -1 перед введением дозы	День 0 ICM ^b	День 1 после введения дозы ^b	День 2 (при необходимости) ^b	7	14 ±1	30 ±2	60 ±3	90 ±3	120 ±3	180 ±3	240 ±3	300 ±3	360 ±3	450 ±5	540 ±5	630 ±5	720 ±5
<i>Сокращения: AAVhu68, аденоассоциированный вирус серотипа hu68; BAER, слуховые вызванные ответы Брейнштерна; BSID-III, шкалы Бейли для развития младенцев и детей ясельного возраста, третье издание; СМЖ, спинномозговая жидкость; ДНК, дезоксирибонуклеиновая кислота; DT - тензор диффузии; ЭКГ, электрокардиограмма; ELISpot, метод иммуноферментных пятен; GALT, галактозилцерамидаза; ICM, intracisterna magna; ITQoL, Опросник качества жизни для младенцев и детей ясельного возраста; LFT, функциональные пробы печени; LP - люмбальная пункция; MPT, магнитно-резонансная томография; nAbs, нейтрализующие антитела; SiBR, Шкалы независимого поведения, модифицированные; VEP, Визуальные вызванные потенциалы; Вайнленд-III, Шкалы адаптивного поведения Вайнленд, третье издание</i>																			

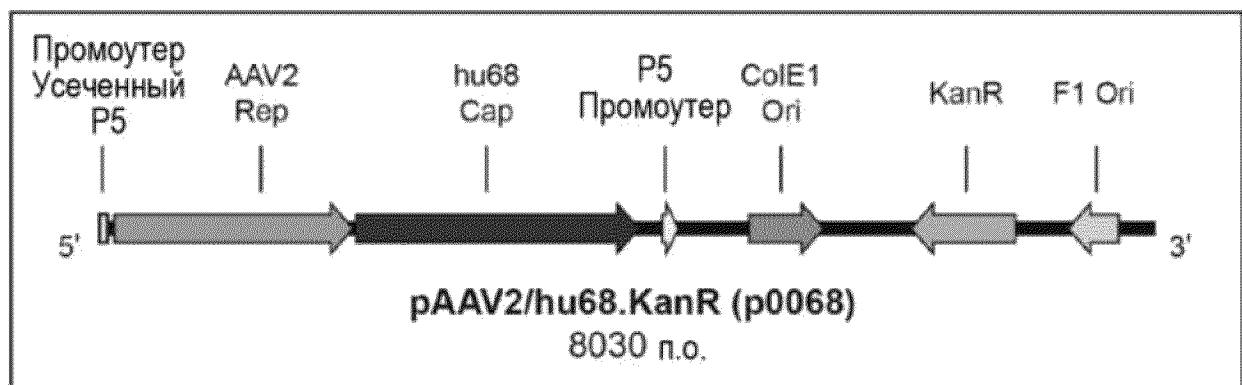
Фиг. 19



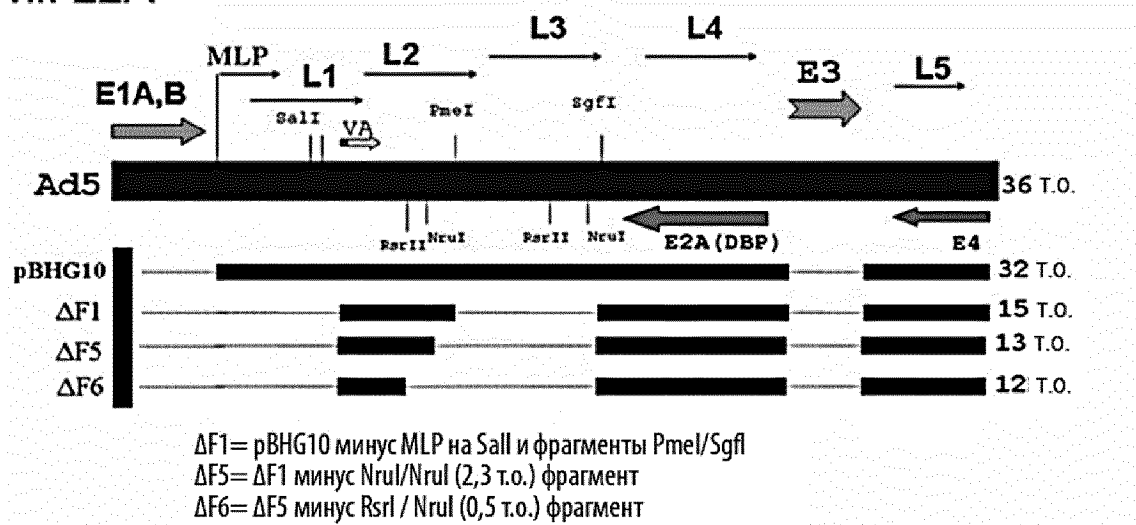
Фиг. 20



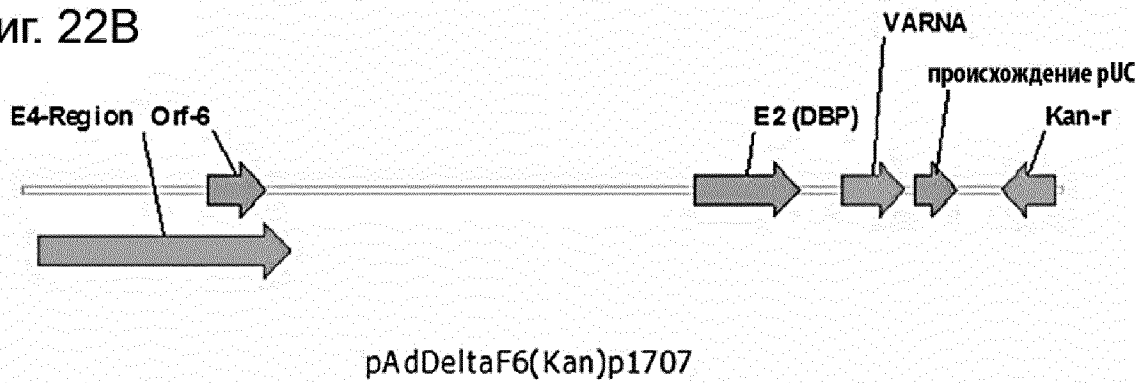
Фиг. 21



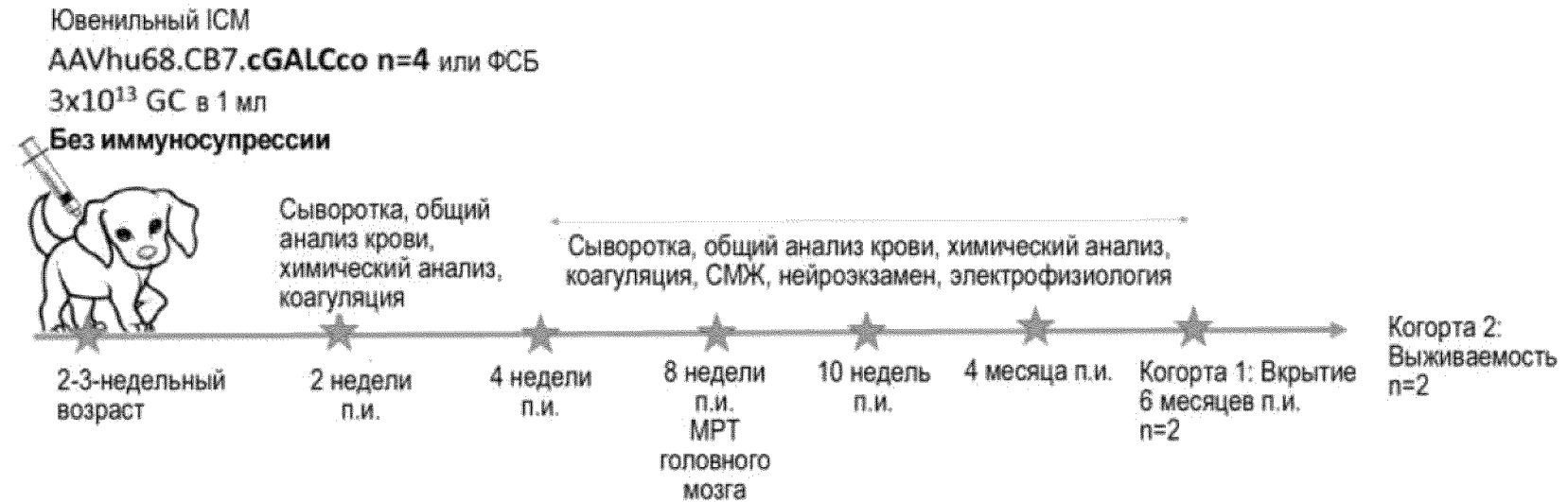
Фиг. 22А



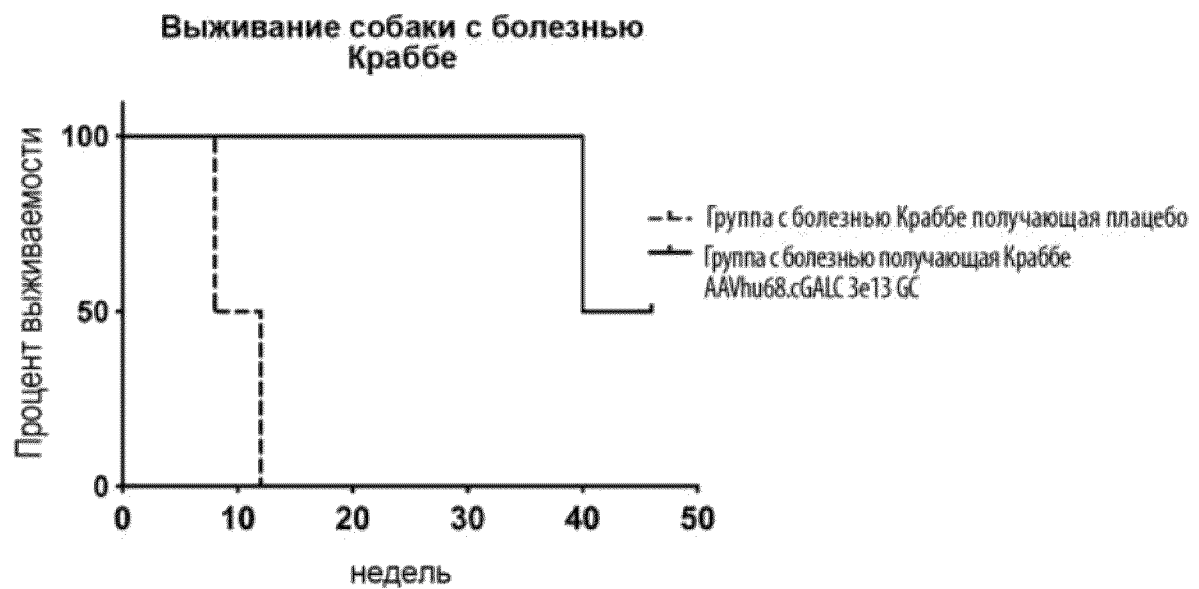
Фиг. 22В



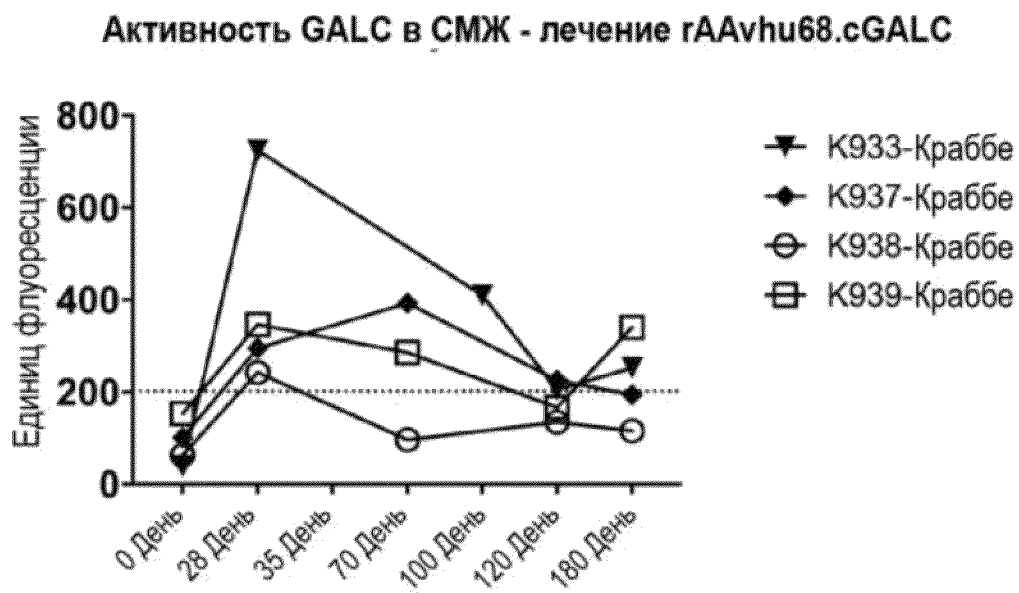
Фиг. 23



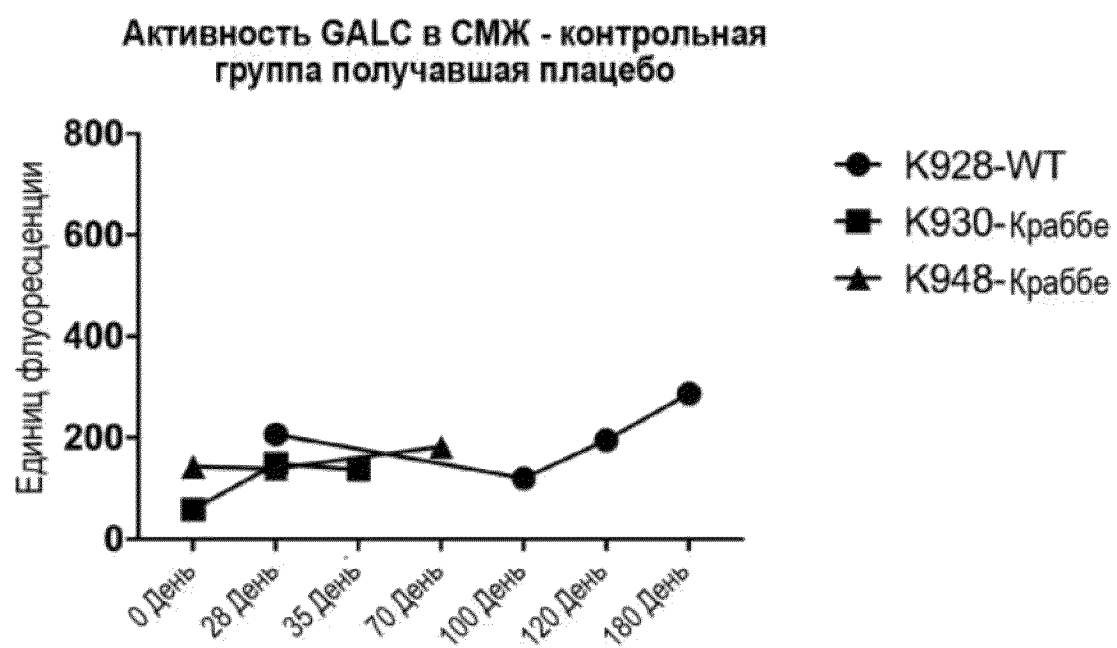
Фиг. 24А



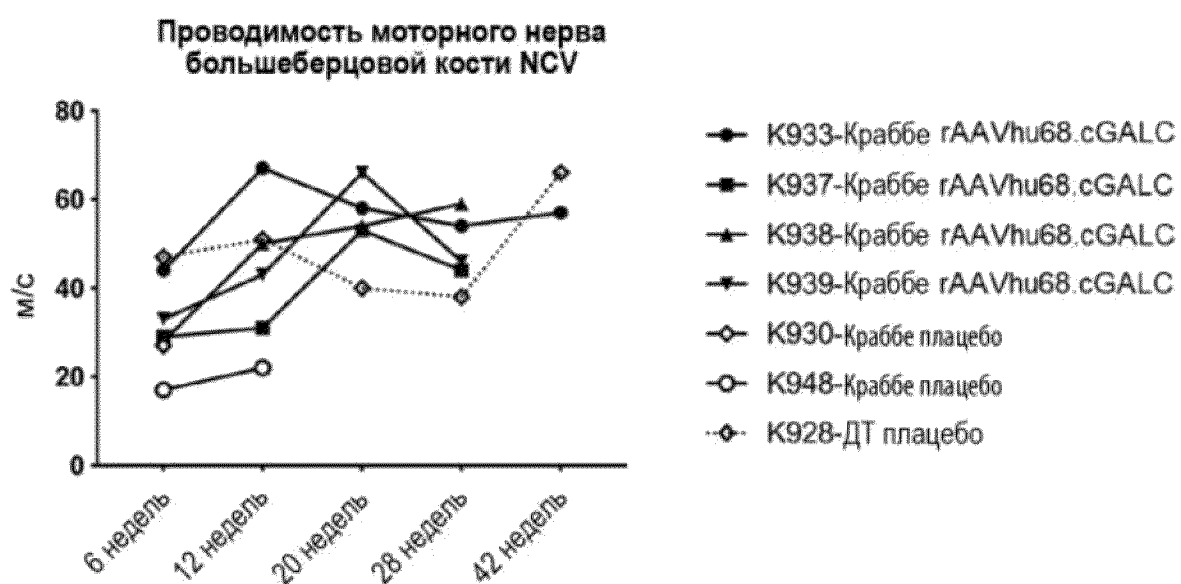
Фиг. 24В



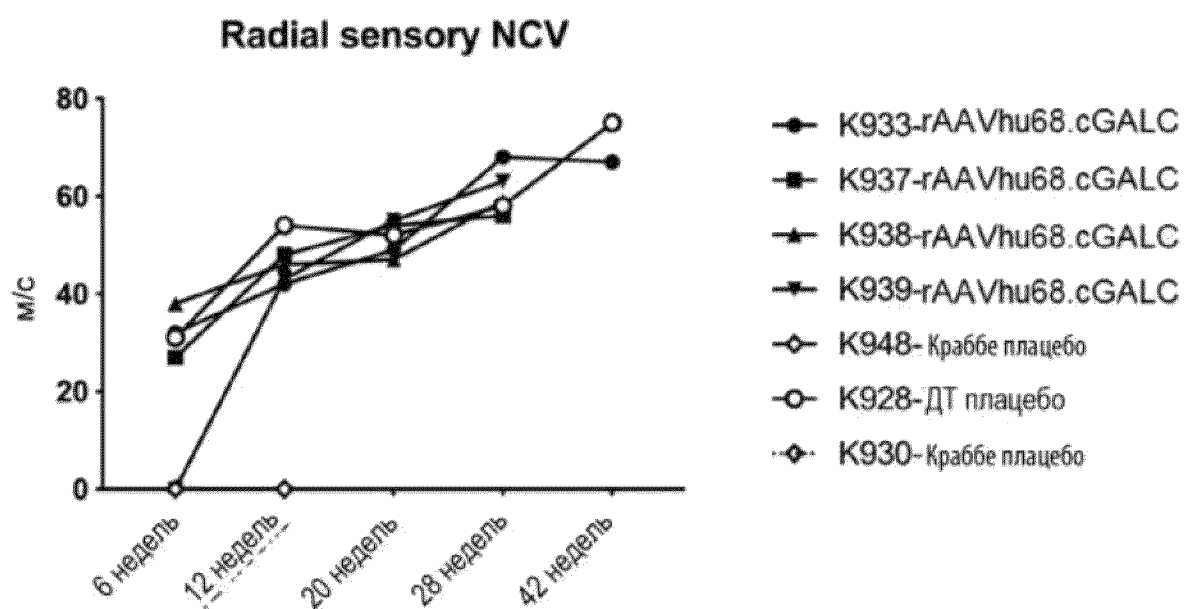
Фиг. 24С



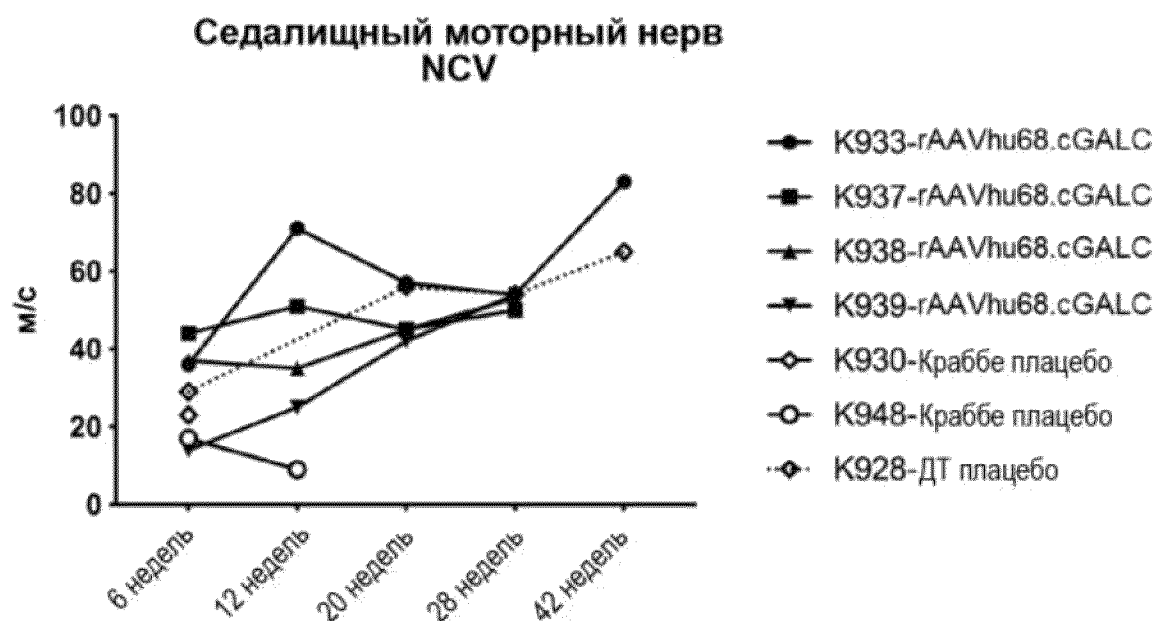
Фиг. 25А



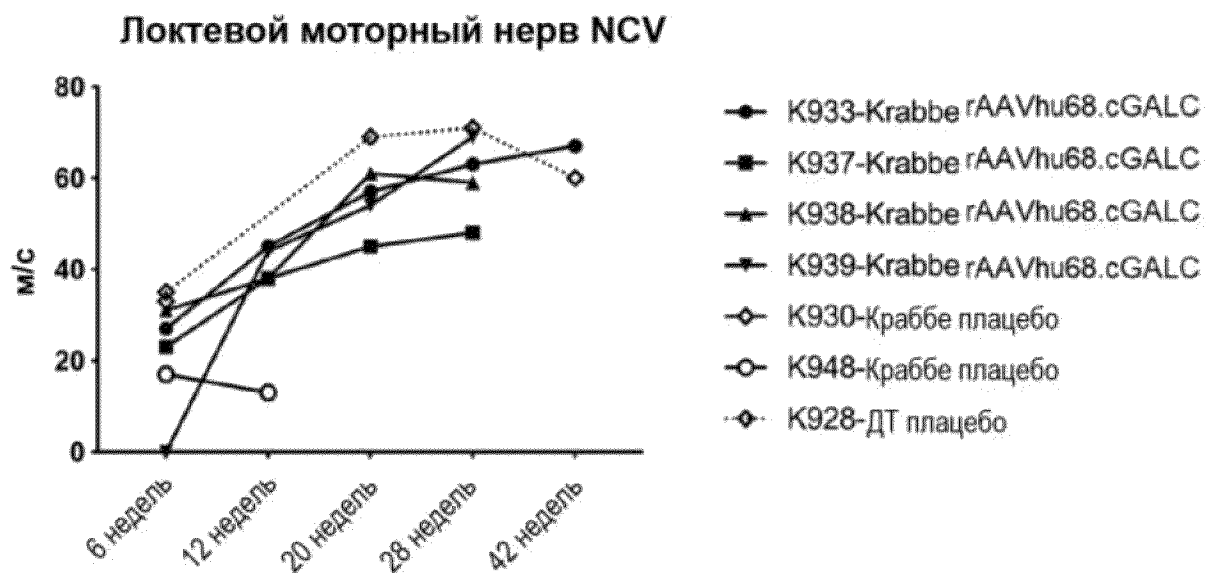
Фиг. 25В



Фиг. 25С



Фиг. 25D



Фиг. 25Е

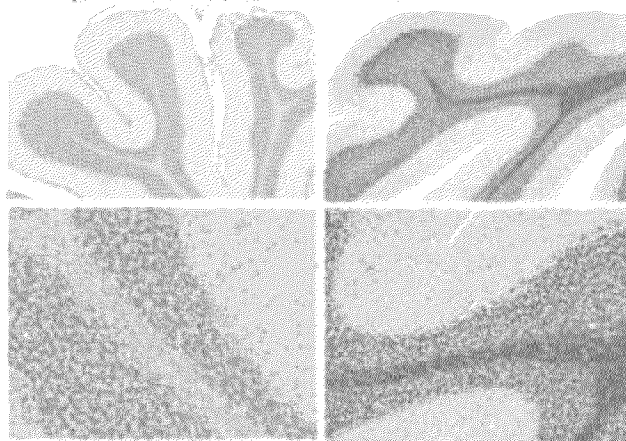
Неврологический осмотр больных болезнью Краббе

Собака #	DOB	Возраст (нед.)	«походка прыгающего кролика» (0,1)	Потеря тона хвоста (0,1)	Дефицит GP (0-2)	Атаксия (0-3)	Стойка планти-класса (0-2)	Тремор головы, раскачивание туловища (0-3)	Спинальные рефлексы (0-2)	Не передвигается или не может стоять (0,1)	Мышечная атрофия (0-3)	Отсутствующая угроза (0,1)	Нистагм (0,1)	Изменение психического статуса (0,1)	Аномальная поза
K928	12/10/18	13	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Походка с расширенной базой
K933	12/10/18	13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K937	1/7/19	12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K938	1/7/19	12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K939	1/8/19	12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K948	1/31/19	11	0	0	2	3	0	1	1	0	1	1	0	0	
K928	12/10/18	24	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
K933	12/10/18	24	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
K937	1/7/19	24	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
K938	1/7/19	24	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
K939	1/8/19	24	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	

Фиг. 26А

Люксол синий (миелинизация)

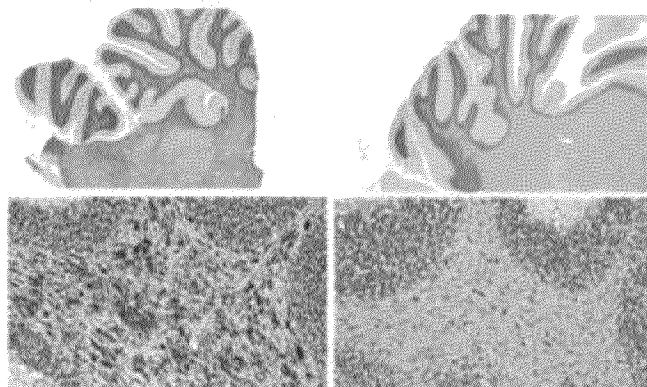
плацебо - 8 недель rAAVhu68.cGALC - 28 недель



Фиг. 26В

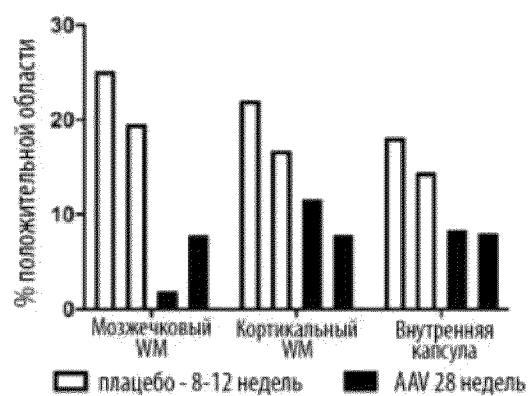
IBA1 (нейровоспаление)

плацебо - 8 недель rAAVhu68.cGALC - 28 недель

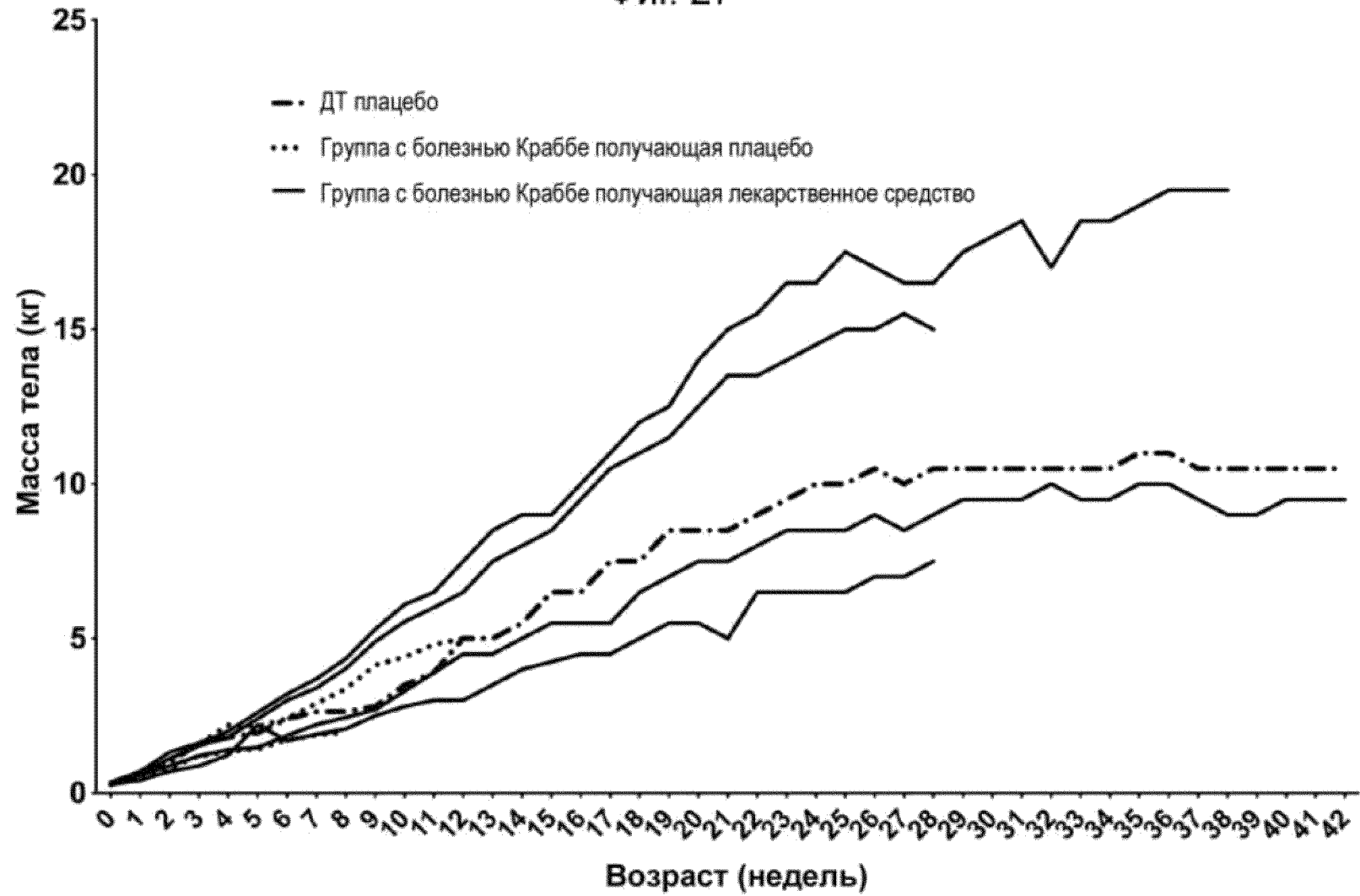


Фиг. 26С

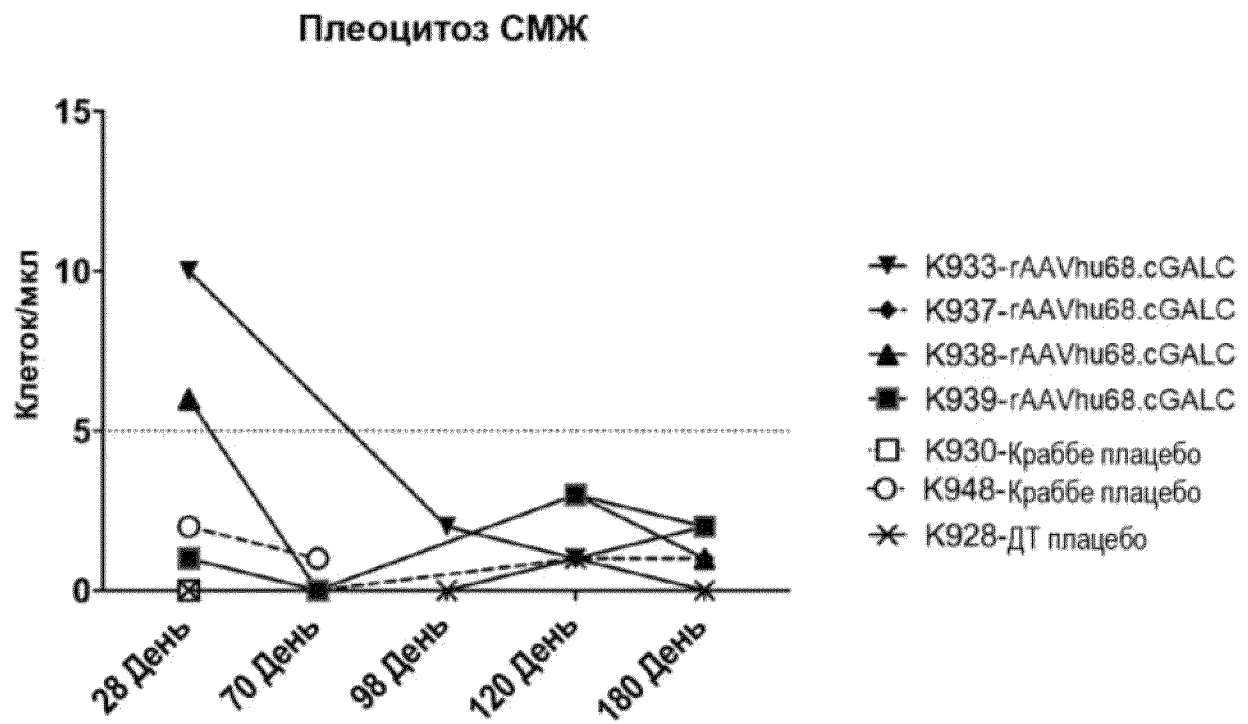
Количественное определение IBA1



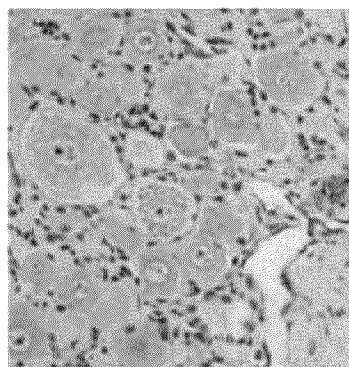
Фиг. 27



Фиг. 28А



Фиг. 28В

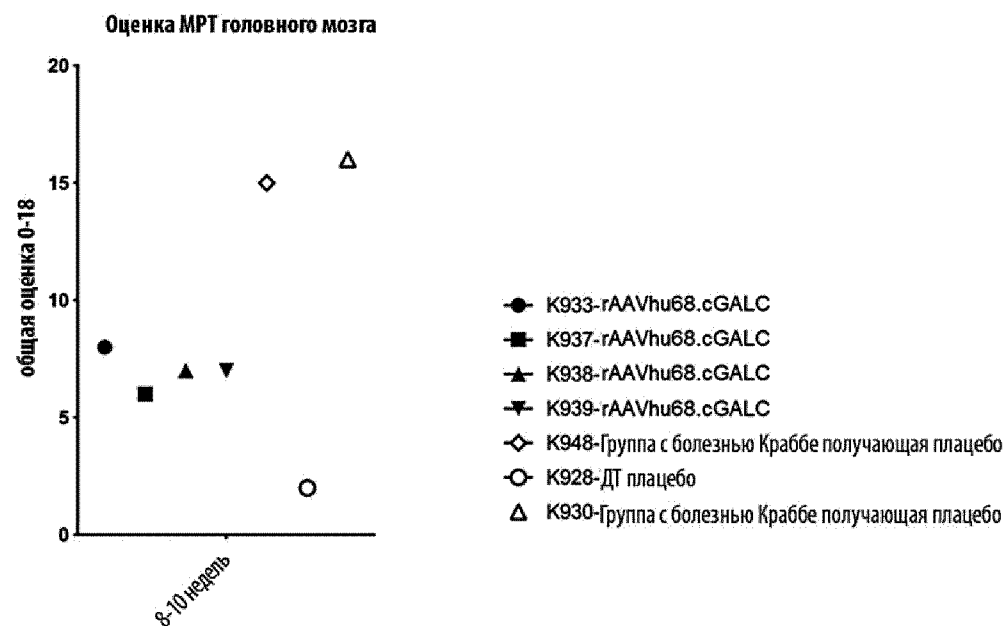


Фиг. 29А

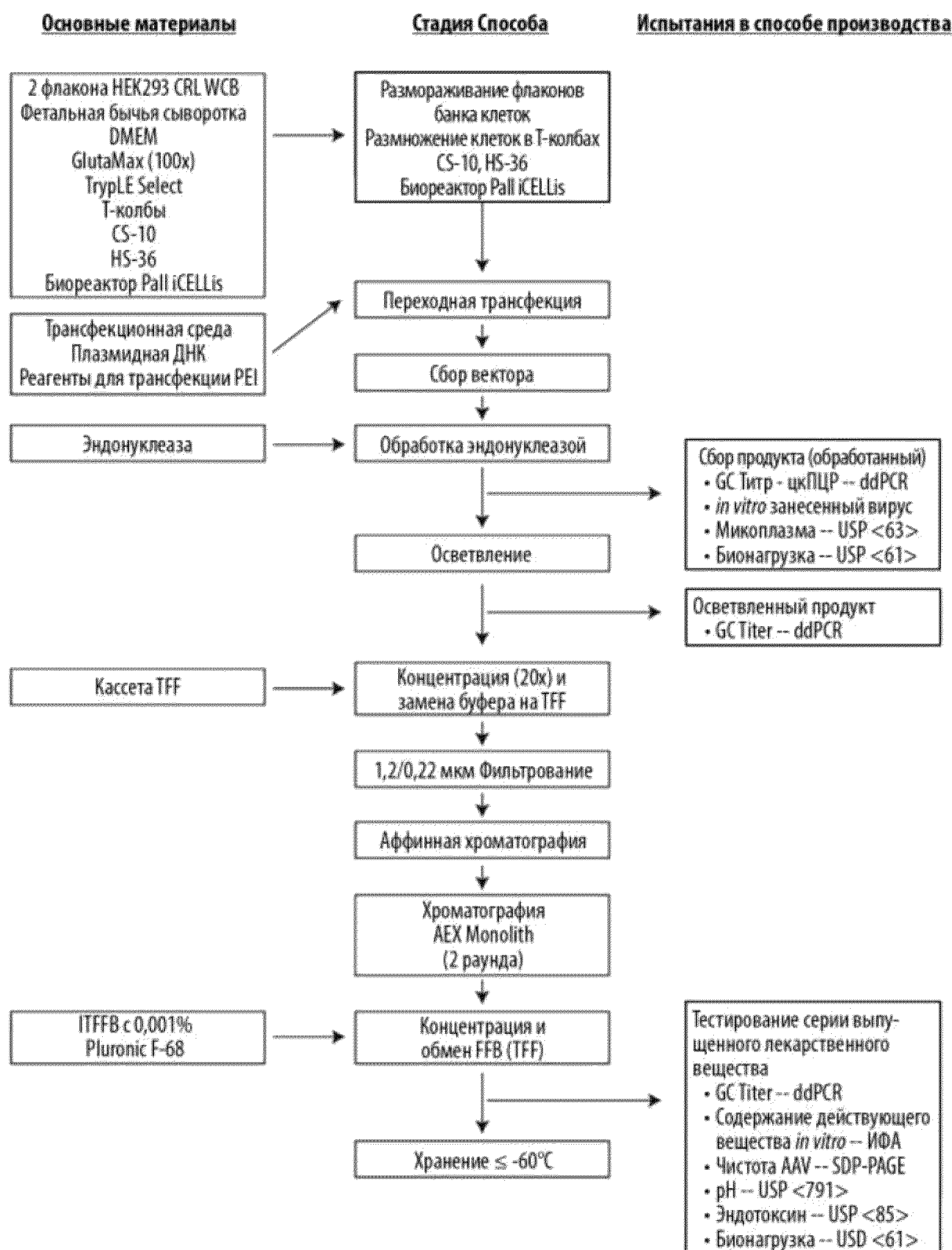
Собака #	DOB	Дата снимка	Возраст на момент снимка (нед.)	Ширина мозолистого тела сагитальная (мм)	Ширина мозолистого тела сагитальная (мм)	Ширина мозолистого тела сагитальная (мм)	Длина мозолистого тела сагитальная (мм)	Диаметр промежуточной массы сагитальный (мм)	Расширенные борозды на поперечном (0-3)	Боковая вентрикуломегалия (0-3)	Расширение обонятельного желудочка	Фронтально-затылочное отношение (# рассчитано)
K928	12/10/2018	2/25/2019	11,0	1,4	1,2	2,3	21	8,6	1	0	n	0,37
K930	12/10/2018	2/5/2019	8,1	2,5	1,6	2,5	20,5	6,7	2	2	y	0,42
K933	12/10/2018	2/25/2019	11,0	2,5	2	2	23	7,8	1	1	n	0,42
K937	1/7/2019	3/18/2019	10,0	2,5	1,2	2,4	23,5	9,6	1	1	n	0,43
K938	1/7/2019	3/18/2019	10,0	2,5	0,8	2,1	24,2	8,2	1	1	n	0,42
K939	1/8/2019	3/19/2019	10,0	2	1,2	2	19,3	8,2	0	0	n	0,43
K948	1/31/2019	4/15/2019	10,6	2	0,8	2	24	7,4	2	1	y	0,41

Расширенные борозды на поперечном (0-3)	Боковая вентрикуломегалия (0-3)	Расширение обонятельного желудочка	Фронтально-затылочное отношение (# рассчитано)	T2 гиперинтенсивность WM (0 = гипо, 1 = изо, 2 = гипер) полуовальный центр	внутренняя капсула	corona radiata	corpus	затылочный мозжечковый	улучшение белого вещества (да или нет)	Общая оценка
1	0	n	0,37	0	0	1	0	0	n	2
2	2	y	0,42	2	2	2	2	2	n	16
1	1	n	0,42	2	1	1	0	2	n	8
1	1	n	0,43	1	1	1	0	1	n	6
1	1	n	0,42	2	0	1	0	1	n	7
0	0	n	0,43	2	1	2	0	2	n	7
2	1	y	0,41	2	2	2	2	2	n	15

Фиг. 29В



Фиг. 30



Фиг. 31

